

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01420

研究課題名(和文) Wntリガンド-受容体相互作用の構造メカニズム

研究課題名(英文) Structural mechanism of the Wnt-receptor interaction

研究代表者

高木 淳一 (Takagi, Junichi)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：90212000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ほ乳類Wntリガンド単体、および受容体細胞外ドメインとの複合体の状態の3次元構造をX線結晶構造解析により明らかにすることを旨とした。様々な工夫と独自技術を駆使することにより、Wnt-と受容体(Fz)の2者複合体の結晶化に成功し、2.8 Åでその原子構造解明を達成した。さらに、「RaPIDシステム」を応用してマウスWnt3aに対する環状ペプチドバインダーの探索を行い、Wntシグナル伝達を阻害するペプチドの単離に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wntシグナルは多細胞動物の発生・形態形成に必須だけでなく、その異常はがんを含む様々な疾患に関わり、さらにはWntが組織幹細胞の生存と増殖に必須な増殖因子であることから再生医療を進めるためにも非常に重要な蛋白質である。本研究では、世界初のヒトWnt3の結晶構造解析により、これまで不明であったこの重要なシグナル伝達の分子メカニズムの原子レベルでの解明に大きく前進しただけでなく、がんに対する医薬のリードとなり得る化合物を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Wnt/beta-catenin signaling plays fundamental roles in organogenesis, tissue regeneration, and cancer, but current understanding of its molecular mechanism is limited due to the lack of high resolution structural information of mammalian Wnt proteins. Through this research project, we determined a 2.8 angstrom-resolution crystal structure of human Wnt3 in complex with its receptor Frizzled 8 for the first time. Furthermore, by using the RaPID system, we have performed in vitro selection against mouse Wnt3a to discover macrocyclic peptide binders, resulting in a peptide (WAp-D04) that can inhibit the receptor-mediated signaling process in cells. This work represents the first instance of molecules capable of inhibiting Wnt signaling through direct interaction with a Wnt protein, a molecular class for which targeting has been challenging due to its highly hydrophobic nature.

研究分野：構造生物学

キーワード：Wntシグナル X線結晶構造解析 受容体 蛋白質間相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルは多細胞動物の発生・形態形成における最も根源的、本質的シグナリング経路であり、発生生物学分野では最も良く研究されているものの一つだが、Wnt が様々な組織幹細胞の生存と増殖に必須であることが知られるようになってきてからは、多様な分野のアカデミア研究者はもちろん、企業においてもますます重要な研究対象となっている。Wnt シグナルは単純化すれば、「Wnt リガンド 細胞膜受容体 細胞内シグナリング分子 遺伝子発現調節」というステップに分解できるが(図1)、多くの「Wnt シグナル研究」はこの後半部分、すなわち細胞内の出来事の解析に集中し、前半の「シグナル受容と伝達」の部分の分子論的研究は遅れている。その最大の理由は、Wnt リガンド自身を含め、Wnt シグナル装置の構成成分がいずれも『発現精製して再構成実験を行うことが非常に困難なタンパク質である』ことにある。なぜ Wnt リガンドがそれほど難しいかという点、それはこれらが分泌型糖タンパク質であるにも関わらず、特殊な脂肪酸鎖によって修飾された「リポタンパク質」であり、基本的に「水に溶けない」からである。よって実は前述の Wnt3a、Wnt5a などすべて界面活性剤の存在下でしか保存できず、このために応用可能な実験の種類が大幅に制限され、結晶化なども困難なままである。

受容体に目を転ずると、Frizzled(Fz)はヒトで 10 種類存在し、いわゆる 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である。当然ながら発現精製が困難であり、構造情報も細胞外領域の一部についてしか無い。また Fz のシグナリングにおける機能にはリダダンシーがあると考えられているが、多くの培養細胞に内在性 Fz の発現があり、過剰発現による細胞実験が難しいことが知られている。一方、補助受容体である LRP5/6 も、長くその生化学的解析が困難な巨大膜タンパク質として知られていたが、申請者がプライベートシャペロン Mesd との共発現により細胞外全長断片 (LRP6ec) の発現精製に成功し、ネイティブな受容体を認識できるモノクローナル抗体の樹立に世界で初めて成功したのを皮切りに、多くの研究室から精製タンパク質や抗体の作製が報告され、今では細胞外領域の多くのドメインについて結晶構造が知られるまでになっている。しかしながら、Wnt リガンド-Fz 受容体-LRP6 補助受容体という「3 者複合体」は、その存在が確実視されてはいるものの、まだ誰も直接的にその形成を証明出来ていない。結晶構造解析はもちろん、再構成系を用いた分子レベルの生理機能解析、さらには後に述べるような幹細胞培養実験において、良質な組換え精製タンパク質の調製が必須であるのに、Wnt シグナル受容・伝達装置の主要なコンポーネントである 3 者が、いずれも「入手困難なタンパク質」という有様では、分子論的研究が進まなかったのは当然といえる。

そんななか、2012 年に Stanford 大の Garcia らにより、Xenopus 由来の Wnt8(XWnt8)とマウス Fz8 の Wnt 結合ドメイン(Fz8CRD)の複合体の結晶構造が報告された(図2)。彼らは、Wnt リガンドの中でも XWnt8 が例外的に「扱いやすい」タンパク質であること、そして Fz8CRD と複合体にすることで、Wnt の脂肪酸鎖がマスクされ水溶性になることを突き止め、これを利用したのである。しかし XWnt8 は、単にツメガエル由来というだけでなく、ほ乳類 Wnt の中でも幹細胞増殖や細胞の分化で特に注目されている Wnt3a や Wnt5a などとは最も遠いオルソログで、一次配列上でも大きな欠失があるなど、立体構造上の類似性も限定的であると予想される。たとえば Wnt と受容体の相互作用を阻害したり、あるいは Wnt リガンドそのものをミミックするような化合物や抗体を開発するには、ほ乳類 Wnt リガンドそのものの原子分解能立体構造とその受容体との界面の情報が必要であるが、世界中の有力な研究グループの努力にもかかわらず未だ達成されていない。

2. 研究の目的

このように、本研究を開始する時点では、ヒトはもちろん哺乳動物由来の Wnt の立体構造は一つも知られておらず、ほ乳類の Wnt リガンドに関する分子構造科学的情報は圧倒的に不足していた。そこで本研究は、ほ乳類 Wnt リガンド単体、および受容体細胞外ドメインとの複合体の状態の 3 次元構造を X 線結晶構造解析により明らかにすることを目指した。Wnt リガンドのタンパク質としての扱いにくさから遅れてきた結晶化に、代表者は多くの独自技術開発と周到な予備実験を武器に取り組んだ。種々の疾患においても鍵となる役割を果たしている Wnt シグナルにおいて、シグナル受容の最初のステップである、「細胞外でのリガンド-受容体相互作用」を原子分解能で解明することは、新たな創薬ターゲット部位の発見や革新的医療技術の開発などにつながり、社会的意義は極めて大きい。

3. 研究の方法

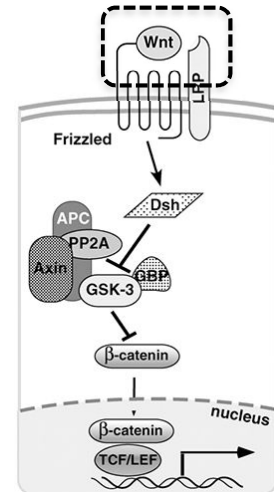


図1 Wnt シグナル経路
主要な 3 つの経路のうち、「カノニカル」と呼ばれるもの。本研究では、シグナルの受容と伝達に関する「細胞外装置」(点線内)の構造メカニズム解明を目指す。



図2 XWnt8-Fz8 CRD 複合体の結晶構造
Wnt (ライトグレー) が脂肪酸鎖を使って Fz の CRD (黒) を挟み込む様に結合している。

細胞外の Wnt リガンドが膜受容体に認識され、その情報が細胞膜を横切って伝達されて細胞の挙動を左右する引き金を引くメカニズムを、原子分解能の立体構造レベルで明らかにすることが代表者が今後数年でどうしても達成したい研究目標であった。本研究はこのうちの最初のステップである「Wnt シグナル受容」部分の解明に目的を絞っているが、それだけでも非常に挑戦的な内容である。前述したように国際的に激しい競争があり、精製することすら難しいターゲット分子を扱う故に、ただ単にタンパク質を調製して結晶化し、X線結晶解析を行う、という単純なプロジェクトでは無い。医学生物学的に最大の学術的成果を上げるために、以下の4つの業務項目を設定した。

- (1) 各種ほ乳類 Wnt サブタイプの Afm による可溶化とその活性試験
- (2) ほ乳類 Wnt リガンドと Afm の複合体の結晶構造解析
- (3) ほ乳類 Wnt 特異的バインダー（抗体、特殊ペプチド）の取得とそれらの機能解析
- (4) Wnt-Fz CRD の2者、および Wnt-Fz-LRP6ec 3者複合体（細胞外装置）の構造解析

4. 研究成果

研究期間内に得られた成果を、年度ごとに述べる。

平成29年度

項目1（各種ほ乳類 Wnt サブタイプの Afm による可溶化とその活性試験）においては、Wnt と Afm (アフアミン) の安定発現株を樹立した。Wnt3a と Afm は無血清培地中で細胞に共発現させることによって安定な複合体として培養上清中に回収することができ、この複合体の大量精製を行った。項目2（ほ乳類 Wnt リガンドと Afm の複合体の結晶構造解析）では、Wnt リガンドのもつ強い疎水性という課題を、Afm 複合体化によって解決し、Wnt-Afm 複合体の状態に結晶化をおこなった。またヒト Afm 単独の結晶化と構造解析を達成した(図3)。項目3（ほ乳類 Wnt 特異的バインダーの取得とそれらの機能解析）では、東京大学の菅裕明教授が開発した特殊環状ペプチドスクリーニング法「RaPID システム」を応用し、マウス Wnt3a に対する環状ペプチドバインダーを3つ単離することが出来た。最も重要な項目4（Wnt-Fz CRD - 2者、および Wnt-Fz-LRP6ec 3者複合体（細胞外装置）の構造解析）では、Wnt-Fz CRD 2者複合体については、構造解析品質の回折を見せる結晶を得ることに成功し、2.9Å 分解能の回折データ取得に成功した。上記の Wnt-Fz CRD 2者複合体と LRP6ec の間の相互作用解析系をピアコアを用いて確立し、安定な3者複合体を形成する LRP6 変異体の単離を完了した。



図3 ヒト AFM 単体の結晶構造
レインボーカラーのリボンモデル

平成30年度

項目1（各種ほ乳類 Wnt サブタイプの Afm による可溶化とその活性試験）において、前年度に樹立した Wnt3a と Afm の安定発現株の上清およびそこから精製した Wnt3a-Afm 複合体を用い、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて活性を調べるとともに、上清中に存在する Wnt3a の蛋白質量を定量する方法を開発した。項目2（ほ乳類 Wnt リガンドと Afm の複合体の結晶構造解析）では、前年度に引き続き、Wnt-Afm 複合体の状態に結晶化をおこなったが、解析品質の結晶は得られなかった。項目3（ほ乳類 Wnt 特異的バインダーの取得とそれらの機能解析）では、「RaPID システム」を応用したマウス Wnt3a に対する環状ペプチドバインダーの探索を継続した結果、新たなものを含め合計13種単離することが出来た。これらペプチドの親和性をピアコアによってしらべた結果、6つは有意な結合がみられず、3つは数十マイクロモル程度の弱い親和性、5つは1μM以下の程度の親和性を持つことがわかった。さらには Wnt の生物活性に対する効果を細胞を用いてしらべたところ、一つにおいて Wnt シグナル伝達阻害活性が認められた(図4)。項目4（Wnt-Fz CRD - 2者、および Wnt-Fz-LRP6ec 3者複合体（細胞外装置）の構造解析）では、Wnt-Fz CRD 2者複合体については、前年度に得られた回折データを用いて構造精密化を行い、世界初の哺乳類 Wnt

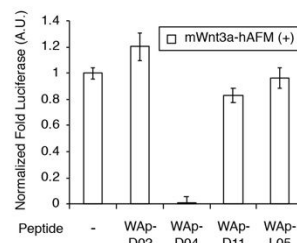


図4 Wnt3a 環状ペプチドバインダーによる活性阻害

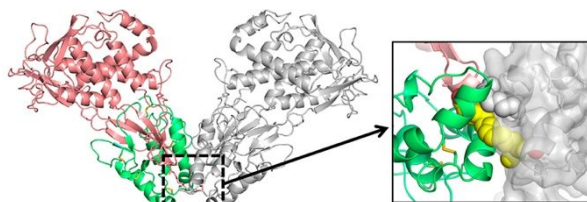


図5 Wnt3a-Fz8 CRD の2:2複合体構造（脂肪酸鎖部分を拡大）

の立体構造解析を完了した(図5)。構造をもとに PA タグ挿入変異体を作製することで、これまで不可能だった「生物活性を100%保持したままの Wnt3a タンパク質を細胞や組織中で可視化する」ことに成功した。これらの結果を合わせ、論文を執筆し、投稿した。項目1については目的を達成したので本年度で終了とした。項目2については結晶が得られないという問題が解決出来なかったが、項目4においてほ乳類 Wnt の構造決定という目的を達成したので、次年度以降は実施しないことにした。

平成31 / 令和元年度

項目3 (ほ乳類 Wnt 特異的バインダーの取得とそれらの機能解析) においては、前年度に得た、Wnt シグナル伝達阻害活性を持つ環状ペプチドバインダー (PD04) に対して、配列の一部をランダム化したライブラリーを用いて改変をおこない、親和性が5倍程度上昇した変異体 (PD04r1) を得ることに成功した (図6)。この一連の結果を論文投稿し、年度内に受理されて発表することが出来た。項目4 (Wnt-Fz CRD-2 者、および Wnt-Fz-LRP6ec 3 者複合体 (細胞外装置) の構造解析) においては、Wnt-Fz CRD 2 者複合体の結晶構造 (哺乳類 Wnt の立体構造解析としては世界初) を達成し、この成果を Nature Struct Mol Biol 誌に発表することができた。3 者複合体については、2 者複合体の立体構造をヒントに LRP6 に結合する Wnt3 上の領域を予想し、その領域に相当する合成ペプチドを作製して上記の2 者複合体結晶へのペプチドソーキングによって3 者複合体結晶化を目指した。結晶化と回折データの取得まで果したが、残念ながら得られた構造中には LRP6 ペプチドの電子密度は観測されなかった。

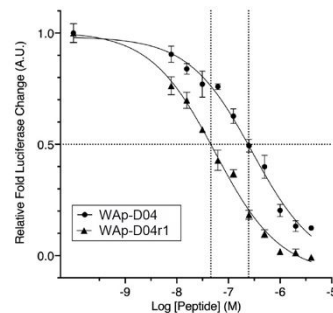


図6 Wnt3a 環状ペプチドバインダー-WAp-D04 の改変と活性の強化

以上のように、当初目標としたほ乳類 Wnt の構造情報取得という困難な課題を達成することができ、国際的な一流誌に論文発表することができた。また Wnt3a バインダーペプチドを複数種単離できたことは極めて重要であるが、なかでも Wnt3a の生物活性を阻害するペプチドが得られたことは特筆に値する。Wnt シグナルは様々な疾患に関わるので、その阻害剤は医薬品開発につながる可能性もある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計22件（うち査読付論文 22件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 8件）

| | |
|---|----------------------------|
| 1. 著者名 Bashiruddin Nasir K., Matsunaga Yukiko, Nagano Masanobu, Takagi Junichi, Suga Hiroaki | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Facile Synthesis of Dimeric Thioether-Macrocyclic Peptides with Antibody-like Affinity against Plexin-B1 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry | 6. 最初と最後の頁 1847 ~ 1851 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.8b00219 | 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 Wang Huping, Han Wenyu, Takagi Junichi, Cong Yao | 4. 巻 430 |
| 2. 論文標題 Yeast Inner-Subunit PA-NZ-1 Labeling Strategy for Accurate Subunit Identification in a Macromolecular Complex through Cryo-EM Analysis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology | 6. 最初と最後の頁 1417 ~ 1425 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2018.03.026 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Tabata Sanae, Kitago Yu, Fujii Yuki, Mihara Emiko, Tamura-Kawakami Keiko, Norioka Naoko, Takahashi Katsu, Kaneko Mika K., Kato Yukinari, Takagi Junichi | 4. 巻 147 |
| 2. 論文標題 An anti-peptide monoclonal antibody recognizing the tobacco etch virus protease-cleavage sequence and its application to a tandem tagging system | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Protein Expr Purif. | 6. 最初と最後の頁 94-99 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2018.03.004 | 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 Seino Takashi, Kawasaki Shintaro, Shimokawa Mariko, Tamagawa Hiroki, Toshimitsu Kohta, Fujii Masayuki, Ohta Yuki, Matano Mami, Nanki Kosaku, Kawasaki Kenta, Takahashi Sirirat, Sugimoto Shinya, Iwasaki Eisuke, Takagi Junichi, Itoi Takao, Kitago Minoru, Kitagawa Yuko, Kanai Takanori, Sato Toshiro | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cell Stem Cell. | 6. 最初と最後の頁 454 ~ 467.e6 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2017.12.009 | 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 Brown Zuben P., Arimori Takao, Iwasaki Kenji, Takagi Junichi | 4. 巻 201 |
| 2. 論文標題 Development of a new protein labeling system to map subunits and domains of macromolecular complexes for electron microscopy | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J. Struct. Biol. | 6. 最初と最後の頁 247 ~ 251 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsb.2017.11.006 | 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 Sakai K, Passioura T, Sato H, Ito K, Furuhashi H, Umitsu M, Takagi J, Kato Y, Mukai H, Warashina S, Zouda M, Watanabe Y, Yano S, Shibata M, Suga H, Matsumoto K | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature chemical biology | 6. 最初と最後の頁 598-606 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0285-7 | 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 Hirai Hidenori, Matoba Kyoko, Mihara Emiko, Arimori Takao, Takagi Junichi | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Crystal structure of a mammalian Wnt/frizzled complex | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology | 6. 最初と最後の頁 372 ~ 379 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-019-0216-z | 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 Otero-Ramirez Manuel E., Matoba Kyoko, Mihara Emiko, Passioura Toby, Takagi Junichi, Suga Hiroaki | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 Macrocyclic peptides that inhibit Wnt signalling via interaction with Wnt3a | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 RSC Chemical Biology | 6. 最初と最後の頁 26 ~ 34 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1039/d0cb00016g | 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 - |

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 14件 / うち国際学会 7件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Junichi Takagi |
| 2. 発表標題 Plexin crosslinking by divalent artificial binders differentially controls its signaling state. |
| 3. 学会等名 The EMBO Workshop "Molecular Neurobiology" (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高木淳一 |
| 2. 発表標題 受容体機能における糖鎖の役割を可視化する |
| 3. 学会等名 ConBio2017ワークショップ「化学の視点で拓く糖鎖生物学」(招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高木淳一 |
| 2. 発表標題 Conformational freedom of the LRP6 ectodomain is regulated by N-glycosylation. |
| 3. 学会等名 2nd IPR/RSC Joint Symposium "PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION" (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高木淳一 |
| 2. 発表標題 EM visualization of LRP6 ectodomain ~N-glycosylation, conformational freedom, and signaling activity~ |
| 3. 学会等名 Gordon Research Conference "Wnt signaling" (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高木淳一 |
| 2. 発表標題 特殊環状ペプチドによる受容体-リガンド相互作用のアロステリック阻害 |
| 3. 学会等名 近畿化学協会合成部会 第1回合成フォーラム (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高木淳一 |
| 2. 発表標題 Crystal structure of human Wnt3 reveals its signaling mechanism on cell surface |
| 3. 学会等名 Seminar at Universita Cattolica del Sacro Cuore (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高木 淳一、平井秀憲、的場京子、有森貴夫、三原恵美子 |
| 2. 発表標題 Crystal structure of human Wnt3 in complex with mouse Frizzled 8 |
| 3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会 Joint Symposium “New perspectives on Wnt signaling, unveiled by structural and cell biology” (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高木淳一 |
| 2. 発表標題 LassoGraft Technologyによる新規バイオ医薬品モダリティの創成 |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会シンポジウム「日本発新バイオ医薬品イノベーションを目指す最先端創薬」(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|--|--|---------------|
| 産業財産権の名称 歯の再生治療のためのUSAG-1を標的分子とした中和抗体 | 発明者 高橋克、菅井学、時 田義人、高木淳一、 三原恵美子 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-130153 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|