

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18370048  
 研究課題名（和文） 新型の血管内皮増殖因子（VEGF-F）の構造と機能の解明  
 研究課題名（英文） Studies on the structure and function of new vascular endothelial growth factors  
 研究代表者  
 森田 隆司（MORITA TAKASHI）  
 明治薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：90128108

研究成果の概要：申請者は、VEGFの分子作用機序の解明を目標に、へび毒腺に発現する毒型VEGF（VEGF-F）に焦点を当て、生化学的および生物学的な解析を行った。その結果、毒へびに発現する毒型VEGFは機能的に重要な領域の構造（受容体結合ループおよびC末端領域）を多様化させることで、その機能を多様化していることを明らかにした。次に、vamminをはじめとする異なるリガンド特性を持つVEGFを用いた超微形態学的解析より、VEGFの血管透過性の亢進に伴う血管壁の超微構造変化（VVOおよびfenestrae形成）は、リガンドの受容体選択性によって異なることを示した。さらに、種々のへび毒よりVEGFとは異なる新しいVEGF受容体結合タンパク質、KDR-bp（Lys<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>）を同定した。VEGFの血管透過性亢進作用は癌性浮腫や腹水、炎症細胞・癌細胞浸潤の原因となることから、本研究の成果は、それら病態機序の解明および分子治療に貢献することと期待している。さらに、KDR-bpの発見はKDRの新たな機能探索ならびにVEGFおよびVEGF受容体分子標的物質の開発研究において有用なツールとなると考える。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：血管内皮増殖因子・VEGF・血管透過性・生体生命情報学・分子認識・蛋白質・ゲノム・生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor; VEGF-A<sub>165</sub>）は165アミノ酸残基から成る分子量約45,000のホモ二量体タンパク質であり、血管新生作用や血管透過性亢進作用など多彩な生物活性を示す。その作

用は内皮細胞膜上の受容体Flt-1（VEGF受容体1）およびKDR（VEGF受容体2）を介して発現する。当研究室ではへび毒より2種の新規なVEGF様タンパク質（vamminおよびVR-1と命名）を見出している。VamminおよびVR-1はKDRのみに特異的に結合しVEGF-A<sub>165</sub>に比べ強

力な生物活性を示すことから、7番目のVEGFサブタイプとしてVEGF-Fと分類されている。近年、種々の組織細胞生物学的解析および遺伝子改変動物を用いた解析よりVEGFの多様な生理機能が明らかにされてきたが、タンパク質レベルに焦点を当てた解析は少なく、リガンド-受容体間の分子相互作用や生物活性の発現メカニズムも未だ不明な点が多い。

我々はVEGFの構造機能相関について明らかにする目的で、(1)VEGF-Fの構造および機能の多様性、(2)機能発現メカニズムが不明なVEGFの血管透過性亢進活性について、生理的なVEGFとは異なるリガンド特性を持つVEGF-Fを用いて、生物学的および超微形態学的に解析、(3)抗血管病薬の創薬シーズを見つけるため、種々ヘビ毒中よりVEGF受容体のアンタゴニスト分子の探索、の3点について遂行する。

## 2. 研究の目的

新型のVEGF-Fの構造と機能相関を解明することで、VEGF分子と機能の多様性及びVEGFの強力な生物活性の発現メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) VEGF-Fの細胞生物学的機能解析

VEGF-FはVEGF-A (VEGF165)と同程度の濃度で血管内皮細胞の増殖を惹起するが (EC50 = 100 pM)、VEGF-Aに比べ約2倍の最大増殖率を示す。この強力な生物活性は*in vivo*でも観察され、VEGF-Aに比べ強力な血圧降下作用を有している。VEGF-Fの強力な生物活性の発現機序を同定する目的で、培養細胞系を用いてVEGF-Fの細胞内シグナル伝達機構についてVEGF-Aと比較しながら検討した。またVEGF-Aには細胞増殖活性の他に細胞遊走作用・血管透過性亢進作用があることが知られているので、これらの生物活性に対しても定量的に比較検討を行った。

### (2) 新たなVEGF様分子の探索・同定

ごく最近、他の研究グループからVEGFR-2だけでなくVEGFR-1にも結合する新しいヘビ毒VEGFが同定された\*。ヘビ毒タンパク質の加速進化と多様性を考慮すると\*\*、さらに異なる受容体選択性および生物活性を持ったVEGF様分子が含まれていると期待できる。そこで新たなVEGF様分子の同定を目的とし、免疫学的および遺伝子工学的手法を用いて各種ヘビ毒を用いスクリーニングした。現在、抗VEGF-F抗体を使ったスクリーニングで予備的な知見を得ている。

\*Takahashi, T. *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 46304-46314 (2005)

\*\*Ogawa, T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8557-8561 (1992)

### (3) 血管新生系に作用する新規な毒素成分の探索

VEGFR-2 (KDR)は、血管新生・血管形成において中心的な役割を果たす。当教室で見出したVEGF-FはVEGFR-2のみを活性化する初めての毒素タンパク質である。ヘビ毒には同一の生体分子を標的とするアクチベータおよびインヒビター分子が含まれることがあることから、種々のヘビ毒にVEGFR-2に作用する新たな毒素成分を探索した。その結果、つい最近アメリカヌママムシ毒中に新たなKDR結合タンパク質を同定した。同様の作用を示すタンパク質は他のヘビ毒にも含まれている可能性を考え、さらにスクリーニングを行い単離・構造決定した。

### (4) VEGF-Fの高いレセプター選択性に関する構造生物学的研究

VEGF-FはVEGFR-2にのみ特異的に結合するリガンドである。我々は結晶構造解析から、VEGF-FはVEGF-Aと比べてレセプター結合ループの構造と表面電荷が大きく異なっていることを明らかにしている。VEGF-Fの高いレセプター選択性が、これらの構造上の差異に起因することを明らかにするため、VEGF-Aの遺伝子組換え体を作成し、そのレセプター結合性について検討した。

### (5) VEGF-FのC末端ヘパリン結合領域の新たな機能の探索

VEGF-A (VEGF165)のC末端には、55アミノ酸残基で構成されるヘパリン結合領域が存在する (Keyt, B. A. *et al. J. Biol. Chem.* **271**, 7788-7795, 1996; Fairbrother, W. J. *et al. Structure* **6**, 637-648, 1998)。一方、VEGF-FのC末端領域は16-17アミノ酸残基と短い。つい最近、我々は合成ペプチドを用いた検討からVEGF-FのC末端領域はVEGF165と同様にヘパリン結合領域として機能し、その生物活性に関与していることを明らかにした。また、VEGF-FのC末端ペプチドはVEGF165の生物活性(細胞増殖および血圧降下作用)を抑制することから、VEGF165が結合するヘパリンと同様のヘパリン構造を認識していると考えられる。しかし、一次構造の大きな違いとヘビ毒タンパク質の加速進化を考えると、単にヘパリン結合領域としてのみ機能しているとは考えにくい。そこで、VEGF-AのC末端ヘパリン結合領域をVEGF-FのC末端領域と置換した組換えタンパク質を調製し、その生物活性および生化学的性質について検討した。

### (6) 受容体選択性・親和性の異なるVEGFの生物活性の評価

VEGFは、それぞれ異なる受容体選択性・親

和性を示すことで多様な生理活性を発現する。しかし内因性のサブタイプの生理活性を比較検討しても、これまでの報告以上の情報を得ることは出来ない。ヘビ毒には哺乳動物には見られない受容体結合性を示すVEGFが含まれていることから、これらの分子の生物活性を比較することで、それぞれの受容体の機能について(受容体同士のクロストークを含めて)新たな情報を得ることが出来る。このような観点から、得られたVEGFの生化学的性質およびいくつかの生物活性について哺乳動物由来のVEGFと比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組織型および毒型VEGFの比較生化学的解析

種々のヘビ毒タンパク質はしばしば、生物活性に重要な領域を選択的に変化させることで多様な機能を獲得することが知られている。そこで我々は、VEGF-F(毒型VEGF)の分子多様性を明らかにするため、毒ヘビに発現する種々の組織型VEGF(ヘビVEGF-A)および毒型

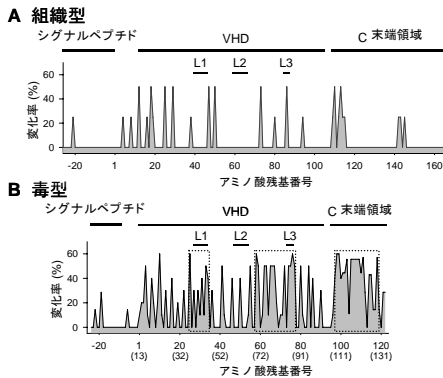


図1. 組織型および毒型 VEGF の分子多様性

毒型 VEGF-F のカッコ内のアミノ酸残基番号は、相対する組織型 VEGF-A の残基番号を示す。多様化領域を点線四角で囲んだ(B)。VHD; VEGF ホモロジドメイン, L1-3; ループ1-3

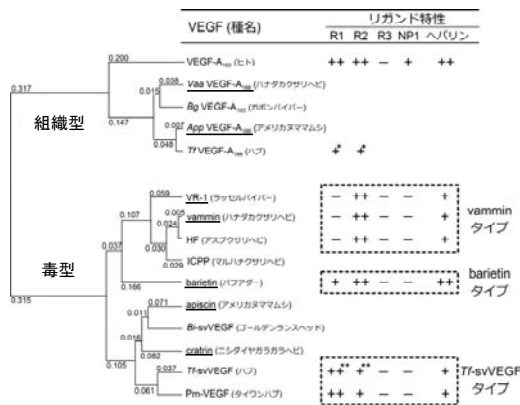


図2. 組織型および毒型 VEGF の分子系統樹とリガンド特性

本研究によりクローニングした7つの VEGF 分子を下線で示す。分子系統樹は VEGF ホモロジドメインの一次構造を基に作成した。  
\* 免疫沈降解析結果より \*\* 結合アッセイより結合親和性を算出した。  
R1; Flt-1, R2; KDR, R3; Flt-4, NP1; ニューロロニン-1  
-; 結合しない, +++; 結合する

VEGF (VEGF-F) の配列を決定した。それらを

比較した結果、組織型 VEGF の構造は互いに高く保存されていたのに対し(>94%)、毒型 VEGF は多様性に富んでおり、特に受容体結合ループ1とループ3およびC末端の補助因子と結合すると予測される領域が最も多様化していた(図1)。毒ヘビ由来の組織型および毒型 VEGF を機能のおよび系統発生的に分類すると、毒型 VEGF は組織型とは独立した進化を遂げたと予測された。また、毒型 VEGF は少なくとも3群に分けることができることが分かった(図2)。以上の結果から、ヘビ毒腺に発現する毒型 VEGF (VEGF-F) は機能に特に重要な領域の構造を変化させることで、その機能を多様化していると推定した。

##### (2) VEGFの血管透過性亢進活性の超微形態学的解析

VEGFの血管透過性亢進作用は血管形成作用とは独立して引き起こされることが知られている。その作用はKDRを介すると考えられているが、幾つかの相反する報告もあり、そのメカニズムは未だ明確ではない。我々は受容体選択性の異なる3種の VEGF (VEGF-A<sub>165</sub>、placenta growth factor-1 (PlGF-1)、vammin) を用い、生理学および超微形態学の両面から VEGFの血管透過性亢進作用の解析を行った。Milesアッセイにより血管内から血管外組織への色素漏出量を測定した結果、VEGF-A<sub>165</sub>およびvamminは色素漏出を呈したのに対し、Flt-1のみに結合するPlGF-1は色素漏出を呈さなかった(図3A)。また、vamminはVEGF-A<sub>165</sub>よりも強力な色素漏出を引き起こすことが分かった(図3A)。

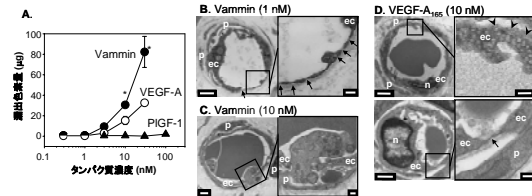


図3. VEGF による色素漏出作用および毛細血管壁超微構造変化

A. Miles アッセイによるサンプル皮内投与10分後の色素漏出量を示す。\*p<0.005  
B-D. 毛細血管の透過電子顕微鏡像。有窓構造(fenestrae)を矢印(\*)、VVOを矢頭(▶)で示す。拡大領域を四角で囲む。ec: 内皮細胞, p: 周皮細胞, n: 核 bar: 1 mm (全体写真) および 200 nm (拡大写真)

VEGFは、毛細血管壁にその血管透過性を亢進させると予想される小胞-空胞オルガネラ(Vesiculo-vacuole organelle; VVO: 内皮細胞内に多数生じる小孔)と有窓構造(fenestrae: 径50-80 nmの内皮細胞膜に開いた穴)の2種の超微構造形成を引き起こすことが知られている(図4)。

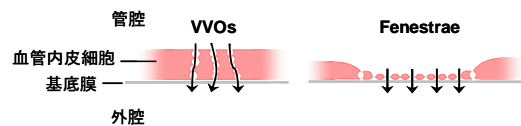


図4. VEGFによる血管壁の超微構造変化

VEGF-A<sub>165</sub>およびvamminにより惹起される超

微構造変化を比較したところ、VEGF-A<sub>165</sub>は、ほぼ同程度の頻度でVVOとfenestraeを形成したのに対し(35%および24%)、vamminはVVOに比べfenestraeを優位に形成させた(10%および53%)(図3B-D)。現在までにVEGF-A<sub>165</sub>の超微形態学的解析より、VVOの出現頻度とfenestraeの出現頻度は反比例することから、VVOからfenestraeが形成される機序がすでに提唱されている。そこで、vamminによる超微構造変化がVEGF-A<sub>165</sub>に比べ短時間で生じるためにfenestrae形成が優位に観察された可能性を考え、より短時間の超微構造変化を捉えるため皮内投与後の暴露時間を10分から3分に短縮して同様の実験を行った。その結果、10分間暴露時と同様にvamminはfenestrae形成のみを優先的に引き起こした(7%および16%)。以上の結果から、vamminはfenestrae形成を優位に惹起すること、またVVOおよびfenestraeは異なる機序により形成されると推論した。Fenestrae形成を優位に誘導するvamminがVEGF-A<sub>165</sub>に比べ色素漏出作用が高いことを考えると、fenestraeはVEGFの血管透過性亢進作用においてより機能的な超微構造であると考察した。興味深いことに、超微構造変化はFlt-1にのみ結合するPlGF-1刺激下においても引き起こされたが、色素漏出は全く観察されなかった。したがって、VEGFの色素漏出作用と超微構造変化は異なる機序により引き起こされると考えた。

### (3) VEGF受容体結合タンパク質KDR-bpの分子特性

ヘビ毒には生体分子の特異的なアクチベーターやインヒビターが含まれていることが知られている。VEGFのアンタゴニストは抗血管病治療薬のシードとなりうることから、我々は、ヘビ毒よりVEGF-Fとは異なるVEGF受容体結合分子の探索を試みた。スクリーニングの結果、アメリカヌママムシ毒より新しいKDR結合タンパク質を見出し、KDR-binding protein (KDR-bpと略)と命名した。その一次構造を解析した結果、KDR-bpは不活性型のホスホリパーゼA<sub>2</sub>: Lys<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>ファミリーに分類されるタンパク質であった。ヘビ毒に含まれるLys<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>は、PLA<sub>2</sub>活性の代わりに強力な筋壊死活性を示すPLA<sub>2</sub>ホモログ分子として報告されているが、その分子機序は不明である。種々の増殖因子受容体を用いたBiacore相互作用解析の結果、KDR-bpはKDRおよびFlt-1の細胞外ドメインに結合性を示したが、相同な構造を持つ他の増殖因子受容体であるPDGF受容体やFGF受容体には結合しなかった。KDR-bpとKDRの結合はVEGF-A<sub>165</sub>によって競合的に阻害され、またKDR-bpはVEGF-A<sub>165</sub>のヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖活性を阻害することから、KDR-bpはKDRのアンタゴニスト様の活性を示すと考えた。この結果により、KDR-bpは、近

年報告された金属酵素インヒビターTIMP-3に次いで3つ目のVEGF受容体結合タンパク質であることを明らかにした。

### (4) VEGF受容体結合タンパク質KDR-bpの結合部位の同定

血管内皮増殖因子VEGFはその受容体KDRに結合することで、多彩な生理作用を示す。我々の教室では、ヘビ毒に含まれる不活性型のホスホリパーゼA<sub>2</sub>ホモログ(KDR-bpと命名)はKDRの細胞外ドメインに結合し、アンタゴニスト様の性質を示すことを明らかにしている。本論文では、KDR-bpのKDR結合部位を同定する目的でKDR-bpの一次構造をもとに9種の合成ペプチドを作成し、そのKDR結合性を検討した。その結果、C末端のループ領域のペプチドがKDR-bpと同等の親和性で結合することが明らかとなった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

1. Yamazaki Y, Matsunaga Y, Tokunaga Y, Obayashi S, Saito M and Morita T: Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. *J. Biol. Chem.* (査読有) in press
2. Matsunaga Y, Yamazaki Y, Suzuki H, Morita T: VEGF-A and VEGF-F evoke distinct changes in vascular ultrastructure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) **379**: 872-875 (2009)
3. Fujisawa D, Yamazaki Y, Lomonte B, Morita T: Catalytically inactive phospholipase A<sub>2</sub> homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region. *Biochem. J.* (査読有) **411**: 515-522 (2008)
4. Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, Pink R, Buckley SMK, Greig JA, Denby L, Custers J, Morita T, Francischetti IMB, Monteiro RQ, Barouch DH, Rooijen NV, Napoli C, Havenga MJE, Nicklin SA, Baker AH: Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* (査読有) **132**: 397-409 (2008)
5. Yamazaki Y, Nakano Y, Imamura T, Morita T: Augmentation of vascular permeability of VEGF is enhanced by

- KDR-binding proteins.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) **355**: 693-699 (2007)
6. Kaji T, Yamamoto C, Oh-i M, Fujiwara Y, Yamazaki Y, Morita T, Plaas AH, Wight TN: The vascular endothelial growth factor VEGF165 induces perlecan synthesis via VEGF receptor-2 in cultured human brain microvascular endothelial cells.  
*Biochim. Biophys. Acta.* (査読有) **1760**: 1465-1474 (2006)
7. Tokunaga Y, Yamazaki Y, Morita T: Localization of heparin- and neuropilin-1-recognition sites of viral VEGFs.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) **348**: 957-962 (2006)
8. Atoda H, Yokota E, Morita T: Characterization of a monoclonal antibody B1 that recognizes phosphorylated Ser-158 in the activation peptide region of human coagulation factor IX.  
*J. Biol. Chem.* (査読有) **281**: 9314-9320 (2006)
9. Suzuki-Inoue K, Fuller GLJ, García A, Eble JA, Pöhlmann S, Inoue O, Gartner TK, Hughan SC, Pearce AC, Laing GD, Theakston RD, Schweighoffer E, Zitzmann N, Morita T, Tybulewicz VLJ, Ozaki Y, Watson SP: A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2.  
*Blood* (査読有) **107**: 542-549 (2006)
10. Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, Pengo V, Barban M, Padriani R, Ieiri I, Otsubo K, Kashima T, Kimura S, Kijima S, Echizen H: Different contributions of polymorphism in *VKORC1* and *CYP2C9* to intra- and inter- population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African- Americans.  
*Pharmacogenetics Genomics* (査読有) **16**: 101-110 (2006)

[学会発表] (計5件)

1. 血液凝固IX因子と抗凝固タンパク質 (IX/X-bpおよびIX-bp) の相互作用に対するMg<sup>2+</sup>の影響: 石川みどり、山崎泰男、森田隆司、第55回毒素シンポジウム、2008/7、山梨
2. 組織型および毒型VEGF (血管内皮増殖因子) のゲノム構造解析: 山崎泰男、齋藤

- 麻衣、徳永優子、森田隆司、第55回毒素シンポジウム、2008/7、山梨
3. 血液凝固IX因子と抗凝固タンパク質 (IX/X-bpおよびIX-bp) の相互作用の速度論的解析: 石川みどり、山崎泰男、森田隆司、日本薬学会128年会、2008/3、横浜
  4. 異なるC末端ドメインを持つVEGFキメラの創製とその生物活性: 卯月博和、山崎泰男、森田隆司、日本薬学会128年会、2008/3、横浜
  5. 組織型と毒型の血管内皮増殖因子のゲノム構造解析とその進化論的考察: 齋藤麻衣、徳永優子、長谷川芳裕、山崎泰男、森田隆司、日本薬学会128年会、2008/3、横浜

[図書] (計2件)

1. Yamazaki Y, Morita T: Snake Venoms and Other Toxic Components Affecting Thrombosis and Hemostasis. In: Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008. (Tanaka K, Davie EW eds), Springer, pp462-482 (2008)
2. Yamazaki Y, Morita T: Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol. Divers.* 10, 515-527 (2006)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 隆司 (MORITA TAKASHI)  
明治薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 18370048

### (2) 研究分担者

山崎 泰男 (YAMAZAKI YASUO)  
明治薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 30308621

### (3) 連携研究者