

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07262

研究課題名(和文) 動的なヘテロオリゴマー形成による新規なWntシグナル伝達制御の構造基盤の解明

研究課題名(英文) Structural basis for Wnt signaling regulation by dynamic heterooligomer

研究代表者

寺脇 慎一 (Terawaki, Shin-ichi)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：10452533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Wntシグナル伝達経路で機能するAxinとCoiled-coil-DIX1(Ccd1)がDIXドメインと呼ばれる機能領域で形成するヘテロオリゴマーのX線結晶構造解析、蛍光共鳴移動エネルギー移動(FRET)を利用した溶液中におけるオリゴマー構造解析と分子間相互作用解析、培養細胞における転写活性測定をおこなった。その結果、Ccd1がホモオリゴマー状態から解離してくるAxinとヘテロオリゴマーを形成することで、Axinのホモオリゴマー構造が解消される可能性が示唆された。今後、Axinのオリゴマー構造の変化とシグナル伝達制御との関係を明らかにすることが必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wntシグナル伝達経路は、構成するタンパク質の機能異常が、細胞のがん化や精神性疾患、糖尿病、骨・軟骨性疾患に関係することが臨床研究から報告されているため、本研究の成果は、創薬に応用することができる。動的オリゴマー形成を介するシグナル伝達制御は、Wnt経路に特異的な分子機構であるため、その制御の仕組みを理解することで、がんや精神性疾患などに対する副作用の少ない薬剤開発が可能になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling pathway plays an important role in determination for cell fate, such as embryonic development. The cytoplasmic signaling proteins, Axin, Coiled-coil-DIX1 (Ccd1), and Dvl form the platform for cytoplasmic signal transduction by making the dynamic oligomer through the homotypic and heterotypic interaction. In this study, we determined the crystal structure of Axin-Ccd1 heterooligomer forming the DIX domains conserved at both proteins. The structure of Axin-Ccd1 heterooligomer revealed the detail of the heterotypic interaction between the DIX domains and the rearrangement of the Axin homooligomer induced by the Ccd1-binding. The fluorescence resonance energy transfer measurement and mutation study indicated that Ccd1 induces the rearrangement of Axin homooligomer in solution by the heterotypic interaction. These findings suggest the requirement investigating the relationship between the rearrangement of Axin homooligomer and the regulatory mechanism for Wnt signaling.

研究分野：構造生物化学

キーワード：Wntシグナル伝達 動的オリゴマー形成 X線結晶解析 蛍光共鳴エネルギー移動

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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ヒトに至る高等生物に保存されており、シグナル伝達を構成するタンパク質群の機能異常が癌や精神性疾患、糖尿病、骨・軟骨疾患にみいだされている。分泌タンパク質 Wnt が細胞膜にある受容体に結合すると、膜直下に Axin、Dvl、Coiled-coil-DIX1 (Ccd1) が DIX ドメインと呼ばれる機能領域を介した分子間相互作用の協同的作用により、解離・会合を繰り返す動的オリゴマーを形成して下流シグナルを伝達する。DIX ドメインは、ユビキチン様構造の 2 番目と 4 番目の β ストランド ($\beta 2$ 、 $\beta 4$) からなる Head 領域と Tail 領域を介して分子間相互作用し、らせん状のホモオリゴマー構造を形成することが明らかとなっているが、一方で、ヘテロオリゴマーがどのようにして形成されるのかはわかっていない。そこで、本研究では、Axin-Ccd1 ヘテロオリゴマーの X 線結晶解析、蛍光エネルギー移動共鳴 (FRET: Fluorescence resonance energy transfer) を利用した溶液構造解析と分子間相互作用解析、培養細胞を用いた Wnt 依存的転写活性測定を通して、Wnt シグナル伝達制御における動的オリゴマー形成の仕組みと意義の解明をおこなった。

本課題に先立って実施した研究課題(若手研究 B 課題番号 25840017)において、Axin-Ccd1 ヘテロオリゴマーの結晶化および X 線回折実験を実施して、分解能 3.1 Å での構造解析に成功して、低分解能の分子構造モデルから、Ccd1 による Axin の分子認識機構と Axin ホモオリゴマー構造を変化させてシグナル伝達を制御する仕組みについて、作用モデルを考察することができていた。

2. 研究の目的

本研究では、Wnt シグナル依存的に解離・会合を繰り返して動的なオリゴマーを形成する DIX ドメインが、分子間相互作用によってオリゴマー構造を変化させてシグナル伝達を制御する仕組みを立体構造に基づいて原子レベルで解明することを目的とした。Ccd1-Axin 複合体の低分解能構造解析から、2 分子の Ccd1 が 1 つの Axin を挟み込んで、らせん状のヘテロオリゴマー構造を形成することがわかってきた。しかし、低分解能構造のためアミノ酸残基の側鎖間の相互作用は精度よく解析できておらず、また、観察されたヘテロオリゴマー構造が、シグナル伝達制御にどのように関与しているのかは生化学的検証を必要としていた。そこで、本研究では、①高分解能での X 線結晶構造解析、②溶液中における蛍光共鳴エネルギー移動を利用したオリゴマー構造変化の解析、③ *in vitro* 結合実験および培養細胞を利用した転写活性測定を実施した。

3. 研究の方法

Axin-Ccd1 複合体の結晶化条件を検討して、3 Å を超える高分解能構造解析をおこない、DIX ドメインの分子間相互作用をアミノ酸側鎖レベルで解析することを試みた。そして、ヘテロオリゴマー中の Ccd1 と Axin のそれぞれの DIX ドメインについて、単独ホモオリゴマー中の立体構造と比較し、ヘテロオリゴマー形成に関与する DIX ドメインの構造変化とシグナル伝達制御との関係を検証した。次に、構造解析から特定した相互作用部位の変異体を作成し、*in vitro* 結合実験から相互作用に重要なアミノ酸残基の同定を試みた。また、立体構造に基づいて、Axin DIX ドメインの蛍光標識体を作成し、単独ホモオリゴマーと Ccd1 DIX ドメインと結合したヘテロオリゴマーについて、FRET の変化を測定して、ホモオリゴマーとヘテロオリゴマーの状態、溶液中における DIX ドメイン間の距離分布を解析し、結晶構造で観察されるオリゴマー構造の変化と一致するかどうかを検証した。さらに、培養細胞をもちいた転写活性測定をおこない、構造情報から示唆される相互作用がシグナル伝達制御に必須なことを検証した。

4. 研究成果

Axin-Ccd1 ヘテロオリゴマーの高分解能結晶を調製するために、Ccd1 DIX ドメインの $\beta 1$ - $\beta 2$ ループ領域の複数のアミノ酸残基にアラニン変異を導入することで、ホモオリゴマー状態を改良して結晶化を試みたところ、X 線回折データセットの分解能は 2.80 Å まで向上した。Axin-Ccd1 ヘテロオリゴマーの低分解能構造モデルを元に精密化をおこない、構造決定をおこなった (R/R_{free} = 21.8/26.1 (%))。構造解析の結果、Axin-Ccd1 ヘテロオリゴマーは、1 本鎖型のらせんオリゴマー構造をとっており、その繰り返し単位は、それぞれ単独のホモオリゴマー構造と比較すると大きく構造変化することが明らかになった。ヘテロオリゴマー構造の最小ユニットは、Ccd1 と Axin が 2 対 1 で形成されており、結晶中では、2 つの最小ユニットでらせん構造ピッチを形成していた。このらせん構造においては、2 つのサブユニットタンパク質の N 末端は、すべてらせんオリゴマー構造の外側に向いており、全長タンパク質が相互作用する際にも影響を与えないと予測され、生体内でも形成が可能な構造体であると考えられた。

構造解析から特定した相互作用に関わるアミノ酸残基について、変異体を作成して *In vitro* pull-down assay によって、各残基の相互作用に対する寄与を検討した。その結果、Ccd1 Tail 領域と Axin Head 領域の Head-to-Tail ヘテロ相互作用がヘテロオリゴマー形成に重要であることがわかった。特に Axin Head 領域にヘテロオリゴマー形成に重要であるが、ホモオリゴマー形成には関与していない残基を同定できたことは意義がある。また、興味深いことに、Axin Tail 領域のアミノ酸残基の変異は、ホモオリゴマー形成を抑制する一方で、ヘテロオリゴマー形成は促進する結果となった。このことは、Ccd1 が Axin とヘテロオリゴマーを形成する過程では、Axin ホモオリゴマーではなく、Axin 単量体を補足する可能性を示唆しており、解離・会合を繰

り返す動的な特性がシグナル伝達制御に関わることを示していると考えられた。

次に、Ccd1-Axin ヘテロオリゴマーの形成にともなう Axin ホモオリゴマー構造変化を検討するために、立体構造に基づいた FRET 実験系の構築をおこなった。Axin DIX ドメインの N 末端システイン残基に対して 2 種類の蛍光色素をチオール-マレイミド反応を利用して導入し、Axin ホモオリゴマー形成に由来する FRET シグナルを観測可能な実験系を構築した。この FRET 実験系において、Ccd1 を添加したところ、Axin とのヘテロオリゴマー形成に伴って、Axin ホモオリゴマーの形成に由来する FRET シグナルは減少したことから、Ccd1 とのヘテロオリゴマー化によって Axin 間距離が広がることが確認できた。この結果は、結晶構造中で確認された Axin の間に Ccd1 が入り込むことで、Axin 間距離が変化することを示すものと考えられる。この FRET 実験系において、Axin 変異体をもちいた測定をおこなったところ、ヘテロオリゴマー形成を特異的に抑制する変異体では、Axin ホモオリゴマー形成には影響しないものの、Ccd1 による FRET シグナルの変化は観測されなかった。また、Axin ホモオリゴマー形成を抑制する変異体は、Axin ホモオリゴマー形成に由来する FRET シグナルを減少させた。以上の結果から、構築した FRET 実験系での検証によって、溶液中においても Ccd1 は Axin ホモオリゴマー構造を変化させることが確認された。続いて、培養細胞を用いて、Axin と Ccd1 を共発現させて転写活性の測定をおこなった。ヘテロオリゴマー形成特異的なアミノ酸残基の Axin 変異体は、野生型と同等の分子活性を示し、一方でホモオリゴマー形成を抑制する変異体では、転写活性の抑制効果が減少したことから、変異の効果が培養細胞内での分子活性とも一致することを確認した。

本研究から、Ccd1 が Axin のホモオリゴマー構造を変化させてシグナル伝達を制御する新規な分子機構を提唱することが可能になった。Axin は、GSK3 β や CK1 と複合体を形成して、Wnt シグナル ON の場合では、Ccd1 やもう一つの活性化因子 Dvl を介することで、受容体および共役受容体 LRP6 と共局在し、GSK3 β を抑制する。しかしながら、Axin ホモオリゴマー構造の変化が、LRP6 による Axin 複合体中の GSK3 β に対する抑制に必要なのかは検討できていない。今後、細胞内での Axin ホモオリゴマーの構造変化と分子制御との関係を構造生物学的手法に基づいて明らかにしていくことが、Wnt シグナル伝達経路の仕組みを理解するために必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamanishi Kumpei, Fiedler Marc, Terawaki Shin-ichi, Higuchi Yoshiki, Bienz Mariann, Shibata Naoki	4. 巻 12
2. 論文標題 A direct heterotypic interaction between the DIX domains of Dishevelled and Axin mediates signaling to β -catenin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaaw5505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aaw5505	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 -
1. 著者名 Yamanishi Kumpei, Kumano Wataru, Terawaki Shin-Ichi, Higuchi Yoshiki, Shibata Naoki	4. 巻 26
2. 論文標題 Head-to-Tail Complex of Dishevelled and Axin-DIX Domains: Expression, Purification, Crystallographic Studies and Packing Analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein & Peptide Letters	6. 最初と最後の頁 792 ~ 797
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/0929866526666190425152721	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 -
1. 著者名 Yamanishi Kumpei, Sin Yooksil, Terawaki Shin-ichi, Higuchi Yoshiki, Shibata Naoki	4. 巻 75
2. 論文標題 High-resolution structure of a Y27W mutant of the Dishevelled2 DIX domain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 116 ~ 122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/S2053230X18018290	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 -
1. 著者名 Hattori Mai, Ishikawa Osamu, Oikawa Daisuke, Amano Hiroo, Yasuda Masahito, Kaira Kyoichi, Ishida-Yamamoto Akemi, Nakano Hajime, Sawamura Daisuke, Terawaki Shin-ichi, Wakamatsu Kaori, Tokunaga Fuminori, Shimizu Akira	4. 巻 91
2. 論文標題 In-frame Val 216 -Ser 217 deletion of KIT in mild piebaldism causes aberrant secretion and SCF response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 35 ~ 42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.03.012	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 -

1. 著者名 Terawaki Shin-ichi, Fujita Shohei, Katsutani Takuya, Shiomi Kensuke, Keino-Masu Kazuko, Masu Masayuki, Wakamatsu Kaori, Shibata Naoki, Higuchi Yoshiki	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural basis for Ccd1 auto-inhibition in the Wnt pathway through homomerization of the DIX domain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-08019-5	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 寺脇慎一	4. 巻 52
2. 論文標題 サリドマイド誘導体がもたらすユビキチンリガーゼ基質認識の変換機構	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1157
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 -

[学会発表] 計26件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 S. Terawaki, K. Wakamatsu, K. Shiomi, M. Masu, N. Shibata, and Y. Higuchi
2. 発表標題 Structural basis of the molecular interaction of Axin with Coiled-coil-DIX1 by heterotypic oligomerization of DIX domain
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会・第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会(招待講演)
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 町田結衣, 小野塚樹, 荒井将吾, 塚越隆寛, 細田和男, 庫本高志, 寺脇慎一, 若松馨
2. 発表標題 活性型Giと特異的に相互作用するGINIPタンパク質の構造と活性
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 黒川優香、葛貫絵梨奈、浦野智子、島崎安希子、河野俊之、細田和男、寺脇慎一、若松馨
2. 発表標題 アドレナリン受容体細胞内第三ループとGPCRモジュレーター-spinophilinとの相互作用解析
3. 学会等名 NMR討論会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 清水結加、寺脇慎一、若松馨
2. 発表標題 FRETおよび発光を利用したWntシグナル伝達因子の集合状態解析法の開発
3. 学会等名 日本化学会群馬地区研究交流会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 金子 尚樹、石渡 拓也、清水 結加、寺脇 慎一、若松 馨
2. 発表標題 Wnt シグナル制御因子のオリゴマー形成における分子間相互作用を特徴付けるアミノ酸残 基の同定
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 加藤 安梨沙、寺脇 慎一、若松 馨
2. 発表標題 Wnt 誘導性発現因子 Axin2 のホモオリゴマー形成機構の生化学的解析
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 若松馨、浦野智子、島崎安希子、宮下祐美、細田和男、寺脇慎一
2. 発表標題 GPCRモジュレーター-spinophilinとアドレナリン受容体の細胞内ループとの相互作用解析
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 山西勲平、柴田直樹、フィードラー マーク、寺脇慎一、ピエンツ マリアン、樋口芳樹
2. 発表標題 Dishevelled、Axin由来のDIXドメイン同士によるヘテロ相互作用が両者の共局在化を引き起こし、Wnt/ β -catenin経路を活性化させる
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 寺脇慎一、勝田拓也、清水結加、金子尚樹、柴田直樹、樋口芳樹
2. 発表標題 Dvl1 DIXドメインによるホモオリゴマー形成機構の構造学的解析
3. 学会等名 Wnt研究会2018-2019
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 田村裕貴、畑隼弥、寺脇慎一、箱嶋敏雄、若松馨
2. 発表標題 Tiam1/2と活性酸素制御因子phox複合体との分子間相互作用
3. 学会等名 日本化学会群馬地区研究交流会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 町田結衣、小野塚樹、寺脇慎一、若松馨
2. 発表標題 GABA受容体シグナリング調節因子GINIPと活性化型G _i 1との相互作用解析
3. 学会等名 日本化学会群馬地区研究交流会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 石渡拓也、中込蒼一朗、寺脇慎一、若松馨
2. 発表標題 Wntシグナル伝達経路制御因子Axin-Ccd1複合体の変異体解析
3. 学会等名 日本化学会群馬地区研究交流会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 田村裕貴、畑隼弥、寺脇慎一、箱嶋敏雄、若松馨
2. 発表標題 活性酸素発生制御因子Nox複合体サブユニットp67phoxのTiam2結合領域の同定
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 浦野智子、島崎安希子、宮下祐美、細田和男、寺脇慎一、若松馨
2. 発表標題 GPCR モジュレーター spinophilin とアドレナリン受容体細胞内ループとの相互作用: NMR 情報を基にした相互作用部位の絞り込み
3. 学会等名 NMR討論会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 中込蒼一朗, 藤田祥平, ザムザリナ ピンティ タリブディン, 榎正幸, 樋口芳樹, 若松馨, 寺脇慎一
2. 発表標題 Wntシグナル伝達を制御する動的ヘテロオリゴマーのX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 小野塚樹, 森川友仁, 河野俊之, 寺脇慎一, 若松馨
2. 発表標題 三量体Gタンパク質Gi1 サブユニットのGPCR非活性化型変異体に関する構造学的解析
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 若松馨, 神山亮司, 山井俊英, 小森谷美歌, 武田茂樹, 寺脇慎一
2. 発表標題 GPCRの熱安定性および長期安定性の新規スルホペタイン類による向上
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 小野塚樹, 寺脇慎一, 河野俊之, 若松馨
2. 発表標題 GPCR模倣ペプチドと結合した三量体Gタンパク質 i1のGEF反応中間体の調製
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 小森谷美歌、浦野智子、寺脇慎一、若松馨
2. 発表標題 卵白リゾチームのリフォールディングのスルホペタインによる促進
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 GPCRシグナリング抑制因子Spinophilinとアドレナリン受容体との相互作用解析
2. 発表標題 島崎 安希子、浦野 智子、細田 和男、寺脇 慎一、若松 馨
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 小野塚樹、寺脇慎一、河野俊之、若松馨
2. 発表標題 GPCR模倣ペプチドと結合した三量体Gタンパク質 サブユニットの安定化法の検討
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 Shin-ichi Terawaki, Shohei Fujita, Takuya Katsutani, Kensuke Shiomi, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu, Kaori Wakamatsu, Naoki Shibata & Yoshiki Higuchi
2. 発表標題 Structural basis for limitation of Ccd1 activity by a unique homomeric interaction in the Wnt pathway
3. 学会等名 The 42nd Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 吉兼明日香, 寺脇慎一, 若松馨
2. 発表標題 逆行性輸送因子BICD1と核膜孔サブユニットとの複合体の結晶化
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 寺脇慎一, 石渡拓也, 藤田翔平, 榎正幸, 樋口芳樹, 若松馨
2. 発表標題 ゼブラフィッシュCcd1 DIXドメインの不活性型変異体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 畑隼弥, 寺脇慎一, 箱嶋敏雄, 若松馨
2. 発表標題 動的散乱分析を活用した離合集散型シグナル伝達因子複合体の結晶化
3. 学会等名 日本結晶学会
4. 発表年 2016年～2017年

1. 発表者名 Shunya Hata, Toshio Hakoshima, Kaori Wakamatsu and Shin-ichi Terawaki
2. 発表標題 Preparation and Crystallization of Actin Regulating Complex for Formation of Dendritic Spine
3. 学会等名 GUMI&AMDE 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年～2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

タンパク質の立体構造に基づく癌治療薬開発
http://www.st.gunma-u.ac.jp/research_topics/chem-bio_terawaki/
がん発症に関わる可逆的多量体化タンパク質がWntシグナルを制御する仕組みを解明(プレスリリース) <http://www.st.gunma-u.ac.jp/20191211-cbterawaki/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----