

令和 3 年 6 月 7 日
愛 媛 大 学

プロテインアレイを用いた大規模探索で 細胞死や炎症に関わる相互作用ペアを多数発見

～希少難病の病態解明や治療薬探索への応用に期待～

愛媛大学大学院医学系研究科解析病理学大学院生の Zhou Wei(ジョウ ウェイ)さんと、プロテオサイエンスセンターの竹田浩之(たけだ ひろゆき)准教授、増本純也(ますもと じゅんや)教授らを中心とする研究グループは、細胞死や組織に炎症を誘導するシグナル伝達に重要な役割を果たす「デスドメインスーパーファミリー」と呼ばれるタンパク質の部品(ドメイン)のセット(プロテインアレイ)を世界で初めて作製し、それを用いた大規模試験で新規の相互作用ドメインの組み合わせを多数発見することに成功しました。この研究には、愛媛大学独自の技術であるコムギ胚芽無細胞タンパク質合成技術、プロテインアレイ作製技術、高速スクリーニング技術が活用されました。

デスドメインスーパーファミリーを持つタンパク質同士の相互作用(結合)は、細胞内のシグナル伝達で重要な役割を担っており、細胞死や組織の炎症を誘導します(別紙図1参照)。このデスドメインスーパーファミリーの結合に異常をきたすと、希少難病である自己炎症疾患、自己免疫疾患や免疫不全症を引き起こします。しかし、ヒトはデスドメインスーパーファミリータンパク質を 100 種類以上持っており、その組み合わせは 1 万を超えます。これまで、この多数の組み合わせのうち、強く結合して細胞にシグナルを伝えるドメインのすべての組み合わせが明らかになっていなかったため、症状のひとつひとつの原因を解明し、それに対する治療薬を開発することが困難でした。

Zhou さんらの研究によって、強く結合するデスドメインスーパーファミリータンパク質間の組み合わせが明らかになりました。この成果により、これらの疾患の詳細な病態解明が進むものと考えられます。また、特定のデスドメインスーパーファミリー同士の過剰な結合を抑える薬剤を開発することで、これらの疾患の新たな治療法の開発につながる可能性があります。

本研究成果は、英国科学誌「*Cell Death & Differentiation*」に掲載され、オンライン版で公開されました(令和 3 年 5 月 15 日(日本時間))。また、論文掲載に先駆けて、本研究成果の一部を、令和 2 年 9 月に開催された第 93 回日本生化学会大会でも口頭発表しており、発表者の Zhou さんは若手優秀賞を受賞しています。

つきましては、是非、取材くださいますようお願いいたします。

記

掲載誌:Cell Death & Differentiation DOI: 10.1038/s41418-021-00796-x

題名:A comprehensive interaction study provides a potential domain interaction network of human death domain superfamily proteins

(和訳):網羅的ヒトデスドメインスーパーファミリー相互作用解析によるデスドメインスーパーファミリータンパク質間ネットワーク解明

主な著者:愛媛大学大学院医学系研究科解析病理学 大学院生 Zhou Wei

責任著者:愛媛大学プロテオサイエンスセンタープロテオ創薬部門 准教授 竹田 浩之

愛媛大学大学院医学系研究科解析病理学プロテオサイエンスセンター病理学部門 教授 増本 純也

本件に関する問い合わせ先

愛媛大学大学院医学系研究科解析病理学

増本 純也

TEL:089-960-5977

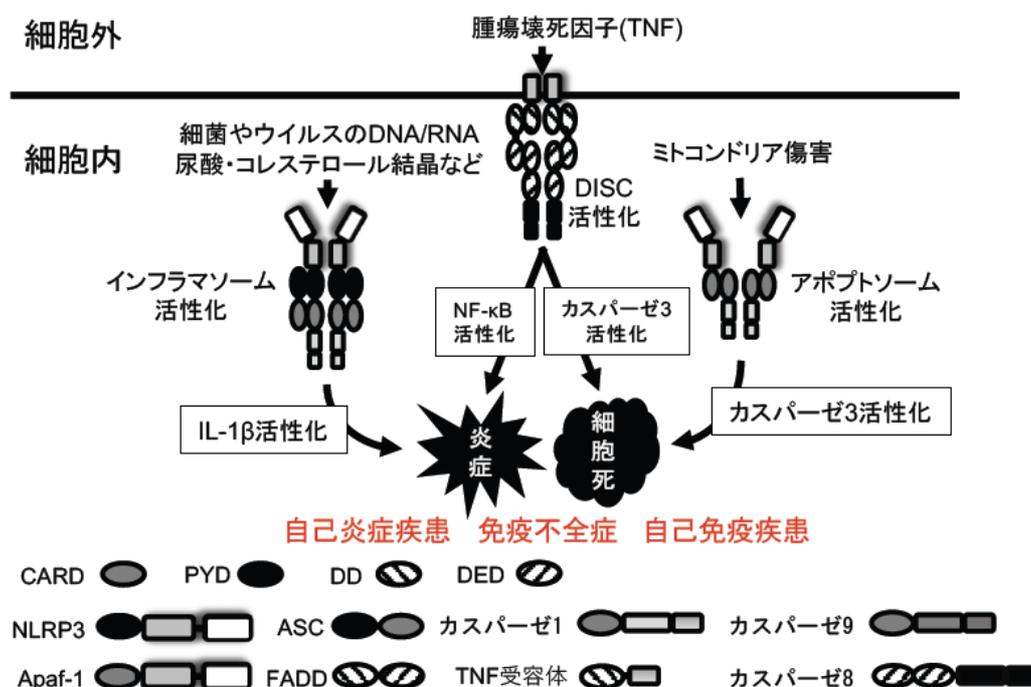
Mail:masumoto@m.ehime-u.ac.jp

※送付資料 7 枚(本紙を含む)

＜研究の背景と経緯＞

「デスドメインスーパーファミリー」はタンパク質とタンパク質を相互作用（結合）させる機能をもつドメイン（タンパク質の部品）です。このデスドメインスーパーファミリーを持つタンパク質（デスドメインスーパーファミリータンパク質）同士の相互作用は、細胞や組織を外敵から守る生体防御の重要な仕組みに関わります。細胞内にウイルスなどの病原体や危険物質が侵入したり、細胞内のシステムに異常がおきると、いくつかのデスドメインスーパーファミリータンパク質がそれらの異常を感知して、デスドメインスーパーファミリーを介してお互いに結合し、巨大な「複合体」をつくります。複合体が形成されたことが信号（シグナル）となり、その緊急信号を受け取った細胞は私たちの身体を守るための反応（炎症や細胞死）を起こします。

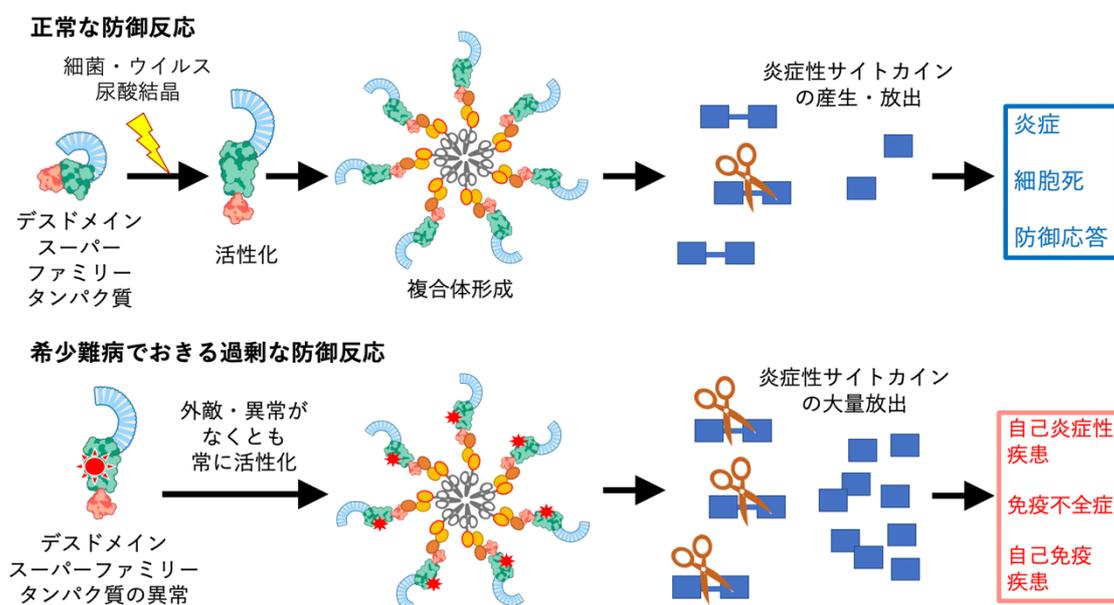
例えば、病原体や危険物質が細胞内に侵入すると、インフラマソームと呼ばれる巨大な複合体が形成(活性化)されます【図1】。インフラマソームが形成されることで、信号が伝わると、炎症性サイトカイン（周辺の組織に炎症を引き起こすことで外敵を排除する働きをもつ信号物質）のひとつであるIL-1 β が放出されます。同様に、細胞外からの腫瘍壊死因子(TNF)と呼ばれるサイトカインによる信号によってDISCと呼ばれる複合体が形成され、炎症や細胞死が誘導されます。細胞内でエネルギーを製造するミトコンドリアが壊れるとアポプトソームと呼ばれる複合体がつくられ、細胞死が誘導されます。



【図1】 デスドメインスーパーファミリータンパク質による生体防御機構

このように、デスドメインスーパーファミリータンパク質は私たちの身体を守っている重要な仕組みですが、ひとたびこれらのタンパク質が異常をきたし、暴走すると、自己炎症疾患、自己免疫疾患、免疫不全症などの希少難病の原因となることが知られています【図2】。これらの疾患のいくつかについては、どのデスドメインスーパーファミリータンパク質の相互作用異常が原因で、病気が引き起こされているのかという「疾患責任タンパク質」が明らかになっています。このような疾患では、原因となっている相互作用を抑えることで、シグナル伝達の暴走を抑える「分子標的治療薬」の開発が進められています。

しかし、症状のひとつひとつについて、どのようなデスドメインスーパーファミリータンパク質の相互作用が原因であるのかという病態メカニズムや、疾患責任タンパク質の不明な疾患では、治療薬の開発が進んでいません。その理由のひとつとして、デスドメインスーパーファミリータンパク質の数が多いことが挙げられます。ヒトは100種類を超えるデスドメインスーパーファミリータンパク質を持っており、それらの相互作用の組み合わせは1万数千に上ります。実際に細胞内で機能してシグナル伝達に関わっている「正しい」組み合わせは、この膨大な組み合わせのごく一部にかぎられます。希少難病の病態メカニズムを解明し、治療法を開発するためには、まずデスドメインスーパーファミリータンパク質同士の相互作用の正しい組み合わせを解明する必要があります。



【図2】自己炎症(性)疾患などの希少難病が発生するメカニズム

＜研究の内容＞

今回、医学系研究科解析病理学大学院生のZhou Weiさんをはじめとするプロテオサイエンスセンターの医工連携共同研究グループは、愛媛大学独自のコムギ胚芽無細胞タンパク質合成技術を使って、ヒトのデスドメインスーパーファミリー116種類を合成しました【図3】。このようなタンパク質のセットを「プロテインアレイ」と呼びます。116種類のヒト・デスドメインスーパーファミリーを揃えたプロテインアレイの作製は世界初の試みです。

研究グループは、プロテオサイエンスセンターが保有するスクリーニング設備（大規模な探索実験を高速で実施するための実験設備）と、作製したプロテインアレイを用いて、デスドメインスーパーファミリー同士を総当たりで反応させ、13,924通りの相互作用解析（結合の強さを測定する試験）を行いました【図3】。その結果、これまでに報告されていたドメインの組み合わせに加えて、これまで知られていなかった新たな相互作用ドメインの組み合わせを少なくとも20種類発見しました。



【図3】本研究の概要

本研究で新たに発見されたデスドメインスーパーファミリータンパク質間の相互作用は、細胞死や、組織に炎症を誘導する何らかのシグナル伝達で重要な役割を担っていると予想されます。今後、これらのタンパク質に注目した自己炎症疾患などの希少難病の病態に関する研究が進められると、いくつかの希少難病の原因や発症のメカニズムの解明につながることを期待されます。

さらに今回の研究の成果は、デスドメインスーパーファミリータンパク質同士の相互作用を標的とした薬の開発にも応用できます。この研究で用いた相互作用解析実験に薬剤を添加することで、デスドメインスーパーファミリーの相互作用に対する薬の作用を試験できます。この実験系を用いると、疾患の原因になるデスドメインスーパーファミリーの相互作用を抑える薬剤を探すことが可能となる

ため、過剰な防御反応を抑える、自己炎症疾患などの希少難病を治療する分子標的薬の開発が加速するものと期待されます。

本研究で得られた成果の要点を以下に示します。

- コムギ胚芽無細胞タンパク質合成技術を用いて、ヒトのデスドメインスーパーファミリー116種類からなるプロテインアレイを世界で初めて作製しました。
- 愛媛大学の大規模スクリーニング設備によって13,924通りの相互作用解析を行い、新規の相互作用を少なくとも20種類発見しました。
- 新規の相互作用は自己炎症疾患などの希少難病の病態メカニズムの解明だけでなく、それらの疾患に対する分子標的として、創薬への応用が期待されます。

■用語説明

コムギ無細胞タンパク質合成系

コムギ無細胞タンパク質合成系は愛媛大学プロテオサイエンスセンターで開発された、タンパク質生産技術です。コムギ胚芽の抽出液を用いて試験管内で安定して高効率にタンパク質を合成できます。微生物から高等生物、さらに人工タンパク質に至るまで多様なタンパク質を生産し、さまざまな実験に用いることができます。プロテインアレイの製造にはコムギ無細胞タンパク質合成系の高い翻訳効率が必要です。

プロテインアレイ

数十から数万の組換えタンパク質を収集したタンパク質のセットをプロテインアレイと呼びます。愛媛大学で開発しているプロテインアレイは、コムギ無細胞タンパク質合成技術を用いてタンパク質を個別に合成し、極小の試験管を集積したタイターウェルプレート上にアレイ状に配置しています。プロテインアレイを用いることで、非常に膨大な数のタンパク質を用いて疾患に関係するタンパク質の探索や、治療薬の探索を効率的に実施することができます。

相互作用解析システム

生体内において、タンパク質は、低分子や他のタンパク質と相互作用（結合）することで機能を発揮しています。タンパク質の相互作用の解析は基礎生命科学から創薬研究まで重要です。愛媛大学プロテオサイエンスセンターでは、

- ・ コムギ無細胞タンパク質合成系で生産したタンパク質
- ・ タンパク質の相互作用を鋭敏に検出できる相互作用解析系
- ・ ロボット分注装置などを駆使して1日あたり最大6万反応以上の実験を実施できる高速解析システム

を開発し、大規模なタンパク質間相互作用研究を推進しています。

デスドメインスーパーファミリー

細胞死を誘導するシグナルに関わる同じような構造を有する結合ドメインの総称。**CARD** (カスパーゼ・リクルートメント・ドメイン)、**PYD** (パイリン・ドメイン)、**DD** (デス・ドメイン)、**DED** (デス・エフェクター・ドメイン)の4つが知られている。

インフラマソーム

外来の異物や自己の危険な代謝産物などを認識し、活性化される細胞内タンパク質複合体。**NLRP3** というセンサー、**ASC** というアダプター、カスパーゼ**1** というタンパク質分解酵素からなる。活性化されると、炎症性サイトカインのひとつである**IL-1 β** を活性化して炎症を誘導する。

アポプトソーム

細胞内のミトコンドリアの傷害によって漏れる物質を認識し、活性化される細胞内タンパク質複合体。**Apaf-1** というセンサー、カスパーゼ**9** というタンパク質分解酵素からなる。活性化されると、細胞を構成する成分を分解するカスパーゼ**3** というタンパク質分解酵素を活性化して細胞死を誘導する。

DISC

細胞死誘導シグナル複合体の略。腫瘍壊死因子(TNF)を認識する**TNF** 受容体、**FADD** というアダプター、カスパーゼ**8** というタンパク質分解酵素からなる。活性化されると、細胞を構成する成分を分解するカスパーゼ**3** というタンパク質分解酵素を活性化して細胞死を誘導する。一方で、炎症に関わるタンパク質の産生を誘導する**NF- κ B** という転写因子を活性化して炎症を誘導する。

IL-1 β

細胞から放出されて炎症を誘導するタンパク質である炎症性サイトカインという物質のひとつで、インフラマソームが活性化することによって前駆体から切断されて活性化する。

希少難病

患者数が少ないため、病態解明や治療薬開発が進んでいない難治性疾患の総称。本研究では自己炎症疾患などの難治性炎症疾患や免疫不全症を対象としている。

<まとめ・今後の展望>

今回の研究成果により、

- 1) 生体防御や疾患に関わる可能性が高いデスドメインスーパーファミリーの新規の相互作用を20種類以上発見できたこと。
- 2) 本研究で見出された相互作用は希少難病の病態解明にとって重要な発見であること。
- 3) これらの相互作用は新規の分子標的候補として創薬への応用が期待されること。

などが示されました。

デスドメインスーパーファミリーは希少難病だけではなく、多くの生活習慣病や感染症にも関わっているため、今回の研究成果は、これらの疾患に対する病態解明と創薬への応用が期待されます。