◆ 総 説 ◆

血管内皮増殖因子ファミリー —その多様な構造と機能—

山崎 泰男*, 森田 隆 司*

Vascular endothelial growth factor family
—Molecular and functional diversity—

Yasuo YAMAZAKI*, Takashi MORITA*

Key words: vascular endothelial growth factor (VEGF), structure,
receptor-binding affinity, biological activity,
molecular diversity.

山崎泰男

明治薬科大学 生体分子学教室 助手

2003 年 3 月 明治薬科大学 大学院 薬学研究科
薬学専攻 博士課程修了
同 年 3 月 博士(薬学)
同 年 4 月 NEC ソフト株式会社
(明治薬科大学 客員研究員)
2004 年 4 月より現職

はじめに

血管は栄養および酸素の供給を行う全身循環系で、生体の生理学的機能の維持に不可欠である。血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) は血管の形成 (neovascularization) を担う主要因子の一つで、胎生期の血管形成 (vasculogenesis) をはじめ種々の病態における血管新生 (angiogenesis) にも関与している^{*1}。今日までに、血管の形成過程は多数のタンパク質因子が協調して働くかなり複雑な過程であることが明らかにされてきているが、その過程において VEGF (とその受容体系) が律速的に機能していることがしばしばである¹⁾⁻³⁾。VEGF の生理的な重要性は、リガンドまたは受容体のいずれの遺伝子を欠損させてもそのフェノタイプは血管の形成不全による胎生致死であることから伺うことができる⁴⁾。1989 年に最初の VEGF (VEGF-A165 と VEGF-A189, 詳細は後述) の一次構造が報告されて以来^{5) 6)}、これま

でに機能の異なるいくつかのホモログ分子 (サブタイプと呼ぶ) が同定されている。哺乳動物には VEGF-A, -B, -C, -D および胎盤成長因子 (placenta growth factor: PlGF) の 5 つのサブタイプが見出されており、血管と同じ全身循環系であるリンパ管の形成 (lymphangiogenesis) を担う分子も VEGF ファミリーに分類されるタンパク質であることが明らかにされてきている^{7) 8)}。さらに最近では、ウイルスゲノムおよびヘビ毒に外来性の VEGF (それぞれ VEGF-E および VEGF-F) も見つかっており、VEGF は 7 種のサブタイプで構成される多様性に富むタンパク質ファミリーであることが明らかになってきた⁹⁾⁻¹²⁾。また、これらのリガンド分子に対し、VEGF 受容体にも 5 種の分子が同定されている。そのうち 3 種は受容体型チロシンキナーゼに分類される分子で、それぞれ Flt-1 (VEGF 受容体 1 と呼ばれる, VEGFR-1 と略), KDR (VEGFR-2), Flt-4 (VEGFR-3) と呼ばれる。また、ニューロピリン 1 (NP-1) およびニュ

*1 血管の存在しない部位に新たに血管が形成されることを血管形成 (vasculogenesis)、既存血管から枝分かれによって新たに血管が形成されることを血管新生 (angiogenesis) と呼ぶ。

*明治薬科大学 生体分子学教室 [〒 204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1]

Department of Biochemistry, Meiji Pharmaceutical University [2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan]

Tel & Fax: 042-495-8479 e-mail: tmorita@my-pharm.ac.jp

図1 VEGFファミリーとその受容体選択性

内在性および外来性のVEGFファミリーと5種の受容体に対する結合選択性についてまとめた。結合するリガンドを各受容体の上に示した（例えば、VEGF-AはVEGFR-1、VEGFR-2、NP-1、NP-2に結合する）。受容体上のリガンド結合部位は灰色で示した。アスタリスク（*）はアイソフォームによって結合性の有無が異なることを示している。

ーロピリン-2（NP-2）と呼ばれる2種の非チロシンキナーゼ型受容体もVEGF受容体として機能する。それぞれのVEGFサブタイプは、異なる選択性と親和性でこれらの受容体と相互作用することで（表1、図1）、多彩な生理作用（生物活性）を発現すると考えられている。

これまでに多くの総説がVEGFファミリーについて紹介してきた^{7-9) 11) 12)}。しかし、そのほとんどはその生理機能に焦点を当てており（もちろんそれは大変興味深いのだが）、タンパク質分子としてのVEGFファミリーについて書かれた総説はほとんどないのが現状であると思う。そこで本稿では、構造的および機能的な多様性に焦点を当てVEGFファミリーについて紹介した。さらに、現在までに明らかにされ

てきた各サブタイプの特性と生物活性を理解し易くするために、VEGFファミリーの全リガンド分子の受容体結合性をできるだけ親和性で表現しつつ整理し（表1）、各サブタイプの生物活性についてまとめた表を作成した（表2）。VEGFについて読者諸兄の理解の助けになれば幸いである。

VEGF-A

VEGF-Aの構造とVEGFR結合性。 VEGF-Aは最初に同定されたサブタイプで、血管透過性亢進因子（vascular permeability factor: VPF）とも呼ばれる。その名の通りVEGF-Aは、内皮細胞特異的なマイトジェンとして作用するだけ

表 1 VEGF ファミリーの受容体結合親和性

リガント \ 受容体	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	NP-1	NP-2	ヘパリン
VEGF-A ₁₆₅	1.0×10^{-11}	$0.75 \sim 7.7 \times 10^{-10}$	-	1.8×10^{-10}	1.3×10^{-10}	+
VEGF-A ₁₂₁				-	-	-
VEGF-A ₁₄₅				-	7.0×10^{-10}	+
VEGF-B ₁₆₇	$10^{-10} \sim 10^{-11} *$	-	-	+	ND	+
VEGF-B ₁₈₆				+ ⁽³⁾		-
PlGF-1 (PlGF ₁₃₁)	1.9×10^{-10}	-	-	-	-	-
PlGF-2 (PlGF ₁₅₂)	2.5×10^{-10}			+	+	+
VEGF-C ⁽¹⁾	-	$\sim 10^{-8} *$	$\sim 10^{-9} *$	-	+	-
VEGF-C ΔNAC		4.1×10^{-10}	1.4×10^{-10}			
VEGF-D ⁽²⁾	-	1.6×10^{-5}	8.2×10^{-7}	-	+	-
VEGF-D ΔNAC		5.6×10^{-8}	2.0×10^{-8}			
ウイルス VEGF (VEGF-E)	-	$3.3 \times 10^{-10(4)}$	-	± ⁽⁵⁾	ND	± ⁽⁶⁾
vammin (VEGF-F)	-	4.1×10^{-10}	-	-	ND	+
TfsvVEGF (VEGF-F)	$\sim 10^{-11} *$	$10^{-8} \sim 10^{-9} *$	-	-	ND	+

+ : 結合するが, その親和性は不明. - : 結合しない. ND : 未決定.

* : 論文中の競合結合実験の結果から筆者らが推測した.

(1) VEGF-C R226, 227S (組換え前駆体 VEGF-C)⁽⁴⁸⁾.

(2) 全長をコードする cDNA を使って発現した組換え VEGF-D⁽⁴⁹⁾.

(3) C 末端領域のプロセッシングされた VEGF-B₁₈₆ (VEGF-B₁₂₇) が NP-1 結合性を示す⁽³⁷⁾.

(4) NZ7 株にコードされるウイルス VEGF で測定した K_d 値⁽⁵⁸⁾.

(5) NZ10, NZ2, D1701 株由来のウイルス VEGF は NP-1 結合性を示すが, NZ7 および VR634 由来の VEGF は結合しない⁽⁶¹⁾.

(6) NZ2 株由来の VEGF はヘパリンに結合するが⁽⁵⁷⁾, NZ7 株由来の VEGF は結合しない⁽⁵⁸⁾.

でなく, 強力な血管透過性亢進因子としても働く⁽⁵⁾⁽⁶⁾. VEGF-A の血管透過性亢進作用は, 新たに血管を必要とする部位に血漿タンパク質を漏出させることで新生血管の形成を補助していると考えられているが, その生理的意味は未だ不明な点が多い. VEGF-A はジスルフィド結合で架橋されたホモ二量体構造を有する糖タンパク質で, 9 種のスプライシングバリエーションが報告されている (構成されるアミノ酸残基数に従って VEGF-A₁₂₁, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189, 206 と呼ばれる). これらのうち生理的には VEGF-A₁₆₅ が最も多量に発現している (図 2). VEGF-A 遺伝子は 6p21.3 に位置し, 8 個のエキソンで構成されている. エキソン 1-5 は VEGF 相同ドメイン (VEGF homologous domain: VHD) と呼ばれる各 VEGF サブタイプ

間で相同な領域をコードしており, この領域は全ての VEGF-A アイソフォームに共通している (図 3). VHD にはいくつかの増殖因子ファミリーに見られる cystine knot モチーフを含んでいることから, VEGF ファミリーも血小板由来増殖因子 (PDGF) などと同様に cystine knot 増殖因子と呼ばれる.

VEGF-A は VHD を介して VEGFR-1 および VEGFR-2 に結合するが, その親和性は VEGFR-2 に比べ VEGFR-1 に対して約 10 倍高い⁽¹³⁾⁻⁽¹⁵⁾ (表 1, 図 1). VEGFR-1 と VEGFR-2 は互いに相同な受容体で (アミノ酸レベルで約 50% の同一性), その細胞外ドメインは連続した 7 つのイムノグロブリン (Ig) 様ドメインで構成されている (図 1). VEGF-A はいずれの受容体の場合も, 第 2 および第 3-Ig 様ドメイ

表2 VEGF ファミリーの生物活性

	内皮細胞増殖	migration	血管透過性亢進	血管新生	リンパ管新生
VEGF-A	+	+	+	+	+, - ⁽¹⁾
VEGF-B	-	ND	-	+, - ⁽¹⁾	-
PlGF	-	+	-	+	ND
VEGF-C	+	+	+	+	+
VEGF-D	+	+	-	+	+
ウイルス VEGF (VEGF-E)	+	+	+	+	ND
vammin (VEGF-F)	+	ND	+	+	ND
TfsvVEGF (VEGF-F)	+	+	+	+	ND

ND：未決定.

(1) 作用の有無の異なる報告がある (本文参照).

(2) 血管新生作用を示すが, その作用は弱い.

(3) 全長型の VEGF-D の血管新生作用は弱い, 成熟型の VEGF-D (VEGF-DANAC) は強力な血管新生作用を示す³⁴⁾.

ンに結合する. 1 分子の VEGF-A (二量体) は, 2 分子の VEGFR と結合し受容体の二量体化を引き起こすことで, VEGFR を活性化する¹⁶⁾. 分子生物学的手法を用いた研究から, それぞれの受容体との結合様式は類似しているが, 結合に寄与するアミノ酸残基は厳密に区別されていることが明らかにされている¹⁷⁾⁻¹⁹⁾. VEGF-A の立体構造は, リガンド単独 (VHD のみ) およびリガンドと VEGFR-1 の第 2-Ig 様ドメインとの複合体の X 線結晶構造が報告されている²⁰⁾⁻²¹⁾ (図 4). リガンドの受容体への結合による構造変化はほとんどなく, その接触面は疎水性に富んでいる (接触面のおよそ 70% が疎水性)²¹⁾. VEGF-A の接触面には 3 つのループ (それぞれループ 1, ループ 2, ループ 3 と呼ばれる) が位置しており, 受容体と直接相互作用している.

VEGF-A のアイソフォームとヘパリンおよび NP 結合性. VEGF-A アイソフォームのいくつかは VEGFR-1 および VEGFR-2 だけでなく, ヘパリン (生理的にはヘパラン硫酸プロテオグリカン) およびニューロピリンと呼ばれる非チロシンキナーゼ型受容体 (NP-1 と NP-2) にも結合性を示す. 主要アイソフォームである VEGF-A165 (エキソン 6 コード領域を含まな

いアイソフォーム) は, その C 末端領域を介してヘパリンおよび NP-1 に結合する (図 2. VEGF-A165 の点線部分)²²⁾⁻²³⁾. 培養細胞に NP-1 と VEGFR-2 を共発現すると, VEGF-A165 の細胞結合親和性が VEGFR-2 単独の場合と比べて約 10 倍高くなることから, NP-1 は VEGFR-2 の補助受容体として機能していると考えられている²³⁾. 一方, NP-1 が単独で migration シグナルを媒介するとの報告もあり, NP-1 は単なる補助受容体ではないようだ²⁴⁾. ヘパリンも VEGF-A165 の VEGFR-2 の自己リン酸化活性を増強することから, NP-1 と同様に VEGFR-2 に対し補助因子的に働くと考えられる²⁵⁾. 実際にプラスミン消化によって C 末端のヘパリン / NP-1 結合部位を欠失した VEGF-A は, その細胞増殖活性が約 1/100 に低下する²²⁾.

VEGF-A アイソフォームは, VEGFR 結合性に差異はないが, そのヘパリンおよび NP 結合性によって区別することができる (表 1). VEGF-A121 (エキソン 6 および 7 コード領域を含まないアイソフォーム) はヘパリンにも NP-1 にも結合できないが²⁶⁾, VEGF-A189 および VEGF-A206 (エキソン 6 および 7 コード領域を含む) は非常に強いヘパリン結合性を示

図2 組織型 VEGF (VEGF-A) とヘビ毒由来の VEGF (VEGF-F) の一次構造

ヘビ毒 VEGF (vammin と *TfsvVEGF*), ヘビ組織型 VEGF (*TfVEGF166*), ヒト VEGF-A165 の一次構造を比較した。Vammin と同一のアミノ酸残基を灰色, システイン残基を黒色で示した。シーケンス上の番号は vammin の残基番号に, シーケンス下の番号はヒト VEGF-A165 の残基番号に対応している。Vammin のループ3領域に挿入されているスレオニン残基 (Thr86a) は黒でハイライトした。X線結晶構造²¹⁾で VEGFR-1 の第2-Ig様ドメインと相互作用している残基を□で, アラニンスキャニングの結果¹⁷⁻¹⁹⁾から VEGFR-2 との相互作用に重要と考えられている残基を■でマークした。Vammin と VEGF-A165 の点線で囲んだ領域は, それぞれヘパリンおよびヘパリン/NP-1 結合領域を示す^{26) 27)}。

す^{26) 27)}。また, エキソン 6b および 7 コード領域を持たないアイソフォームである VEGF-A145 は, ヘパリンおよび NP-2 に結合性を示すが, NP-1 には結合しない²⁸⁾ (表1)。NP-2 は NP-1 と類似した構造を持つ受容体であるが, その役割はほとんど明らかにされていない。9つのアイソフォームのうち VEGF-A165b は他のアイソフォームとは全く異なる性質を示す。VEGF-A165b は VEGF-A165 と同等の親和性で VEGFR-2 に結合するにもかかわらず, VEGF-A165 によって誘発される血管新生を阻害する^{29) 30)}。

VEGF-A の生物活性。 VEGF-A は血管内皮細胞の増殖活性および migration 活性, さらに強力な血管透過性亢進作用を示す (表2)。内

皮細胞増殖活性をはじめ, VEGF-A の主要な生物活性は VEGFR-2 を介して発現することが明らかにされている。一方, VEGF-A に高い親和性を示す VEGFR-1 は, VEGF-A による血管の形成を調節する decoy 受容体として機能していると考えられている^{31) 32)}。また, VEGFR-1 は肝細胞増殖因子などの分泌を介した成体肝臓の保護作用という血管の形成とは無関係な作用も媒介していることが明らかにされている³³⁾。VEGF-A は *in vivo* で強力な血管新生作用を示すことが知られているが, リンパ管形成作用に関しては作用の有無の異なる2つの報告がある^{34) 35)} (表2)。

図3 VEGFファミリータンパク質の構造

各VEGFサブタイプ(最も一般的なアイソフォーム)の模式構造を示した。各分子の大きさを比較できるように、構成アミノ酸残基数に従って大きさを表示した。各模式図の横に示した数字(括弧内)は構成アミノ酸残基数を示す。VHDは各サブタイプ間で相同なVEGF相同領域(VEGF homologous domain: VHD)を、●は全てのサブタイプに保存されているシステイン残基を示す。また、同定されているヘパリンおよびNP-1結合部位を模式図中に示した。○はVEGF-CおよびVEGF-DのVHDに特異的なシステイン残基を示す(本文参照)。VEGF-CおよびVEGF-Dは2段階のプロセッシングを受け(▼, ▽の順)N末端とC末端のプロペプチド領域(それぞれN-proおよびC-proと表示)が除去されることで、成熟タンパク質へと変換される。

VEGF-B

VEGF-BはVEGF-related factor (VRF)とも呼ばれる。VEGF-BはVEGFR-1に結合性を示すが、VEGFR-2およびVEGFR-3には結合しない(図1)。VEGFR-1に対する親和性はVEGF-Aに比べ約1/10である(表1)。VEGF-BにはVEGF-B167およびVEGF-B186と呼ばれる2つのアイソフォームが存在する³⁶⁾。VEGF-B167のC末端領域はVEGF-A165の同領域に相同で、ヘパリンおよびNP-1に結合性を示す³⁷⁾(表1, 図3)。一方、VEGF-B186はヘパリンおよびNP-1結合性を示さない³⁷⁾(表1)。興味深いことに、VEGF-B186はプロテアーゼによるプロセッシングを受け(VEGF-B127となる)、C末端領域が短くなるとNP-1結合性を示すようになる³⁷⁾(表1)。プロセッシング酵素は未同定であるが、配列(Glu125-Pro126-Arg127 ↓ Ser128-Val129)から血液凝固因子トロンボジンの可能性が考えられる。

*In vitro*でVEGF-Bには増殖因子活性はなく、血管透過性亢進作用も示さない(表2)。一

方、*in vivo*ではVEGF-Bが血管新生を誘発するとの報告もあるが³⁸⁾、相反するレポートもありその生理的役割は不明である³⁴⁾(表2)。VEGF-BはVEGF-Aと共発現するとVEGF-A/VEGF-Bで構成されるヘテロ二量体を形成することが知られている³⁹⁾。VEGF-Bの血管新生作用はVEGF-A/VEGF-B二量体による可能性も考えられる(PlGFを参照)。

PlGF

PlGFはVEGF-Aと同様にホモ二量体糖タンパク質である。主要な発現部位は胎盤であるが、その発現は心臓や肺をはじめ多くの組織に見られる。PlGFはVEGF-Bと同様にVEGFR-1特異的なリガンドであり、その親和性もほぼ同程度である(図1, 表1)。PlGFは、リガンド単独(VHDのみ)およびリガンドとVEGFR-1の第2-Ig様ドメインとの複合体のX線結晶構造が明らかにされている^{40) 41)}(図4)。その結合様式はVEGF-Aと極めてよく似ているが、興味深いことにPlGFとVEGF-AによるVEGFR-1

図4 VEGFの立体構造

A. ヘビ毒 VEGF (vammin) の X 線結晶構造 (リボンモデル). VEGF-A および PlGF も本質的に同様の構造をしている. B. ヘビ毒 VEGF, PlGF, VEGF-A の表面電荷モデル (図 A 左の裏返し). vammin, ヒト PlGF, ヒト VEGF-A (表面電荷モデル) と VEGFR-1 の第 2-Ig 様ドメイン (緑色リボンモデル) の複合体 (vammin は結合性を示さないが, VEGF-A・VEGFR-1 複合体を基にドッキングモデルを作成した). 構造中に示した残基番号は, ヒト VEGF-A の残基番号 (図 2) に対応している. VEGFR-1 結合性の PlGF および VEGF-A が負電荷 (赤) に富むのに対し, VEGFR-1 に結合しない vammin はむしろ正に帯電 (青) している (本文参照). 緑の点線は, 第 3-Ig 様ドメインへのリンカー (予想) を示した (文献 66 を参照).

のチロシンリン酸化パターンは異なっている⁴²⁾。この事実は、両者の VEGFR-1 の活性化様式が本質的に異なることを示していると考えられるが、その詳細は全く不明である。PlGF には C 末端領域の構造が異なる 4 種のスプライシングアイソフォームが報告されている: PlGF-1 (PlGF131), PlGF-2 (PlGF152), PlGF-3 (PlGF203), PlGF-4 (PlGF224)。PlGF-2 は NP-1, NP-2 およびヘパリンに結合性を示すが、PlGF-1 はいずれにも結合性を示さない (表 1)。PlGF は単独で血管内皮細胞の migration 活性を示すが、増殖因子活性および血管透過性亢進活性はない (表 2)。一方 PlGF を VEGF-A と同時に作用させると、PlGF は VEGF-A の増殖因子活性および血管透過性亢進活性を増強する⁴³⁾。PlGF は、VEGF-B の場合と同様に、VEGF-A とヘテロ二量体を形成する。このヘテロ二量体の生物活性については、血管形成に促進的⁴⁴⁾ もしくは阻害的⁴⁵⁾ に働くとの 2 つの相反するレポートがある。PlGF 欠損マウスは、腫瘍形成や虚血を誘発させても、それに伴う血管新生が抑制されているとの報告がある⁴⁶⁾。これらの結果から、PlGF が病的な血管新生に関与していると考えられているが、その生理的役割には不明な点が多い。

VEGF-C および VEGF-D

VEGF-C および VEGF-D の構造と VEGFR 結合性。 VEGF-C および VEGF-D は、それぞれ VEGF-related protein および c-Fos-induced growth factor (FIGF) と呼ばれ、いずれもリンパ管形成因子として機能する。前述のサブタイプとは異なり、ヒト VEGF-C および VEGF-D にはアイソフォームの報告はない。マウス VEGF-D には 2 種のアイソフォームが報告されているが、両者に機能的な差異は見つかっていない⁴⁷⁾。VEGF-C および VEGF-D は VEGFR-2 および VEGFR-3 に選択的に結合する (図 1)。VEGFR-3 は VEGFR-1 および VEGFR-2 と同様に受容体型

チロシンキナーゼの 1 種で、その細胞外ドメインは連続した Ig 様ドメインで構成される (第 5-Ig 様ドメインは生合成後、プロセッシングされる) (図 1)。VEGF-C および VEGF-D は、VHD の両末端 (N 末端および C 末端) に長いプロペプチドをもった前駆体タンパク質として生合成される^{48) 49)} (図 3)。これらの前駆体タンパク質は、プラスミンやフリンなどのプロテアーゼによって 2 段階のプロセッシングを受け、VHD のみで構成される成熟型へと変換される^{50) 51)} (図 3)。興味深いことに、成熟型 VEGF-C および VEGF-D (それぞれ VEGF-C $\Delta N\Delta C$ および VEGF-D $\Delta N\Delta C$) は、他のサブタイプと同様に cystine knot モチーフを持つにもかかわらず、非共有結合性の二量体を形成する^{48) 49)}。その立体構造が興味深いのが、いずれのタンパク質の立体構造も報告されていない。前駆体タンパク質がプロセッシングされ成熟型に変換されると、前駆体タンパク質の時に比べて受容体に高親和性に結合できるようになる^{48) 49)} (表 1)。また、いずれの受容体に対しても VEGF-C が高親和性のリガンドである^{48) 49)} (表 1)。VEGF-C および VEGF-D には他のサブタイプには見られないシステイン残基 (Cys156) がある (図 3, 白丸)。この残基をセリンに変異させた VEGF-C (VEGF-C156S) は VEGFR-3 に特異的なリガンドに転じることから、Cys156 は VEGFR-2 との相互作用に必須であると考えられている⁵²⁾。

VEGF-C および VEGF-D の生物活性。 VEGF-C および VEGF-D は、リンパ管内皮細胞に対し増殖活性および migration 活性を示す (表 2)。VEGF-C は VEGF-A と同様に血管透過性亢進活性を示すが⁴⁸⁾、VEGF-D にはその活性は全くない⁵³⁾ (表 2)。VEGFR-3 の特異的なリガンド VEGF-C156S は血管透過性亢進活性を示さないことから⁵²⁾、VEGF-C の血管透過性亢進活性は VEGFR-2 を介していると考えられる。しかし、VEGF-C と類似の受容体選択性を有する VEGF-D にはこの作用が見られないことから、

血管透過性亢進活性の発現メカニズムには更なる検討が必要であろう^{*2}。マウスに VEGF-C156S を発現すると、血管構造に影響を与えることなくリンパ管形成のみが特異的に誘導されることから、リンパ管形成シグナルは VEGFR-3 を介していると考えられる⁵⁴⁾。ごく最近、VEGF-C および VEGF-D は NP-2 に結合することが報告された⁵⁵⁾ (表 1)。NP-2 欠損マウスはリンパ管形成に異常が見られることから⁵⁶⁾、VEGFR-2 における NP-1 と同様に、NP-2 は VEGFR-3 の補助受容体として機能しているのかもしれない。

ウイルス VEGF (VEGF-E)

Orf ウイルスおよび *Pseudocowpox* ウイルス (主にヒツジに感染、ヒトへの感染は極めて稀) のゲノムには VEGF の相同タンパク質がコードされている。ウイルス由来の VEGF (ウイルス VEGF または VEGF-E と呼ばれる) は VEGFR-2 に特異的なリガンドで、VEGF-A とほぼ同程度の親和性で VEGFR-2 に結合する⁵⁷⁾⁻⁵⁹⁾ (図 1, 表 1)。これまでに多種のウイルス VEGF の構造が決され、他のサブタイプと同様に cystine knot モチーフを持つことが明らかにされているが、VEGF-A に対する相同性は低くアミノ酸配列レベルで 25–35% 程度である。最近、*Orf* ウイルス NZ2 株由来の VEGF の X 線結晶構造が報告され、受容体結合ループ 1 およびループ 3 の構造が既知の VEGF に比べかなり flexible な構造を持つことが明らかにされた⁶⁰⁾。ウイルス VEGF は血管内皮細胞に対する増殖因子活性、migration 活性、および血管透過性亢進性を示すが (表 2)、その活性は VEGF-A

に比べて弱い⁶¹⁾。増殖因子活性はいずれのウイルス由来の VEGF でもほぼ同程度であるが、血管透過性亢進活性は由来ウイルスによってかなり異なる⁶¹⁾。ウイルス VEGF のうちいくつかは NP-1 にも結合性を示すことが報告されているが (表 1)、NP-1 結合性と血管透過性亢進活性は相関しない⁶¹⁾。このサブタイプのいくつかはヘパリンにも結合性を示す。最近、ウイルス VEGF のヘパリンおよび NP-1 結合領域はその C 末端領域に存在し、両者の結合性は相関することが明らかにされた⁶²⁾。ウイルス VEGF の C 末端領域はプロリンおよびスレオニン残基に富むユニークな構造をしており、VEGF-A をはじめ他のサブタイプとは相同性を示さない (図 3)。VEGF 遺伝子を欠損したウイルスはその感染効率が著しく低下することから、ウイルス VEGF は *Orf* ウイルスおよび *Pseudocowpox* ウイルスの感染過程に重要な働きをしていると考えられる⁶³⁾。

ヘビ毒 VEGF (VEGF-F)

ヘビ毒 VEGF の VEGFR およびヘパリン結合性。 前述のウイルスに加え、いくつかのクサリヘビ科ヘビ毒も外来性の VEGF のソースであることが明らかにされてきている。ヘビ毒由来の VEGF は、最初、強力な血圧降下性因子 (hypotensive factor: HF) としてヨーロッパ地域に生息する *Vipera aspis aspis* 毒より単離された⁶⁴⁾。その後、2つのホモログ分子 (vammin と VR-1) が他種のクサリヘビ科ヘビ毒から単離され、HF を含めその詳細な性質が解析されている^{65) 66)}。これらのヘビ毒由来の VEGF は 110 または 109 アミノ酸残基からなるホモ二量体

^{*2} VEGF ファミリーの血管透過性亢進活性の作用メカニズムは、増殖因子活性や migration 活性とは異なり、各サブタイプの受容体選択性ではうまく説明できない。本文中で紹介したように VEGFR-2 を介していることを示唆する報告があるが、VEGFR-2 に結合しない VEGF-A 変異体 (VEGFR-1 には結合する) が血管透過性亢進活性を保持しているとの報告もある⁵³⁾。また Src 欠損マウスは、その発生過程において血管形成に異常はないにも関わらず、VEGF-A を投与しても血管透過性亢進作用を示さない⁶⁹⁾。さらに、VEGFR-2 の特異的リガンドであるウイルス VEGF (VEGF-E) は、その増殖因子活性に比べ血管透過性亢進活性が著しく弱い⁶¹⁾。これらの事実から、VEGF-A の血管透過性亢進作用はその血管の形成作用とは明らかに独立した作用であると考えることができ、その作用が未知の受容体を介している可能性も考えられる。

タンパク質で、VEGF-Aに約50%の相同性を示すタンパク質である。またその生物活性は強力で、VEGF-Aと比較して強力な血管内皮細胞増殖活性および血圧降下作用を示す(表2)。これらのヘビ毒由来のVEGFはVEGFR-2に特異的なリガンドで、VEGFR-1、VEGFR-3、およびNP-1には全く結合しない(図1, 表1)。また、VEGF-Aと比べてその親和性は低いが、ヘパリンにも結合性を示す⁶⁷⁾(表1)。これらのユニークな特徴から、ヘビ毒由来のVEGFは7番目のサブタイプとしてVEGF-Fと命名された⁶⁵⁾。最近報告されたX線結晶構造によると、VEGF-Fの受容体結合ループ3には他のサブタイプにはない1アミノ酸残基(Thr86a)の挿入が見られる⁶⁶⁾(図2)。また、VEGFR-1結合性のVEGF-AおよびPlGFが負電荷に富むのに対し、ヘビ毒由来のVEGFはむしろ正に荷電している⁶⁶⁾(図4)。VEGFR-1の第3-Ig様ドメインが強い塩基性(アミノ酸配列から計算されるpI値で11.8)であることを考えると、VEGFR-1との結合にはリガンド分子の電荷が大きく影響するのかもしれない。

VHDの相同性とは異なり、ヘビ毒VEGFのC末端領域は他のサブタイプと比べて短く、また相同性も示さない(図2, vavminの点線部分, 図3)。合成ペプチドを使った実験から、ヘビ毒VEGFのヘパリン結合領域はこの領域に局在していることが明らかにされている⁶⁷⁾。このペプチドはVEGF-Aの生物活性を阻害することから、VEGF-Aと類似したヘパリン構造を認識すると考えられている⁶⁷⁾。結晶中でこの領域はdisorderしていることから、かなりflexibleな構造をしていると考えられる⁶⁶⁾。

ヘビ毒VEGFの多様性。最近、ヘビ毒には前述の分子とは性質の異なるVEGFが含まれていることが報告された⁶⁸⁾。沖縄に生息するハブ毒に含まれるVEGFは、VEGFR-1およびVEGFR-2に結合する(*Tfsv*VEGFと命名された)⁶⁸⁾。*Tfsv*VEGFはVEGFR-1にVEGF-Aと同等の親和性で結合するが、VEGFR-2に対して

は結合親和性が約100倍低い(表1)。興味深いことに、*Tfsv*VEGFはその増殖因子活性は弱いにもかかわらず、VEGF-Aとほぼ同程度の血管透過性亢進活性を示す(表2)。毒タンパク質の多様性を考えると、ヘビ毒にはさらに性質の異なるVEGFが含まれているのではないかと考えられる。実際、我々のグループではアフリカに生息するクサリヘビの1種には、新規な受容体結合性を示すVEGFが含まれていることを見出している(未発表データ)。一方ヘビには、毒中に含まれるVEGFとは別に、VEGF-Aと高い相同性を示す組織型のVEGFも発現している(図2)。これらの組織型VEGFの一次構造は、多様な性質を示すヘビ毒VEGFとは異なり、毒ヘビ種間で高く保存されている(未発表データ)。これらの事実から、ヘビ毒に含まれるVEGFは組織型のVEGFとは独立して分子進化することで、捕食の武器に特化した新たな機能(強力な血圧降下作用や血管透過性亢進活性)を獲得したと想像できる。

おわりに

VEGFに関する研究は、ガンや網膜症などをはじめとする血管新生の分子メカニズムの解明やその治療に直結することから、個体、組織、細胞レベルでの理解を目標に解析が進められてきた。一方、クローニング等によって多くのサブタイプやアイソフォームの構造が明らかにされてきているにもかかわらず、受容体の結合様式をはじめとするタンパク質レベルでの解析を行った例はまだ少数であり、その理解は不十分であると言わざるを得ない(受容体との結合親和性の解析されていないサブタイプも存在する)。また前述した血管透過性亢進活性に代表されるように、受容体との機能相関が不明な生物活性も少なくない。これらの理解を困難にしている原因の一つには、各リガンド分子が複雑な受容体選択性を持っていることが挙げられる。実際に、哺乳動物に発現している生理的サ

ブタイプは、その多くが複数の受容体と相互作用する^{*3}。さらに最近では、各受容体同士のクロストークや受容体がヘテロ二量体を形成する可能性も示唆されており、VEGF-VEGF受容体系の分子レベルでの理解はますます困難になってきたと言える。このような現状を考えると、ウイルスおよびヘビ毒に見つかった外来性のVEGFは生理的なサブタイプには見られないユニークな性質を示すことから、VEGF-VEGF受容体系を新しい側面から捉える有力な研究ツールとなりうると言えよう。トキシンなどの外来性物質が研究の突破口を開いた例は少なくない。毒ヘビやウイルスが、進化の過程でVEGFを武器に選択しその構造や機能を多様化させたことは大きな意味があるに違いない。外来性VEGFの研究は我々に思いもよらない新たな事実を教えてくれるだろう。

謝辞: 稿を終えるにあたり、執筆の機会を与えて下さった大阪大学蛋白質研究所の高木淳一先生に深謝致します。

文 献

- 1) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**: 242-248, 2000.
- 2) Carmeliet P: Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**: 653-660, 2003.
- 3) Jain RK: Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**: 685-693, 2003.
- 4) Lohela M, Saariisto A, Veikkola T, Alitalo K: Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost* **90**: 167-184, 2003.
- 5) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**: 1306-1309, 1989.
- 6) Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**: 1309-1312, 1989.
- 7) Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* **25**: 581-611, 2004.
- 8) Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K: The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* **65**: 550-563, 2005.
- 9) Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 359-371, 2006.
- 10) Yamazaki Y, Morita T: Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers* **10**: 515-527, 2006.
- 11) Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S: Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* **580**: 2879-2887, 2006.
- 12) Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K: The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* **63**: 601-615, 2006.
- 13) de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**: 989-991, 1992.
- 14) Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 1579-1586, 1992.
- 15) Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT: Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7533-7537, 1993.
- 16) Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA: Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **273**: 11197-11204, 1998.
- 17) Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N: Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors: generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **271**: 5638-5646, 1996.
- 18) Li B, Fuh G, Meng G, Xin X, Gerritsen ME, Cunningham B, de Vos AM: Receptor-selective variants of human vascular endothelial growth factor: generation and characterization. *J Biol Chem* **275**: 29823-29828, 2000.
- 19) Pan B, Li B, Russell SJ, Tom JY, Cochran AG, Fairbrother WJ: Solution structure of a phage-derived peptide antagonist in complex with vascular endothelial growth factor. *J Mol Biol* **316**: 769-787, 2002.
- 20) Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM: Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7192-7197, 1997.
- 21) Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM: Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* **91**: 695-704, 1997.
- 22) Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N: The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* **271**: 7788-7795, 1996.
- 23) Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth

^{*3} VEGF-Aの場合、主要アイソフォームのVEGF-A165は3種の受容体(VEGFR-1, VEGFR-2, NP-1)に結合する。一方、VEGF-A121は2種(VEGFR-1, VEGFR-2)、VEGF-A145は4種の受容体(VEGFR-1, VEGFR-2, NP-1, NP-2)に結合する。

- factor. *Cell* **92** : 735–745, 1998.
- 24) Wang L, Zeng H, Wang P, Soker S, Mukhopadhyay D: Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J Biol Chem* **278** : 48848–48860, 2003.
 - 25) Tessler S, Rockwell P, Hicklin D, Cohen T, Levi BZ, Witte L, Lemischka IR, Neufeld G: Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors. *J Biol Chem* **269** : 12456–12461, 1994.
 - 26) Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* **267** : 26031–26037, 1992.
 - 27) Park JE, Keller GA, Ferrara N: The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* **4** : 1317–1326, 1993.
 - 28) Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G: Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem* **275** : 18040–18045, 2000.
 - 29) Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ: VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **62** : 4123–4131, 2002.
 - 30) Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waite E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, Bates DO: VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* **64** : 7822–7835, 2004.
 - 31) Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M: Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 9349–9354, 1998.
 - 32) Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J: Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* **126** : 3015–3025, 1999.
 - 33) LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N: Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* **299** : 890–893, 2003.
 - 34) Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, Kholova I, Kauppinen RA, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K, Yla-Herttuala S: VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* **92** : 1098–1106, 2003.
 - 35) Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF: VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67** : 227–237, 2002.
 - 36) Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U: Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* **271** : 19310–19317, 1996.
 - 37) Mäkinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M, Eriksson U, Alitalo K: Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem* **274** : 21217–21222, 1999.
 - 38) Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, Duriez M, Schwartz B, Branellec D, Levy BI: Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* **93** : 114–123, 2003.
 - 39) Miquelot L, Gertszenstein M, Harpal K, Rossant J, Nagy A: Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev Biol* **212** : 307–322, 1999.
 - 40) Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ, Maglione D, Battisti M, Tucci M, Persico MG, Acharya KR: The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* **276** : 12153–12161, 2001.
 - 41) Christinger HW, Fuh G, de Vos AM, Wiesmann C: The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. *J Biol Chem* **279** : 10382–10388, 2004.
 - 42) Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P: Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* **9** : 936–943, 2003.
 - 43) Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N: Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* **269** : 25646–25654, 1994.
 - 44) Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML: Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* **271** : 3154–3162, 1996.
 - 45) Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, Fleet C, Tritsaris K, Dissing S, Leboulch P, Cao Y: Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* **1** : 99–108, 2002.
 - 46) Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG: Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* **7** : 575–583, 2001.
 - 47) Baldwin ME, Roufail S, Halford MM, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG: Multiple forms of mouse vascular endothelial growth factor-D are generated by RNA splicing and proteolysis. *J Biol Chem* **276** : 44307–44314, 2001.
 - 48) Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K: Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* **16** : 3898–3911, 1997.
 - 49) Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E, Roufail S, Simpson RJ, Moritz R, Karpanen T, Alitalo

- K, Achen MG: Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* **274** : 32127-32136, 1999.
- 50) McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG: Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* **198** : 863-868, 2003.
 - 51) Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, Benjannet S, Marcinkiewicz J, Chretien M, Seidah NG, Khatib AM: The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* **111** : 1723-1732, 2003.
 - 52) Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O, Alitalo K: A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem* **273** : 6599-6602, 1998.
 - 53) Stacker SA, Vitali A, Caesar C, Domagala T, Groenen LC, Nice E, Achen MG, Wilks AF: A mutant form of vascular endothelial growth factor (VEGF) that lacks VEGF receptor-2 activation retains the ability to induce vascular permeability. *J Biol Chem* **274** : 34884-34892, 1999.
 - 54) Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K: Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* **20** : 1223-1231, 2001.
 - 55) Karpanen T, Heckman CA, Keskkitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G, Tamagnone L, Alitalo K: Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J* **20** : 1462-1472, 2006.
 - 56) Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, Eichmann A: Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* **129** : 4797-4806, 2002.
 - 57) Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, Stacker SA: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** : 3071-3076, 1999.
 - 58) Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M: A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* **273** : 31273-31282, 1998.
 - 59) Meyer M, Clauss M, Lepplé-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C: A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **18** : 363-374, 1999.
 - 60) Pieren M, Prota AE, Ruch C, Kostrewa D, Wagner A, Biedermann K, Winkler FK, Ballmer-Hofer K: Crystal structure of the Orf virus NZ2 variant of vascular endothelial growth factor-E. Implications for receptor specificity. *J Biol Chem* **281** : 19578-19587, 2006.
 - 61) Wise LM, Ueda N, Dryden NH, Fleming SB, Caesar C, Roufail S, Achen MG, Stacker SA, Mercer AA: Viral vascular endothelial growth factors vary extensively in amino acid sequence, receptor-binding specificities, and the ability to induce vascular permeability yet are uniformly active mitogens. *J Biol Chem* **278** : 38004-38014, 2003.
 - 62) Tokunaga Y, Yamazaki Y, Morita T: Localization of heparin- and neuropilin-1-recognition sites of viral VEGFs. *Biochem Biophys Res Commun* **348** : 957-962, 2006.
 - 63) Savory LJ, Stacker SA, Fleming SB, Niven BE, Mercer AA: Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in orf virus infection. *J Virol* **74** : 10699-10706, 2000.
 - 64) Komori Y, Nikai T, Taniguchi K, Masuda K, Sugihara H: Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). *Biochemistry* **38** : 11796-11803, 1999.
 - 65) Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, Morita T: Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem* **278** : 51985-51988, 2003.
 - 66) Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H: Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J Biol Chem* **280** : 2126-2131, 2005.
 - 67) Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T: Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. *Biochemistry* **44** : 8858-8864, 2005.
 - 68) Takahashi H, Hattori S, Iwamatsu A, Takizawa H, Shibuya M: A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. *J Biol Chem* **279** : 46304-46314, 2004.
 - 69) Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Chersesh DA: Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* **4** : 915-924, 1999.