

2004年9月8日

独立行政法人 理化学研究所
財団法人かずさ DNA 研究所

腫瘍壊死（えし）因子のシグナルが核内に伝わる分子メカニズムを解明

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、生体内での免疫応答や炎症反応の過程において、腫瘍壊死因子*1のシグナルが細胞の核内に伝達される際に、重要な役割を果たすタンパク質「CYLD」の立体構造を決定し、タンパク質間相互作用ネットワークのメカニズムの一端を解明することに成功しました。ゲノム科学総合研究センター（榎佳之センター長）タンパク質構造・機能研究グループの横山茂之プロジェクトディレクター、木川隆則チームリーダー、斉藤講平研究員らの研究グループと財団法人かずさDNA研究所（大石道夫理事長）の小原收ヒト遺伝子研究部長他の共同研究による成果です。

本研究は、わが国で推進している「タンパク 3000 プロジェクト」の一環として行われたものです。本成果は腫瘍抑制のメカニズムの理解につながるものであり、学術的な貢献の他にも今後の新たな創薬ターゲットとしても期待されています。

本研究成果の詳細は、米国の学術雑誌『Structure』9月号に掲載されます。

※1 腫瘍壊死因子

細胞から放出されるタンパク質性因子の一種で TNF- α とも言う。破骨細胞（造血系の幹細胞に由来する多核の細胞）の働きを高め、細胞膜表面の特異的な受容体に結合し、シグナルを細胞内へと伝達する因子である。そのシグナルは核内へと移行してさまざまな遺伝子発現を誘導する。腫瘍壊死因子は生体の恒常性の維持に必要な因子であり、従来抗腫瘍作用を期待されていたが、現在ではさらに炎症、免疫、細胞の生死との関係も注目されている。

1. 背景

細菌やウイルスなど外部からの刺激により免疫・炎症反応は誘導されます。この時、活性化されたマクロファージ*2はサイトカイン*3の一種である腫瘍壊死因子（TNF- α ）を産生します。TNF- α は細胞膜表面の特異的な受容体（TNFR）に結合し、このシグナルは細胞内へと伝達されます。

これに伴い、TNFR の細胞内ドメインは TRADD、TRAF などと呼ばれるタンパク質と複合体を形成しますが、これら因子の活性にはリン酸化やユビキチン化*4といった修飾が関与していることが知られています。

また、細胞内から核内へのシグナル伝達に関与する NF- κ B は、免疫・炎症反応において刺激誘導される多くの遺伝子の発現誘導に関わっている転写因子として知られています。NF- κ B は通常 I- κ B とよばれる制御タンパク質と複合体を形成し、不活型で細胞質に局在しています。I- κ B は IKK と呼ばれるリン酸化酵素複合体によりリン酸化されるとこれにより誘導されるユビキチン化をシグナルとして分解されます。I- κ B が外れた NF- κ B は核内に移行し転写因子として働きます。

IKKはIKK-aとIKK-bと呼ばれるリン酸化酵素サブユニットとNEMO (IKK-g)と呼ばれる調節サブユニットからなる複合体で、この酵素活性自体も上流因子によるリン酸化やユビキチン化によって調節されています。またIKKは、TNFRからだけではなく、インターロイキン受容体やT細胞受容体、B細胞受容体からのシグナル伝達にも関与する因子です。

CYLDは、家族性円柱腫症の原因遺伝子産物として同定されましたが、近年上記のNF- κ Bへのシグナル伝達系路上においてTRAFとIKKの間に位置する負の調節因子であることが報告され、注目されています(図1)。

2. 研究成果と手法

CYLDタンパク質は脱ユビキチン化酵素で、N末端側のタンパク質間相互作用に関わると予想される領域とC末端側の酵素活性領域とに分けることができます。N末端側領域にはCAP-Glyと呼ばれるドメインが3つあります。

研究グループは、CYLDタンパク質のシグナル伝達ネットワーク上への関与のメカニズムを明らかにするために、まずIKKの調節サブユニットであるNEMOと相互作用するCYLD内の領域の特定を試みました。その結果、3番目のCAP-Glyドメインがこの相互作用には必要十分であることが明らかになりました。

次にこのドメイン領域の立体構造決定を試みました。無細胞タンパク質合成法^{*5}で炭素原子と窒素原子をそれぞれ¹³C、¹⁵Nという安定同位体で標識して合成を行い、精製を行いました。核磁気共鳴(NMR)分光装置を用いて、2次元、3次元測定を行い、化学シフト、核オーバーハウザー効果^{*6}などの情報を収集し、立体構造を決定しました。その結果、CAP-Glyドメインは5本の β ストランド^{*7}が逆平行シート型でバレル状になった構造を基本としていることが明らかとなりました。この構造は、プロリンというアミノ酸^{*8}に富む領域を認識結合することで知られているSH3ドメインを彷彿させるものでした(図2)。タンパク質表面の解析をおこなったところ、伸びたペプチド鎖が結合しうる疎水性の溝があることが明らかとなりました。プロリンに富む領域はペプチド鎖が伸びた状態になりやすいことが知られていますので、この溝が相互作用に関わっていることが推測されました。一方で、相互作用因子であるNEMOのアミノ酸配列を分析し、相互作用部位の候補となりうるプロリンに富む領域を2ヶ所特定しました。これらのアミノ酸配列に相当するペプチドを用いた解析の結果、これらのうちの1つと特異的に結合することが明らかとなり、NEMO上の結合部分の特定に成功しました。さらにNMRを用いた解析により、上記の溝がこの結合面であることが実験的に明らかとなりました。

以上の結果を基にして、最終的に計算機によるドッキングシミュレーション実験により複合体モデルを提唱しました(図3)。疎水性の溝の中心部分に位置するフェニルアラニン残基やロイシン残基がリガンド側のプロリン残基を、溝の周辺に局在する電荷を持つアミノ酸残基の側鎖がリガンド側の逆の電荷を持つアミノ酸残基の側鎖を認識しているモデルが得られ、CYLDとNEMOの相互作用の分子メカニズムが解明されました。

3. 今後の展開

本成果によって、未だ明らかにされていないTRAFからIKKへのシグナル伝達

の分子メカニズムの一端が明らかになりました。これにより、本伝達経路の異常を原因とする疾病のメカニズムの解明に重要な知見を与え、疾病に対する薬の創製にもつながると考えられます。CYLDの機能の解析は始められたばかりであり、本伝達経路におけるCYLDの活性を制御する機構をはじめとして、その構造解析を含めた更なる解析による全容解明が期待されます。

本成果では腫瘍壊死因子による誘導系のみしか述べておりませんが、IKKを介したNF- κ Bの活性化は、インターロイキンによる刺激やT細胞、B細胞における免疫系でも見られることから、これら他の伝達系におけるCYLDの関与の有無も解析されることが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 横浜研究所

ゲノム科学総合研究センター

タンパク質構造・機能研究グループ

プロジェクトディレクター 横山 茂之

Tel : 045-507-2515 / Fax : 045-507-2509

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 腫瘍壊死因子

細胞から放出されるタンパク質性因子の一種でTNF- α とも言う。破骨細胞（造血系の幹細胞に由来する多核の細胞）の働きを高め、細胞膜表面の特異的な受容体に結合し、シグナルを細胞内へと伝達する因子である。

※2 マクロファージ

マクロファージとは、細菌やウイルス、塵やホコリまで食べてしまう貪食細胞のこと。マクロ (Macro) =大きい、ファージ (PHage) =食べるものということが由来とされる。

※3 サイトカイン

細胞から放出されるタンパク質性因子で、免疫系、造血系、内分泌系、神経系など生体のさまざまな高次機能を維持する上で重要な生理活性物質。

※4 ユビキチン化

タンパク質の翻訳後修飾の一つで、タンパク質のリジン残基にユビキチン C 末端が

イソペプチド結合する反応。従来はタンパク質分解へのシグナルと認識されていたが、最近では多様な機能への関与が報告されている。

※5 無細胞タンパク質合成法

立体構造解析をはじめとした生化学的な実験を行うために用いるタンパク質を、試験管内で合成する方法。従来は大腸菌や酵母、昆虫細胞などの生体を用いることが多かったが、本方法を用いることにより、毒性のあるタンパク質などの発現に有効である点や、安定同位体による標識を効率よく人為的に行うことができるという利点がある。タンパク質構造・機能研究グループでは独自に開発した技術を利用しており、同様な方法のなかで最も利用実績がある。

※6 核オーバーハウザー効果

核磁気共鳴において、ある核にラジオ波を照射したとき、空間的に近い距離にある他の核のシグナル強度が変化する現象で、通常、二つの核間の距離の6乗分の1に比例する。現在行われているNMRによるタンパク質の立体構造決定では、この距離情報を大量に収集することで行われることが多い。

※7 β ストランド

タンパク質二次構造にあたるポリペプチド鎖の一種で、複数本が規則的に並ぶことでシート状構造を形成する。

※8 アミノ酸

アミノ基、カルボキシル基が同一の炭素原子に結合している有機化合物で、タンパク質の構成単位。ほとんどの場合、生体タンパク質は側鎖の異なる20種類のアミノ酸からできていて、プロリン、フェニルアラニン、ロイシンなどはそれらの中に含まれる。

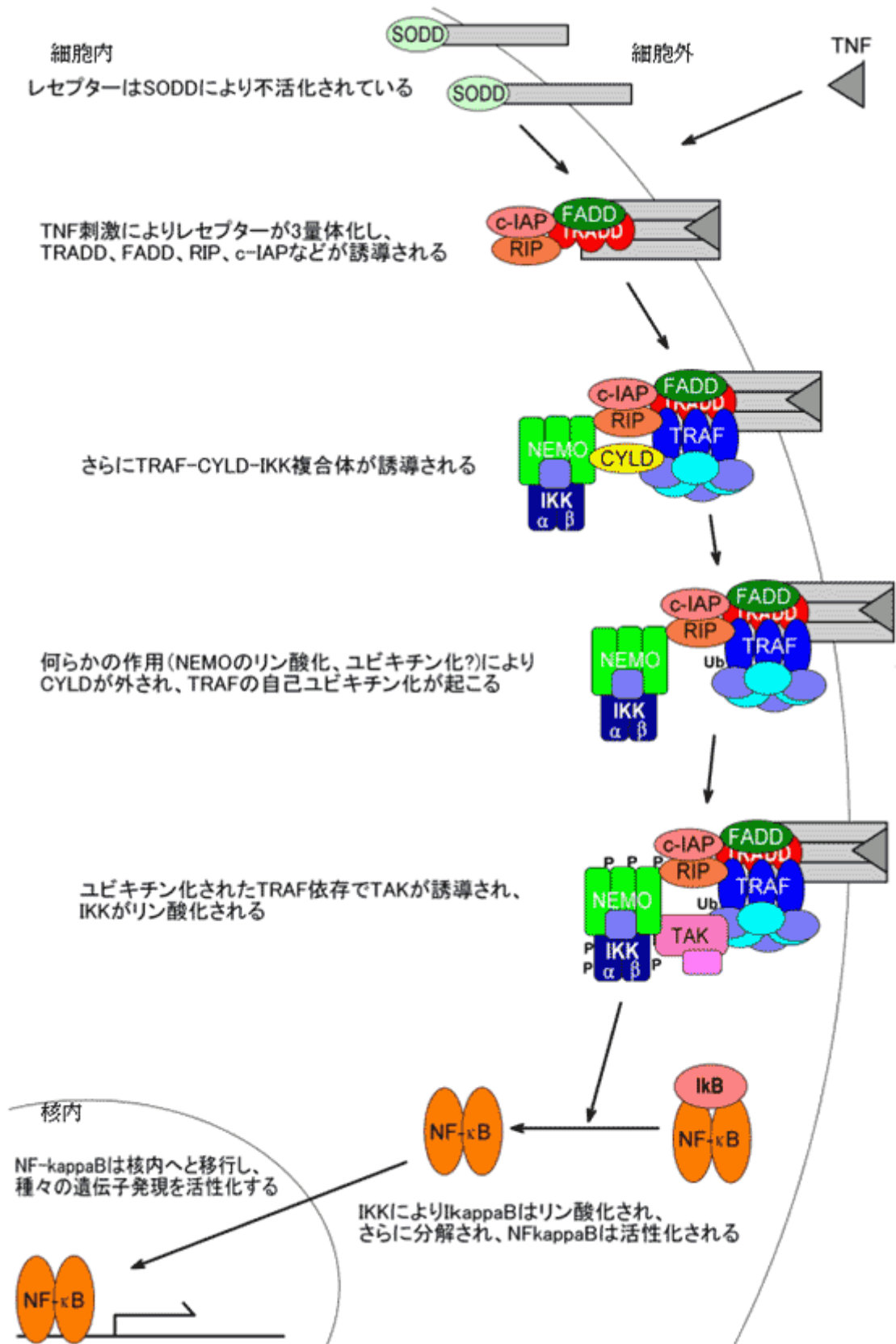


図1 TNF から NF-κB へのシグナル伝達経路

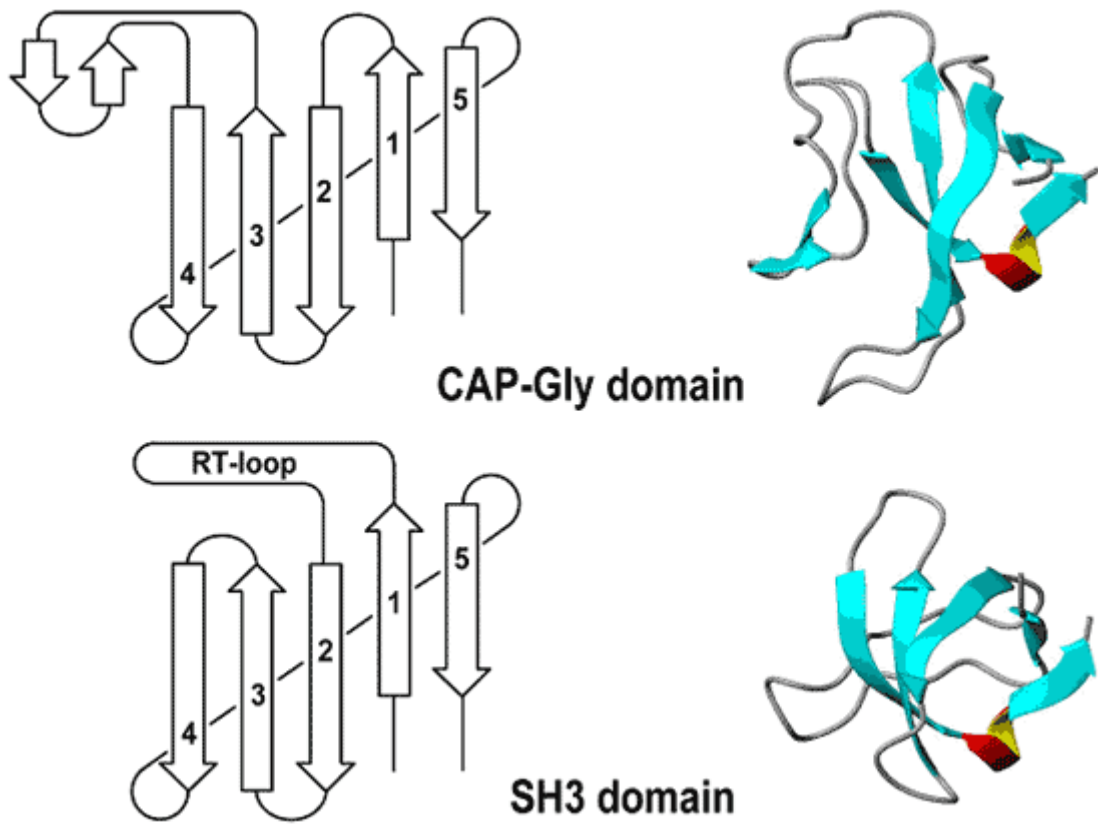


図2 CAP-Gly ドメインと SH3 ドメイン

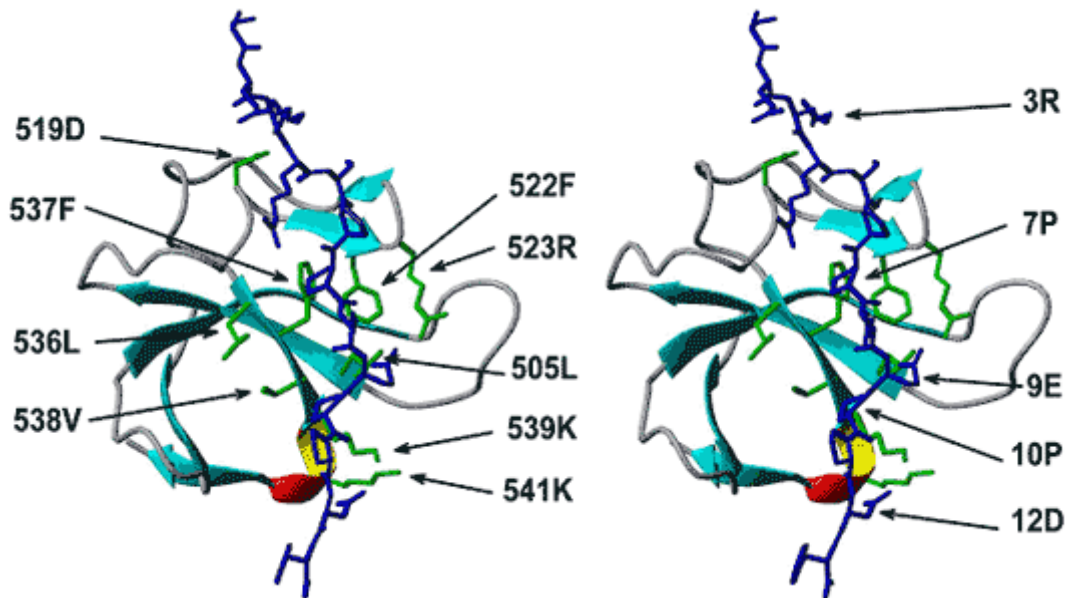


図3 CYLD の CAP-Gly ドメインによる NEMO のプロリンに富む領域の認識モデル