

# インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の構造変化と活性化： talín による活性化機構

## The structure and activation of integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3: regulation of integrin activation by talin

加藤 恒<sup>1\*</sup>, 富山佳昭<sup>2</sup>  
Hisashi KATO, Yoshiaki TOMIYAMA

加藤 恒

平成7年3月  
大阪大学医学部卒業  
平成17年3月  
大阪大学大学院 医学系研究  
科 分子病態医学 博士課程  
卒業  
平成17年10月  
カリフォルニア大学サンディ  
エゴ校 血液・腫瘍科 研究  
員 (Sanford J. Shattil研究室)  
平成24年11月  
大阪大学大学院 医学系研究  
科 血液・腫瘍内科

**Key words:** Integrin, inside-out signal, Talin

### Points

- ① インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 は血栓形成に必須の分子で、その活性化状態は inside-out シグナルにより厳密に制御されている。
- ②  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 細胞外領域の「折れ曲がり」構造から「起き上がり」構造への変化が  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 へのリガンド結合を可能にすると考えられている。
- ③ Inside-out シグナルによる talin の  $\beta$ 3 細胞内領域への結合が  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の活性化に必須であり、talin の結合により  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 細胞内領域、膜貫通領域に構造変化が誘導される。
- ④ Talin の  $\beta$ 3 細胞内領域への結合に始まり  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 細胞外領域の起き上がり構造への変化に至る一連の機構を明らかにすることは、今後新たな抗血小板療法につながると思われる。

## 1. はじめに

インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 は血小板が止血を行う上で極めて重要な受容体である。フィブリノゲン、およびフォンビルブランド因子が主なりガンドであるが、非活性化状態の  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 には結合せず、inside-out シグナルによる活性化を受け、はじめてリガン

ドとの結合が可能となる。生体内では通常、病的血栓を形成することなく止血が行われており、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の活性化状態は厳密に制御されていると考えられるが、これまでその制御機構の詳細は明らかではなかった。2001年に報告されたインテグリン  $\alpha$ v $\beta$ 3 細胞外領域の結晶構造解析に続いて行われた多くの検討により、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の活性化は複雑な構造変化を伴うものであることが明らかとなったが、本稿では inside-out シグナルがどのような機序で  $\beta$ 3 インテグリン細胞内領域からはじまる  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の構造変化、リガンド親和性につながっていくのか、という点について紹介する。

<sup>1</sup> 大阪大学医学系研究科 血液・腫瘍内科

<sup>2</sup> 大阪大学医学部附属病院 輸血部

\*責任者連絡先:

大阪大学大学院 医学系研究科 血液・腫瘍内科

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 (C9)

Tel: 06-6879-3871, Fax: 06-6879-3879

E-mail: hisashi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

## 2. インテグリンとは

インテグリンは $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットのヘテロダイマーで形成され, 18種類の $\alpha$ , 8種類の $\beta$ サブユニットの組み合わせにより, これまでに24種類のインテグリンの存在が知られている(図1)<sup>1,2)</sup>. これらインテグリンはI型の膜貫通蛋白に分類され,  $\alpha/\beta$ 両サブユニットとも細胞外N末端領域が受容体の大部分を占め, 1回膜貫通領域を経て短い細胞内領域がC末端領域により構成されている. それぞれのインテグリンは異なるリガンドを認識するが, 一般に細胞表面のインテグリンは非活性化状態にあり, リガンドとの結合には細胞周囲からの様々な刺激に続いて起こる inside-out シグナルによるインテグリンの活性化が必要である. リガンドの結合はインテグリンを通じて細胞内へ outside-in シグナルを伝達し, 細胞増殖, 遊走, 形態変化など様々な細胞現象へ結びつくことになり, インテグリンは細胞が周囲の環境に応じて行動するために重要な役割を果たしていると言える. よってインテグリン活性化, リガンド親和性の制御を行うことが様々な疾患の治療につながると考えられ, 現在インテグリンは創薬の重要なターゲットとして期待されている.

## 3. インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3 細胞外領域の立体構造

インテグリンの多くは幅広い種類の細胞に発現するのに対して, 主にフィブリノゲンをリガンドとするインテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 はその発現がほぼ血小板, 巨核球系細胞に限定されている. 血小板1個あたり約80,000分子が発現する  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 は血小板表面蛋白の大部分を占め, 先天的に  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 に変異を有する Glanzmann 血小板無力症において止血機能異常が見られることより<sup>3,4)</sup>,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が血栓形成において必須の分子であることは明らかである<sup>5,6)</sup>.

骨髓巨核球においてRNAから翻訳された  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 それぞれのサブユニットは小胞体で複合体を形成した後に  $\alpha$ IIb はゴルジ体で重鎖と軽鎖に切断され, 血小板表面に発現する前に再度ジスルフィド結合で結ばれる. 血小板表面で  $\alpha$ IIb と  $\beta$ 3 は, それぞれのN末端同士が結合して形成された8 nm $\times$ 12 nmの“頭部”を頂点に持ち, そこから細胞質内へ伸びる長さ

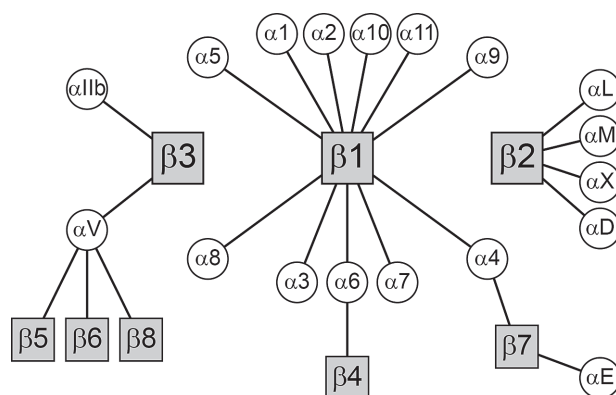


図1 インテグリンファミリー  
細胞表面に発現するインテグリンは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の二つのサブユニットから形成されるヘテロダイマーで, 18種類の $\alpha$ サブユニットと8種類の $\beta$ サブユニットの組み合わせにより24種類のインテグリンがこれまでに知られている.

約15 nmの  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 それぞれの“茎”が頭部を支えており, 頭部でフィブリノゲンと結合することが電子顕微鏡による観察で明らかとなっている<sup>7,8)</sup>.  $\alpha$ IIbには20個,  $\beta$ 3には56個のシステインを含み, システイン同士の架橋で形成された多数のジスルフィド結合が  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の立体構造に影響すると考えられる. 古くからジチオトレイトール(DTT)処理によってジスルフィド結合を還元した血小板は, フィブリノゲンを加えると血小板凝集が惹起されることが知られており<sup>9)</sup>, このことは  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の立体構造と活性化状態に関連が存在することを示唆している. インテグリンの立体構造については, 2001年にXiongらの行ったインテグリン  $\alpha$ v $\beta$ 3 細胞外領域の結晶構造解析により理解が大きく深まることとなった<sup>10)</sup>. 驚いたことに彼らの報告によると, 結晶化した  $\alpha$ v $\beta$ 3 はこれまで考えられていた頭部を頂点とする直立構造の他に“bent”構造と呼ばれる, インテグリンがお辞儀をして頭部を下に向けた折れ曲がり構造が存在することが分かった(図2).  $\alpha$ サブユニットの細胞外領域は $\beta$ -propeller, thigh, calf-1, calf-2の4つのドメインから,  $\beta$ サブユニット細胞外領域は $\beta$ Aドメイン, hybrid, PSI, 4つのI-EGF,  $\beta$ -tailの合計8つのドメインで構成されるが<sup>11,12)</sup>,  $\alpha$ vは“knee”または“genu”と呼ばれる thigh と calf-1ドメインの間で,  $\beta$ 3はPSI/EGF-1とEGF-2ドメインの間で茎が折れ曲がっていた.  $\alpha$ v $\beta$ 3のみでなく, 2008年に報告された  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 細胞外領域全体の結晶構造解析では<sup>13)</sup>,

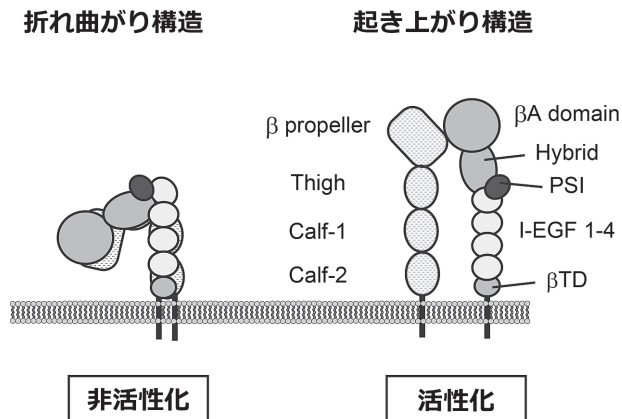


図2 インテグリン細胞外領域の構造変化

2001年に報告されたインテグリン  $\alpha v \beta 3$  の結晶構造解析では、細胞外領域の頭部を下に向けた「折れ曲がり構造」と、細胞外領域が直立した「起き上がり構造」の二つの構造が観察された。折れ曲がり構造のインテグリンはリガンドに対して低親和性の非活性化状態にあるとされ、起き上がり構造のインテグリンが活性化状態にあると考えられている。

$\alpha IIb \beta 3$  も  $\alpha v \beta 3$  同様の折れ曲がり構造、起き上がり構造の二つの構造を取ることが分かった。

インテグリンの活性化と細胞外領域の構造変化を説明する二つの仮説，“switchblade”モデルと“deadbolt”モデルが提唱されている(図3)。Switchbladeモデルでは、折れ曲がり構造を取るインテグリンは頭部のリガンド結合部位が隠されており、リガンドが結合できない、つまり非活性化状態にある。Inside-out シグナルを受け、ジャックナイフのような動きで細胞外領域が起き上がると、露出された頭部にリガンドが結合できるというものである<sup>14)</sup>。これに対して、インテグリンは起き上がる必要はなく、リガンドは折れ曲がったままのインテグリンに結合できるというのが deadbolt モデルである<sup>15,16)</sup>。Deadbolt モデルにおいて非活性化状態のインテグリンでは  $\beta$  サブユニット根元にある  $\beta TD$  が頭部をつなぎとめているためリガンドが結合できない。Inside-out シグナルにより頭部が解放されると、折れ曲がり構造のままリガンドの結合が可能になり、リガンドが結合した後に起き上がるとされているが、deadbolt モデルを否定するデータの報告もある<sup>17)</sup>。また、細胞外領域が起き上がるのみでなく  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットの間隔にも変化が生じるが、両サブユニットの間隔が大きい、脚を広げた状態ではより高いリガンド

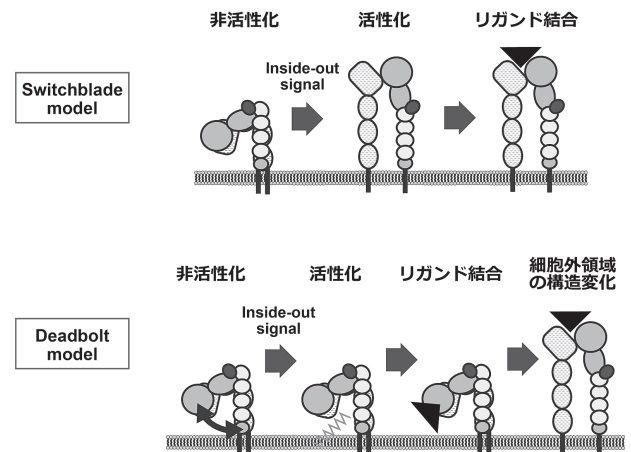


図3 Switchblade モデルと Deadbolt モデル

Switchblade モデルでは、折れ曲がり構造のインテグリンでは頭部のリガンド結合部位が隠されているためにリガンドが結合できないが、inside-out シグナルにより活性化され、起き上がり構造に変化すると頭部のリガンド結合部位が露出し、リガンド結合が可能となる。一方、deadbolt モデルでは、inside-out シグナルが頭部と細胞外領域の付け根の間のコンタクトを解除し、リガンド結合が結合する。Deadbolt モデルでは、リガンドの結合に細胞外領域の起き上がりは必要とされず、リガンドが結合した後の変化で起き上がるとされている。

親和性をもたらしている可能性と、リガンドが結合した結果脚が広がる可能性などが考えられている。このあたりの細胞外領域の構造変化については過去の日本血栓止血学会誌においてその詳細が述べられているので参照されたい<sup>18-20)</sup>。

血栓の形成は  $\alpha IIb \beta 3$  に結合したフィブリノゲンを介して血小板同士が架橋されることで進行する。血漿中のフィブリノゲンは 150~400 mg/dL と非常に高濃度であり、血小板  $\alpha IIb \beta 3$  は常にリガンドであるフィブリノゲンに接しているにも関わらず、定常状態で血栓形成は起こらない。しかし、いったん血管が損傷すると、瞬時に  $\alpha IIb \beta 3$  が活性化し、血小板凝集塊により止血が行われる。このように  $\alpha IIb \beta 3$  の活性化状態は厳密な制御を受けていると考えられるが、結晶構造解析で示されたように、その活性化は複雑な構造変化を伴うものである。骨髓巨核球の細胞質断片から形成され、核を持たない単純な構造の血小板が一体どのようにこういった複雑な制御を行っているのだろうか。血小板  $\alpha IIb \beta 3$  の活性化において、inside-out シグナルの最終段階で  $\beta 3$  細胞内領域への talin の結合が必須である<sup>21)</sup>。実

際の血小板では、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 細胞外領域の構造変化は細胞内領域が起点となって始まると考えられるが、インテグリン活性化機構をより深く理解するには、これまでに報告されたインテグリン細胞外領域のみを用いた結晶構造解析による情報だけでは十分とは言えない。

#### 4. Talin による $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化

Talin は 2541 個のアミノ酸から構成される巨大な細胞骨格蛋白で<sup>22)</sup>、focal adhesion に局在する蛋白として chicken 平滑筋から同定された<sup>23)</sup>。talin 欠損マウスは胎生致死となるが<sup>24)</sup>、Cre-loxP システムにより血小板特異的に talin の発現を欠損させると、アゴニスト刺激で誘導される  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化が消失し、血小板無力症マウスとなる<sup>25, 26)</sup>。また、CHO 細胞、ES 細胞由来の培養巨核球においても、RNAi による talin の発現低下による  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化の抑制など<sup>27)</sup>、inside-out シグナルにおける talin の重要性が多くの検討により示されている<sup>28)</sup>。 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化は古くから遺伝子導入が容易な  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 発現 CHO 細胞を用いた検討が行われてきたが、full-length talin の過剰発現では CHO 細胞上の  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 は活性化されない。Talin は、talin-head ドメインと呼ばれる 50 kDa の N 末端側と 220 kDa の C 末端側の rod ドメインから成り立っており(図 4A)、talin-head ドメインの大部分を占める FERM (four-point-one-protein/ezrin/radixin/moesin) ドメインの中でも F3 ドメインが  $\beta$  インテグリン細胞内領域との結合に重要である<sup>29)</sup>。 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 発現 CHO 細胞で F3 ドメインを含む talin-head のみを過剰発現させた場合、アゴニストなどによる細胞刺激と無関係に  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を恒常的に活性化させることが可能である<sup>29)</sup>。しかし、 $\beta$ 3 細胞内領域の一部を欠損し、talin の結合部位を失った変異  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 $\Delta$ 728 発現 CHO 細胞では、talin-head による  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化は起こらず<sup>30)</sup>、 $\beta$ 3 細胞内領域を介した talin-head による直接の活性化誘導であることが分かる。なぜ full-length talin の過剰発現では  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を活性化させられないのだろうか。これは通常、full-length talin ではインテグリン活性化に最も重要な F3 ドメインは C 末端側の rod ドメインと分子内結合を形成し、autoinhibition と呼ばれる構造的に F3 ドメインが隠

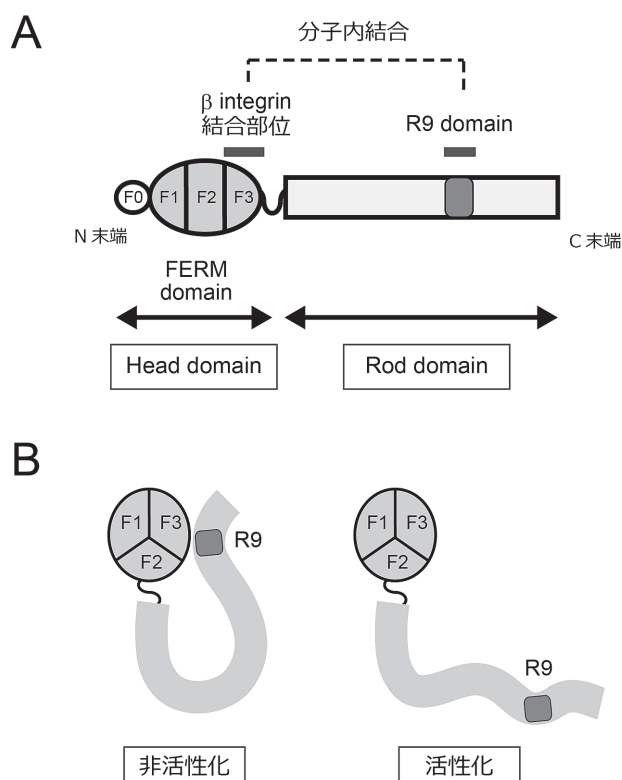


図 4 Talin の構造と分子内結合による autoinhibition

A) Talin の構造は head ドメインと rod ドメインの二つに分けられる。とくに head ドメインがインテグリンの活性化に重要とされており、F3 ドメインが  $\beta$  インテグリン細胞内領域に結合する。

B) 非活性化状態の talin は rod ドメインが F3 ドメインと分子内結合を形成することでインテグリンとの結合を阻害している。Talin が活性化し、分子内結合が解除されると F3 ドメインがインテグリンと結合可能な状態になる。

された非活性化状態にあるためである(図 4B)<sup>31, 32)</sup>。細胞質内に分布する full-length talin は、まず inside-out シグナルにより活性化された Rap1 の作用により細胞膜へ移動し<sup>33, 34)</sup>、次に talin 自身の autoinhibition が解除され活性化する。F3 ドメインと rod ドメインの間の分子内結合が解除される機構のひとつが、2012 年の Song らによる“Pull/Push メカニズム”によりわかりやすく説明されている(図 5)<sup>35)</sup>。Talin-head の F2, F3 ドメインは電気的に陽性を帯びているが、非活性化状態の talin では F3 ドメインに結合する rod ドメインが陰性電荷を持っており、同じく陰性を帯びた細胞膜と反発するために head ドメインは細胞膜から遠ざけられる。つまり、rod ドメインにより F3 ドメインが隠されるのみでなく、電気的にもインテグリンから遠ざけられ、2段階に阻

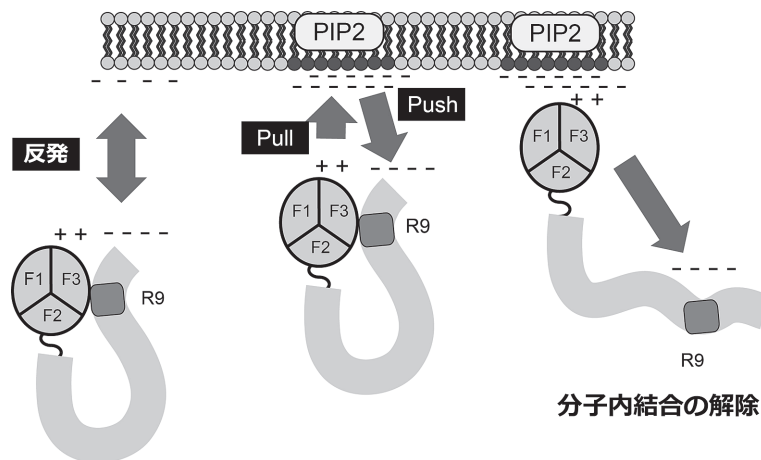


図5 Pull/PushメカニズムによるTalinの活性化

分子内結合を持つ非活性化状態の talin は rod ドメインと細胞膜との間の反発により、細胞膜とインテグリン細胞内領域から遠ざけられている。細胞が活性化し、細胞膜の PIP2 が増加すると陰性の電荷が強まり、head ドメインを引き付ける (pull) とともに rod ドメインを引きはがし (push), autoinhibition が解除される。

害されていることになる。血小板がアゴニスト刺激を受けると phosphatidylinositol(4) phosphate 5 kinase type I gamma (PIPK1g) が talin とともに細胞膜へ移動、細胞膜リン脂質をリン酸化し、細胞膜局所の phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate (PIP2) を増加させる。PIP2 はより強い陰性電荷を帯びており、陽性の電荷を帯びた F2, F3 ドメインとの親和性が高まり、F3 ドメインを rod ドメインから引きはがすと同時に (pull), 陰性電荷を帯びた rod ドメインを細胞膜から遠ざける (push) ことで talin-head が露出され、インテグリンとの結合が可能となる。

## 5. Talin の結合による $\beta 3$ 細胞内領域の構造変化

では talin が  $\beta 3$  細胞内領域へ結合した後、一体どのように細胞外領域での構造変化、リガンドへの親和性変化につながるのだろうか。

Talin は  $\beta 3$  細胞内領域の二つの部分に結合することが可能である (図 6A)。まず一つ目は、 $\beta 3$  細胞内領域にある NPxY motif との F3 ドメイン内の phosphotyrosine-binding (PTB) ドメインを介した結合である。この結合は比較的強い結合であり、NPxY motif に変異を導入した  $\beta 3$ -L746A ノックインマウスでは talin は  $\beta 3$  細胞内領域へ結合ができず、talin ノックアウトマウス同様の  $\alpha$ IIB $\beta 3$  活性化異常、止血機能

異常を示す<sup>36)</sup>。PTB ドメインを介して  $\beta 3$  の細胞内領域へ結合する蛋白は talin の他にも Dok1 などがあるが、インテグリン活性化作用を持つのは talin のみである<sup>29)</sup>。Wegener らが報告したように talin-head は NPLY 配列の他に、細胞膜近傍領域でも  $\beta 3$  と結合することが可能であり、他の PTB ドメイン結合蛋白には見られない、この細胞膜近傍領域での結合が talin に特有の  $\alpha$ IIB $\beta 3$  活性化作用に重要であると考えられている<sup>37, 38)</sup>。Talin-head 内の NPxY motif 結合部位に W359A という変異を導入すると、talin-PTB ドメイン/ $\beta 3$ -NPxY motif の強固な結合が障害される (図 6B)。その結果、talin-head と  $\beta 3$  細胞内領域の結合が著明に低下し、 $\alpha$ IIB $\beta 3$  の活性化はわずかに誘導されるのみとなる。一方、二つ目の talin/ $\beta 3$ -膜近傍領域の結合は比較的弱く、この結合を障害する変異 (L325R) を talin-head に導入しても、talin-PTB ドメイン/ $\beta 3$ -NPxY motif の強い結合により talin-head は  $\beta 3$  に結合可能である。しかし、興味深いことに、この変異 talin-head L325R は  $\alpha$ IIB $\beta 3$  を活性化することはできない<sup>38)</sup>。アゴニストによる  $\alpha$ IIB $\beta 3$  活性化能を有する CMK 細胞に、L325R あるいは W359A 変異を導入した talin-head を過剰発現させアゴニスト刺激下で解析すると、両変異ともに  $\alpha$ IIB $\beta 3$  活性化能は野生型 talin-head にくらべ著明に障害されるが、若干  $\alpha$ IIB $\beta 3$  活性化能が残存していた W359A 変

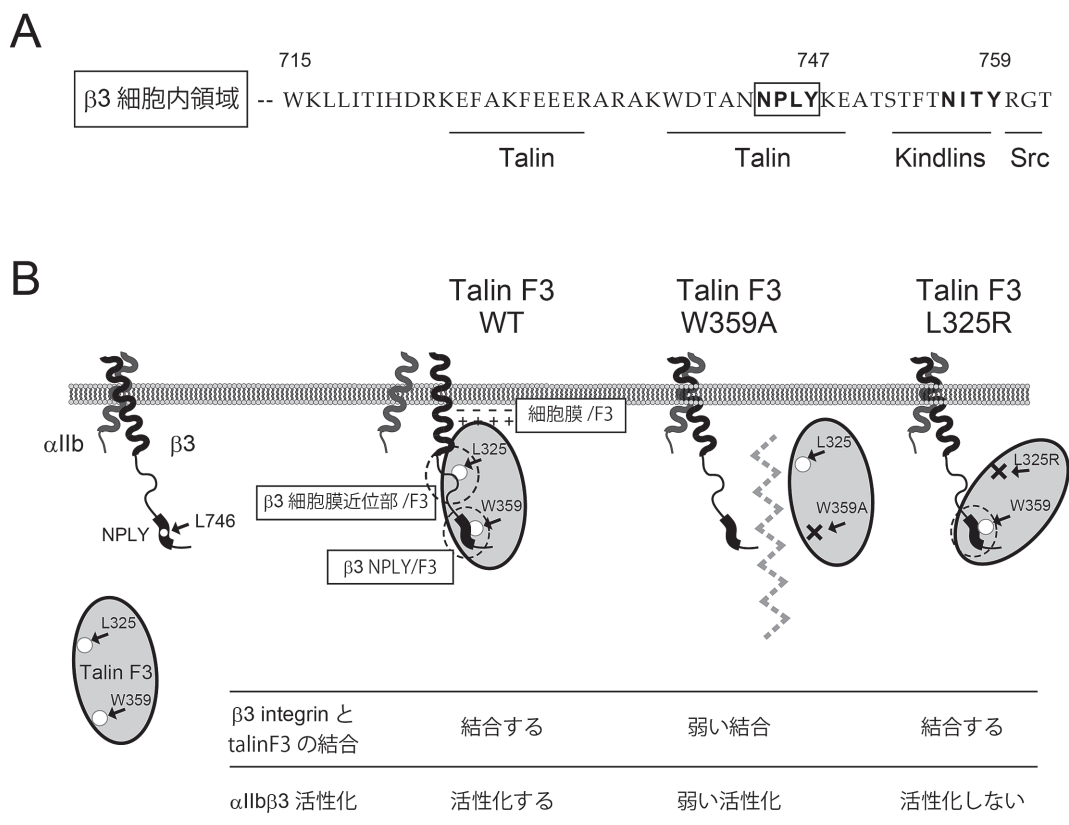


図6 Talin と  $\beta 3$  インテグリン細胞内領域との結合によるインテグリン活性化  
 A) Talin は  $\beta 3$  インテグリン細胞内領域に二つの結合部位を持つ。  
 B) TalinF3 ドメインは  $\beta 3$ -NPxY motif,  $\beta 3$  細胞膜近傍に結合した後、細胞膜との間にも結合を形成し、インテグリン膜貫通領域と細胞内領域の構造変化を誘導し、インテグリンを活性化させる。

異に対して、L325R では活性化能は完全に消失していた<sup>39)</sup>。さらに最近、これら二つの変異を持つノックインマウスを用いた血小板機能の解析が報告され、どちらのマウスも止血機能異常を示すが、血小板機能障害は talin-W359A ノックインマウスに比べて talin-L325R ノックインマウスにおいてより高度であった<sup>40)</sup>。これらの成績より、talins と  $\beta 3$  膜近傍領域の結合がより重要であると考えられる。Talin-head と  $\beta 3$  膜近傍領域が結合すると、続いて陽性の電荷を帯びた F3 ドメインが陰性に荷電する細胞膜と新たな結合を作るが、この F3 ドメインと細胞膜の結合が  $\beta 3$  膜貫通領域の傾きを変えることで、 $\alpha$ IIb $\beta 3$  細胞外領域の構造変化につながると考えられている。L325R 変異の導入は、talins-head/ $\beta 3$  膜近傍領域、talins-head/細胞膜の二つの結合を両方失うことになり、talins による  $\beta 3$  細胞内領域、膜貫通領域の構造変化が  $\alpha$ IIb $\beta 3$  の活性化誘導にとって極め

て重要であることを示している。

## 6. Salt bridge の形成による膜貫通領域の構造変化

異なるインテグリン  $\alpha$  サブユニット、 $\beta$  サブユニットそれぞれの間で細胞内領域の膜直下の配列は保存されており ( $\alpha$  サブユニット: GFFKR,  $\beta$  サブユニット: LLv-iHDR), インテグリン活性化に重要な部分であると考えられてきた(図7)。そこで、Hughes らはこの領域でアラニン置換による変異導入を行い、 $\alpha$ IIb-R995A/ $\beta 3$  と  $\alpha$ IIb/ $\beta 3$ -D723A の組み合わせで発現させると  $\alpha$ IIb $\beta 3$  が恒常的に活性化状態となることを見出した。  $\alpha$ IIb-R995 と  $\beta 3$ -D723 の間で形成される salt-bridge が  $\alpha$ IIb $\beta 3$  を非活性化状態に保つために重要であり、変異を導入すると非活性化状態を維持できず  $\alpha$ IIb $\beta 3$  が恒常的に活性化状

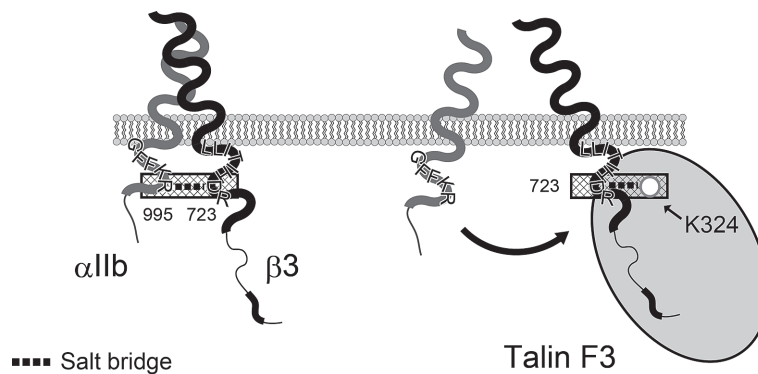


図7 インテグリン細胞内領域の salt-bridge とインテグリン活性化  
 インテグリン細胞内領域で、 $\alpha$ IIb-R995 と  $\beta$ 3-D723 の間で形成される salt-bridge はインテグリンを非活性化状態に保っている。Talin F3 ドメインが結合すると、 $\alpha$ IIb-R995 と  $\beta$ 3-D723 の間の salt-bridge が失われ、F3 ドメインと  $\beta$ 3 インテグリンの間に新たな salt-bridge が形成される。

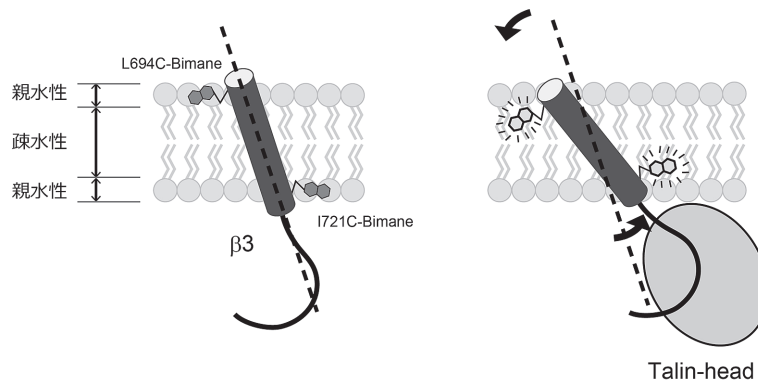


図8  $\beta$ 3 インテグリン細胞内領域の構造変化の検出  
 $\beta$ 3 インテグリン膜貫通領域を含む合成タンパクを人工的な細胞膜である nanodisc へ埋め込む。細胞膜貫通領域の両端は bimane を結合させてあり、talin-head の結合が  $\beta$ 3 細胞膜貫通領域の傾きを変化させ、bimane の周囲が細胞膜内部の疎水性に変わるため bimane が蛍光を発するようになる。

態となる<sup>41)</sup>。Anthisらは細胞内において、この salt-bridge が talin-head ドメインにより失われるという、talin による  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化誘導を考える上で重要な報告をしている<sup>42)</sup>。Talin-head が  $\beta$ 3 細胞内領域へ結合すると、F3 ドメインの K324 が  $\beta$ 3-D723 の近傍に位置する。すると  $\beta$ 3-D723 に対して  $\alpha$ IIb-R995 と F3 ドメイン K324 が競合した結果、新たな salt-bridge が  $\beta$ 3-D723/talinF3-K324 の間に形成される(図7)。 $\beta$ 3-D723/ $\alpha$ IIb-R995 の間の salt-bridge を失うことで  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の細胞内領域は大きく解離することになり、膜貫通領域の形態にも変化がおよび細胞外領域の構造変化に影響すると考えられる。このような talin が膜貫通領域の構造におよぼす影響を直接評価した

報告はこれまでなかったが、2012年にKimらは bimane と呼ばれる蛍光色素を  $\beta$ 3 膜貫通領域合成ペプチドの両端に結合し、人工的な細胞膜 nanodisc<sup>43)</sup>に埋め込み、talin による膜貫通領域構造変化の評価を試みた(図8)<sup>44)</sup>。Bimane は疎水性の環境に置かれると蛍光を発するが、最初  $\beta$ 3 膜貫通領域に結合した bimane は細胞膜の表面の親水性部分に位置するため蛍光は弱い。ここに talin-head を加えると、細胞膜領域の両端で有意に蛍光の増加が見られた。これは膜貫通領域の両端の環境が疎水性に変化、つまり膜貫通領域が細胞膜に対する傾きを増し、膜貫通領域の両端が細胞膜の内部にもぐりこんだことを意味している。この傾きの増加には、talin-head-K324/

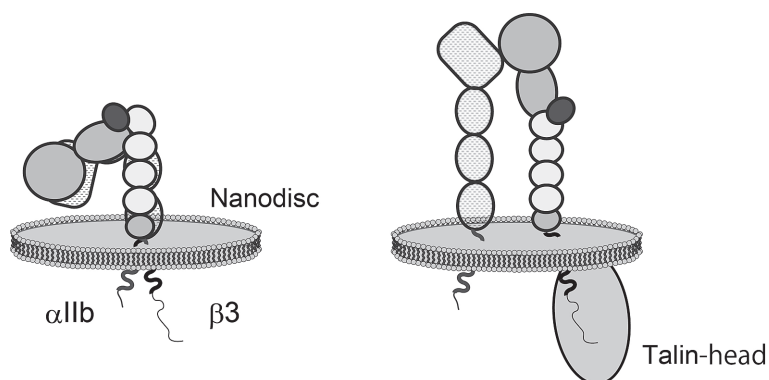


図9 Nanodisc上の $\alpha$ IIb $\beta$ 3の構造変化  
Nanodiscへ埋め込んだ血小板より精製した完全長インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3に対して、Talin-headが $\beta$ 3細胞内領域へ結合すると、細胞外領域が折れ曲がり構造から起き上がり構造へと変化する。

$\beta$ 3-D723の間の新たな salt-bridge の形成が必要であり、変異を導入し salt-bridge の形成を障害した talin-head-K324D では、bimane の蛍光は増加しない、すなわち膜貫通領域の角度に変化が見られない。

## 7. Talin による nanodisk 上の $\alpha$ IIb $\beta$ 3 細胞外領域の構造変化

このように多くの研究結果がインテグリン膜貫通領域、細胞内領域における構造変化のインテグリン活性化誘導への関与を示唆している。しかし、inside-out シグナルによる talin の  $\beta$ 3 細胞内領域への結合が、実際に  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 細胞外領域の起き上がり構造を誘導できるかどうかは不明であった。そこで Ye らは nanodisc と呼ばれる直径 10~13 nm のリン脂質二重膜<sup>43)</sup>に血小板ライセートより精製した  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を埋め込み検討を行った(図9)<sup>45)</sup>。ひとつの nanodisc には膜貫通領域と細胞内領域を含んだ完全長  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が 1 分子組み込まれる場合が多く、clustering と呼ばれる  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 同士の凝集が起こらない状態での観察が可能である。 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を発現する nanodisc に精製した野生型 talin-head を加えると、CHO 細胞などと同様に  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化認識抗体 PAC1<sup>46)</sup> の結合が増加する。この時、電子顕微鏡による nanodisc 上の  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を観察すると、talin-head を加える前には 90% の  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が高さ 11 nm の折れ曲がり構造をとっていたが、talin-head を加えると高さ 19 nm の起き上がり構造の  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が有意に増加していた。

この結果は talin-head の  $\beta$ 3 細胞内領域への結合が実際に細胞外領域の構造変化を誘導し、活性化を誘導していることを示す重要なものである。

## 8. おわりに

これまでにインテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の活性化機構を対象とした非常に多くの試みが報告され、インテグリン細胞外領域の構造変化、talin による細胞内領域、膜貫通領域の変化など多くのことが明らかとなったが、talin の結合に始まる細胞内の構造変化がいかに関与する  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 細胞外領域の複雑な構造変化、活性化に至るかについての一連の詳細な制御機構については依然として不明な点が多く残されている。さらにインテグリン活性化に重要とされる Kindlin-3 などの分子が  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の構造に与える影響も検討する必要があると考えられる<sup>47, 32, 48)</sup>。今後のさらなる研究の積み重ねにより  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化機構が解明され、動脈血栓性疾患のコントロールの改善につながることを期待される。

著者全員の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

## 文献

- 1) Hynes RO: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687, 2002.



- 2) Takada Y, Ye X, Simon S: The integrins. *Genome Biol* **8**: 215, 2007.
- 3) Nurden AT, Pillois X, Wilcox DA: Glanzmann thrombasthenia: state of the art and future directions. *Semin Thromb Hemost* **39**: 642–655, 2013.
- 4) Tomiyama Y: Glanzmann thrombasthenia: integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 deficiency. *Int J Hematol* **72**: 448–454, 2000.
- 5) Collier BS, Shattil SJ: The GPIIb/IIIa (integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* **112**: 3011–3025, 2008.
- 6) Shattil SJ, Newman PJ: Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* **104**: 1606–1615, 2004.
- 7) Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillips DR: Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* **260**: 1743–1749, 1985.
- 8) Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS: Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem* **267**: 16637–16643, 1992.
- 9) Zucker MB, Masiello NC: Platelet aggregation caused by dithiothreitol. *Thromb Haemost* **51**: 119–124, 1984.
- 10) Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA: Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *Science* **294**: 339–345, 2001.
- 11) Luo BH, Carman CV, Springer TA: Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**: 619–647, 2007.
- 12) Luo BH, Springer TA: Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 579–586, 2006.
- 13) Zhu J, Luo BH, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA: Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell* **32**: 849–861, 2008.
- 14) Nicolaou F, Teodoridis JM, Park H, Georgakis A, Farokhzad OC, Böttinger EP, Da Silva N, Rousselot P, Chomienne C, Ferenczi K, Arnaout MA, Shelley CS: CD11c gene expression in hairy cell leukemia is dependent upon activation of the proto-oncogenes ras and junD. *Blood* **101**: 4033–4041, 2003.
- 15) Adair BD, Xiong JP, Maddock C, Goodman SL, Arnaout MA, Yeager M: Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 in a complex with fibronectin. *J Cell Biol* **168**: 1109–1118, 2005.
- 16) Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA: New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* **102**: 1155–1159, 2003.
- 17) Zhu J, Boylan B, Luo BH, Newman PJ, Springer TA: Tests of the extension and deadbolt models of integrin activation. *J Biol Chem* **282**: 11914–11920, 2007.
- 18) 高木淳一：シグナル伝達におけるインテグリンの構造変化。血栓止血誌 **14**: 3–10, 2003.
- 19) 高木淳一：血小板インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の立体構造から解くリガンド認識の構造的基盤。血栓止血誌 **16**: 39–46, 2005.
- 20) 島岡要： $\beta$ 2 インテグリン：活性化のメカニズムとアロステリックインヒビター。血栓止血誌 **15**: 321–333, 2004.
- 21) Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH: The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 288–300, 2010.
- 22) Critchley DR, Gingras AR: Talin at a glance. *J Cell Sci* **121**: 1345–1347, 2008.
- 23) Burridge K, Connell L: A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *J Cell Biol* **97**: 359–367, 1983.
- 24) Monkley SJ, Zhou XH, Kinston SJ, Giblett SM, Hemmings L, Priddle H, Brown JE, Pritchard CA, Critchley DR, Fässler R: Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Dev Dyn* **219**: 560–574, 2000.
- 25) Nieswandt B, Moser M, Pleines I, Varga-Szabo D, Monkley S, Critchley D, Fässler R: Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *J Exp Med* **204**: 3113–3118, 2007.
- 26) Petrich BG, Marchese P, Ruggeri ZM, Spiess S, Weichert RA, Ye F, Tiedt R, Skoda RC, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH: Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *J Exp Med* **204**: 3103–3111, 2007.
- 27) Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA: Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**: 103–106, 2003.
- 28) Petrich BG: Talin-dependent integrin signalling in vivo. *Thromb Haemost* **101**: 1020–1024, 2009.
- 29) Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, Alvarez BG, Fujioka Y, Liddington RC, Ginsberg MH: The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* **277**: 21749–21758, 2002.
- 30) Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJ, Hynes RO, Ginsberg MH: The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* **274**: 28071–28074, 1999.
- 31) Goksoy E, Ma YQ, Wang X, Kong X, Perera D, Plow EF, Qin J: Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol Cell* **31**: 124–133, 2008.
- 32) Moser M, Legate KR, Zent R, Fässler R: The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**: 895–899, 2009.
- 33) Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA, Puzon-McLaughlin W, Lafuente EM, Boussiotis VA, Shattil SJ, Ginsberg MH: Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Curr Biol* **16**: 1796–1806, 2006.
- 34) Watanabe N, Bodin L, Pandey M, Krause M, Coughlin S, Boussiotis VA, Ginsberg MH, Shattil SJ: Mechanisms and consequences of agonist-induced talin recruitment to platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J Cell Biol* **181**: 1211–1222, 2008.
- 35) Song X, Yang J, Hirbawi J, Ye S, Perera HD, Goksoy E, Dwivedi P, Plow EF, Zhang R, Qin J: A novel membrane-dependent on/off switch mechanism of talin FERM domain at sites of cell adhesion. *Cell Res* **22**: 1533–1545, 2012.
- 36) Petrich BG, Fogelstrand P, Partridge AW, Yousefi N, Ablooglu AJ, Shattil SJ, Ginsberg MH: The antithrombotic potential of selective blockade of talin-dependent integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (platelet GPIIb-IIIa) activation. *J Clin Invest* **117**: 2250–2259, 2007.

- 2007.
- 37) García-Alvarez B, de Pereda JM, Calderwood DA, Ulmer TS, Critchley D, Campbell ID, Ginsberg MH, Liddington RC: Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* **11**: 49–58, 2003.
  - 38) Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH, Campbell ID: Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* **128**: 171–182, 2007.
  - 39) Nakazawa T, Tadokoro S, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Exp Hematol* **41**: 79–90.e1, 2013.
  - 40) Stefanini L, Ye F, Snider AK, Sarabakhsh K, Piatt R, Paul DS, Bergmeier W, Petrich BG: A talin mutant that impairs talin-integrin binding in platelets decelerates  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 activation without pathological bleeding. *Blood* **123**: 2722–2731, 2014.
  - 41) Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, Shattil SJ, Ginsberg MH: Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* **271**: 6571–6574, 1996.
  - 42) Anthis NJ, Wegener KL, Ye F, Kim C, Goult BT, Lowe ED, Vakonakis I, Bate N, Critchley DR, Ginsberg MH, Campbell ID: The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J* **28**: 3623–3632, 2009.
  - 43) Civjan NR, Bayburt TH, Schuler MA, Sligar SG: Direct solubilization of heterologously expressed membrane proteins by incorporation into nanoscale lipid bilayers. *Biotechniques* **35**: 556–560, 562–563, 2003.
  - 44) Kim C, Ye F, Hu X, Ginsberg MH: Talin activates integrins by altering the topology of the  $\beta$  transmembrane domain. *J Cell Biol* **197**: 605–611, 2012.
  - 45) Ye F, Hu G, Taylor D, Ratnikov B, Bobkov AA, McLean MA, Sligar SG, Taylor KA, Ginsberg MH: Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *J Cell Biol* **188**: 157–173, 2010.
  - 46) Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF: Changes in the platelet membrane glycoprotein IIB.IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* **260**: 11107–11114, 1985.
  - 47) Karaköse E, Schiller HB, Fässler R: The kindlins at a glance. *J Cell Sci* **123**: 2353–2356, 2010.
  - 48) Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fässler R: Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* **14**: 325–330, 2008.