

令和元年6月12日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15444

研究課題名(和文)ジアシルグリセロールキナーゼが癌細胞増殖を促す一方でT細胞を不活化する分子機構

研究課題名(英文) Molecular basis underlying cancer cell proliferation and T-cell anergy induction by diacylglycerol kinase alpha

研究代表者

高橋 大輔 (Takahashi, Daisuke)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：70791523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は、脂質メッセンジャーであるDGとPAの細胞内濃度を調整する脂質代謝酵素である。しかしながら、その生理・病理学的重要性にもかかわらず、未だ構造生物学的理解は乏しい。本研究では、DGKを昆虫細胞により初めて大量発現させ、活性を保持した試料を高純度・高収率に精製することに成功した。さらにDGK N末端の活性制御領域であるDGK-EFのCa²⁺結合型の結晶構造を新規に決定するとともに、Ca²⁺が結合するとDGK-EFがプロテアーゼ耐性のあるリジッドな構造へと変化することを生化学・物理化学的手法を用いて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質キナーゼであるDGKに関する構造生物学的理解は乏しく、活性が確認されて以来約60年、DGK触媒領域の構造は不明のままである。特に、がん免疫治療の標的の一つとして近年注視されているDGKの構造基盤の解明は、構造に指南された阻害剤開発のためにひも必要である。本研究で初めて確率した昆虫細胞によるDGK試料の大量発現・精製法およびN末端EFハンドドメインの構造決定と構造変化の解析は、これまで遅れていたDGKの構造研究を進展させるものである。

研究成果の概要(英文)：Diacylglycerol kinases (DGKs) modulate the levels of lipid messenger, DG and PA, thus function as a molecular hub for cellular signaling. To date, however, little progress has been made for the structural biology of DGKs including the structural basis for its catalytic function and regulation. In this study, we have produced a full-length DGK using baculovirus-insect cell expression system. The purified protein was found to be a monomer and enzymatically active, demonstrating that this approach is very promising to produce DGK for future functional and structural studies. Furthermore, we have determined the first crystal structure of the N-terminal EF-hand motifs (DGK-EF) in its Ca²⁺ bound form. Our biochemical and biophysical analyses also reveal that DGK-EF adopts a protease-susceptible "open" conformation and cooperative binding of two Ca²⁺ ions induce substantial conformational changes, likely regulates intramolecular interactions responsible for the activation of DGK.

研究分野：蛋白質科学, 構造生物学, 生化学

キーワード：ジアシルグリセロールキナーゼ 脂質キナーゼ マルチドメイン蛋白質 構造解析 昆虫細胞・バキュロウイルス EFハンド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、ジアシルグリセロール (DG) をリン酸化しホスファチジン酸 (PA) を産生する脂質キナーゼである。DGKは、これらの脂質セカンドメッセンジャーの細胞内濃度を緻密に調節することにより、シグナル伝達の制御因子として機能している。哺乳類では、これまで10種のDGKアイソフォームが同定されており、各DGKアイソフォームが細胞の生存、増殖、分化など、多彩な生理機能および病態に関与していることが報告されている。

申請者の研究グループは、DGK α アイソザイムががん細胞において高発現し、がん細胞の増殖を促すことを見出した。一方で、免疫細胞 (T細胞) では、RasGRPを活性化するDGをDGK α が消費し、T細胞の非応答状態 (anergy) が誘導されることが報告されている。近年、申請者のグループは、この「がん細胞を増殖させ、逆にT細胞を不活化する」という極めてユニークなDGK α のはたらきに注目し、DGK α 阻害剤のスクリーニングを行った。その結果、DGK α に特異的な阻害剤CU-3を同定し、CU-3による阻害が、がん細胞のアポトーシスを誘導し、Tリンパ球を活性化することを明らかにした。このことは、DGK α 阻害剤が「がん細胞の増殖を抑制し、かつ、がん免疫の活性を亢進する」という二重の効果を持つ画期的な抗がん剤となり得る可能性を示しており、DGK α は、国内外でも新規のがん免疫治療ターゲットとして注視されている。しかしながら、その生理学的・創薬学的重要性にもかかわらず、がん細胞と免疫細胞において逆の効果をもつDGK α については、下記のようにその立体構造および相互作用蛋白質を含め、蛋白質分子レベルでの理解が未だ乏しい。

(1) DGKは生体膜脂質のなかでも疎水性が高く露出が少ないDGを認識してリン酸化する。しかしながら、1959年にDGK活性が見つかった以来、他のアイソフォームも含め、DGKの立体構造は未決定のままであり、基質認識と触媒機構についての構造生物学的理解はほとんど進んでいない。今後の合理的な創薬のためにも、DGK α の立体構造情報が求められている。

(2) これまで申請者のグループは、DGK α が関与するシグナル伝達経路 (NF- κ B経路, Ras/ERK経路) を明らかにしてきたが、Srcチロシンキナーゼの一例を除いては、DGK α と直接相互作用するタンパク質はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

DGK α の酵素機能を原子レベルで解明するため、そして新規に同定したCU-3をリード化合物として、今後さらに効果的な阻害剤を設計していくためには、DGKの立体構造情報が不可欠である。本研究ではX線結晶構造解析によりDGK α (N末端制御領域とC末端触媒領域, 図1) の立体構造を決定し、分子内活性制御機構および触媒機構を原子レベルで明らかにすることを目的とした。なお、上記 (2) の相互作用蛋白質については、今後の研究課題としたい。

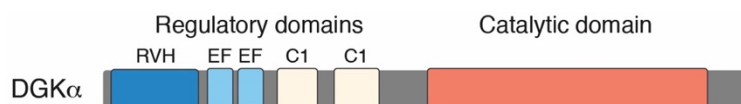


図 1. DGK α のドメイン構造

3. 研究の方法

(1) DGK α 触媒領域および全長試料の発現と精製

構造解析, 相互作用解析で使用するヒト由来DGK α 触媒ドメインを種々の可溶化タグを付加し、大腸菌にて発現した。さらに、DGK α 触媒ドメイン及び全長の試料をバキュロウイルス-昆虫細胞発現系において発現させ、その後 Ni-affinity, ゲル濾過クロマトグラフィーで精製し、解析に用いた。

(2) DGK α 全長試料の活性測定と構造解析

ADP 発光検出系を用いた活性測定系を用いて、精製した全長 DGK α の活性を測定し、DGK 活性の Ca²⁺、ATP、DG 依存性を調べた。全長 DGK α の円偏光二色性スペクトル測定による二次構造解析、結晶化スクリーニングを行った。

(3) DGK α -EF の結晶化と構造解析

大腸菌により発現し、その後精製した DGK α N 末端の EF ハンド領域 (DGK α -EF) の結晶化を行った。得られた結晶を用いて X 線構造解析を行い、Ca²⁺結合型の立体構造を決定した。

(4) DGK α -EF の Ca²⁺結合能、コンフォメーション変化の生化学・物理化学的解析

DGK α -EF とその変異体を用いて、Ca²⁺結合の親和性、結合様式を等温滴定型カロリメトリー (ITC) により調べた。さらに Ca²⁺結合によるコンフォメーション変化を物理化学・生化学的手法により解析した。

4. 研究成果

(1) 昆虫細胞による DGK 大量発現系の構築

初めに種々の可溶化タグ (GST, MBP, Sumo) を付加した DGK α 触媒ドメイン (DGK α -CD) を作成し、大腸菌にて発現させたが、全てのコンストラクト (24 種) が、不溶性の封入体、或いは可溶性の凝集体を形成することが明らかになった。次に、バキュロウイルス・昆虫細胞 (Sf9) 発現系を用いて DGK α -CD の発現を試み、Ni²⁺アフィニティ、ゲル濾過クロマトグラフィー (SEC) による精製を進めたが、この場合も DGK α -CD は Sf9 由来の夾雑蛋白質とともに可溶性の凝集体を形成した。これらに対して、全長 DGK α は、昆虫細胞で発現後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより単量体として高純度に精製することができた (図 2)。収量も細胞培養 1L あたり 1.3mg であり、結晶化スクリーニング、物理化学的解析、相互作用蛋白質探索のための DGK α 試料を充分得ることができた。

(論文⑥)

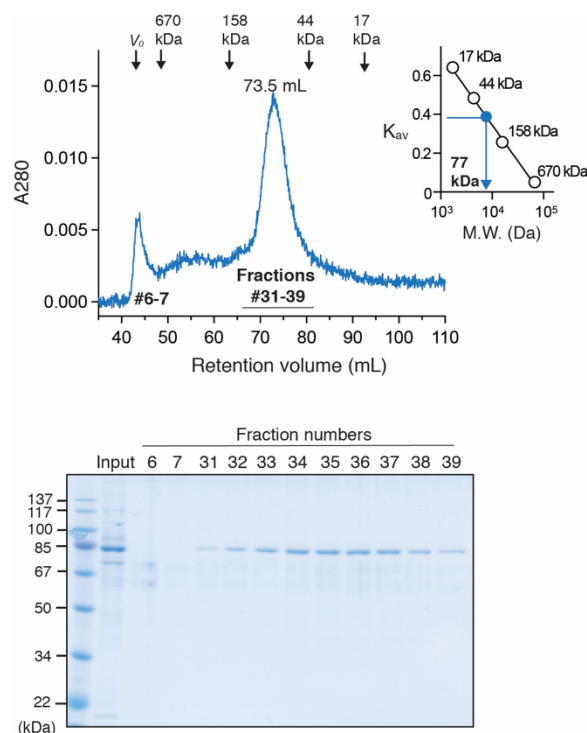


図 2. 昆虫細胞を用いた DGK α の発現・精製

また、精製した DGK α は活性を保持しており、DG、ATP に対する濃度依存性も、ブタ胸腺から精製された DGK α および Cos7 細胞で発現させた DGK α と差異のない結果が得られた。さらに本研究成果を活かし、DGK ζ アイソザイムの発現系も構築した。(論文②)

DGK α 試料を濃縮し、結晶化のスクリーニングを試みたが、これまで結晶は得られていない。引き続き結晶化を進めるとともに、収量・結晶化能向上のための試料の改変を行い、X線構造解析のための良質な蛋白質結晶を得る必要がある。

(2) Ca²⁺結合型 DGK α -EF の立体構造解析とコンフォメーション変化の解析

X線回折法により Ca²⁺結合型 DGK α -EF の立体構造を 2.1 Å の分解能で決定した (図 3)。一見、DGK α -EF は、標準的な EF-hand 構造をとっているが、リガンド様ヘリックスと呼ばれる付加的なヘリックス (LM-helix) を EF-hand の疎水性コアにパッキングさせていることが明らかになった。さらに、物理化学・生化学的解析により、DGK α -EF は Ca²⁺ の非存在下でトリプシンがアクセスしやすいオープンな構造を保持し、二量体を形成することを明らかにした。DGK α は Ca²⁺ により活性化されることがこれまで明らかになっている。本研究では、Ca²⁺ 結合が誘導する DGK α -EF の顕著な構造変化を明らかにし、それに付随する分子内 (個々のドメイン間) 相互作用の変化が活性化のために重要であることを構造生物学的観点から示唆することができた (論文③)。

今後、本研究で得られた DGK α -EF の立体構造と構造変化に関する知見を起点として、DGK α の分子内活性制御機構の分子基盤をさらに解明していく予定である。

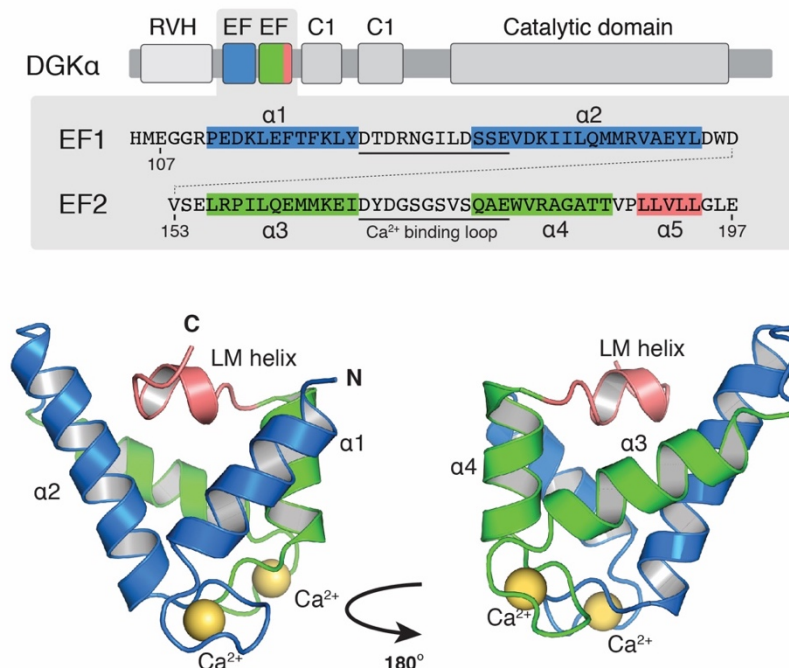


図 3. DGK α -EF の立体構造

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Iwata, K., Sakai, H., Takahashi, D. and Sakane F. Myristic acid specifically stabilizes diacylglycerol kinase δ protein in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*, 1864, 1031–1038 (2019). DOI: 10.1016/j.bbalip.2019.04.003
- ② Saito, T., Takahashi, D. and Sakane, F. Expression, purification and characterization of human diacylglycerol kinase ζ . *ACS Omega*, 4, 5540–5546 (2019)
- ③ Takahashi, D., Suzuki, K., Sakamoto, T., Iwamoto, T., Murata, T., and Sakane, F. Crystal structure and calcium-induced conformational changes of diacylglycerol kinase α EF-hand domains. *Protein Science*, 28, 694–706(2019)

- ④ Yamaki, A., Akiyama, R., Murakami, C., Takao, S., Murakami, Y., Mizuno, S., Takahashi, D., Kado, S., Taketomi, A., Shirai, Y., Goto, K. and Sakane, F. Diacylglycerol kinase α -selective inhibitors induce apoptosis and reduce viability of melanoma and several other cancer cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, in Press, (2018). DOI: 10.1002/jcb.28288
- ⑤ Maeda, Y., Shibata, T., Akiyama, R., Murakami, Y., Takao, S., Murakami, C., Takahashi, D., Sakai, H., and Sakane, F. Diacylglycerol kinase β induces filopodium formation via its C1, catalytic and carboxy-terminal domains and interacts with the Rac1-GTPase-activating protein, β 2-chimaerin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **504**, 54-60, (2018). DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.119
- ⑥ Takahashi, D. and Sakane, F. Expression and purification of human diacylglycerol kinase α from baculovirus-infected insect cells for structural studies. *Peer J*, 6, e5449, (2018). DOI: 10.7717/peerj.5449
- ⑦ Lu, Q., Komenoi, S., Usuki, T., Takahashi, D., and Sakane, F. Abnormalities of the serotonergic system in diacylglycerol kinase δ -deficient mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **497**, 1031-1037, (2018).
- ⑧ Mizuno, S., Sasai, H., Kume, A., Takahashi, D., Satoh, M., Kado, S. and Sakane, F. Dioleoyl-phosphatidic acid selectively binds to α -synuclein and strongly induces its aggregation. *FEBS Letters*, **591**, 784–791 (2017).

[学会発表] (計 11 件)

- ① 高橋大輔, 複数ドメイン “モジュール” 蛋白質の活性を制御する分子・構造基盤, 第 6 回生命分子科学研究会, 2019 年 3 月 7 日, 福岡 (口頭発表)
- ② 山田遥夢, 高橋大輔, 坂根郁夫, α -シヌクレインの脂質結合能の解析と PA プローブへの応用 (Lipid binding analysis of α -synuclein for the development of a novel PA probe), 第 91 回日本生化学会大会, 2018 年 9 月 24~26 日, 京都 (口頭発表+ポスター)
- ③ 西藤巧, 高橋大輔, 坂根郁夫, バキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いたジアシルグリセロールキナーゼ ζ の発現精製と酵素学的解析 (Characterization of purified diacylglycerol kinase ζ expressed in insect cells), 第 91 回日本生化学会大会, 2018 年 9 月 24~26 日, 京都 (ポスター)
- ④ Lu, Q., Komenoi, S., Takahashi, D. and Sakane, F. Abnormalities of the serotonergic system in diacylglycerol kinase δ -deficient mouse brains. 59th International Conference on the Bioscience of Lipids "Lipid Fluxes and Metabolism –From Fundamental Mechanisms to Human Disease": Helsinki, Finland: September 4–7, 2018.
- ⑤ Lu, Q., Komenoi, S., Takahashi, D. and Sakane, F. Abnormalities of the serotonergic system in diacylglycerol kinase δ -deficient mouse brains. 1st International Symposium on Soft Molecule Activation Research Center: Chiba, Japan, August 31–September 1, 2018.
- ⑥ Brummett, L., Sachdev, B., Takahashi, D., Dittmer, N.T., and Kanost, M.R. Blue Blood Proteomics: Relative and accurate measurement of hemolymph protein abundance in *Manduca sexta* immune response, using *in vivo* ^{15}N metabolic labelling and mass spectrometry 10th International Conference on Molecular Biology and Genetics of Lepidoptera, Orthodox Academy of Crete, Kolympari, Crete, Greece, August 19–25th, 2018.
- ⑦ Takahashi, D., Suzuki, K., Sakamoto, T., Iwamoto, T., Murata, T., and Sakane, F. Molecular basis for the intramolecular regulation of DGK α : analysis of Ca^{2+} induced conformational changes in N-terminal EF-hand motifs. 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018 年 6 月 26~28 日, 朱鷺メッセ, 新潟 (ポスター)
- ⑧ 陸強, 米野井優, 高橋大輔, 坂根郁夫, ジアシルグリセロールキナーゼ δ の欠損はセロトニン神経系の機能低下を惹起する. 2018 年度生化学会関東支部例会, 2018 年 6 月 23 日, 埼玉 (ポスター)
- ⑨ 陸強, 米野井優, 高橋大輔, 坂根郁夫, ジアシルグリセロールキナーゼ δ の欠損はセロトニン神経系の機能低下を惹起する. 第 60 回日本脂質生化学会, 2018 年 5 月 31~6 月 1 日,

東京（口頭）

- ⑩ 川瀬功暉, 高橋大輔, 坂本泰一, 坂根郁夫, 新規リン脂質プローブの開発を目指したジアシルグリセロールキナーゼ η プレクストリン相同ドメインの脂質結合解析. 日本分子生物学会/日本生化学会 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017, 神戸（ポスター）
- ⑪ Takahashi, D., Satoh, E., Sakane, F. Expression and purification of diacylglycerol kinase α catalytic domain for crystallographic studies. *The 7th mini-international symposium on DGK*, Kobe University, Japan, March, 2017.

[図書]（計 0 件）

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

[その他]

ホームページ等

九州大学大学院 薬学研究院 蛋白質創薬学分野

<http://meneki.phar.kyushu-u.ac.jp/Protein/TOP.html>

千葉大学大学院 理学研究院 化学研究部門 生体機能化学研究室

<https://sakane32.wixsite.com/biofunctionchemistry>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：坂根 郁夫

ローマ字氏名：Fumio Sakane

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。