

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390008

研究課題名（和文） TRAF6に関わるシグナル伝達機構の構造生物学的研究

研究課題名（英文） Structural insight into the signal transduction mechanism of TRAF6 related proteins

研究代表者

山縣 ゆり子 (YAMAGATA YURIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：40183678

研究成果の概要（和文）：

サトカインとその細胞受容体の複合体として腫瘍壊死因子 TNF $\alpha$ -TNFR2 複合体の X 線結晶構造解析を行い、TNFR1 と TNFR2 の相互作用様式の違いに基づき、両受容体特異的阻害剤設計の可能性を示すとともに細胞内へのシグナル伝達が TNF $\alpha$ -TNFR2 複合体の重合を通して行われているという提案を行った。TNFR ファミリーと自然免疫に関わる Toll 様レセプターファミリーの両方からのシグナルを伝達する働きをもつ TRAF6 の細胞内シグナル伝達機構に関しては、TRAF6BP 単体の X 線結晶構造解析の結果、TRAF6BP は、2 量体をとること、さらに 2 量体の接触面について推定できた。さらに、ジスルフィド結合できない変異型タンパク質を調製、結晶化したところ、TRAF6BP は 2 量体が 3 量体を形成する可能性が示唆された。これと以前に報告された TRAF6C の単量体構造を用いて、3 量体モデルを作成、これと Traf6BP の 6 量体がうまく複合体を作れるサイズと結合領域を持つ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Tumor necrosis factor (TNF) is a well-known inflammatory cytokine that is implicated in several autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. Here we show the first crystal structure of the TNF-TNFR2 complex. Structural differences between TNFR1 and TNFR2 are analyzed and discussed. This data will be key to the future development of low-toxic TNFR1 selective therapies. In addition, we also reveal the formation of a TNFR2 supra-complex on the cell surface. Aggregation of these receptors may contribute to the currently unidentified mechanism of TNFR superfamily signal initiation.

Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) transduces signals from members of the Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor and TNFR families. Here we show that the first crystal structure of the TRAF6 binding protein. The TRAF6 binding protein forms a dimer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：タンパク質、シグナル伝達、構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

生命現象の解明や創薬の標的としても注目されるサイトカインの働きを細胞外レセプターとの結合様式に始まり、細胞内でのシグナルの伝達機構を原子レベルで解明し、生命現象の本質を物理と化学の言葉で理解すること、並び創薬へ応用することは大変意義深い。我々は、腫瘍壊死因子 TNF レセプターファミリーと自然免疫に関わる Toll 様レセプターファミリーの両方からのシグナルを伝達する働きをもつ TRAF6 のシグナル伝達機構に特に注目した。

## 2. 研究の目的

本研究では腫瘍壊死因子 TNF レセプター (TNFR) ファミリーと自然免疫に関わる Toll 様レセプターファミリーの両方からのシグナルを伝達する働きをもつ TRAF6 のシグナル伝達機構に特に注目した。そのため、細胞外の TNF と TNFR2、並びに細胞内の TRAF6 とその結合タンパク質 TRAF6BP 複合体の X 線結晶構造解析を行う。さらに、TRAF6BP の構造解析例がないので、TRAF6BP 単独での X 線結晶構造解析も行う。明らかになった立体構造に基づき推定した細胞内でのシグナルの伝達機構を物理化学的、生化学的、分子生物学的手法を駆使して実証する。以上を目的とした。

## 3. 研究の方法

タンパク質の X 線結晶構造解析の成否は、タンパク質の調製、結晶化がうまく行くか否かによる。最近の例では、タンパク質の全長のみならず、変異型やドメインに分けて調製、結晶化することで構造解析の成功例も多い。本研究ではヒト TNF はリジン欠損型を用い、TNFR2 は細胞外ドメインを調製し、複合体の結晶化を行った。マウス TRAF6 については、Coiled-coil の一部を含む C 末の TRAF6 (TRAF6C ; 341~516 番目) を、TRAF6BP については全長のものを選んだ。それぞれ、それまでの実験で、大腸菌中での発現、上清移行を確認したものである。本研究では、本研究を開始する前にそれぞれ、確立した大量調製法を基に、さらに立体構造的な純度を指標に種々改良を加えた。TRAF6BP については His タグの切断を行い、生体内試料と同一試料を調製、複合体についてはこれまでの pH 8 より 7 や 9 の方が複合体を形成し易いことを見出した。それらの試料を用いた結晶化では、TRAF6BP 単独については幾つかの条件で結晶

の再現性は得られるようになったが、初めは構造解析可能な大きさではなかった。その原因に C 末部の分解が少し起こることが示唆されたので、タグの位置を C 末側に変更したところ、構造解析可能な結晶が得られた。放射光研究施設 (SPring-8 や PF) で X 線回折データを収集し、TRAF6BP の類似と思われるタンパク質の構造を用い、分子置換法で構造の解析を目指したが、成功しなかった。そこで、SeMet 化 TRAF6BP を調製、SPring-8 の BL44XU において、SeMet 化結晶のデータ収集を行い、単多波長異常分散法で構造解析し、REFMAC を用いて精密化構造を得た。TRAF6C-TRAF6BP 複合体の結晶化は今回構造解析に成功した TRAF6BP を用いて蒸気平衡法と自由界面拡散法で複合体形成に有利だと見出した pH 6.7 や 9 で、最低 1000 条件でスクリーニングを試みたが、構造解析可能な結晶は現在のところ得られていない。そこで、明らかにした TRAF6BP 単独構造とすでに報告されている TRAF6C の構造 (Nature, 2002) から複合体モデルを作成した。

## 4. 研究成果

1) サイトカインとその細胞受容体の複合体として腫瘍壊死因子 TNF $\alpha$ -TNFR2 複合体の X 線結晶構造解析 (図 1) から、TNFR1

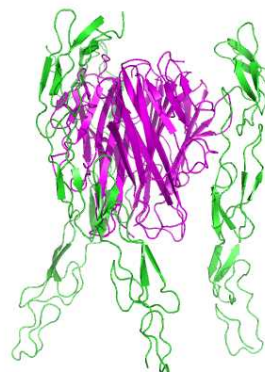


図 1、TNF $\alpha$  (桃色) 3 量体と TNFR2 (緑色) 3 量体からなる複合体の構造

と TNFR2 の相互作用様式の違いに基づき、両受容体特異的阻害剤設計の可能性を示すとともに細胞内へのシグナル伝達が TNF $\alpha$ -TNFR2 複合体の重合を通して行われているという提案を行った (図 2)。

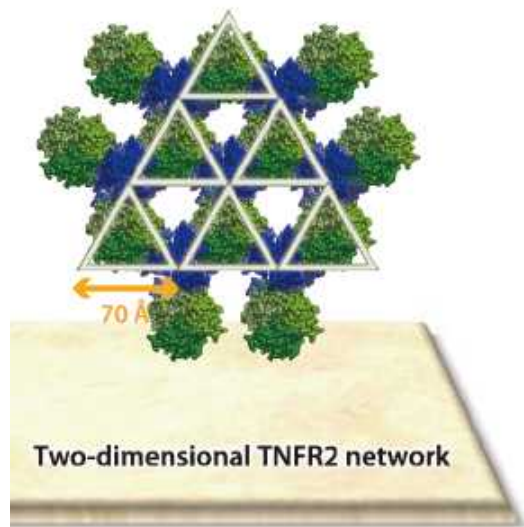


図 2、TNF $\alpha$ -TNFR2 複合体の重合モデル

2) TNFR ファミリーと自然免疫に関わる Toll 様レセプターファミリーの両方からのシグナルを伝達する働きをもつ TRAF6 のシグナル伝達機構に関しては、TRAF6BP 単独の X 線結晶構造解析の結果、TRAF6BP は、2 量体をとること、さらに 2 量体の接触面について推定できた。本結晶構造中では、TRAF6BP の 2 量体通しが、ジスルフィド結合を介した多量体構造を形成していた。しかし、本タンパク質は細胞中では還元的環境である細胞質に存在しているので、ジスルフィド結合を介した多量体構造は結晶化によるアーティファクトと思われた。そこで、ジスルフィド結合に関わっていた Cys を Ser に変異した変異型タンパク質を調製、結晶化し、X 線結晶構造解析を行ったところ、TRAF6BP は 2 量体がさらに 3 量体を形成する可能性が示唆された。これと以前に報告された TRAF6C の単量体構造 (Nature, 2002) を用いて、3 量体モデルを作成したところ、これと TRAF6BP の 6 量体がうまく複合体を作れるサイズと結合領域を持つ可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Preparation, Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Studies of the Glycosylated Form of Human Interleukin-23, T Shirouzono, M Chirifu, C Nakamura, Y Yamagata and S Ikemizu, Acta Cryst. F68, 432-435 (2012) 査読有

2. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the Subclass B3 Metallo- $\beta$ -Lactamase SMB-1 that Confers Carbapenem Resistance, J Wachino, Y Yamaguchi, S Mori, Y Yamagata, Y Arakawa and K Shibayama, Acta Cryst. F68, 343-346 (2012) 査読有

3. Structural Insights into Differences in Drug-binding Selectivity between Two Forms of Human  $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein Genetic Variants, the A and F1\*S Forms, K Nishi, T Ono, T Nakamura, N Fukunaga, M Izumi, H Watanabe, A Suenaga, T Maruyama, Y Yamagata, S Curry and M Otagiri, J. Biol. Chem., 286, 14427-14434 (2011) 査読有

4. Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 complex, Y Mukai, T Nakamura, M Yoshikawa, Y Yoshioka, S Tsunoda, S Nakagawa, Y Yamagata, and Y Tsutsumi, Science Signaling, 3, ra83-92 (2010) 査読有

5. The crystal structure of the green tea polyphenol(-)-epigallocatechingallate (EGCG)-transthyretin complex reveals a novel binding site distinct from the thyroxine binding site, M Miyata, T Sato, M Kugimiya, M Sho, T Nakamura, S Ikemizu, M Chirifu, M Mizuguchi, Y Nabeshima, Y Suwa, H Morioka, T Arimori, M A Suico, T Shuto, Y Sako, M Momohara, T Koga, S Morino-Koga, Y Yamagata and H Kai, Biochemistry, 49, 6104-6114 (2010) 査読有

6. Structure of Metallo- $\beta$ -lactamase IND-7 from a Chryseobacterium indologenes Clinical Isolate at 1.65 Å Resolution, Y Yamaguchi, N Takashio, J Wachino, Y Yamagata, Y Arakawa, K Matsuda, and H Kurosaki, J. Biochemistry (Tokyo) 147, 905-915 (2010) 査読有

[学会発表] (計14件)

1.  $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質バリエーション間のリガンド認識機構、石井宏志、中村照也、小野知美、和泉実代子、渡邊博志、小田切優樹、山縣ゆり子、丸山徹、第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2012.8.6、ホテル平安の森京都(京都)

2. 効率よくセフェム系  $\beta$ ラクタム剤を加水分解するメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ(KHM-1)の構造学的解析、山口佳宏、西並隆、安田健二、切替照雄、山縣ゆり子、黒崎博雅、第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2012.8.6、ホテル平安の森京都(京都)

3. Citrobacter freundii 由来メタロ-β-ラクタマーゼ(KHM-1)の単核 Zn 型および複核 Zn 型の結晶構造、山口 佳宏、西並 隆、安田 健二、切替 照雄、山縣 ゆり子、黒崎 博雅、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012.6.22、名古屋国際会議場(名古屋)

4. ヒトα1- 酸性糖蛋白質による薬物結合の構造学的基盤、中村 照也、和泉 実代子、渡邊博志、小田切 優樹、丸山 徹、山縣 ゆり子、第 12 回日本蛋白質科学会年会、2012.6.20、名古屋国際会議場(名古屋)

5. インターロイキン 23 の X 線結晶構造解析、四郎園巧、池鯉鮒麻美、中村千陽、中村照也、山縣ゆり子、池水信二、平成 23 年度日本結晶学会年会、2011.11.24、北海道大学(札幌)

6. Crystal Structure of Interleukin-23. Takumi Shirouzono, Mami Chirifu, Chiharu Nakamura, Teruya Nakamura, Yuriko Yamagata, Shinji Ikemizu, 17<sup>th</sup> International Conference of Biophysics, 2011.11.3, Beijing, China

7. インターロイキン 23 の X 線結晶構造解析、四郎園巧、池鯉鮒麻美、中村千陽、中村照也、山縣ゆり子、池水信二、第 9 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2011.9.12、ホテル箱根アカデミー(箱根)

8. Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex, Yohei Mukai, Teruya Nakamura, Mai Yoshikawa, Yasuo Yoshioka, Shin-ichi Tsunoda, Shinsaku Nakagawa, Yuriko Yamagata, and Yasuo Tsutsumi, XXII Congress of the International Union of Crystallography, 2011.8.24, Madrid, Spain

9. インターロイキン 23 の X 線結晶構造解析、四郎園巧、池鯉鮒麻美、中村千陽、中村照也、山縣ゆり子、池水信二、第28回PFシンポジウム、2011. 7.12-13、つくば国際会議場エポカル(つくば)

10. 112 位と114位のアミノ酸残基はα1- 酸性糖タンパク質バリエーション間の薬物結合選択機構に寄与する、丸山徹、和泉実代子、中村照也、西弘二、小野知実、渡邊博志、山縣ゆり子、小田切優樹、日本薬学会第131回年会、2011.3.28、ツインメッセ静岡(静岡)

11. α1-酸性糖タンパク質の薬物結合に関する構造生物学的研究、和泉実代子、中村照也、小野知実、渡邊博志、山縣ゆり子、小田切優樹、丸山徹、第27回日本薬学会九州支部大会、2010.12.11、長崎大学(長崎)

12. Cd(II)イオン置換メタロ-β-ラクタマーゼ(VIM-2)の結晶構造、山口佳宏、金 万春、松永和代、松山泰知、和知野純一、藤間祥子、井原敏博、山縣ゆり子、荒川宜親、黒崎博雅、平成22年度日本結晶学会年会、2010.12.3、大阪大学(大阪)

13. Crystal Structure of the Glycosylated Form of Interleukin-23, M. Chirifu, C. Hayashi, T. Nakamura, Y. Yamagata, S. Ikemizu, 3<sup>rd</sup> International Symposium on Diffraction Structural Biology, 2010.5.25, Orsay, France

14. ヒトα1-酸性糖タンパク質/薬物複合体のX線結晶構造解析、和泉実代子、小野知実、中村照也、西弘二、渡邊博志、丸山徹、山縣ゆり子、小田切優樹、日本薬学会第25年会、2010.5.12、徳島県郷土文化会館(徳島)

[その他]

報道関係

TNFとTNFR2複合体のX線結晶構造解析の成果が、平成22年12月27日(月)に日刊薬業の10面と日経産業新聞の10面に掲載された。

ホームページ

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/sb/index.html>

アウトリーチ活動

平成23年度熊本大学女子中高校生の理系進路選択支援事業 平成23年10月22日(熊本大学医学部保健学科)

「立体構造の美しいタンパク質に魅せられて」約20名の女子中高校生にタンパク質の立体構造決定に関する話をした。参加者の9割が、理系科目の勉強は将来の自分にとって必要と思うや理系のイメージ好感度がアップした、8割が科学技術に関係する職業に就きたいと思う等のアンケートの結果を得た。

6. 研究組織

(1)研究代表者

山縣 ゆり子 (YAMAGATA YURIKO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号:40183678

(2)研究分担者

なし

(3)連携分担者

なし