

## 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24年 4月 2日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770112

研究課題名（和文） 動的なオリゴマー形成因子による新規シグナル伝達制御の構造基盤

研究課題名（英文） Structural basis of a novel Wnt signaling regulation by dynamic oligomerized proteins

## 研究代表者

寺脇慎一（TERAWAKI SHIN-ICHI）

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10452533

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、高等生物の細胞増殖、分化の制御にはたらく Wnt シグナル伝達において、動的なオリゴマーを形成して機能する Coiled-Coil DIX1 (CCD1) と Axin の間で作られる複合体の調製と結晶化、および大型放射光施設 SPring-8 を使用した X 線結晶構造解析の研究を進めた。CCD1 と Axin のオリゴマー形成と分子間相互作用の両方に必要とされる DIX ドメインについて、発現系の構築と精製方法を検討した。また、Axin の CCD1 結合領域を最適化して、動的な光散乱測定による複合体試料の分析をおこなった。さらに、CCD1-Axin 複合体の結晶化条件を探索し、得られた結晶について、X 線回折実験をおこない結晶品質の評価をおこなった。その結果、分解能 20 Å 程度の低分解能の回折点の観測に成功した。今後、結晶品質の改善に向けた研究を進める必要がある。

## 研究成果の概要（英文）：

The Wnt signaling pathway plays an essential role in cell growth, differentiation, polarity formation and neural development. Coiled-Coil DIX1 (CCD1) and Axin have a novel ability to form dynamic oligomers and the complex formation. To elucidate the interaction between CCD1 and Axin, we have been carried out structural studies of the CCD1-Axin complex using X-ray crystallography. We established the preparation of the DIX domains of both proteins, which are necessary for the dynamic oligomerization and the complex formation. We performed crystallization trials on the CCD1-Axin complex. The crystals were unsuitable for crystallographic analysis because their diffraction quality was poor (around 20 Å). Improvement of the crystallization condition is required for the structural analysis of the CCD1-Axin complex.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物化学

キーワード：動的オリゴマー形成、Wnt シグナル伝達、DIX ドメイン

### 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル伝達は、ショウジョウバエから人に至る高等生物に高度に保存されたシグナル伝達経路であり、初期発生における体軸形成や器官形成、神経細胞や毛髪再生をになう特定の細胞への分化に必須である。また、種々のヒト疾患で細胞内シグナル伝達を構成するタンパク質の遺伝子変異が見出されており、臨床医学的にも注目を集めている。分泌型糖タンパク質である Wnt が受容体に結合することで伝達される Wnt シグナル伝達は、受容体直下に CCD1、Dvl、Axin の 3 つの蛋白質を配置することによって、遺伝子発現や細胞運動を制御している(図 1)。 CCD1、Dvl、Axin は、共通に保存された DIX ドメインを介してシグナル依存的に動的なオリゴマーを形成する(図 2)。申請者の所属グループによる DIX ドメインの X 線結晶構造解析の結果、DIX ドメインは、らせん状に連なった動的なホモオリゴマー構造をとることが明らかになっている(*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007, 14, 484-492)。このことは、Wnt シグナル伝達経路では、DIX ドメインを持つ動的オリゴマー形成因子群が、一過的に会合・離散する特性を介して下流へのシグナルを制御することを示している。また、DIX ドメインは、動的なオリゴマーを形成する機能に加えて、分子間相互作用にも必要とされるため、Wnt シグナル伝達制御に極めて重要な役割を持っているが、その標的認識の分子機構やオリゴマー形成との相関関係は不明であった。そのため、Wnt シグナル伝達を制御する分子機構を理解するためには、動的なオリゴマー形成因子による複合体形成時の溶液中の挙動の解析と X 線結晶構造解析による構造的研

究が必要であると考えられていた。

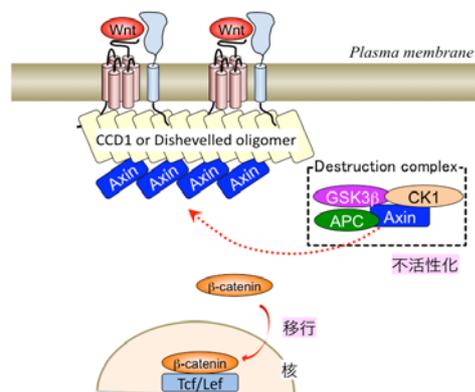


図 1) Wnt シグナル伝達において、CCD1、Dishevelled によるオリゴマーは、Wnt と結合した受容体直下に形成される。Axin は、Glycogen Synthase kinase 3  $\beta$  (GSK3  $\beta$ )、Adenomatous Polyposis Coli (APC)、Casein kinase 1 (CK1) と複合体 (Destruction Complex) を形成しているが、CCD1 または Dishevelled オリゴマーに Axin が結合することで、 $\beta$  カテニンのリン酸化が抑制され、核へと移行し遺伝子発現を促進する。

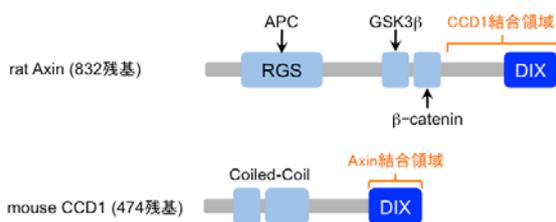
### 2. 研究の目的

本研究では、解離、会合を繰り返す動的なオリゴマーを形成する DIX ドメインが、標的タンパク質を認識する分子機構と Wnt シグナル伝達制御の仕組みの解明に向けた研究をおこなった。Wnt シグナル伝達では、CCD1 が Axin と DIX ドメインを含む領域を介して複合体をつくることで、シグナル伝達の活性化に働くことが報告されている(*Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 4414-4422)。しかし、DIX ドメインを介した分子間相互作用の詳細や CCD1 が Axin にどのような作用を及ぼすことでシグナル伝達経路を活性化するのは不明である。そこで、本研究では、CCD1 DIX ドメインと Axin DIX ドメインとの複合体の X

線結晶構造解析をおこない、DIX ドメインの分子間相互作用を原子レベルで解明することを目標とした。さらに、Axin DIX ドメインの単独オリゴマー構造と複合体中での立体構造の比較をおこない、Axin の分子構造の変化とシグナル伝達制御との関係を調べることを計画した。

### 3. 研究の方法

図 2) Axin と CCD1 のドメイン構成



(1) 図に示すように、CCD1 と Axin の相互作用領域である DIX ドメインを含む領域の大腸菌発現系を構築し、相互作用に必要な最小領域かつ構造的に安定な領域の同定を試みた。様々な領域を持つタンパク質を発現させ、アフィニティーカラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムをもちいて精製し、MBP pull-down assay により相互作用を確認しつつ、発現領域の至適化をおこなった。

(2) 相互作用が確認された領域の複数の組み合わせで、CCD1-Axin 複合体を形成させ、動的光散乱測定をおこない、CCD1、Axin の単独条件と複合体を形成させた条件の下で観測される会合体の分子量変化を分析した。

(3) CCD1-Axin 複合体について、結晶化を試みた。市販のスクリーニングキットをもちい、10°Cおよび4°Cにおいて結晶化スクリーニングをおこなった。得られた初期条件について、沈殿剤濃度、タンパク質濃度、pH、温度等の条件を精密化し、アディティブスクリーニングやシーディング等の手法をもちい結晶化条件の最適化をおこなった。

(4) CCD1 DIX ドメイン単独で形成されるオリ

ゴマー状態の原子レベルでの分析をおこなうために、CCD1 DIX ドメイン単独の結晶化およびX線結晶構造解析をおこなった。

### 4. 研究成果

Axin DIX ドメインの立体構造を基にしたアミノ酸配列の比較から、CCD1 の DIX ドメイン領域を予測し、ドメイン境界を決定した。この情報元に、発現系構築をおこない、精製方法を確立した。精製した CCD1 DIX ドメインは、動的光散乱分析の結果、濃度依存的なオリゴマーを形成することが確認された。さらに、CCD1 DIX ドメイン単独の結晶化に成功し、放射光施設 Spring-8 における X 線回折実験をおこなった結果、分解能 3.0 Å の回折データの収集に成功した。また、多波長異常分散法により実験位相を決定するために、セレノメチオニン置換体結晶を作成し、3 つの異なる波長で測定し、回折データを取得した。以上の結果は、結晶化報文として発表した(主な発表論文等・雑誌論文1)。

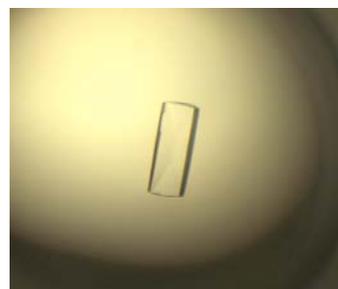


図 3) CCD1 DIX ドメインの結晶

CCD1-Axin 複合体を調製するために、Axin の CCD1 結合領域の至適化を Pull-down assay によっておこなった。研究開始当初、CCD1 は、Axin の DIX ドメインの N 末端側の領域に結合することを他研究グループの報告から予測していたが、我々の分析の結果、Axin が CCD1 の DIX ドメインと結合するためには、C 末端の DIX ドメインが必須であることがわかった。さらに、Axin と CCD1 の DIX ドメイン領域を利用して複合体を形成させた条件下で動的

光散乱分析をおこなった結果、Axin と CCD1 の等量モルの混合溶液は、単独での溶液状態と比較して、より単分散の傾向を示すことが明らかになった。Axin と CCD1 は、単独では、それぞれ異なる分子量分布を示し、それぞれの分散度は 40%程度に見積もられる。等量比で混合した試料は、分子量分布に変化が見られ、さらに、Axin、CCD1 の DIX ドメイン単独の状態よりも分散度が改善された単一ピークが検出された。また、高濃度の複合体溶液では、分子量分布がより高分子量側にシフトし、分散度はより単分散の傾向を示すことがわかった。

動的散乱分析の結果を踏まえ、結晶化試料を調製し、結晶化スクリーニングをおこなった。得られた結晶について、結晶化条件の最適化をおこない、X 線回折実験をおこなった結果、分解能 20 Å までの低分解能の回折が確認された。今後、原子分解能での解析をおこなうために、より高分解能の回折を示す結晶の調製を進める予定である。

## 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 1 件)

1. Terawaki, S., Yano, K., Katsutani, T., Shiomi, K., Keino-Masu, K., Masu, M., Shomura, Y., Komori, H., Shibata, N. & Higuchi Y.

‘Crystallographic characterization of the DIX domain of the Wnt signalling positive regulator Ccd1.’

*Acta Crystallogr. Sect F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2011, 67, 758–761. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

### 1. 寺脇慎一

微小管依存的な物質輸送を制御する BICD の構造生物学的研究

超異分野学会

平成 23 年 3 月 19 日 東京

2. 寺脇慎一、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹  
Wnt シグナル伝達で機能する CCD1 DIX ドメインの X 線結晶構造解析  
日本分子生物学会第 33 回年会  
平成 22 年 12 月 7 日 神戸

3. 寺脇慎一、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹  
Wnt シグナル伝達で機能する CCD1 のオリゴマー形成機構に関する構造学的研究  
日本結晶学会 60 周年記念年会  
平成 22 年 12 月 3 日 大阪

4. 柴田直樹、寺脇慎一、小森博文、庄村康人、Fiedler Marc、Bienz Mariann、樋口芳樹  
Wnt シグナル制御因子 Dishevelled-DIX ドメインの X 線構造解析  
第 10 回日本蛋白質学会年会  
平成 22 年 6 月 17 日、札幌

5. 寺脇慎一、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹  
Wnt シグナル伝達ではたらく CCD1 の構造化学的研究  
第 10 回日本蛋白質学会年会  
平成 22 年 6 月 17 日、札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺脇慎一 (TERAWAKI Shin-ichi)  
群馬大学大学院 工学研究科・助教  
研究者番号：104525533

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし