Osaka University Knowledge Archive

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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【24】

氏　　名	板　井　利　満（いた い とし みつ）
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

ィ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、しかしよ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った特性が示された。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った特性が示された。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。