

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06508

研究課題名(和文) 動的オリゴマー形成因子の分子構造変化による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 Regulation of Wnt Signaling by Molecular Conformational Change of Dynamic Oligomer Formation Factors

研究代表者

寺脇 慎一 (Terawaki, Shin-ichi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・特定講師

研究者番号：10452533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Wntシグナル伝達経路の制御因子Axinの分子制御機構の解明を目的として、Axin結合タンパク質であるCoiled-Coil-DIX1(Ccd1)およびCK1との複合体形成の分子機構の解析をX線結晶構造解析、NanoBit法、転写活性測定によって試みた。その結果、NanoBit法をによって、AxinのDAXドメインを介したCcd1のDIXドメインとの結合は、ヘテロオリゴマー形成に伴いAxinの分子構造を大きく変化させることがわかった。また、Axin-CK1複合体の調製条件を確立したが、結晶化には至らなかった。今後は、クライオ電子顕微鏡の活用を見込んだ構造解析を進める必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wntシグナル伝達経路の異常は、がんや精神性疾患などの多様な疾病に関係しており、創薬展開が期待されている。動的オリゴマー形成を介するシグナル伝達制御は、Wnt経路に特異的であるため、その制御の仕組みの解明は創薬基盤として有用である。本研究では、Axinと2つの結合タンパク質との複合体形成の分子機構を原子レベルで解明することで、分子間相互作用と分子制御の仕組みを理解することを可能とする。また、Axin-CK1間の分子間相互作用については、Wnt経路で特に注目すべき未解明な点の一つであるが、CK1を介するリン酸化シグナルの制御についても全く未解明のため、学術的な理解にも大いに貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to elucidate the molecular regulatory mechanism of Axin, a regulator of the Wnt signaling pathway, we investigated the molecular mechanism of complex formation with Coiled-Coil-DIX1 (Ccd1) and CK1, an Axin-binding protein, by X-ray crystallography, NanoBit method, and transcriptional activity measurement. The NanoBit method was applied to the analysis of the molecular mechanism of the complex formation with Ccd1. The NanoBit method revealed that the binding of Ccd1 to the DIX domain of Ccd1 via the DAX domain of Axin significantly changes the molecular structure of Axin upon hetero-oligomer formation. In addition, conditions for preparing a complex of Axin and CK1 were established, but crystallization was not achieved. In the future, it is necessary to proceed with structural analysis in anticipation of using cryo-electron microscopy.

研究分野：構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析 Wntシグナル Axin

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、細胞の増殖や分化を制御する重要なシグナル伝達経路の一つであり、がん、精神性疾患、生活習慣病等に対する創薬標的として期待されている。分泌型糖脂質修飾タンパク質 Wnt が細胞膜上の受容体 Frizzled に結合すると、細胞内で Dvl や Ccd1 のシグナル伝達因子が活性化して、Axin に結合するタンパク質リン酸化酵素群 GSK3、CK1 によるカテニンのリン酸化を抑制することで、カテニンが細胞内に蓄積して細胞核へ移行し、関連遺伝子群の発現を促進する。本経路において、Axin は、カテニンのリン酸化反応を促進する足場タンパク質として機能して Wnt 経路を負に制御するが、Dvl や Ccd1 との複合体形成によって、カテニンのリン酸化が抑制される仕組みは理解されていない。

Axin、Dvl、Ccd1 は、DIX ドメインと呼ばれる機能領域を共通に保存しており、ホモおよびヘテロな分子間相互作用を通して、濃度依存的に解離・会合する動的なオリゴマーを形成する。本研究グループでは、Axin、Dvl、Ccd1 の DIX ドメインのホモおよびヘテロオリゴマーの X 線結晶構造解析をおこない、その分子構造とオリゴマー形成の分子機構を明らかにすることで、動的オリゴマー形成とシグナル伝達との関係の解明を試みてきた (*Sci. Rep.*, 2017, 7, 7739; *Sci. Signal*, 2019, 12, eaaw5505)。本研究では、我々がおこなった Axin-Ccd1 ヘテロオリゴマーの X 線結晶構造解析の結果に基づく Ccd1 や Dvl が Axin の分子構造変化を誘導する制御モデルを検証するために、発光検出法を利用した *in vitro* 実験系および培養細胞実験系を用いてオリゴマー構造変化の分析をおこなった。また、Axin 結合タンパク質である CK1 は、分子間相互作用の仕組みが未解明であり、Axin のオリゴマー構造の変化に依存して分子活性が制御されるかは明らかになっていないため、Axin と CK1 との複合体の X 線結晶構造解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、Wnt シグナル依存的に形成される DIX ドメインを介した Ccd1 と Axin とのヘテロオリゴマー形成が、Axin の分子構造変化を誘導して、タンパク質リン酸化酵素群の分子機能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。発光検出タグを Axin の N 末端に付加し、Axin のオリゴマー形成に依存して観測される発光を指標にすることで、Axin のオリゴマー構造の変化の解析をおこない、シグナル伝達制御との関係を *in vitro* 実験系から培養細胞実験系のレベルで明らかにする。また、Axin オリゴマーの構造変化に伴い、Axin に結合するタンパク質リン酸化酵素群の分子活性が影響を受ける可能性を検討するために、Axin-CK1 複合体の発現、精製、結晶化をおこない、X 線結晶構造解析に向けた試料の調製方法を確立し、立体構造解析によって分子間相互作用を原子レベルで解明することを試みる。

3. 研究の方法

本課題に先立って実施した研究課題(基盤研究 C 課題番号 16K07262)において、Axin DAX ドメインのオリゴマー形成と構造変化を分析してきた。本課題から得られた知見をもとに、細胞内においても Axin のオリゴマー構造変化が検出できるかを発光検出法をもちいて検討した。

Axin と CK1 との複合体の X 線結晶構造解析を目的として、結晶化に適した複合体試料の調製をおこなった。Axin の CK1 結合部位は、天然変性領域である Axin の中央領域に含まれることが報告されていたが、検討が不十分であった (*J. Cell. Biochem.*, 2004, 94, 217-224)。また、CK1 の特定の塩基性アミノ酸残基が Axin との分子間相互作用に関わっているとの情報を参考にして、Axin の欠損体および CK1 を大腸菌発現系を利用して調製し、精製タンパク質を用いた *in vitro* プルダウンアッセイによって CK1 結合部位の同定を試みた。そして、同定した Axin の CK1 結合領域と CK1 との複合体を調製し、結晶化を試みた。

4. 研究成果

発光検出法による Axin のオリゴマー構造変化の解析をおこなうにあたって、はじめに精製タンパク質による検討をおこなった。発光タグを Axin DAX ドメインに付加する大腸菌発現系を構築した。精製試料を用いて二つの試料を混合して発光測定をおこなったところ、濃度依存的な発光強度の上昇が確認された。また、培養細胞を用いた結果から、細胞レベルにおいて、立体構造解析の結果から示唆された Axin のオリゴマー構造が、Dvl や Ccd1 によって再編されることが確認できた。今後は、Axin のオリゴマー構造変化とカテニン転写活性との相関を分析することによってシグナル伝達制御との関係を検証していく必要がある。

次に、Axin の CK1 結合部位を同定するために、Axin 中央部に含まれる保存性の高い領域について MBP 融合タンパク質の大腸菌発現系を作成し、その精製タンパク質を使用した *in vitro* プルダウンアッセイによって CK1 との結合実験をおこなった。その結果、これまでに報告されている領域とは異なる酸性アミノ酸残基領域を含む 30 残基の CK1 結合部位(CBR)を同定することに成功した。さらに、ゲル濾過によって Axin-CBR と CK1 との複合体が分取可能であることも確認できた。複合体試料をもちいて結晶化スクリーニングをおこなったところ、硫酸アンモニウムを沈殿剤とする条件において、結晶化を確認することができた。X 線回折実験によって、分解能 3

の X 線回折データを収集し、CK1 をサーチモデルとして分子置換法によって位相決定したが、Axin-CBR に相当する電子密度を確認することはできなかった。今後は、複合体の安定化が可能な溶液条件を利用して、クライオ電子顕微鏡による立体構造解析を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 K. Yamanishi, M. Fiedler, S. Terawaki, Y. Higuchi, M. Bienz, and N. Shibata	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 該当する

1. 著者名 K. Yamanishi, W. Kumano, S. Terawaki, Y. Higuchi, N. Shibata	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 A. G. H. Rodrigo, N. Tomonobu, H. Yoneda, R. Kinoshita, Y. Mitsui, T. Sadahira, S. Terawaki, Y. Gohara, N. L. G. Y. Komalasari, F. Jiang, H. Murata, K. Yamamoto, J. Futami, A. Yamauchi, F. Kuribayashi, Y. Inoue, E. Kondo, S. Toyooka, M. Nishibori, M. Watanabe, Y. Nasu, M. Sakaguchi	4. 巻 634
2. 論文標題 Toll-like receptor 4 promotes bladder cancer progression upon S100A8/A9 binding, which requires TIRAP-mediated TPL2 activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 83 ~ 91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.09.116	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 寺脇慎一、藤田祥平、中込蒼一郎、石渡拓也、清水結加、笠野一郎、井上裕介、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹、若松馨
2. 発表標題 Axinオリゴマーの構造変化を介したWntシグナル伝達制御の構造基盤
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 S. Terawaki, K. Wakamatsu, K. Shiomi, M. Masu, N. Shibata, Y. Higuchi
2. 発表標題 Structural basis for dynamic oligomerization of Wnt signaling regulators
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Erina Kuzunuki, Ibuki Busujima, Yuka Kurokawa, Taiichi Sakamoto, Toshiyuki Kohno, Kazuo Hosoda, Shin-ichi Terawaki, Kaori Wakamatsu
2. 発表標題 Successful Analysis of the Interaction between a GPCR Peptide Fragment Having High Aggregating Tendency with a Modulator Protein of the GPCR
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 菅原 梨華・小野塚 樹・町田 結衣・塚越 隆寛・関根 紘太・島田 千紗都・細田 和男・寺脇 慎一・若松 馨
2. 発表標題 GINIPがGi特異的に活性を調節するメカニズム
3. 学会等名 日本化学会群馬地区研究交流会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 毒島いぶき・葛貫絵梨奈・黒川優香・河野俊之・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ペプチドの相互作用の1H/13C/15N-NMRによる解析
3. 学会等名 日本化学会群馬地区研究交流会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 寺脇慎一
2. 発表標題 動的オリゴマー形成を介する細胞シグナル制御の構造生物学
3. 学会等名 群馬大学Sメンブレプロジェクト若手研究者発表会・生体分子化学プロジェクト講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 葛貫絵梨奈, 毒島いぶき, 黒川優香, 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 との新しい融合タンパク質を用いた相互作用解析
3. 学会等名 NMR討論会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 黒川優香, 葛貫絵梨奈, 日比健人, 河野俊之, 寺脇慎一, 若松馨
2. 発表標題 アミロイド化傾向を有するタンパク質・ペプチドの凝集防止
3. 学会等名 NMR討論会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 関根 紘太, 町田 結衣, 小野塚 樹, 塚越 隆寛, 菅原 梨華, 細田 和男, 寺脇 慎一, 若松 馨
2. 発表標題 GABAB 受容体シグナリング調節因子 GINIP の立体構造解析
3. 学会等名 日本化学会群馬地区研究交流会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 塚越 隆寛, 小野塚 樹, 町田 結衣, 関根 紘太, 菅原 梨華, 細田 和男, 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 と活性型 G _i との相互作用領域の同定
3. 学会等名 日本化学会群馬地区研究交流会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 S. Terawaki, K. Wakamatsu, K. Shioni, 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G _i 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>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/</p>

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------