



Title	Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF- α -converting enzyme, but not its truncated soluble form
Author(s)	板井, 利満
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46024
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	いた板 井 利 满
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 18913 号
学位授与年月日	平成16年4月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF- α -converting enzyme, but not its truncated soluble form (TNF- α 可溶化酵素による腫瘍壊死因子(TNF)のプロセシング機構)
論文審査委員	(主査) 教授 長田 重一 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

〔目的〕

プロテアーゼによる膜タンパク質の切断・可溶化は、生体での細胞の増殖、分化、死のイベントを調節する重要な機構のひとつである。例えば、細胞表面での発現で機能を局所に限定されたサイトカインも、可溶化により遠方の細胞に作用出来る。また逆に可溶化により標的へのシグナル伝達能が低下する場合もみられる。TNF- α (tumor necrosis factor、腫瘍壊死因子) の可溶化酵素である TACE (TNF- α -converting enzyme) は ADAM ファミリーと呼ばれる膜型のメタロプロテアーゼの一種であり、TNF- α 以外にも構造の異なる様々な膜タンパク質のプロセシングを担うが、その切断機構には不明な点が多い。そこで本研究では、組み替え TACE 分子を調製しこの分子の生化学的性質を解析した。

〔方法ならびに成績〕

TACE は分子の N 末端側が細胞外に、C 末端側が細胞内に突出した I 型の膜タンパク質であり、細胞外領域はプロドメイン、酵素活性部位、ディスインテグリンドメイン、システインに富むドメインから成っている。我々はヒト抹消血リンパ球から RT-PCR (reverse transcription PCR) によりヒト TACE の cDNA を調製し、タンパク質全長をコードする膜結合型 TACE (mTACE) および、C 末端側の膜貫通ドメインと細胞内領域を欠く可溶型 TACE (sTACE) の発現プラスミドを構築した。これらをヒト TNF- α 発現ベクターと共にヒト 293 細胞に一過的に発現させ、培養上清中に分泌された TNF- α を ELISA 法で測定したところ、mTACE の共発現は cDNA 導入量依存的に TNF- α の分泌を促進した。一方、sTACE はその発現細胞の培養上清が TNF- α の切断部位を含むペプチドを切断する活性を持つものの、ヒト 293 細胞からの TNF- α の分泌を促進しなかった。また、ヒト Fas リガンド (FasL) cDNA を発現したヒト 293 細胞は内在活性により有意なレベルで可溶型 FasL を分泌したが、このプロセシングはメタロプロテアーゼ阻害剤で抑制されるものの、mTACE と sTACE のいずれの共発現でも促進されなかった。以上の結果から、生体では sTACE は TNF- α を切断・可溶化出来ないこと、および TACE は FasL のプロセシングには関与しないことが示唆された。

次に TNF- α と TACE の相互作用を調べた。FLAG 配列で C 末端を標識した mTACE および sTACE のそれぞれを TNF- α と共に COS 細胞に発現させ、細胞溶解液中の TNF- α の TACE との会合を免疫沈降法とウエスタンブロッテ

イングにより解析した。その結果、TNF- α はmTACEのみならずsTACEとも共沈降した。また、この相互作用はメタロプロテアーゼ阻害剤の影響を受けなかった。このことは、TACEが酵素活性中心以外の部位でも基質と結合することを示唆している。そこで、メタロプロテアーゼドメインを欠いた変異型TACE(delta M)の発現プラスミドを用い同様の実験を行ったところ、TNF- α はdelta Mとも共沈降し、TACEのディスインテグリンドメインまたはシステインに富むドメインを介した結合の可能性が考えられた。また同様のアッセイにおいてTACEとFasLの相互作用は否定された。

変異型TACEであるdelta Mはその構造上、TACE活性に対する優性阻害効果が期待された。そこでTNF- α とFasLのプロセシングの違いを確認するために、delta Mをヒト293細胞に発現させ、プロセシングへの影響をELISA法で調べた。その結果、mTACEによるTNF- α の分泌促進はdelta M発現プラスミドの導入量依存的に抑制され、delta Mの優性阻害効果が確認されたが、予想に反し、mTACEの影響を受けないFasLのプロセシングも同様に阻害された。このことから、FasLの可溶化酵素はTACEとは別の、しかしそく似たタイプのメタロプロテアーゼであると推論された。

[総 括]

本研究により、TACEは生体でのTNF- α のプロセシングを担うために膜結合型である必要があるという、従来のメタロプロテアーゼにみられなかつた特性が示された。加えて、FasLのプロセシングにTACEは関与しないものの、FasLの可溶化酵素はTACEとよく似たタイプのプロテアーゼであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

一部の膜タンパク質はプロテアーゼにより切断され可溶型の分子を生じる。この現象はsheddingと呼ばれ、タンパク質の機能や活性の重要な調節機構である。TNF- α の可溶化酵素として同定されたTACE(TNF- α -converting enzyme)は、ADAMファミリーと呼ばれる膜型メタロプロテアーゼの一種であり、構造の異なる様々な膜タンパク質の可溶化を担うが、その機構には不明な点が多い。

本研究では、TACE自身が膜タンパク質であることに着目し、基質を切断・可溶化する際、自身が膜結合型構造をもつ必要性の有無を生化学的に検討した。その結果、無細胞系では部位欠失変異体の可溶型TACEもペプチド基質を切断するが、細胞発現系におけるTNF- α の分泌促進には、膜結合型構造をもつTACEのみが機能的であることを示した。またTACEが酵素活性部位以外にもディスインテグリンドメインまたはシステインに富むドメインを介して基質と会合する可能性を示した。さらに同様の解析から、TNFファミリーに属するFasリガンドの可溶化にTACEは関与しないことを示唆した。

本研究によりTACEの膜結合型構造が基質のsheddingに必要という従来型のメタロプロテアーゼにはみられなかつた特性が示された。また、他のTACEの基質と比べても構造的にTNF- α とよく似たFasリガンドの可溶化酵素がTACEと異なる点は興味深い。本研究は学位の授与に値すると考えられる。