

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06527

研究課題名(和文) シグナル脂質代謝酵素DGK の触媒機構及び分子内活性化制御機構の構造基盤の解明

研究課題名(英文) Structural basis for enzymatic catalysis and regulation of diacylglycerol kinase alpha

研究代表者

高橋 大輔 (Takahashi, Daisuke)

九州大学・薬学研究院・講師

研究者番号：70791523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規がん免疫治療薬の標的として考えられている脂質代謝酵素DGK の触媒機構、活性制御機構の構造基盤の解明を目的とした。まず、昆虫細胞発現系を用いて高純度のDGK を調製し、結晶化を試みたが、結晶を得ることができなかった。打開策として、クライオ電顕単粒子解析による構造決定を目指し、抗DGK 抗体Fab断片との複合体を調製し、解析を進めた。また、N末端のEF領域がCa²⁺結合によりモルテングロビュールの状態から、コンパクトな状態へと変化し、その構造変化が隣接するRVH領域との相互作用を変化することをNMR、X線小角散乱等の物理化学的測定により明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規のがん免疫治療薬の標的であるDGK に関する構造生物学的理解は乏しく、活性が確認されて以来約60年、立体構造は不明のままである。本研究では、DGK 試料の大量発現・精製を進め、新たに抗DGK抗体Fabとの複合体を調製し、クライオ電顕による解析に着手することができた。また、種々の物理化学的手法を用いてDGK の活性制御を担うN末端領域の構造・相互作用変化をさらに詳細に明らかにすることができた。DGK 阻害剤開発のためには、より高分解能での構造解析が必要になるが、Cryo-EMのための試料調製が進んだことや個々のドメインの相互作用を明らかにしたことは、今後の構造解析に大きく貢献したといえる。

研究成果の概要(英文)：DGK represents a novel target for cancer immunotherapy. In this study, we aimed to elucidate the structural basis for its enzymatic catalysis and regulation. We have produced a full-length DGK using insect cell expression system and screened crystallization conditions, but could not obtain any protein crystals. To determine the structure, we prepared the complex of DGK with the Fab from an anti-DGK monoclonal antibody and initiated the structural analysis using cryo-EM. We also demonstrated using biophysical methods (NMR and SAXS) that the N-terminal EF domain adopts a molten globule state in its Ca²⁺-unbound state. Further analyses indicate that the partially unfold EF domain interacts with RVH domain, likely via hydrophobic interactions, and this interaction is modified when the EF domain binds to Ca²⁺. Taken together, these results present novel insights into the structural rearrangement of DGK N-domains, which is essential for the activation of DGK .

研究分野：蛋白質科学, 構造生物学, 生物物理学

キーワード：脂質代謝酵素 ジアシルグリセロールキナーゼ EFハンド 構造解析 NMR X線小角散乱 SEC-SAXS/MLS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、脂質の変調が癌・糖尿病など多くの疾患に関与することが明らかになりつつある(有田誠ら, 脂質クオリティ, 2018年, 実験医学増刊). 同時に, 遺伝子で直接コードされない脂質を動的に制御する脂質関連蛋白質群の分子基盤の解明が希求されている.

ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)は, シグナル脂質であるジアシルグリセロール(DG)をリン酸化し, ホスファチジン酸(PA)へと変換することで細胞内情報伝達の分岐器として働く. DGK 全 10 種のアイソザイムについては, 申請者らの研究グループ(千葉大学坂根研)を中心に生化学的研究が進み, 生理機能や病態との関連が明らかになってきた (Sakane *et al.*, 2007, *BBA*, Merida *et al.*, 2015, *Sci Signal*). なかでも α アイソザイム (DGK α) は, “がん細胞の増殖を促すが, T 細胞では活性化を減弱し, 非応答状態(anergy)を誘導する”という生理学的に極めてユニークな機能を持つ (Zha *et al.* 2006, *Nat Immunol* 他). 実際, 申請者らは, スクリーニングにより同定した阻害剤 (CU-3)が, がん細胞のアポトーシスを誘導し, 且つ T 細胞を活性化することを見出した (Liu *et al.*, 2016, *J Lipid Res*, Yamaki *et al.*, 2019, *J Cell Biochem*) (図 1). 以来, DGK α 阻害剤が二重の効果を持つ画期的な新規のがん免疫治療薬候補として注目されており (Noessner, 2017, *Front Cell Dev Biol* 他), 蛋白質立体構造に指南された創薬のためにも DGK 酵素反応機構, 活性制御機構の詳細な理解が求められている. しかしながら, 複数の制御ドメインと触媒ドメインからなる DGK の構造生物学的研究は進展が乏しく, DGK 触媒ドメインの立体構造も未だ報告がない.

2. 研究の目的

本研究では, DGK α の触媒機構, 及び分子内活性化制御機構を構造生物学・物理化学・生化学的手法を駆使して詳細に解析し, 細胞質と細胞膜の界面で働く DGK α の構造基盤, 特に DGK がどのように親水性頭部の露出が少ない DG を認識しリン酸化するか, DGK の複数ドメインがどのように相互作用し, 機能発現に繋がるかを明らかにすることを目的とし, (1) DGK α の構造解析および構造柔軟性の解析, (2) DGK α N 末端 EF-hand ドメインと他の制御ドメイン, 触媒ドメイン間の相互作用の解析を行なった.

3. 研究の方法

(1) DGK α 全長試料の発現と精製

申請者がこれまでに構築した昆虫細胞発現・精製系 (Takahashi *et al.*, 2018, *Peer J*) を用いて, DGK α 全長試料の調製を行ない, 結晶化スクリーニング, 電顕観察に用いた.

(2) 抗 DGK α 抗体 Fab フラグメント (DaMab-Fab), および DGK α 全長との複合体の調製

DGK α 全長のみのサイズ (~80 kDa) では, クライオ電顕単粒子解析に適さないことが考えられたため, 抗 DGK α モノクローナル抗体からパパイン消化によって Fab フラグメント (DaMab-Fab) を調製 (Fab preparation kit, Pierce) し, DGK α との複合体をゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200 increase) により調製した.

(3) DGK α /DaMab-Fab 複体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析のための試料調製

DGK α /DaMab-Fab 複体の単粒子解析を進めるため, ネガティブ染色・透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行い, 試料の評価を行なった.

(4) DGK α N 末端制御ドメインの発現と精製

DGK α N 末端制御ドメイン (RVH, EF, RVH-EF) の cDNA を, pSUMO ベクターに挿入後, 大腸菌 Rosetta2(DE3)により発現し, 既に確立した手法 (Takahashi *et al.* 2019, *Protein Sci*) に従い, 純度良く精製した.

(5) DGK α N末端制御ドメインの構造・相互作用解析

DGK α N末端制御ドメイン (RVH, EF, RVH-EF) について、等温滴定型カロリメトリー(ITC)による Ca²⁺結合の解析, CD と ANS 蛍光による構造変化の解析, 溶液 NMR, X線小角散乱法による溶液構造の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) DGK α の試料調製, 結晶化スクリーニング

DGK α 全長試料を昆虫細胞発現系により発現し, 精製を行なった(図1)。ゲル濾過 (Superdex 200 increase 10/300) 後の精製蛋白質としての平均収量は, 昆虫細胞培地 1L 当たり 3.1 mg (全9回の精製) であり, これまで難しかった DGK α の高収量高純度の精製系を確立することができた。

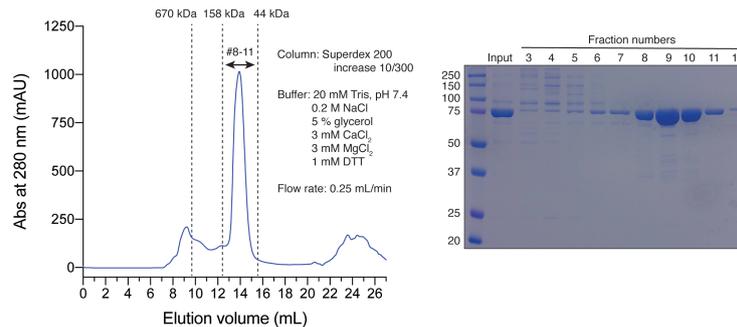


図1. 昆虫細胞 Sf9 細胞を用いた DGK α の発現と精製

精製した DGK α を 7.5 mg/mL に濃縮し, 結晶化条件のスクリーニングを網羅的に行なった (768 条件) が, 非晶質な凝集が多数見られた一方で, 結晶化は観察することができなかった。一方, 大量調製した DGK α 試料を用いて, 酵素活性と膜の形状についての共同研究を進め, DGK α が曲率の高い膜に存在する DG についてアシル鎖特異性を示すことを見出した (Bozelli *et al.*, *FASEB J*, 2021)。

(2) DGK α /DaMab-Fab 複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析のための試料調製

抗 DGK α モノクローナル抗体 (DaMab) と DGK α との親和性を表面プラズモン共鳴により測定したところ, 197 nM の解離定数が得られた。DaMab より調製した Fab を, DGK α に対して 2 モル当量の割合で混合し, ゲル濾過クロマトグラフィーに供与したところ, DGK α : DaMab-Fab 複合体の単一ピークとして調製できた(図2A)。複合体のネガティブ染色 TEM による観察を行い, 試料を評価したところ, 比較的分散した状態であったため, 複合体を凍結し, クライオ電子顕微鏡で観察した。単粒子解析を試みたが, 複合体の分布が少なく, 構造決定には至らなかった。今回, DGK α のクライオ電子顕微鏡での構造解析に新たに取り組むことができたが, 今後更なる試料調製・凍結試料作成条件の検討が必要である。

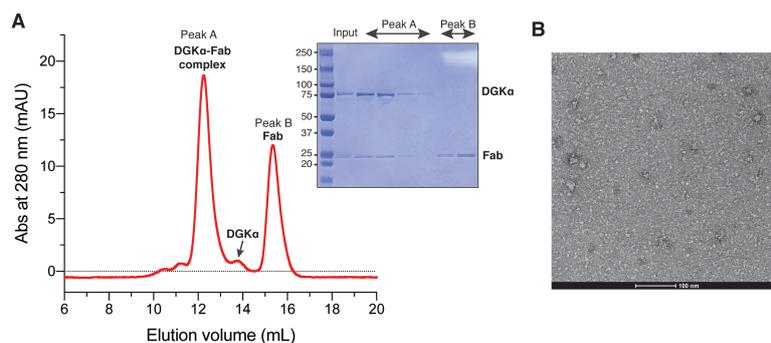


図2. DGK α :DaMab-Fab 複合体の調製 (A) と, ネガティブ染色による透過型電子顕微鏡観察

(3) DGK α N 末端領域の Ca²⁺結合による構造変化, ドメイン間相互作用の解析
 これまで EF ドメインへの Ca²⁺結合は明らかになっていたが, 本研究の解析により, 新たに RVH ドメインも還元状態において Ca²⁺結合能を持つことを見出した (図 3, A).

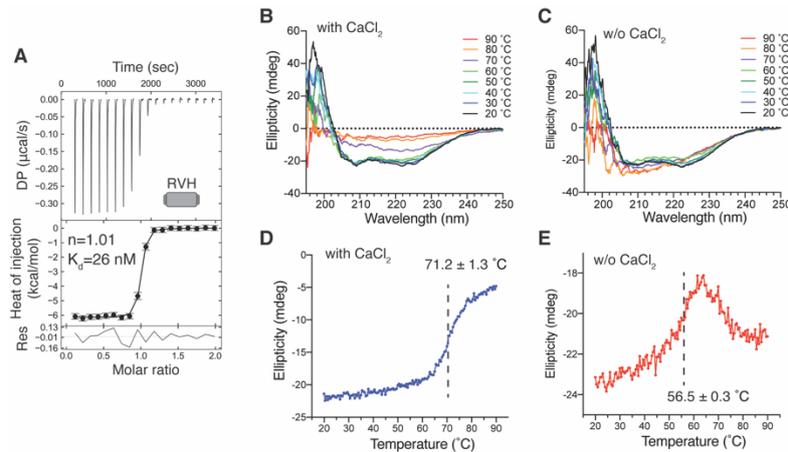


図 3. DGK α N 末端 RVH ドメインへの Ca²⁺結合(A)と構造安定性の変化(B-E)

しかしながら, ANS 蛍光, 溶液 NMR, ゲル濾過クロマトグラフィー解析により, Ca²⁺結合による大きな構造変化を起こすのは, これまでの報告と一致して, 主として EF ドメインであり, EF ドメインは, Ca²⁺非存在下では, ヘリックス構造は保持しているものの 3 次構造が緩んだ Molten globule (MG) 状態をとることを物理化学的手法により明らかにした (図 4). RVH ドメインは, 大きな構造変化は起こさないものの, Ca²⁺の存在・非存在下で構造安定性に顕著な差があることを見出した (図 3, B-E).

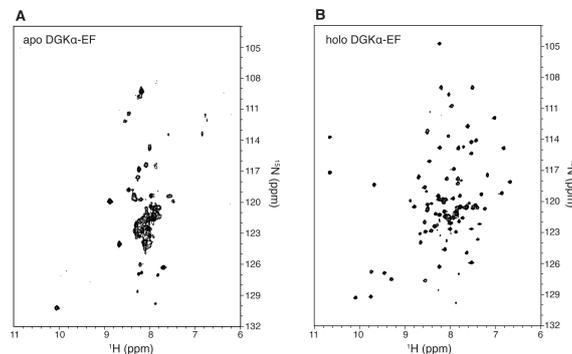


図 4. DGK α N 末端 EF ドメインへの Ca²⁺結合による構造変化

次に, N 末端制御ドメイン RVH-EF の X 線小角散乱測定, 2 次元 NMR 測定を行い, Ca²⁺結合による RVH ドメイン, EF ドメインの構造変化を更に特徴づけた. カルシウムの存在下では EF-hand, RVH が各々独立した構造を保持しているのに対し, カルシウム非存在化では, アポ型の EF ドメインが伸長した構造をとり, RVH と相互作用することが示唆された. 上記の ANS 蛍光測定によりアポ型の EF ドメインにおいて, 蛋白質表面の疎水性が増加していることから, おそらくこの相互作用は疎水的な相互作用であると考えられる. さらに, 溶液 NMR 解析により, RVH, EF ドメインともに, それぞれ単体で存在する場合と RVH-EF として連結された場合に ¹⁵N-¹H HSQC のピークが大幅に変化したことから, 複数ドメイン酵素 DGK のなかでは互いに相互作用すること, さらに Ca²⁺の結合により, その相互作用状態が変化することが示唆された. (Takahashi *et al.*, *Protein Sci*, 2022).

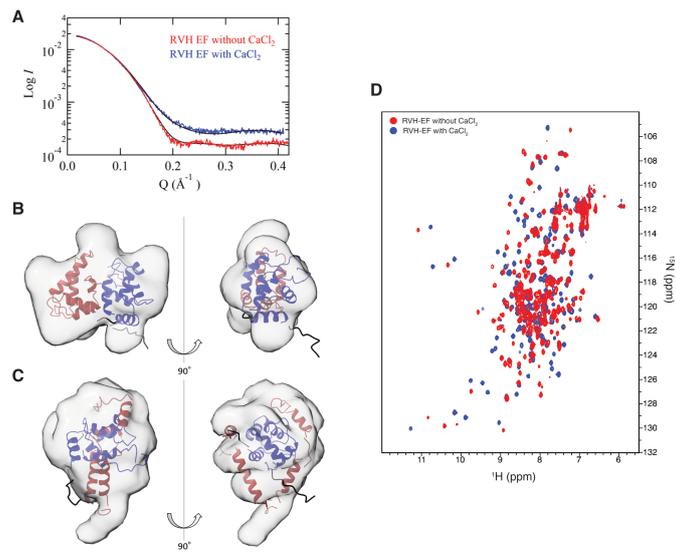


図 5. X線小角散乱 (A-C) と溶液 NMR (D) による RVH-EF 領域の溶液構造解析

DGK α の活性化には EF ドメインへの Ca $^{2+}$ 結合が必要である。また、過去の研究により、EF ドメインは Ca $^{2+}$ 非存在下において隣接する C1 ドメインと相互作用し、Ca $^{2+}$ 結合に伴い、EF と C1 ドメインが解離し活性化型の構造へと変化する事も示唆されている。本研究の結果を組み合わせると、(i) Ca $^{2+}$ の非存在下では、MG 状態をとった EF ドメインが隣り合う RVH、C1 ドメインと疎水的に相互作用しており、その相互作用がそれぞれのドメインを配向させ、DGK α を不活性化型に維持していること、(ii) Ca $^{2+}$ が EF ドメインに結合すると EF ドメインの構造変化が起こり、EF ドメインが独立して存在するようになることで、隣接するドメインとの相互作用が弱まり、活性化型の構造へと変換することが推察される。項目 (2) で進行中のクライオ電顕単粒子解析による高分解能の構造解析が必要であるが、今回の包括的な物理化学的解析により、活性化に必要な N 末端領域の構造変化をより詳細に示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi D, Yonezawa K, Okizaki Y, Caaveiro J, Ueda T, Shimada A, Sakane F, Shimizu N.	4. 巻 Accepted
2. 論文標題 Ca ²⁺ -induced structural changes and intramolecular interactions in N-terminal region of diacylglycerol kinase alpha	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 Accepted
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 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 Suzuki, Y., Asami, M., Takahashi, D., Naguro, I., Ichijo, H., Sakane, F.	4. 巻 26
2. 論文標題 Diacylglycerol kinase colocalizes and interacts with apoptosis signal-regulating kinase 3 in response to osmotic shock.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101006	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 -
1. 著者名 Jose Carlos Bozelli Junior, Jenny Yune, Daisuke Takahashi, Fumio Sakane, and Richard M. Epanand	4. 巻 35
2. 論文標題 Membrane morphology determines diacylglycerol kinase alpha substrate acyl chain specificit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100264R	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 Murakami Y, Murakami C, Hoshino F, Lu Q, Akiyama R, Yamaki A, Takahashi D, Sakane F.	4. 巻 525
2. 論文標題 Palmitic acid- and/or palmitoleic acid-containing phosphatidic acids are generated by diacylglycerol kinase in starved Jurkat T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1054-1060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.162	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 Yamada H, Mizuno S, Honda S, Takahashi D, Sakane F	4. 巻 287
2. 論文標題 Characterization of -synuclein N-terminal domain as a novel cellular phosphatidic acid sensor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS J	6. 最初と最後の頁 2212-2234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15137	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 Komenoi S, Suzuki Y, Asami M, Murakami C, Hoshino F, Chiba S, Takahashi D, Kado S, Sakane F.	4. 巻 19
2. 論文標題 Microarray analysis of gene expression in the diacylglycerol kinase knockout mouse brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100660	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 Iwata, K., Sakai, H., Takahashi, D. and Sakane F.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Myristic acid specifically stabilizes diacylglycerol kinase protein in C2C12 skeletal muscle cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids	6. 最初と最後の頁 1031-1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.04.003.	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 Saito, T., Takahashi, D. and Sakane, F.	4. 巻 4
2. 論文標題 Expression, purification and characterization of human diacylglycerol kinase .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 5540-5546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b00079	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 Takahashi, D., Suzuki, K., Sakamoto, T., Iwamoto, T., Murata, T., and Sakane, F.	4. 巻 28
2. 論文標題 Crystal structure and calcium-induced conformational changes of diacylglycerol kinase EF-hand domains.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 694-706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3572	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋大輔, 米澤健人, 沖崎悠希, 嶋田睦, Jose Caarveiro, 阿部義人, 植田正, 清水伸隆, 坂根郁夫
2. 発表標題 マルチドメイン蛋白質DGK の活性を制御する N末端領域の構造変化の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋大輔, 嶋田睦, Jose Caarveiro, 阿部義人, 植田正, 坂根郁夫
2. 発表標題 DGK 活性制御の分子基盤: N末端RVH領域へのCa ²⁺ 結合の物理化学的解析
3. 学会等名 第43回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋大輔, 嶋田睦, Jose Caarveiro, 阿部義人, 植田正, 坂根郁夫
2. 発表標題 DGK 活性制御の分子基盤: N末端RVH領域へのCa ²⁺ 結合の物理化学的解析
3. 学会等名 2019年度 日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 研究者プロフィール
<https://kyushu-u.pure.elsevier.com/en/persons/daisuke-takahashi>
九州大学大学院 薬学研究院 蛋白質創薬学分野
<http://meneki.phar.kyushu-u.ac.jp/Protein/TOP.html>

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