

平成21年 6月10日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19770091
 研究課題名（和文） Axinのオリゴマー化を決定する因子の構造基盤とβ-カテニン分解活性との相関
 研究課題名（英文） Structural basis for oligomerization of Axin and degradation of β-catenin.
 研究代表者
 柴田 直樹（SHIBATA NAOKI）
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授
 研究者番号：30295753

研究成果の概要： 細胞の分化・分裂などを制御するWntシグナル伝達系のタンパク質の1つであるAxinは、そのDIXドメインを介してらせん構造を構築するように会合するが、この会合様式を決定付けるアミノ酸残基を明らかとするため、会合に関わるアミノ酸残基の変異体について立体構造を解析した。しかし変異DIXドメインも野生型と同様のらせん構造を構築していた。これは、このらせん構造が非常に強固であることを示していると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	150,000	1,850,000

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学（5801）

キーワード：結晶構造解析，タンパク質分解，細胞分化，癌

1. 研究開始当初の背景

Axinは体節形成、体軸形成、細胞の分化・分裂などを制御するWntシグナル伝達系の負の因子として働くタンパク質の1つである。Axinは同じく負の因子であるAdenomatous polyposis coli (APC)タンパク質や正の因子であるDishevelled (Dvl)などと複合体を形成し、Wnt標的遺伝子の転写制御の鍵となるβ-カテニンの細胞質内濃度制御に関わっている。AxinやAPCに変異が生じ、それらの機能が阻害されるとβ-カテニンが異常に蓄積される。するとWnt標的

遺伝子の転写が異常に昂進し、細胞の癌化を引き起こすことが示唆されている。しかし、そのメカニズムにはまだ不明な点が多いため、Axinの構造研究は他の手法では明らかに出来ない分子機構の解明につながる。

Axin, APC, Dvlはいずれもオリゴマー化することが多数の論文で報告されてきた。AxinとDvlには、それぞれオリゴマー化に重要なDIXドメインが存在することが知られている。そこで申請者と共同研究者らはAxinのオリゴマー化に必須なDIXドメインの立体構造解析によって、なぜオリゴマー

化が重要であるのか明らかにすることを旨として、そのX線結晶構造解析を進めてきた。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでの研究成果として、ラット由来 Axin-DIX ドメインの立体構造を初めて明らかにした。この研究成果に関しては論文を発表したが、査読者らの意見の中には、DIX ドメインとしては初めての構造として重要な成果あり、結晶中でオリゴマー構造が見られたことは興味深いとしながらも、オリゴマー形成に特に重要なアミノ酸残基を特定できることが望ましいというものがあつた。そのためには分子間相互作用に直接関わっている残基をいくつか選定し、それら残基に点変異を加えた変異体試料の調製と結晶構造解析を行うことを計画した。Axin-DIX ドメインは Axin のオリゴマー化に重要であるが、本研究ではそれらの残基についての点変異体の結晶構造解析によって変異 DIX ドメインがオリゴマー化した構造を取るかどうか、そして点変異による立体構造への影響を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

野生型 Axin-DIX ドメインの大腸菌発現系で使用しているプラスミドを用いて、変異導入キットを用いて変異体調製を行った。立体構造から分子間相互作用に特に重要と思われる残基は、Y766, Y793, F807, R767, K827 の5つである。最初の3つは主に疎水性相互作用を形成している。疎水性相互作用を弱めるために、より小さな側鎖を持つアミノ酸残基への置換、水素結合をなくすためフェニルアラニンへの置換、また、立体障害を引き起こすためにより大きなトリプトファン残基への置換を試みた。後の2つはイオン相互作用を形成しているため、静電的反発を引き起こすグルタミン酸に置換した。

ー 各試料の調製と複合体の調製 ー

これまでに野生型 Axin-DIX ドメインの構造解析に用いてきた大腸菌発現系と同様に、MBP タグが結合した試料を産出する発現系を用い、アフィニティークロマトグラフィーなどを用いて試料調製を行った。

ー Axin-DIX 変異体の結晶化 ー

点変異の目的が、分子間相互作用を弱くすることであるため、変異体では野生型とは異なる高次構造を取る可能性がある。そのために野生型とは異なる分子間相互作用によって結晶が成長する可能性が高い。従って、必ずしも野生型と同様の結晶化条件で結晶が得られるとは限らなかった。新しい結晶化条件

を見出す必要が生じたので、主に市販のスクリーニングキットを用いて結晶化スクリーニングを行った。

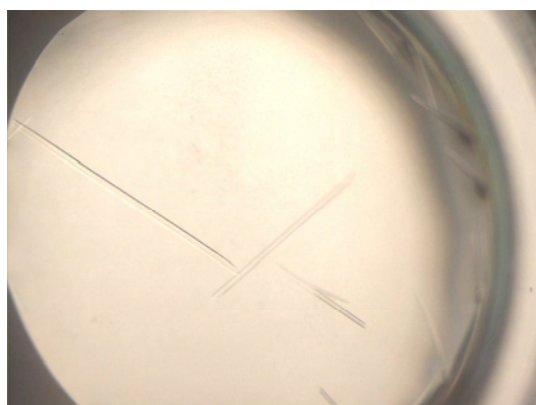
ー データ測定と構造解析 ー

構造解析に必要なデータは放射光施設にて収集した。データ測定を行った変異体については野生型 Axin-DIX ドメインの構造を利用して、分子置換法によって構造解析を行った。

4. 研究成果

野生型 Axin-DIX ドメインの立体構造から、ドメイン間の相互作用に特に重要と考えられる5つアミノ酸残基 (Y766, Y793, F807, R767, K827) について、それぞれ点変異を導入した。Y766 のフェニルアラニン (Y766F)、ロイシン (Y766L) 及びトリプトファン変異体 (Y766W), Y793, F807 についてはロイシン (Y793L, F807L) 及びトリプトファン変異体 (Y793W, F807W), R767, K827 についてはグルタミン酸変異体 (R767E, K827E) を調製した。これらのうち、Y766F, Y766L, Y793L, F807L, R767E 変異体については、大腸菌発現系からアミロースレジンによって精製し、部位特異的プロテアーゼによってタグを切断した後、イオン交換クロマトグラフィーによって Axin-DIX ドメインを精製することが可能であった。これらタンパク質試料について結晶化スクリーニングを行ったところ、Y766F と R767E 変異体について結晶調製に成功した。Y766F 変異体では野生型と同様の針状結晶であったため野生型と同様の分子間相互作用を形成していると考えられたが、R767E 変異体では稜面体状結晶が得られた (図1)。

A



B

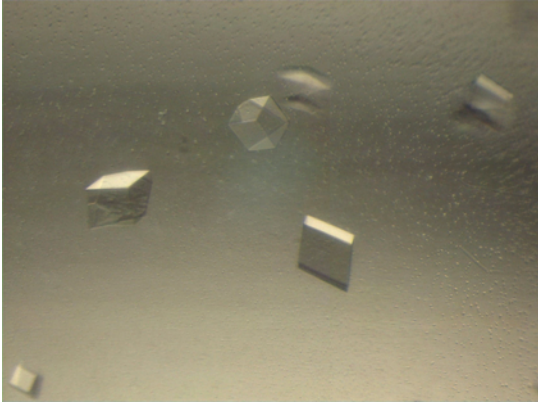
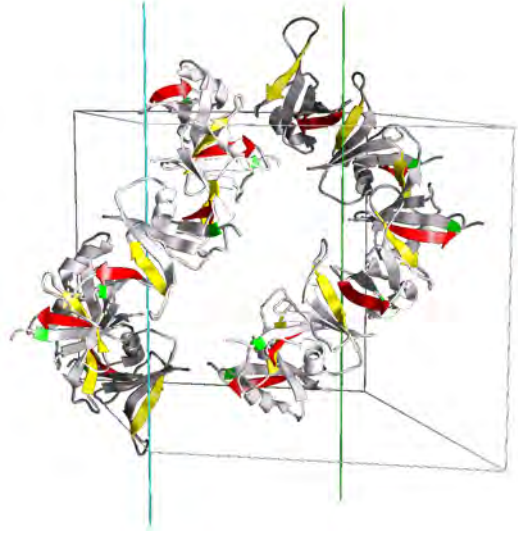


図1. Axin-DIX ドメインの結晶.
(A) 野生型 (B) R767E 変異体

この R767E 変異体について、放射光施設を利用して 3.2 \AA 分解能での回折データ収集を行った。R767E 変異体の構造解析は野生型 Axin-DIX ドメインの構造を基に分子置換法によって行われた。構造精密化の後、最終的に 3.2 \AA 分解能での構造が得られた。R767E 変異体は野生型とは異なる結晶系であり (R767E 変異体: 空間群 $R3$, 野生型: 空間群 $P6_1$), DIX ドメインが結晶中で異なるパッキングであるにもかかわらず、野生型と同様に結晶中でらせん状に配列していた (図2)。また、結晶中での DIX ドメイン間の相互作用は野生型とほぼ同様であった。しかし、変異箇所である 767 番の残基では、野生型では R767 が E800 及び E808 と塩橋または水素結合を形成していたが、R767E 変異体ではこれらの相互作用は欠失していた (図3)。塩橋による相互作用を壊し、静電的反発を引き起こすグルタミン酸に置換したにもかかわらず、野生型と同じらせん状の四次構造を維持していることから、これらの結果は、この構造が非常に強固であることを示唆している。

A



B

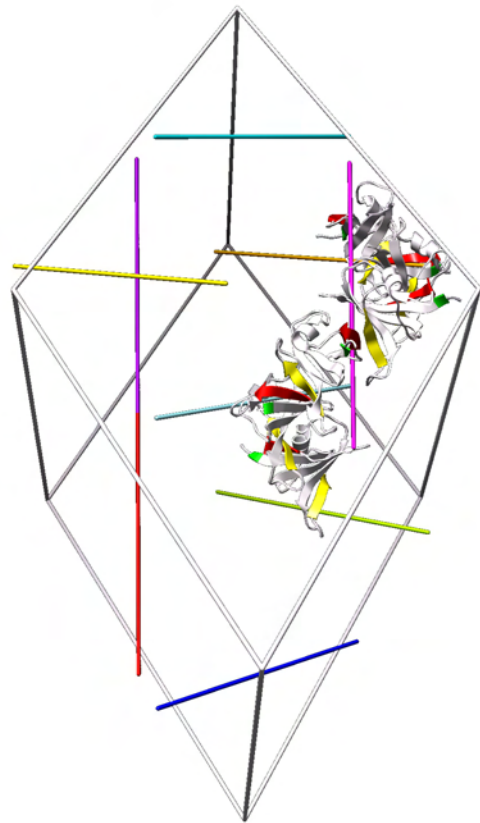


図2. Axin-DIX ドメイン間の相互作用.
(A) 野生型. (B) R767E 変異体.

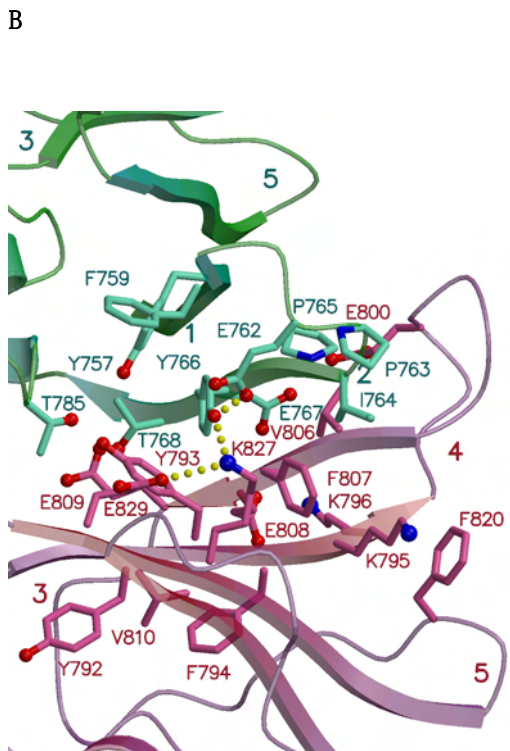
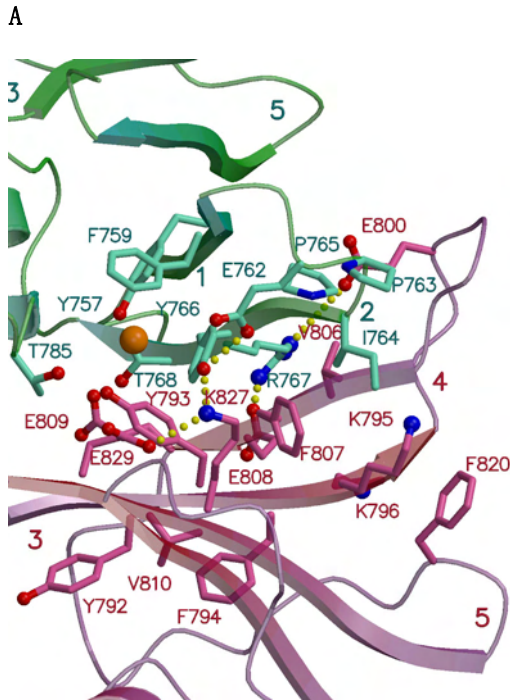


図3. Axin-DIX ドメイン間の相互作用。
 (A) 野生型。 (B) R767E 変異体。
 隣接する2つのAxin-DIXドメインをそれぞれ緑と赤のモデルで示している。黄色い点線は水素結合または塩橋を表す。

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)

[学会発表] (計 2件)

① DIXドメインを介するWntタンパク質の可逆的ポリマー化の構造基盤とWntシグナル制御モデル

Structural basis of dynamic polymerization of DIX domains: a revised model of Wnt signaling.

柴田直樹, Thomas Schwarz-Romond, Marc Fiedler, P. Jonathan G. Butler, 小森博文, 庄村康人, 山本英樹, 菊池章, Mariann Bienz, 樋口芳樹

日本生物物理学会第45回年会

パシフィコ横浜

平成19年12月21(金)~23(日)

口頭及びポスター

② Structural basis of dynamic polymerization of DIX domains: a revised model of Wnt signaling.

Naoki Shibata, Thomas Schwarz-Romond, Marc Fiedler, P. Jonathan G. Butler, Hirofumi Komori, Yasuhito Shomura, Hideki Yamamoto, Akira Kikuchi, Mariann Bienz, Yoshiki Higuchi

The XXI Congress and Assembly of the International Union of Crystallography

(第21回国際結晶学連合会議)

大阪国際会議場

2008年8月23日(土)~31日(日)

ポスター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 直樹 (SHIBATA NAOKI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号: 30295753 (2) 研究分担者

(3) 連携研究者