



ディスインテグリンの構造・機能相関

武 谷 浩 之*

The Structure and Function of Disintegrins

Hiroyuki TAKEYA*

Key words : MNR, disintegrin, platelet, integrin, RGD

はじめに

ディスインテグリン (Disintegrin) は蛇毒から単離された Trigramin や Echistatin などの血小板凝集阻止因子の総称で、分子量 5,000~15,000 のポリペプチドである。これらは血小板膜上のフィブリノゲン/vWF レセプターの GP IIb/IIIa ($\alpha_{IIb} \beta_3$ インテグリン) に拮抗的に結合し (Kd < 100 nM), 凝集を阻止する。また、メラノーマ細胞や血管内皮細胞などの細胞膜に存在する $\alpha_v \beta_3$ や $\alpha_5 \beta_1$ などのインテグリンにも結合し、これらの細胞が接着因子 (フィブロネクチンなど) に結合するのを拮抗的に阻害する。したがってディスインテグリンは、癌細胞の転移や血管新生の強力な阻害因子としても注目されている¹⁾。また、ディスインテグリンをドメイン構造として有する金属プロテアーゼが蛇毒をはじめ、ヒトを含む哺乳動物や線虫、ショウジョウバエなどさまざまな生物種に見いだされ、ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) ファミリーとよばれるようになった。これらは卵-精子の膜融合、筋芽細胞の融合、TNF α (腫瘍壊死因子) のプロセッシングなどにおいて機能していることが明らかにされつつある²⁾。

インテグリン阻害作用にはディスインテグリンに共通に存在する RGD 配列が重要と考えられるが、ディスインテグリンの血小板凝集阻害作用は RGDS などのテトラペプチドよりも 1,000 倍以上強く (たとえば、ハブ毒より単離された Flavoridin は IC₅₀ = 40 nM), 特色ある高次構造がディスインテグリン族の強いインテグリン阻害作用の発現に関連すると言われていいる。本稿では、NMR を用いて解析されたディスインテグリンの三次元構造と、これに基づいて推定されたインテグリンとの相互作用に関する構造要素について解説する。

1. ディスインテグリンの一次構造と立体構造

1987 年、アオハブ (*Trimeresurus gramineus*) 毒から精製された Trigramin のアミノ酸配列が決定されて以来、現在までに 30 以上のディスインテグリン族ポリペプチドのアミノ酸配列が決定されている³⁾。これらはシステインに富む 49~83 残基のポリペプチドで、共通に RGD または KGD 配列を有する (図 1)。ディスインテグリンはそのアミノ酸残基数から 3 つのグルー

*三重大学医学部分子病態学講座 (〒 514-8507 津市江戸橋 2-174)

Department of Molecular Pathobiology, Mie University School of Medicine (Tsu, Mie 514-8507, Japan.)

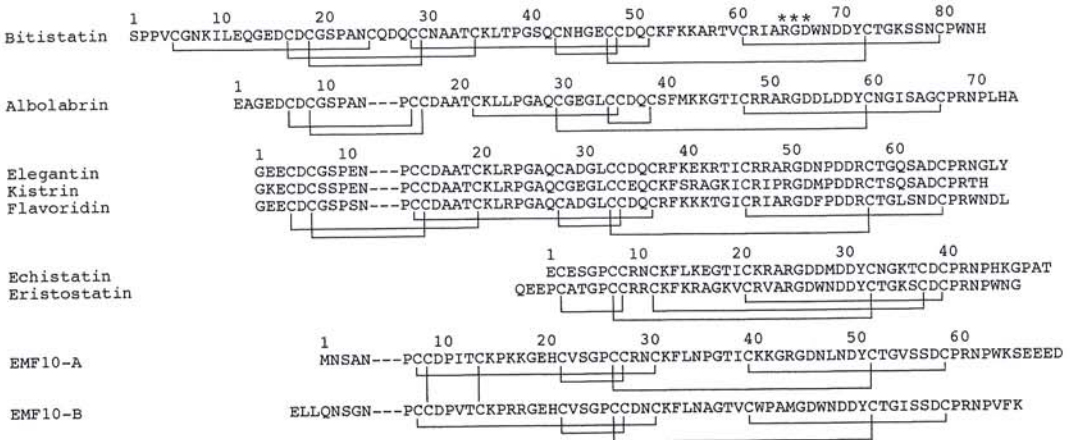


図1 ディスインテグリンの一次構造。

RGD配列の位置を***で示した。二本鎖ディスインテグリンのEMF10のS-S結合はCalvete, et al. (投稿中) によった (Biochemistry 38: 13302-13309, 1999 参照)。

- ① 83 残基で 14 個の Cys 残基 (Bitistatin)
- ② 約 70 残基で 12 個の Cys 残基 (Albolabrin, Kistrin, Flavoridin, Barbourin など)
- ③ 49~51 残基で 8 個の Cys 残基 (Echistatin, Eristostatin など)

に分けることができる。これに加えて最近、S-S 結合でつながった二本鎖 (ヘテロダイマー) のディスインテグリン (図 1, EMF 10) が見いだされた (後述)。Echistatin, Eristostatin などの短鎖ディスインテグリンは C 末側領域に、ほかのディスインテグリンでは見られない Cys 残基 (Cys-37) を有するため、S-S 結合の組み合わせが異なる。また、まったく同じ位置に Cys 残基を有するにも関わらず、Albolabrin の S-S 結合は Kistrin や Flavoridin と異なることは興味深い (図 1)。S-S 結合に基づく高次構造は、ディスインテグリンの活性維持に重要であり、還元すると血小板凝集や細胞接着の阻害活性は消失する。

Kistrin, Flavoridin, Albolabrin, Echistatin の NMR 解析から³⁴⁾, RGD 配列は、2つの β シートに挟まれた 13 残基からなる大きなヘアピン・ループの頂点に、コア部分から 14~17Å ほど突出して存在していることが明らかとなった (図 2)。Kistrin の RGD 配列を LDV 配列 (フ

ィプロネクチンの Connective segment 1 領域に存在し $\alpha_4\beta_1$ 特異的な配列) に置換すると、元来 Kistrin が有する $\alpha_v\beta_3$ 阻害活性が消失するとともに $\alpha_4\beta_1$ 阻害活性を獲得する。このことはディスインテグリンの RGD ループ (ディスインテグリン・ループ) が、インテグリンの特異的結合ポケットに対して RGD 配列や LDV 配列を提示するために最適に配置されていることを物語っている⁵⁾。また、一時ループのフレキシビリティの高さが注目されたが、RGD 配列の両端に Cys 残基を導入してその S-S 結合で構造上の制約をかけると、よりインテグリン親和性が高まる。したがって、むしろ安定した構造 (II' 型 β ターンと考えられている) が高親和性結合に重要であり、インテグリンとの複合体形成が構造の安定性に寄与している可能性が示唆されている。

2. ディスインテグリン以外の血小板凝集阻害因子の構造

ディスインテグリンが単離されたマムシ科やクサリヘビ科の蛇毒は出血毒として知られているが、コブラ科やウミヘビ科の蛇毒は一般に神経毒性のポリペプチドを含む。コブラ科の *Den-*

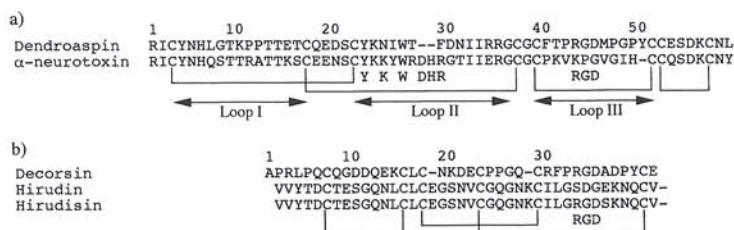


図3 Dendroaspin および Decorsin の一次構造。

- a) Dendroaspin の一次構造を短鎖神経毒の α -Neurotoxin と比較した。RGD 配列およびループ 2 に存在する神経毒活性に必須のアミノ酸残基の位置を示した (Nature Struct Biol 1:802-807, 1994 参照)。
 b) Decorsin の一次構造をヒルジンおよび Hirudisin の 1~40 残基と比較した。RGD 配列の位置を示した。

droaspis jamesonii 毒から単離された Dendroaspin は、その一次構造は短鎖ポリペプチド神経毒の α -Neurotoxin や Erabutoxin b などに相同であるものの神経毒活性は無く、RGD 配列を含む血小板凝集阻害因子である (図 3a)。Dendroaspin の NMR 解析から、その立体構造はやはり全体としては短鎖神経毒に似ているが、ループ III の構造が大きく異なることが明らかとなった (図 4a)。すなわち、短鎖神経毒ポリペプチドのループ III の C 末側半分は β シートを形成し、ループ II を構成する 2 つの β シートに重なり合っているが、Dendroaspin のループ III の C 末側半分には Pro 47-Gly 48-Pro 49 が存在するため β シートが形成されず、コア部分から突出した構造を形成している。RGD 配列は 13 残基から成るこのループ III の頂点に存在しており、この点でディスインテグリンの構造に近い。Dendroaspin のループ III のみを模倣して合成した環状ペプチドはもとのポリペプチドと同等のインテグリン阻害活性を有していた。

ヒル的一种 *Macrobdella decora* から単離された血小板凝集阻害因子の Decorsin は、RGD 配列を含有するが、その一次構造および高次構造はディスインテグリンではなく、トロンビン・インヒビターのヒルジンに相同性の高いことが明らかにされている (図 3b, 図 4b)⁶⁾。Decorsin においても、RGD 配列は β シートに

Eristostatin	CRVA	RGD	-WNDDYC
Barbourin	CRVA	RGD	-WNDDRC
Bitistatin	CRIAR	RGD	-WNDDYC
Echistatin	CKRAR	RGD	-DMDDYC
Albolabrin	CRRAR	RGD	-DLDDYC
Elegantin	CRRAR	RGD	-NPDDRC
EC3-A	CKRA	VGD	-DVDDYC
EC3-B	CKRAM	L D	-GLNDYC
EMF10-A	CKGR	RGD	-NLNDYC
EMF10-B	CWPAM	G D	-WNDDYC
HR1B	CRAE	SECD	IPEESC
RVV-X	CRRAR	DECD	VPEHC
Ecarin	CRPAR	DDCD	VAEHC
ADAM-2	CRLA	ODECD	VTEYC
ADAM-3	CRKS	KDCD	DFPEFC
ADAM-15	CRPT	IRGL	CDLPEFC

図5 ディスインテグリン・ループの比較。

$\alpha_{1b} \beta_3$ に特異的なディスインテグリン (Eristostatin, Barbourin, Bitistatin), $\alpha_{1b} \beta_3$, $\alpha_v \beta_3$, $\alpha_5 \beta_1$ に結合するディスインテグリン (Echistatin, Albolabrin, Elegantin), ヘテロダイマー・ディスインテグリン (EC 3, EMF 10) および ADAM ファミリー蛋白質をグループ分けした。HR 1 B, RVV-X, Ecarin はそれぞれ蛇毒から単離された出血因子、凝固第 X 因子活性化因子、プロトロンビン活性化因子。ADAM-2 および 3 はマウス、ADAM-15 はヒト由来。RGD 配列の位置を枠で囲んだ。

挟まれたヘアピン・ループの頂点に存在しており、この構造は天然インテグリン阻害ポリペプチドに共通した特徴と言える。ヒルジンの相当する領域に RGD 配列を導入した Hirudisin (図 3b) の血小板凝集阻害活性は Decorsin の 1/100 でしかなく、活性発現に最適な RGD ループを構成するためには、ループ内に存在するほかのアミノ酸残基も重要であることが指摘されて

図2a

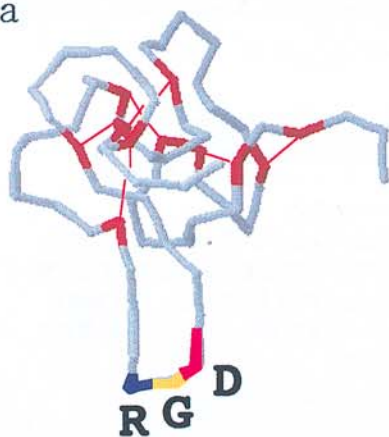


図2b



図2c

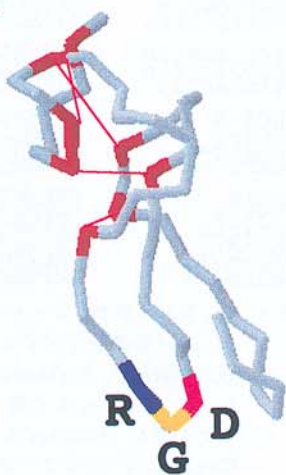


図2d

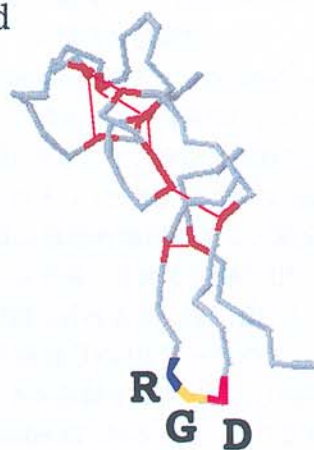


図4a

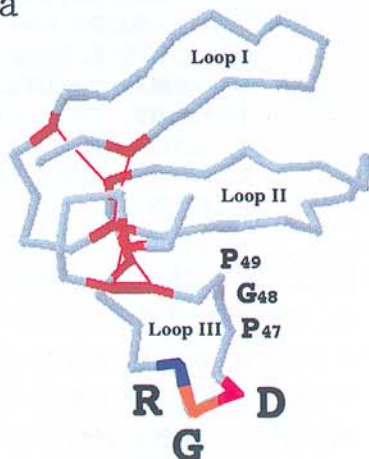
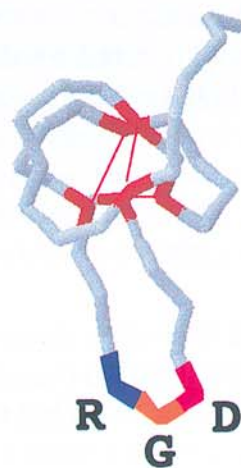


図4b



いる。

3. 特異性に関するディスインテグリン・ループ内のアミノ酸残基

ディスインテグリン属ポリペプチドは低分子量でかつ非常に相同性が高いが、インテグリンに対する特異性が異なる場合があり、どのような構造(アミノ酸残基)が特異性の発現に重要かを探るための良いモデルとなりえる。例えば、Echistatin や Flavoridin は $\alpha_{11b} \beta_3$, $\alpha_v \beta_3$, $\alpha_5 \beta_1$ にほぼ同等の親和性で結合するが、Eristostatin, Barbourin, Bitistatin は $\alpha_{11b} \beta_3$ に特異性が高く $\alpha_v \beta_3$ や $\alpha_5 \beta_1$ への親和性は低い。これらのディスインテグリン・ループ内のアミノ酸残基の比較から、RGDW 配列を有するディスインテグリンは $\alpha_{11b} \beta_3$ に特異的で、RGDNP や RGDD 配列は $\alpha_v \beta_3$ および $\alpha_5 \beta_1$ に親和性の高いことがわかってきた(図5)。実際に Echistatin の RGDD 配列を Eristostatin の RGDW 配列に置換した変異体(Echistatin-D 27 W)は、 $\alpha_{11b} \beta_3$ に親和性がより高くなるとともに $\alpha_v \beta_3$ や $\alpha_5 \beta_1$ に結合しなくなり、Eristostatin の特異性に似てくることが報告されている⁷⁾。Echistatin の高次構造に基づいて作製された Eristostatin および Echistatin-D 27 W の構造モデルから、この2者のディスインテグリン・ループは、大きく疎水的な Trp 残基の影響で、echistatin に比べて幅広であることが推察され、このループの形状が $\alpha_{11b} \beta_3$ のリガンド結合ポケットに適合するために重要であることが示唆されている。

Echistatin の RGDD 配列のさらに C 末の Met 残基(M 28)も $\alpha_v \beta_3$ や $\alpha_5 \beta_1$ への結合に重

要で、Eristostatin と同じ Asn 残基に置換した変異体(Echistatin-M 28 N)は $\alpha_v \beta_3$ および $\alpha_5 \beta_1$ へ結合できなくなる。Echistatin のラベル化の際、クロラミン T を用いると、この Met 残基(M 28)が酸化されてインテグリン阻害活性を失う。構造モデルからこの場合、新たに導入された酸素原子が RGD 配列中の Gly 残基および Asp 残基と水素結合を形成し、ループの形状が変化することが示唆されている。ところが興味深いことに、この Met 残基を同じ疎水性の Leu 残基に置換した変異体(Echistatin-M 28 L)は、 $\alpha_v \beta_3$ への結合性は保持したまま $\alpha_5 \beta_1$ への親和性のみが低くなる⁷⁾。 $\alpha_v \beta_3$ 特異的で $\alpha_5 \beta_1$ には低親和性と考えられる短鎖ディスインテグリン Accutin の同位置がやはり Leu 残基であることはこの結果に一致している¹⁾。

4. 第2結合部位としてのディスインテグリンの C 末側領域

Echistatin および Flavoridin の NMR 解析から、C 末端領域がディスインテグリン・ループに近接して存在していることが明らかとなり(図 2c, d)、インテグリンとの相互作用に何らかの影響を及ぼしている可能性が指摘された³⁾。実際に Echistatin の C 末端9残基を欠失した変異体は $\alpha_{11b} \beta_3$ への結合と血小板凝集阻害活性が減弱し、またリガンドが結合した際の構造変化によって生じるネオ・エピトープ(LIBS: Ligand Induced Binding Site)の形成能が消失することが示されている。この変異体の立体構造モデルから、C 末端9残基の欠失はディスインテグリン・ループにはまったく影響を与えないことが示され、C 末端領域は独立し

図2 ディスインテグリンの立体構造(ポリペプチド主鎖の折り畳み構造を示す)。

a) および b) は Kistrin, Protein Data Bank (PDB) のコード「1KST」を用いて作製。b) は a) を左横から眺めたもの。c) Echistatin (PDB コード「2ECH」), d) Flavoridin (PDB コード「1FVL」)。シスチン残基を赤色で示し S-S 結合を赤線で結んだ。RGD 配列を青, 黄, ピンク色で示した。

図4 Dendroaspin (a) および Decorsin (b) の立体構造。

Dendroaspin および Decorsin の PDB コードは「1DRS」および「1DEC」。シスチン残基を赤色で示し S-S 結合を赤線で結んだ。RGD 配列を青, 黄, ピンク色で示した。

た第2結合部位として高親和性結合に重要であることが示唆されている。最近, Eristostatin ($\alpha_{11b} \beta_3$ 特異的) のC末端 WNG 配列を Echistatin の HKGPAT 配列に置換した変異体が $\alpha_v \beta_3$ および $\alpha_5 \beta_1$ に親和性を示すようになることが報告された。したがって, これらのディスインテグリンのC末端領域は高親和性の結合および LIBS の誘導のみならず, インテグリン特異性の発現にも寄与していることが示唆されている。

5. ヘテロダイマー構造のディスインテグリン

ごく最近 *Echis carinatus* 毒から単離された EC 3⁸⁾ および *Eristocophis macmahoni* 毒から単離された EMF 10 はヘテロダイマー構造のディスインテグリンであり(図 1), これまでのディスインテグリンにはない特異性を示す。EC 3 は $\alpha_4 \beta_1$ や $\alpha_4 \beta_7$ に特異的であり EMF 10 は $\alpha_5 \beta_1$ に特異的で, 両者とも $\alpha_v \beta_3$ や $\alpha_{11b} \beta_3$ に対する阻害活性は非常に弱い。おもしろいことに, これらのディスインテグリンの RGD 配列は EC 3 では両鎖とも, EMF 10 では片鎖が別のアミノ酸に置換しており(図 5), この特徴的な配列がインテグリン認識の特異性に関与することが推察されている⁸⁾。

6. ADAM ファミリー蛋白質に存在するディスインテグリンドメイン

ADAM ファミリー蛋白質はディスインテグリン構造を有するもののそのほとんどの RGD 配列は別のアミノ酸に置き換わっていることが特徴である(図 5)。ADAM-2 (Fertilin β) や ADAM-3 (Cyritestin) は精子細胞膜上に存在し, 卵のインテグリン($\alpha_6 \beta_1$ と考えられている) と結合することで卵・精子融合に機能する。これらのディスインテグリン・ループを模倣した合成ペプチドや, この領域を認識する抗体が卵

と精子の結合を阻害することから, インテグリンへの結合は, RGD 配列は存在しないものの, やはりディスインテグリン・ループを介することが示唆されている。他方, *Bothrops jararaca* 毒から単離された Jararhagin は $\alpha_2 \beta_1$ に結合し, これを分解して血小板のコラゲンへの粘着を阻止するが, Jararhagin の α_2 I-ドメインへの結合部位は金属プロテアーゼ・ドメインに存在することが報告されている⁹⁾。

唯一 RGD 配列の存在が報告されている ADAM-15 のディスインテグリン・ドメイン(D 15)が大腸菌で発現されさまざまなインテグリンに対する特異性が検討された結果, D 15 は $\alpha_v \beta_3$ に特異的であることが示された¹⁰⁾。D 15 の $\alpha_v \beta_3$ 阻害活性は RGD 依存性であり, RGD 配列を SGA 配列に置換すると完全に消失した。D 15 においても RGD 周辺のアミノ酸残基がインテグリン特異性に重要であり, RPTRGD 配列を NWKRGD 配列に置換すると $\alpha_v \beta_3$ に加えて $\alpha_{11b} \beta_3$ を認識するようになるという。ADAM ファミリー蛋白質では RGD に相当する配列のC末側に共通に Cys 残基があり(図 5), S-S 結合に関与していると考えられており, ディスインテグリン・ポリペプチドの RGD ループとの立体構造上の相違に興味を持たれる。

おわりに

本稿ではディスインテグリンの構造・機能相関について解説してきた。最近インテグリン認識の特異性発現機構の解析へと研究が進展してきた。今後は, α_4 インテグリンへの特異性を狙って単離された EC 3⁸⁾ のように, これまで見つかってきたものとは異なる特異性を示すディスインテグリンの探索が進み, 特異性に関与する構造要素がさらに詳細に検討されるものと思われる。また, こうした特異的ディスインテグリンを用いることで, インテグリン側のリガンド結合部位の解析が進むものと期待される。

文 献

- 1) Yeh CH, Pen HC, Huang TF: Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by acting as integrin anti- $\alpha_v \beta_3$ antagonist and inducing apoptosis. *Blood* **92**: 3268-3276, 1998.
- 2) 武谷浩之, 岩永貞昭: ディスインテグリン・ドメインを含むモザイク蛇毒蛋白質の構造と機能. 藤村吉博編集, 血小板血栓形成の分子機序, ライフサイエンス出版, 1998, 171-181.
- 3) Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ: Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin. Hematol* **31**: 289-300, 1994.
- 4) Adler M, Lazarus RA, Dennis MS, Wagner G: Solution structure of kistrin, a potent platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. *Science* **253**: 445-448, 1991.
- 5) Tselepis VH, Green LJ, Humphries MJ: An RGD to LDV motif conversion within the disintegrin Kistrin generates an integrin antagonist that retains potency but exhibits altered receptor specificity. *J Biol Chem* **272**: 21341-21348, 1997.
- 6) Krezel AM, Wagner G, Seymour-Ulmer J, Lazarus RA: Structure of the RGD protein decorsin: Conserved motif and distinct function in leech proteins that affect blood clotting. *Science* **264**: 1944-1947, 1994.
- 7) Wierzbicka-Patynowski I, Niewiarowski S, Marcinkiewics C, Calvete JJ, Marcinkiewics MM, McLane MA: Structure requirements of echistatin for the recognition of $\alpha_v \beta_3$ and $\alpha_5 \beta_1$ integrins. *J Biol Chem* **274**: 37809-37814, 1999.
- 8) Marcinkiewics C, Calvete JJ, Marcinkiewics MM, Raida M, Vijay-Kumar S, Huang Z, Lobb RR, Niewiarowski S: EC3, a novel heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus* venom, inhibits α_4 and α_5 integrins in an RGD-independent manner. *J Biol Chem* **274**: 12468-12473, 1999.
- 9) Pentikainen O, Hoffren A-M, Ivaska J, Kapyla J, Nyronen T, Heino J, Johnson MS: "RKKH" peptides from the snake venom metalloproteinase of *Bothrops jararaca* bind near the metal ion-dependent adhesion site of the human integrin α_2 I-domain. *J Biol Chem* **274**: 31493-31505, 1999.
- 10) Zhang X-P, Kamata T, Yokoyama K, Puzon-McLaughlin W, Takada Y: Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (Metargidin, ADAM-15) with integrin $\alpha_v \beta_3$. *J Biol Chem* **273**: 7345-7350, 1998.