

Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)의 분자구조와 기능



전 창 덕

1990 경북대학교 자연과학대학 생물학과 (이학사)
 1992 경북대학교 자연과학대학 생물학과 (이학석사)
 1996 경북대학교 자연과학대학 생물학과 (이학박사)
 1998~2000 The Center for Blood Research,
 Harvard Medical School, Research
 Fellow
 1996~현 재 원광대학교 의과대학 미생물학교실 조교수

■ 요약 ■

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)은 T 세포의 활성화나 면역세포가 염증작용이 일어나고 있는 곳으로 옮겨갈 때 중요한 역할을 수행하는 당단백질 (glycoprotein)으로서 2-integrin 계열의 분자인 leukocyte function associated antigen-1 (LFA-1)이나 Mac-1의 수용체이며 세포의 막에 homodimer인 상태로 발현되어진다. ICAM-1은 5개의 세포의 domain과 transmembrane domain (TM) 및 짧은 cytoplasmic domain을 갖고 있으며, dimerization motif는 domain 5 또는 TM인 것으로 알려져 있다. 최근의 crystal 구조분석 결과에 의하면 domain 1에도 dimerization motif가 있는 것으로 추정되어지지만 정확한 실험적인 뒷받침이 되어 있지 않다. 본 연구에서는 domain 1에 dimer를 형성할 수 있는 motif가 존재하는 지에 대한 실험적인 증명과 함께 ICAM-1이 세포의 막에서 어떠한 구조를 갖고 있는지에 대한 최근의 연구성과를 보고하고자 한다.

■ 서 론 ■

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54)은 immunoglobulin super-family (IgSF)에 속하며 2-integrin의 계열인 leukocyte function antigen-1 (LFA-1)과 Mac-1과 결합하여 다양한 면역반응에 관여하

는 매우 중요한 막 단백질 중의 하나이다 (Dustin et al, 1999). 주로 ICAM-1은 내피세포 (endothelial cell), 상피세포 (epithelial cell) 및 섬유아세포 (fibroblastic cell)에 발현되어지며 염증반응을 매개하는 물질인 tumor necrosis factor- (TNF-)나 interleukin-1 (IL-1) 등에 의해 유도되어진다. ICAM-1의 발현이 증가되면 면역반응이 증가되며 염증조직으로 면역세포의 이동이 촉진되어진다. 또한 ICAM-1은 rhinovirus의 수용체로서 작용하기도 하며 Plasmodium falciparum에 의해 감염된 erythrocyte와 결합하기도 한다 (Staunton et al, 1990; Kirchhausen et al, 1993).

ICAM-1은 세포막 외부에 5개의 IgSF domain이 있고 소수성 아미노산 잔기를 가진 transmembrane domain (TM)과 짧은 cytoplasmic domain (Cyt)으로 구성되어져 있다. 전자현미경 사진에 의하면 ICAM-1의 IgSF domain은 짧은 막대기 모양의 구조를 갖고 있으며 그 길이가 약 18.7 nm이다. 현재 ICAM-1의 세포 외 구조 중 domain 1과 2가 밝혀진 상태이며 LFA-1과 결합되는 부위는 domain 1 - sandwich의 중간 끝 부분이다. ICAM-1에 결합하는 LFA-1은 chain의 inserted (I) domain이며 구조적인 변화 (high affinity form)를 거쳐 ICAM-1과 결합되게 된다 (Lu et al, 2001).

ICAM-1은 세포의 막 표면에서 dimer 또는 multimer로서 존재를 하며 (Miller et al, 1995), soluble dimer 형태일 때는 monomer일 때보다 약

100배 정도 강한 결합을 할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Miller et al, 1995). ICAM-1은 세포막에서 아마도 domain 5나 transmembrane 위치에서 dimerization motif가 있을 것으로 예상되어져 있으나 ICAM-1의 crystal 구조에서는 domain 1의 val51이 hydrophobic core site로 존재하여 domain 1에서도 dimerization motif가 존재할 것으로 추정되어져 왔다 (Casasnovas et al, 1998).

저자는 본 연구에서 ICAM-1의 domain 1에 dimerization motif가 있는지를 실험적으로 증명하고 domain 1의 dimerization과 domain 5의 상관관계, 그리고 ICAM-1 구조의 변화가 LFA-1과의 결합에 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 조사를 하였다. 뿐만 아니라 ICAM-1이 dimer로서 어떠한 형태로 세포의 외부에서 분포하고 있는지에 대하여 전자현미경적 접근을 통하여 해독하여 보고자 시도하였다.

■ 본 론 ■

1. C-terminal GCN4 coiled coli에 의한 ICAM-1 dimerization

ICAM-1의 TM은 주로 소수성 아미노산 잔기들이 있으며 이들 소수성 잔기중 glycine은 서로 인접한 ICAM-1의 TM과 dimerization motif를 제공할 것으로 추론되어진다. 이러한 dimerization을 모방하기 위하여 본 실험에서는 ICAM-1의 C-terminal 위치에 yeast GCN4 -helix protein을 PCR 방법에 의하여

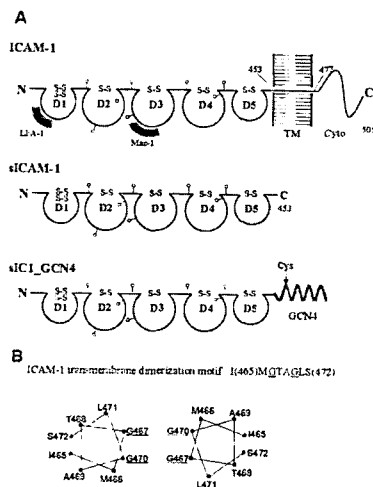


Figure 1. Schematic presentation of C-terminally mutated ICAM-1 constructs (A) and a putative transmembrane domain dimerization motif (B).

fusion 시켰다 (Fig. 1A & B). 또한 dimer가 형성된 후 이를 고정시키기 위하여 GCN4 -helix내에 첫 번째 leucine을 cysteine으로 치환시켜 S-S bond의 형성을 유도하였다. 이렇게하여 발현된 단백질을 SDS/PAGE로 확인한 결과 Fig. 2에서 보는바와 같다. soluble form의 ICAM-1은 monomer로서 분자량이 약 90 kDa인데 반해 GCN4로 fusion시킨 ICAM-1 단백질은 약 두배인 180 kDa 정도이며 이를 DTT로 처리하여 환원시킨 결과 다시 90 kDa를 보였다. 이것은 GCN4 -helix의 fusion을 통하여 ICAM-1 단백질이 dimer로서 발현됨을 나타내어주는 것이었다. ICAM-1 GCN4 단백질을 분리하여 이를 전자현미경에서 관찰한 결과를 Fig. 3에서 보여주고 있다. Monomer 형태의 ICAM-1이 막대모양을 보이는 것과는 달리 dimer는 다양한 형태를 보여주고 있다. Fig. 3의 C에서 보는바와 같이 막대모양, U 모양, 둥근원 모양, 그리고 W 모양을 보이는 것을 발견할 수 있다.

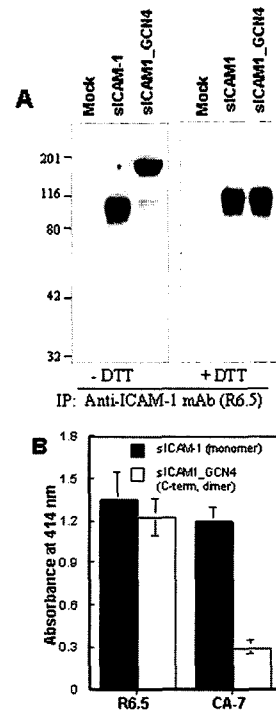


Figure 2. Generation and characterization of C-terminally dimerized ICAM-1. (A) expression from 293T cell. (B) determination of dimer by antibody.

2. 잠재적인 domain 1의 dimerization motif에 cystein기의 치환과 dimer의 형성

ICAM-1의 domain 1에 위치하는 소수성 단면은

ICAM-1의 구조를 결정할 때 dimer의 가능성을 제시하여 주었다 (Casasnovas et al, 1998). 본 연구에서는 이러한 소수성 단면의 일부 아미노산을 cysteine으로 치환함으로써 S-S bond를 형성할 수 있는지를 검정하고자 하였다. 주로 자연적인 상태에서 cysteine 잔기끼리 S-S bond를 형성할 수 있는 조건은 한쪽 아미노산의 C와 맞은편 C의 거리가 4Å 이하일 때 가능하다. Table 1은 ICAM-1 단백질자의 소수성 단면내에 위치하는 아미노산의 거리를 측정하고 각 아미노산이 표면에 노출되어 있는 정도를 나타내어 주는 결과이다.

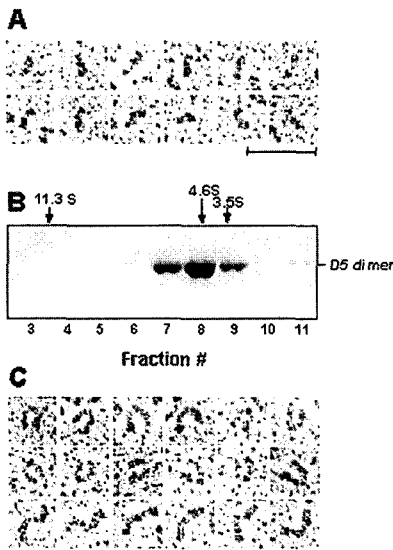


Figure 3. Purification and visualization of C-terminal dimers. A. Representative electron micrographs of purified and rotary shadowed sICAM-1. Bar = 50 nm. B. Purified sICAM-1_GC N4 was sedimented through a glycerol gradient and fractions were subjected to SDS 10% PAGE and staining. The positions of standards sedimented in a parallel gradient are shown above the gel; fraction numbers are shown below the gel. C. Gradient-purified dimers were subjected to rotary shadowing and electron microscopy. Representative "U"-shaped and "V"-shaped dimers, ring-like dimers or "W"-shaped tetramers are depicted.

본 결과로 미루어 볼 때 Leu-42와 Leu-43을 cysteine으로 치환하였을 때 가장 dimer를 형성할 가능성이 높음을 시사하였다. 이를 바탕으로하여 leucine을 cysteine으로 치환한 다음 이를 CHO Lec3.2.8.1 세포에서 발현시킨 결과 computer로 예견한 결과와 매우 흡사한 실험결과가 도출됨을 알 수 있었다. Fig. 4는 leucine기를 cysteine으로 치환한 다음 이를 SDS/PAGE에서 확인한 결과이다. L42C와 L43C만 dimer를 형성하고 있음을 알 수 있는데 이것은 ICAM-1이 세포의 표면에서 발현될 때 domain 1에서 dimerization motif를 중심으로 dimer가 형성되어질 수 있음을 암시하는 결과이다.

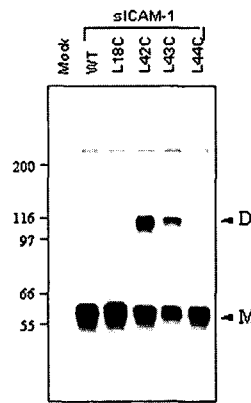


Figure 4. Generation of covalently dimerized sICAM-1 by formation of a disulfide bond in domain 1.

3. C-terminal과 domain 1에 cysteine을 치환하여 발현시킨 ICAM-1 단백질의 구조와 기능

지금까지의 결과는 ICAM-1이 생체막에서 다양한 형태로 존재할 가능성을 제시하여 주고 있다. 즉, ICAM-1_GC N4에서 발견되어지는 U 모양, 둥근원 모양, 그리고 W 모양이 실질적으로 일어날 수 있는지를 증명하기 위하여 ICAM-1_GC N4의 단백질에 leucine 43을 cysteine으로 치환하여 CHO.Lec 3.2.8.1 세포에서 발현시켜 보았다. 이 결과 Fig. 5A에서 보는바와 같이 L43C를 치환시킨 ICAM-1_GC N4는 dimer 이외에도 tetramer를 비롯한 oligomer들이 형성됨을 알 수 있었다.

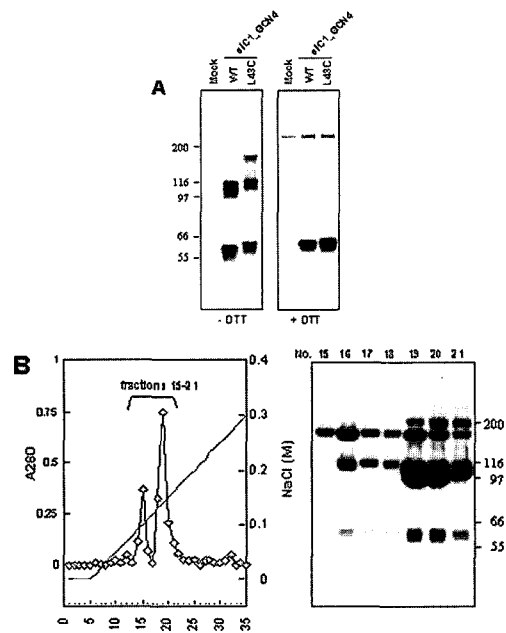


Figure 5. Covalently stabilized domain 1/C-terminal dimers. The domain 1 cysteine mutation L43C was introduced into the sICAM-1_GC N4 C-terminal dimer and the resulting domain 1/C-terminal constructs were expressed in CHO.Lec 3.2.8.1 cells. A. SDS/PAGE. B. ion-exchange chromatography and SDS/PAGE.

SDS/PAGE 상에서의 단백질의 구조를 더 정확히 알아보기 위하여 ion-exchange로 단백질을 분리한 다음 (Fig. 5B) 각 fraction에 대하여 전자 현미경상에서 관찰하여 본 결과 예견한 것과 같이 둥근원 모양, U 모양, 그리고 W 모양의 ICAM-1 단백질을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6). 이러한 결과는 ICAM-1 단백질이 생체 세포막 위에서 다양한 형태의 dimer 또는 tetramer로서 존재할 수 있음을 나타내는 결과이다.

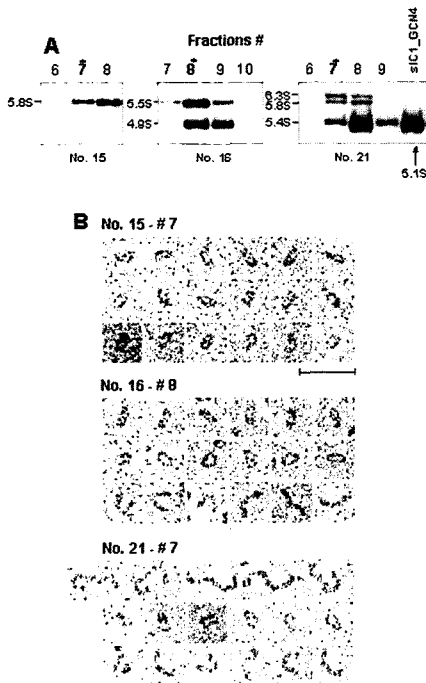


Figure 6. Glycerol gradient sedimentation and visualization of domain 1/C-terminal dimers. Fractions #15, #16 and #21 from Fig.5 B were separately subjected to glycerol gradient sedimentation (A). Fraction #15, #16, and #21 were subjected for rotary shadowed electron micrographs.

Integrin과 같은 막 단백질들은 구조의 변화에 따라 반응 친화력도 변화가 일어날 수 있다. ICAM-1의 경우에도 상기와 같은 구조의 변화가 LFA-1과의 반응에 영향을 미칠 수 있는지에 대한 실험을 실시하였다. Fig. 7에서 보는바와 같이 C-terminal dimer (U자 모양), domain 1/C-terminal dimer (둥근원 모양), 및 domain 1 dimer (C-terminal이 open된 dimer) 모두 LFA-1에 대하여 비슷한 결합력을 보였다. 그러나 monomer인 sICAM-1의 경우에는 dimer와 다른 affinity를 보였다.

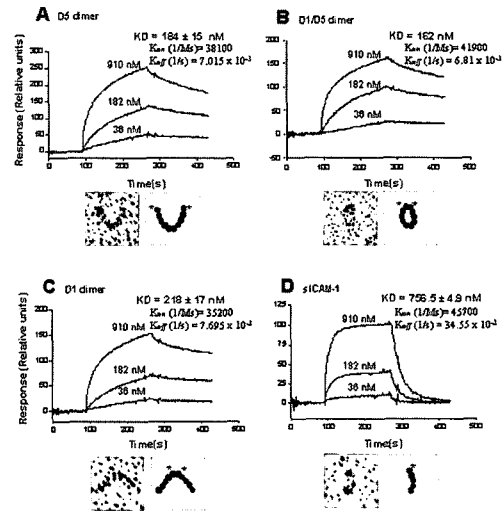


Figure 7. Purified locked open LFA-1 domain was immobilized on a BIAcore sensor chip surface and binding of ICAM-1 preparations was measured under a constant flow of 10–60 ml/min in TBS containing 1 mM MgCl₂. Curve fitting of the association and dissociation phases with BIAevaluation 3.1 software was used to calculate k_{on} , k_{off} and KD values. All values are expressed as mean + s.e.m. for three separate experiments, with the exception of the domain 1/C-terminal dimer for which only enough material for two experiments was generated.

■ 장래전망 ■

ICAM-1이 LFA-1 또는 Mac-1과 결합하거나 효과적으로 생물학적 기능을 나타내기 위해서는 막의 표면에서 적절한 방향성을 갖고 분포되어져야 할 것이다. 뿐만 아니라 ICAM-1은 때로는 LFA-1과 함께 막의 표면에 발현하고 있기 때문에 같은 세포내에 발현되어져 있는 LFA-1과는 반응을 하지 않으면서 인접한 세포에 발현된 LFA-1과 반응해야 하기 때문에 방향성과 기능은 매우 밀접한 관계를 갖고 있을 것으로 간주되어진다. 지금까지의 보고에 의하면 ICAM-1은 domain 5나 TM에 dimerization motif가 있을 것으로 간주되어져 왔다 (Miller et al, 1995). 특히 TM에 있는 glycin rich patch는 이러한 가능성을 높게 시사하고 있는 것이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 ICAM-1의 dimerization motif가 domain 1에도 있음을 실험적으로 증명하였으며 domain 1의 dimerization은 ICAM-1의 막 표면에서의 topology에 큰 영향을 미치고 있음을 시사하고 있다.

막 표면에서 ICAM-1의 독특한 topology는 세포와 세포간의 부착에 중요한 영향을 미치고 있음을 암시한다. 즉, domain 1을 통한 dimerization은 원 모양의 dimer나 W 모양의 tetramer를 형성할 수 있으며

세포의 표면에서 막 단백질의 방향성에 제한을 줄 수 있다는 것이다. 또한 ICAM-1 분자의 비례성을 생각한다면 원모양이나 U 모양으로부터 W 모양을 형성하기 위해서는 ICAM-1 분자가 세포막의 표면에서 180도 회전할 수 있는 가능성도 제시하고 있다. 이러한 점을 감안해 볼 때 ICAM-1 막 단백질의 세포막 표면에서의 구조는 Fig. 8에서 제시한 모델과 같은 모양을 이룰 수 있을 것으로 간주된다. 이러한 구조는 아마도 ICAM-1이 세포와 세포간의 인식 및 부착시 avidity를 증가시키는 역할을 할 수 있을 것으로 보여지며 T 세포의 활성화나 내피세포를 통한 세포의 이동에 중요한 영향을 미칠 수 있는 구조로서의 기능을 할 수 있을 것이다.

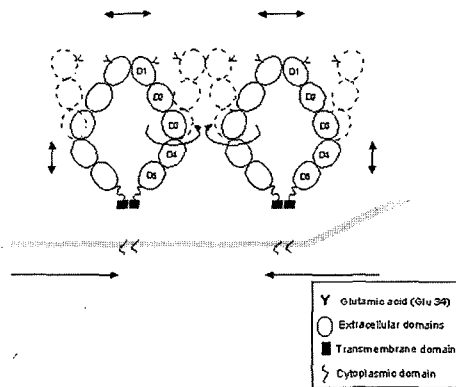


Figure 8. Model of ICAM-1 topomers on the cell surface. ICAM-1 is drawn as five linked ovals representing domains 1-5 expressed on the cell surface (two planes representing the membrane bilayer). The LFA-1 binding site has previously been localized to the face of domain 1 opposite the dimerization interface [Casasnovas, 1998 #13707], whereas the aMb2 binding site is located in domain 3 [Diamond, 1991 #7813], and is predicted to lie on the same side of the ICAM-1 molecule as the LFA-1 binding site (T. A. Springer, C. Jun, and J. Wang, unpublished). To maintain the same dimerization interfaces in domains 1 and 5 upon conversion from the ring-like open dimer (A) to the W-shaped tetramer (C), a rotation of approximately 180° and some hinge-like motions must occur in one or more of the interdomain linkages located between domains 1 and 5. In the figure, this is symbolized by rotation at the domain 4-domain 5 linkage (circular arrows) and a hinge-like motion at both ends of domain 4.

Table 1. C-C distances and exposure of symmetry-related residues in the domain 1 dimer interface seen in a crystal structure of domains 1 and 2 of ICAM-1

Residue	Dimer Cb-Cb distance(Å)		Surface Exposure(Å)	
	A dimer	B dimer	A monomer	B monomer
Leu-18	4.50	6.03	92	93
Leu-42	3.41	4.40	74	62
Leu-43	3.61	2.48	185	166
Leu-44	10.8	4.40	47	57

The putative dimerization interface in domain 1 was deduced from symmetry-related contacts seen between pairs of A molecules (A dimer) and B molecules (B dimer) seen in a crystal structure of ICAM-1 domains 1 and 2 (Casasnovas et al, 1998). The distance separating the Cb atoms of identical residues in the interface was measured. Surface accessibility of each of these residues in the absence of the interface, i.e. in monomer molecules, was measured as exposed surface area (2) using the program DSSP.

■ 참고문헌 ■

Dustin ML, Shaw AS. Costimulation: building an immunological synapse. *Science*. 1999 Jan 29;283(5402):649-50.

Staunton DE, Dustin ML, Erickson HP, Springer TA. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell*. 1990 Apr 20;61(2):243-54.48:

Kirchhausen T, Staunton DE, Springer TA. Location of the domains of ICAM-1 by immunolabeling and single-molecule electron microscopy. *J Leukoc Biol*. 1993 Mar;53(3):342-6.

Casasnovas JM, Stehle T, Liu JH, Wang JH, Springer TA. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4134-9.

Lu C, Shimaoka M, Zang Q, Takagi J, Springer TA. Locking in alternate conformations of the integrin alpha Lbeta 2 I domain with disulfide bonds reveals functional relationships among integrin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2393-8.

Miller J, Knorr R, Ferrone M, Houdei R, Carron CP, Dustin ML. Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1231-41.