◆トピックス◆

インテグリン細胞内領域結合蛋白

柏 木 浩 和*

Integrin Cytoplasmic Region-binding Proteins

Hirokazu KASHIWAGI*

Key words: Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$, cytoplasmic region, signaling, β_3 -endonexin

はじめに

血小板インテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) は、通常は非活性化状態にありそのリガンドであるフィブリノーゲンや von Willebrand 因子などとは結合しない。しかしコラーゲンなどの細胞外マトリックスに接触したり各種 agonist により刺激されると、それらの受容体からのシグナルにより $\alpha_{11b}\beta_3$ は活性化状態となりリガンドと結合できるようになる。この過程は inside-out signal とよばれており、 $\alpha_{11b}\beta_3$ の構造変化による affinity の増加と、 $\alpha_{11b}\beta_3$ の clustering を主とする avidity の増大という二つの側面を有する。また $\alpha_{11b}\beta_3$ はリガンド結合後にさらに構造変化が生じ、細胞内に新たなシグナルを誘導する。これは outside-in signal とよばれている¹⁾。このようなインテグリンを介したシグナルは、 $\alpha_{11b}\beta_3$ のごく短い細胞内領域を介して行われていることから、近年それらと結合しうる蛋白が精力的に研究されてきている。ここでは最近 β_3 の細胞内領域と特異的に結合する蛋白としてクローニングされた β_3 -endonexin を中心に概説する。

新規にクローニングされたインテグリン結合蛋白

インテグリンの細胞内領域と直接あるいは間接的に結合しうる蛋白としては表 1 のようにいくつかの蛋白が知られており、 α -actinin や talin のようないわゆる細胞骨格蛋白と FAK, calreticulin のように細胞内のシグナル伝達に関与していると思われる蛋白に大別しうる。これらの中で近年 yeast-two hybrid system を用いて新たに 5 つの蛋白、ILK (Integrin-linked kinase)²⁾, Cytohesin-1³⁾, ICAP-1⁴⁾, CIB⁵⁾ そして β_3 -endonexin⁶⁾ がクローニングされた。特に ILK と Cytohesin-1 は血小板で発現しているかどうかは不明であるが、 β_3 -endonexin と同様にインテグリンの細胞内領域に直接結合することによりインテグリン機能を調節している可能性がある大変興味深い蛋白であるので簡単に紹介する。ILK は β_1 tail を bait としてクローニングされた serine/threonine kinase であり、 β_1 のみではなく β_2 , β_3 とも結合しうる。ILK を細胞に過剰発現させると、インテグリンを介した接着を抑制することから、ILK はインテグリン機能を negative に制御している可能性がある。

* 大阪大学分子制御内科 (第二内科) [〒565-0871 吹田市山田丘 2-2]
The Second Department of Internal Medicine, Osaka University Medical School,
[2-2, Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan]

表 1 インテグリン細胞内領域結合蛋白

蛋白	Integrin tail partner	特 徴
Talin	$\alpha_{11b}; \beta$	細胞骨格蛋白
α -Actinin	β	細胞骨格蛋白
Filamin	β_2	細胞骨格蛋白
F-actin	α_2 only	細胞骨格蛋白
Calreticulin	α	インテグリンを介した細胞接着に関与
Calcium-and integrin-binding protein (CIB)	α_{11b} only	2 個の EF-hand motif をもつ
pp125 ^{FAK}	β	focal adhesion 部位に局在する Tyrosine kinase
p59 ^{ILK} (integrin-linked kinase)	β	ankyrin repeat をもつ serine/threonine kinase
Paxillin	β_1	SH2, SH3 binding motif および LIM domain をもつ
ICAP-1	β_1 only	β_1 依存性の細胞接着によりリン酸化が生じる
Cytohesin-1	β_2 only	Sec7 および PH domain をもつ
β_3 -endonexin	β_3 only	過剰発現により $\alpha_{11b}\beta_3$ の affinity を増大させる

(文献1より抜粋)

また ILK は anchorage-independent な細胞増殖をきたすことから, malignant transformation に関与している可能性もあると考えられている²⁾. Cytohesin-1 は β_2 tail を bait としてクローニングされ, β_1 や β_3 tail とは結合しない. Cytohesin-1 を過剰発現させると β_2 integrin を介した接着が増強され, inside-out signal に関与している可能性がある³⁾.

β_3 -endonexin

β_3 -endonexin は, β_3 tail を bait とし B リンパ球の cDNA library より yeast-two hybrid system を用いてクローニングされた. 全長は 111 個のアミノ酸からなり分子量約 13 kD の蛋白である⁶⁾. そのアミノ酸配列には homology を有する蛋白や特別な motif はなく, 全く新規の蛋白であると思われる. しかし β_3 -endonexin は 17 個の serine と 9 個の threonine を有しており, PKA や PKC などリン酸化を受けている可能性がある. その組織発現をみると, ほとんどすべての臓器で(少なくとも mRNA の)発現がみられ, β_3 integrin との interaction 以外の働きをしている可能性もある. β_3 -endonexin は yeast-two hybrid system において, β_3 tail

とは結合するが, β_1, β_2 あるいは α_{11b} の細胞内領域とは結合しない. また variant 型血小板無力症患者に見いだされた S 752 → P 変異を導入した β_3 tail との結合は低下する⁶⁾.

β_3 -endonexin と β_3 tail がどの部位を介して結合しうるかに関しては, やはり yeast-two hybrid を用いて詳細に検討されている. β_3 tail に関しては C 末端側の NITY motif が重要であり, この部位を β_1 tail の NPKY と置換すると β_3 -endonexin と結合しなくなる. このチロシン残基をフェニルアラニンに置換しても結合はほとんど変化しないためチロシンのリン酸化は結合には必要ないようである. また β_3 -endonexin 側に関しては, C 端の 2 アミノ酸を削除するだけで β_3 tail と結合しなくなり, また N 端も 20 個以上のアミノ酸を削除すると β_3 tail と結合できなくなる⁷⁾.

CHO 細胞上に発現させた $\alpha_{11b}\beta_3$ は血小板と同様に非活性化状態にあるが, β_3 -endonexin を GFP (Green Fluorescence Protein) との融合蛋白として $\alpha_{11b}\beta_3$ とともに CHO 細胞に過剰発現させると, リガンド類似抗体である PAC 1 やフィブリノーゲンの結合の増加がみられる. また β_3 -endonexin を発現させた細胞ではフィブリノーゲン依存性の凝集塊の形成もみられた

ことから、 β_3 -endonexin は $\alpha_{11b} \beta_3$ の affinity を増加させると思われる。この β_3 -endonexin による $\alpha_{11b} \beta_3$ の affinity の増加は β_3 の細胞内領域だけを同時に発現させると打ち消されてしまうこと、また $\alpha_{11b} \beta_3$ (S 752 $\rightarrow$ P) では affinity の増加がみられないことから、 β_3 -endonexin が β_3 の細胞内領域と結合することにより $\alpha_{11b} \beta_3$ の細胞外領域に何らかの構造変化が生じ、リガンドが結合できるようになると思われる⁸⁾。しかしながらこれらは β_3 -endonexin を CHO 細胞に過剰発現させた結果であり、血小板内で実際に β_3 -endonexin がどのように $\alpha_{11b} \beta_3$ と作用しているか、どのようなシグナルをうけて β_3 -endonexin が $\alpha_{11b} \beta_3$ の活性化を誘導するのか、またほかの β_3 インテグリンである $\alpha_v \beta_3$ にはどのような影響があるのか、などに関しては今後の研究が待たれるところである。

文 献

- 1) Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N: Integrin Signaling: The platelet paradigm. *Blood* **91**: 2645-2657, 1998.
- 2) Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedher S: Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new β_1 -integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**: 91-96, 1996.
- 3) Kolanus W, Nagel W, Schiller B, Zeitlmann L, Godar S, Stockinger H, Seed B: $\alpha_L \beta_2$ integrin/ LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory protein. *Cell* **86**: 233-242, 1996.
- 4) Chang DD, Wong C, Smith H, Liu J: ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol* **138**: 1149-1157, 1997.
- 5) Naik UP, Patel PM, Parise LV: Identification of a novel calcium binding protein interacts with the integrin α_{11b} cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **272**: 4651-4654, 1997.
- 6) Shattil SJ, O'Toole T, Eigenthaler M, Thon V, Williams M, Babior BM, Ginsberg MH: β_3 -endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin β_3 subunit. *J Cell Biol* **131**: 807-816, 1995.
- 7) Eigenthaler M, Hofferer L, Shattil SJ, Ginsberg MH: A conserved sequence motif in the integrin β_3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with β_3 -endonexin. *J Biol Chem* **272**: 7693-7698, 1997.
- 8) Kashiwagi H, Schwartz MA, Eigenthaler M, Davis KA, Ginsberg MH, Shattil SJ: Affinity modulation of platelet integrin $\alpha_{11b} \beta_3$ by β_3 -endonexin, a selective binding partner of the β_3 integrin cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **137**: 1433-1443, 1997.