

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：92723

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02910

研究課題名(和文) がんの発生や悪性化に関与する転写因子複合体の構造解明とその制御法の開発

研究課題名(英文) Structural analysis and regulation of transcription factor complexes involved in tumor development and progression.

研究代表者

宮園 健一 (Miyazono, Kenichi)

株式会社ファスマック・バイオ研究支援事業部・研究員(移行)

研究者番号：90554486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の増殖や分化等の制御を行うTGF- β は、がんの発生や悪性化と強く関係する。細胞内におけるTGF- β シグナルの主な役割は、シグナル依存的に形成されるSMAD2/3を中心とする転写因子複合体である。本研究では、細胞内におけるTGF- β シグナルの精密な制御を可能とする新規手法の開発を目指し、SMAD2/3-転写因子複合体の構造学的な解析とその新規制御法の開発を行った。その結果、X線結晶構造解析法によりSMAD2/3-転写因子複合体(SMAD2-CBP, SMAD2-TMEPAI等)の構造を決定したほか、転写因子複合体の形成阻害を通じてTGF- β シグナルの抑制が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- β シグナルを細胞内で伝達する転写因子SMAD2/3は、多様な転写因子複合体を形成することが知られている。本研究では、その多様な複合体形成にかかわる構造基盤を明らかにしたほか、構造を元に設計したペプチド配列を利用することで、タンパク質分子間相互作用の阻害を通じたTGF- β シグナルの抑制を可能とした。TGF- β シグナル伝達系の異常はがんの発生や悪性化に強く関係しており、そのシグナル伝達機構の解明と新規制御法の構築はがんの新規治療法の開発のために重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：TGF- β regulates cell proliferation, differentiation, and other important biological processes. Therefore, dysregulation of TGF- β signal causes cancer development and malignant transformation. The central players of TGF- β signaling in cells are transcription factors SMAD2/3. SMAD2/3 form a variety of transcription factor complexes with other proteins (SMAD cofactors) to regulate multiple gene expression. In this study, we investigated the structures of the SMAD2/3-cofactor complexes and developed a novel method for the regulation of TGF- β signaling in cells. As a result, we determined the structures of SMAD2/3-transcription factor complexes (SMAD2-CBP, SMAD2-TMEPAI, etc.) by X-ray crystallography and demonstrated that TGF- β signaling can be suppressed through inhibition of transcription factor complex formation.

研究分野：構造生物学

キーワード：TGF- β 分子間相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TGF- β (Transforming growth factor- β) は細胞の様々な機能を調節する多機能性サイトカインであり、細胞の増殖抑制、アポトーシス誘導、免疫調節、血管新生、細胞外マトリックス生産等の制御を行う。そのため、そのシグナル伝達系の機能不全は、がんの発症や悪化へとつながる。TGF- β のシグナルを受けた細胞は、転写因子 SMAD2 および SMAD3 (SMAD2/3) の活性化(リン酸化)を通じて多種多様な遺伝子発現の制御を行う。この際、SMAD2/3 は多様な別のタンパク質(補因子)と結合することによってその機能が調節されることが知られており、この補因子の多様性は、TGF- β シグナルの多機能性と強く関係している(図1)。

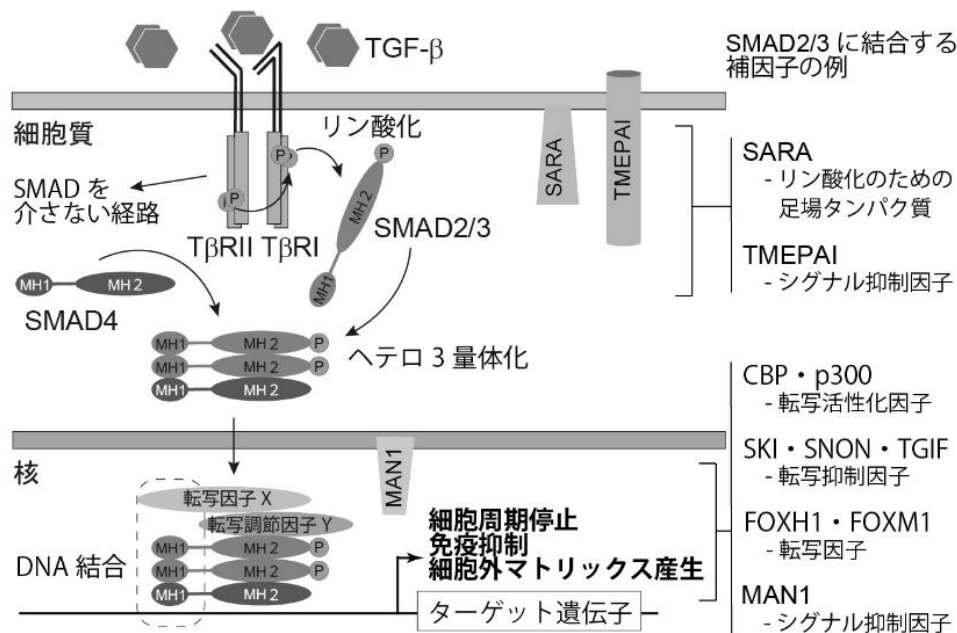


図1: 細胞内における TGF- β シグナル伝達系 (SMAD 経路)

がんの発生や悪化において、TGF- β シグナルは重要な役割を担っている。TGF- β シグナル(特に SMAD 経路)は、細胞増殖を抑制する(細胞周期を止める)機能を持つため、がんの発生には抑制的に作用する。がん細胞の中で発現が亢進するタンパク質の中には、SMAD2/3 と結合することによってその機能を阻害し、がん細胞の増殖を促進させる作用を持つものが存在する。例えば、転写抑制因子である SK1/SNON や TGIF は、SMAD2/3 依存的な転写を阻害することによってがん細胞の増殖を促進させている。一方進行したがんにおいては、TGF- β シグナルは、がんの悪化に寄与することが知られている。がん微小環境では TGF- β の発現が亢進しており、その結果として活性化された SMAD2/3 及びそこに結合するタンパク質(CBP: 転写活性化因子として SMAD2/3 依存的な転写を促進、FOXM1: SMAD2/3 のユビキチン依存的な分解を抑制することにより SMAD 経路を活性化、等)の作用により、がん細胞の免疫系からの回避(制御性 T 細胞誘導)や、がんの浸潤や転移(上皮間葉転換)が起こる。このように、がんの発生や悪化には TGF- β シグナル(特に SMAD2/3 を中心とした転写因子複合体)の機能が極めて重要な役割を果たしている。

がんの発生や悪化のメカニズムは、がんの予防法や新規治療法を確立し国民健康の増進を図るうえで極めて重要な知見である。例えば、がんの発生にかかわるタンパク質複合体の形成を阻害できれば、がんの発生を予防できる可能性がある。また、がんの悪化に関与するタンパク質複合体の形成を阻害できれば、がんの新規治療法へとつながる可能性がある。これらの新規予防/治療法の開発のためには、がんの発生や悪化に関与する転写因子複合体の構造を理解し、構造に基づいてその分子間相互作用を特異的に阻害する物質を作出することが有効であると考えられる。しかしながら、先に述べたような SMAD2/3 を中心とする転写因子複合体の構造情報にかかわる知見はこれまでに十分に明らかにされておらず、その制御法の開発の弊害となっていた。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、がん細胞の中で形成される転写因子複合体の構造基盤解明を通じて、その進行や悪化を制御する新しい手法を開発することである。その中で本研究課題では、がんの発生や悪化と密接な関係のある TGF- β シグナル伝達系(特に転写因子 SMAD2/3 を中心とする経路)に着目し、以下の2点に関して研究を行った。

(1) SMAD2/3-補因子複合体の構造学的多様性の解明

SMAD2/3 は 400 アミノ酸程度からなるそれほど大きくないタンパク質であるにもかかわらず、配列の相同性を持たない多様なタンパク質と特異的に結合できることが知られている。この SMAD2/3-補因子複合体の多様性は、どのような構造基盤に基づいてもたらされているのかは十分に理解されていない。各補因子がどのような構造基盤に基づき、共同・競合しながら SMAD2/3 に対して結合するかを明らかにできれば、特定の補因子群による作用のみを選択的に制御できるようになると期待される。そこで本研究では、SMAD2/3-補因子複合体、特にがん細胞内で形成されることが知られている SMAD2/3-補因子複合体に着目し、その複合体がどのように形成されるのかを構造学的に明らかにしようと試みた。

(2) 転写因子複合体形成阻害を通じた TGF- β シグナルの制御法の開発

様々な生体機能を制御する TGF- β シグナル伝達系の制御剤はこれまでに多数報告されており、基礎から応用にかけて幅広く利用されている。TGF- β シグナル伝達系はその機能から、がん治療に対する重要な創薬ターゲットとされている。しかしながら、既存の TGF- β 阻害剤は、TGF- β そのものに対する抗体医薬や核酸医薬、及びその受容体阻害剤がほとんどであり、細胞内で形成される転写因子複合体を対象とした阻害剤はこれまでに存在しない。そこで本研究では、上記研究課題で明らかにした転写因子複合体の構造情報をつかい、転写因子複合体の形成阻害を通じた、新規 TGF- β シグナル制御法の開発を目指した。これまでの TGF- β シグナル制御技術では、心血管系の異常や炎症の発症等の副作用が併発することが知られているが、本研究で目指す転写因子複合体形成阻害は従来の阻害法と比較しシグナル伝達系下流での阻害となるため、副作用の問題を回避した新規阻害剤となる可能性がある (図 2)。

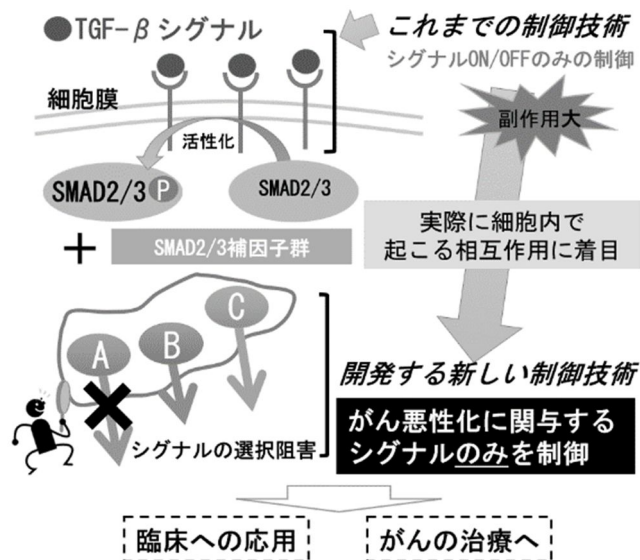


図 2: 転写因子複合体をターゲットとしたがん制御の利点

3. 研究の方法

(1) SMAD2/3-補因子複合体の構造学的多様性の解明

ヒト由来 SMAD2/3 及びその補因子の遺伝子をクローニングし、大腸菌の異種タンパク質発現系を用いて大量発現させた。得られたタンパク質は、高速液体クロマトグラフィーシステムを利用し高純度に精製した。得られたタンパク質を用いて転写因子複合体を再構成し、その結晶化及び X 線結晶構造解析を行った。大腸菌での調製が難しい一部の補因子は、合成ペプチドとして購入し SMAD2/3 との共結晶化に用いた。X 線回折データの取得は、高エネルギー加速器研究機構・Photon Factoryで行った。得られたデータを用い、分子置換法による構造決定を行った。構造の妥当性は変異体解析によって評価した。タンパク質間の分子間相互作用解析は、等温滴定カロリメトリー等で行った。

(3) 転写因子複合体形成阻害を通じた TGF- β シグナルの制御法の開発

SMAD2/3 に結合した補因子の一部構造を抜き出し、阻害ペプチドのリードとした。GPU 計算機を利用した *in silico* 計算等により、分子間相互作用の増強が見込める変異の候補を選抜した。実際に変異が導入されたペプチドを作製 (異種発現もしくは化学合成) し、SMAD2/3 との相互作用を等温滴定カロリメトリー等で定量的に評価した。機能を向上させた阻害ペプチドを細胞内で過剰発現させ、TGF- β シグナルに対する応答を評価 (レポーターアッセイ系やリアルタイム PCR・ウェスタンブロット等) した。

4. 研究成果

(1) SMAD2/3-補因子複合体の構造学的多様性の解明

SMAD2/3 の C 末端側に存在するドメイン (MH2 ドメイン) は多量体形成にかかわるドメインで、多くの補因子が競合的または共同的に結合する。これまでの研究と合わせ、SMAD2/3-補因子複合体として、SMAD2-SK1, SMAD3-FoxH1, SMAD2-MAN1, SMAD2-CBP, SMAD2-Mixer, SMAD2-TEMAPI 複合体の結晶構造を明らかにし、その複合体形成にかかわる構造基盤を明らかにした (図 3)。構

造解析の結果、SMAD2/3-MH2 ドメインの分子表面上では、他のタンパク質分子間相互作用では見られない、独特なメカニズムが存在することが明らかになった。SMAD2/3 のMH2 ドメイン上には、補因子が結合する可能性のある疎水性の小領域が複数あり、各補因子はその一つないし複数をつなぐような形で SMAD2/3 に対し結合する。例えば、SMAD2/3 依存的な転写の活性化に関与する CBP は、ヘリックスを形成し SMAD2/3 の Three-helix bundle region (patch A1) に結合するのに対し、TGF-シグナルの抑制に関与する TMEPAI は、ストランド構造をとり SMAD2/3 の β -Sandwich region (patch B3-B2-B1) に結合する。このような機構を用いることにより、SMAD2/3 は多様な分子間相互作用を可能としていることが明らかとなった。

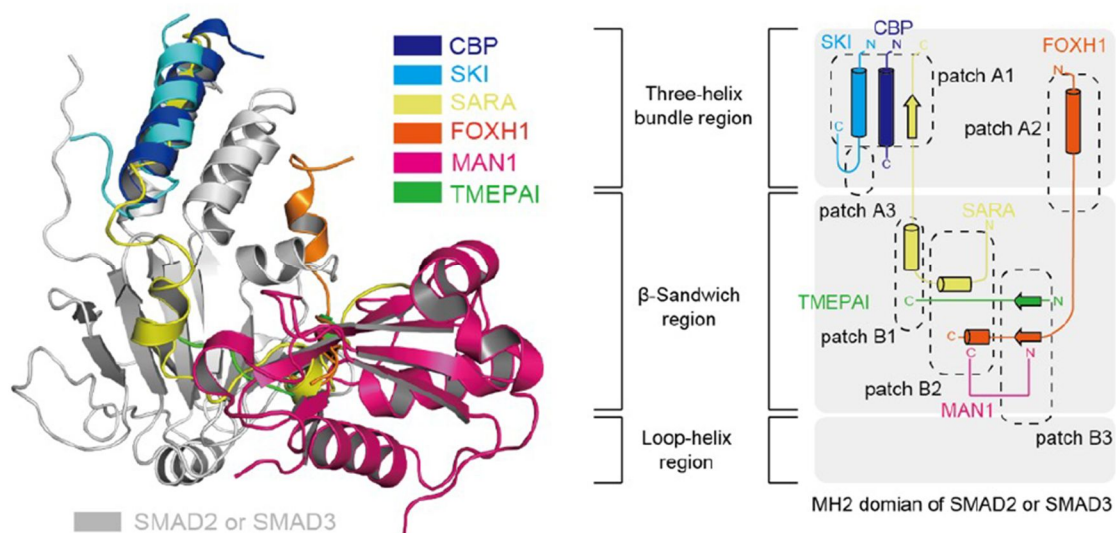


図3 SMAD2/3-補因子複合体の構造

(2) 転写因子複合体形成阻害を通じた TGF-シグナルの制御法の開発

本研究で構造を明らかにした SMAD2-CBP 複合体をもとに、SMAD2 との相互作用をより強固にした CBP 変異体ペプチドを作製した。等温滴定熱量計を用いて SMAD2-CBP 間の相互作用を定量的に解析したところ、変化した CBP 変異体ペプチドは野生型の CBP と比較し 80 倍ほど強く SMAD2 に対し結合することが明らかになった。CBP 変異体ペプチドは転写の活性化に関与するドメインを持たないことから、細胞内でこの CBP 変異体ペプチドを過剰発現させると、本来用いられる CBP と競合し、SMAD2/3 依存的な転写が阻害されることが期待された。CBP 変異体ペプチドを動物細胞内で過剰発現させ、レポーターアッセイにより TGF-シグナルに対する応答を確認したところ、CBP 変異体ペプチドの発現に応じて TGF-シグナルの抑制が確認できた(図4)。

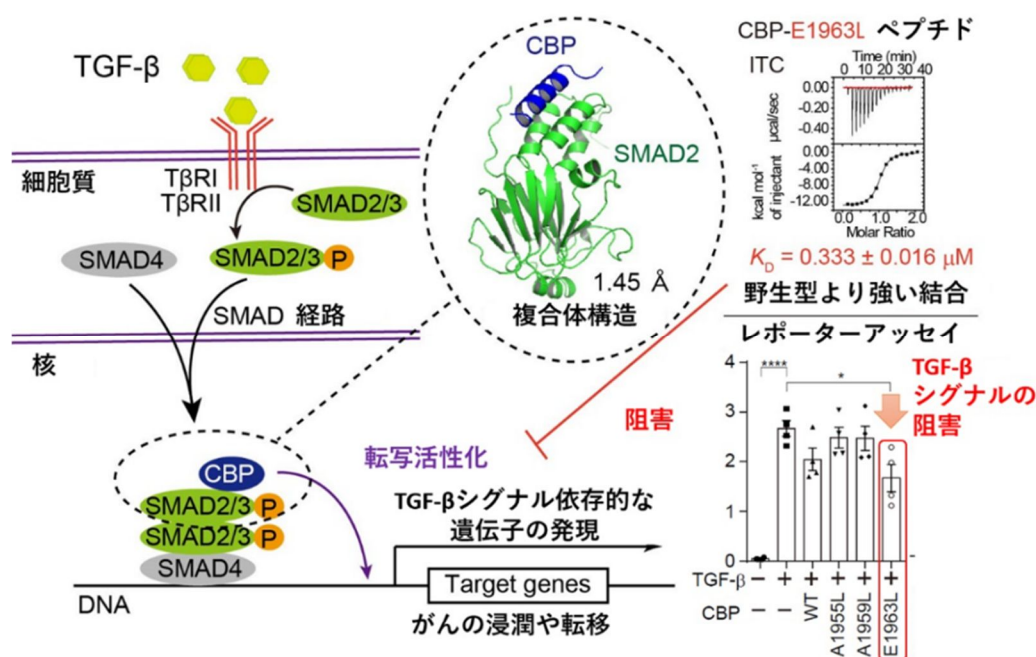


図4 CBP 変異ペプチドによる TGF-シグナルの抑制

(3)その他：SMAD2 及び SMAD3 の性状の差異

SMAD2 と SMAD3 の MH2 ドメインは、他タンパク質との分子間相互作用に利用されるドメインで、非常に高いアミノ酸配列の同一性を持つ。しかしながら、熱安定性解析や、他タンパク質との相互作用解析の結果、SMAD2 と SMAD3 の MH2 ドメインは異なる生物物理学的特性があることが明らかになり、その特性は、わずか数残基の置換によって制御されていることを明らかにした。また、その特性の違いは細胞内でも発揮されている可能性があることがあきらになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 MIYAZONO Ken-ichi、TANOKURA Masaru | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 New era in structural biology with the AlphaFold program | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Translational and Regulatory Sciences | 6. 最初と最後の頁 48～52 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33611/trs.2022-005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 宮園健一、田之倉優 | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 TGF- シグナル伝達系に見られる転写因子複合体の構造多様性とその制御 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 高エネルギー加速器研究機構 『PHOTON FACTORY NEWS』 | 6. 最初と最後の頁 13-17 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 宮園健一、田之倉優 | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 TGF- シグナル伝達系における主要転写因子SMAD2による転写活性化因子認識機構の構造基盤 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 コスモ・バイオ株式会社 『シグナリングに載った日本人研究者』 | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Miyazono Ken-ichi、Ito Tomoko、Fukatsu Yui、Wada Hikaru、Kurisaki Akira、Tanokura Masaru | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Structural basis for transcriptional coactivator recognition by SMAD2 in TGF- signaling | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Science Signaling | 6. 最初と最後の頁 eabb9043 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.abb9043 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮園健一 |
| 2. 発表標題 AlphaFoldによって加速する構造生物学 |
| 3. 学会等名 第6回 Translational and Regulatory Sciences Symposium (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮園健一、伊藤友子、深津由衣、和田ひかる、栗崎晃、田之倉優 |
| 2. 発表標題 TGF- シグナル伝達系の主要転写因子SMAD2による転写活性化因子認識機構 |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮園健一、伊藤友子、深津由衣、和田ひかる、栗崎晃、田之倉優 |
| 2. 発表標題 TGF- シグナル伝達系における転写因子複合体の構造解析とその制御 |
| 3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 楠林和貴、宮園健一、伊藤友子、栗崎晃、田之倉優 |
| 2. 発表標題 TGF- シグナル主要転写因子SMAD2及びSMAD3のMH2ドメインにおける特性評価 |
| 3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Miyazono K, Ito T, Moriwaki S, Ohno Y, Wada H, Fukatsu Y, Kurisaki A, Asashima M, Tanokura M. |
| 2. 発表標題 Structural basis for cofactor recognition mechanism by SMAD2/3 in TGF- signaling |
| 3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 楠林和貴、宮園健一、伊藤友子、栗崎晃、田之倉優 |
| 2. 発表標題 TGF- シグナル伝達因子SMAD2及びSMAD3のMH2ドメインにおける性状比較 |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 楠林和貴、宮園健一、伊藤友子、栗崎晃、田之倉優 |
| 2. 発表標題 TGF- シグナル伝達因子SMAD2及びSMAD3のMH2ドメインにおける性状比較 |
| 3. 学会等名 第20回 東京大学生命科学シンポジウム |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮園健一、森脇沙帆、大野陽介、和田ひかる、伊藤友子、深津由衣、栗崎晃、浅島誠、田之倉優 |
| 2. 発表標題 TGF- シグナル伝達系の主要転写因子SMAD2/3による補因子選択機構 |
| 3. 学会等名 第20回 東京大学生命科学シンポジウム |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮園健一、和田ひかる、森脇沙帆、大野陽介、伊藤友子、深津由衣、栗崎晃、浅島誠、田之倉優 |
| 2. 発表標題 TGF- シグナル伝達系の主要転写因子SMAD2/3による補因子の選択機構及びその制御 |
| 3. 学会等名 日本結晶学会 令和2年(2020年)度年会及び会員総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮園健一、和田ひかる、森脇沙帆、大野陽介、伊藤友子、深津由衣、栗崎晃、浅島誠、田之倉優 |
| 2. 発表標題 TGF- シグナル伝達系にみられる転写因子複合体の構造多様性 |
| 3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>TGF- シグナル依存的な遺伝子発現の活性化機構の一端を解明 https://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=2203 TGF- シグナル依存的な遺伝子発現の活性化機構の一端を解明 https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20201216-1.html</p> |
|---|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 栗崎 晃 (KURISAKI AKIRA) (60346616) | 奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授 (14603) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|