

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02420

研究課題名(和文) Wntシグナル因子が関わる新規癌細胞増殖シグナル活性化と阻害抗体の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis of activation of a novel tumor progression signaling involving Wnt signaling proteins and suppression by antibodies.

研究代表者

柴田 直樹 (Shibata, Naoki)

兵庫県立大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30295753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規の癌細胞増殖シグナル伝達経路DKK/CKAP4シグナルについて、DKKおよびその受容体であるCKAP4の細胞外領域の構造生物学研究を遂行した。CKAP4細胞外領域(128-602)のうち、主鎖の大部分と一部については側鎖も含めた構造をX線結晶構造解析によって解明した。また、DKK1のcysteine-rich domain 1の結晶構造を明らかにした。また、抗CKAP4モノクローナル抗体のFabフラグメントとの複合体について、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を遂行することにより、現在得られているモノクローナル抗体よりも強力に癌細胞増殖を抑制する抗体を取得するための指針を得ることができる。そのような抗体を得ることは、新規抗癌剤を開発する上で極めて重要である。患者の体質や病気の特徴に合わせて治療を行う個別化医療では、がんの原因遺伝子が特定されれば、それを標的とした分子標的薬によって、副作用が少なく高い治療効果が得られると期待される。抗CKAP4抗体に関する研究は、DKK/CKAP4シグナル活性が高いタイプの癌患者に合わせた個別化医療の手段として適用できる新しい抗癌剤の開発につながる可能性が高く、多くの癌患者の治療に貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The Dickkopf(DKK)/cytoskeleton-associated protein 4(CKAP4) pathway is a novel cancer cell proliferation pathway which activates the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT signaling. We successfully crystallized almost entire part of the extracellular region (128-602) of CKAP4 and determined its structure of the main chain and the side chain atoms in part. We also determined a high resolution crystal structure of the cysteine-rich domain 1 (CRD1) of DKK1. Single particle analyses by CryoEM of the complex between CKAP4 extracellular region and the Fab fragment of an anti-CKAP4 mouse monoclonal antibody were also tried.

研究分野：構造生物学

キーワード：結晶構造解析 DKK CKAP4 Wntシグナル伝達経路

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Dickkopf/Cytoskeleton-associated protein 4 (DKK/CKAP4) シグナル軸は新しく見つかった癌細胞増殖を誘導する経路である。特に、死亡率の高い膵癌や肺線癌でDKK, CKAP4両方が高発現している患者(頻度60%以上)で明らかに予後が悪いことが報告されている(*J. Clin. Invest.*, 2016)。DKKは細胞分化を制御するカノニカル Wnt シグナル伝達経路(Wnt シグナル)で働くことが知られている。そこでは、DKKがWntタンパク質の共役受容体 Lipoprotein receptor-related proteins (LRP)5/6 に結合するとWntシグナルを阻害する(図1)。一方DKK/CKAP4シグナルでは、DKKがCKAP4とLRP5/6を橋渡しして三者複合体を構築し、Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/AKTシグナルを活性化すると考えられている。また、それによって癌細胞増殖を亢進すること(*Sci. Signal.*, 2019)(図1)、抗CKAP4抗体がDKK/CKAP4シグナルを阻害し、腫瘍形成能を抑制すること(*Clin. Cancer Res.*, 2019)が明らかにされている。

2. 研究の目的

- (1) CKAP4 細胞外領域全体の構造解明
- (2) CKAP4 細胞外領域 - DKK 複合体の構造解析
- (1) および (2) は CKAP4 - DKK 相互作用による PI3K/AKT シグナルを活性化の仕組みを解明するために必要である。
- (3) CKAP4 細胞外領域 - 抗 CKAP4 モノクローナル抗体複合体の構造解析
腫瘍抑制効果を発揮する抗 CKAP4 モノクローナル抗体と CKAP4 との複合体について構造解析を行うことによって、抗 CKAP4 モノクローナル抗体が CKAP4 - DKK 複合体の形成を抑制する理由を明らかにする。
- (4) CKAP4 細胞外領域 - 抗 CKAP4 モノクローナル抗体の相互作用解析
CKAP4 細胞外領域 - 抗 CKAP4 モノクローナル抗体相互作用について、解離定数を見積もり、抗体結合による立体障害と CKAP4 に対する親和性のどちらが腫瘍抑制効果に重要であるか明らかにする。

3. 研究の方法

CKAP4 細胞外領域(128-602) および DKK(DKK1, DKK2, DKK3, DKK4) cysteine rich domain 1 (CRD1) の大腸菌発現系を利用してタンパク質試料を調製し、これらの混合試料または CKAP4 単独での結晶化スクリーニングを行った。結晶が得られた試料については放射光施設 SPring-8 または Photon Factory において X 線回折実験を行うことによって回折データを得た。構造解析については分子置換法または異常分散法によって初期位相決定を行った。抗 CKAP4 モノクローナル抗体は共同研究者から提供を受けたものを元に、固定化パピインにより Fab フラグメント化したものを用いて構造解析および解離定数の見積りに使用した。

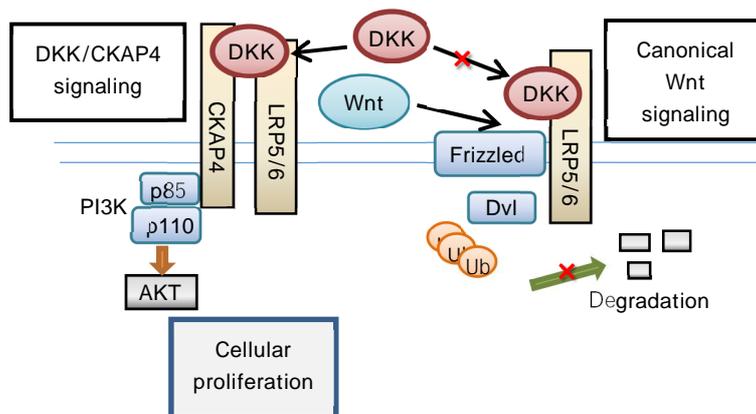


図1. DKKが作用するシグナル伝達経路

- 左: DKK/CKAP4シグナルによるPI3K/AKTシグナル活性化
右: カノニカルWntシグナルによる標的遺伝子の転写制御

左: DKK/CKAP4シグナルによるPI3K/AKTシグナル活性化
右: カノニカルWntシグナルによる標的遺伝子の転写制御

4. 研究成果

- (1) CKAP4 細胞外領域の構造解析
CKAP4 のドメインとして LZ (465-497)があるが、LZ よりも N 末端側に 34 残基延長した発現系で得られたタンパク質試料が非常に良く発現し、可溶性が高く安定であったため、結晶化スクリーニングを行った。その結果、MemGold #F1 (23% (w/v) PEG2000, 0.1 M Tris pH8.0, 0.3 M sodium nitrate) で結晶が得られた。SPring-8 BL32XU において回折強度データを測定したところ、2.5 Å 分解能のデータセットを得た。分子置換法による構造解析を行ったが、一部電子密度が不明瞭な領域があり、その部分については分子モデルを構築できていない。その影響のため Rfree は 0.377 と高い値を示した。図2にN末端付近(431-464)およびLZの電子密

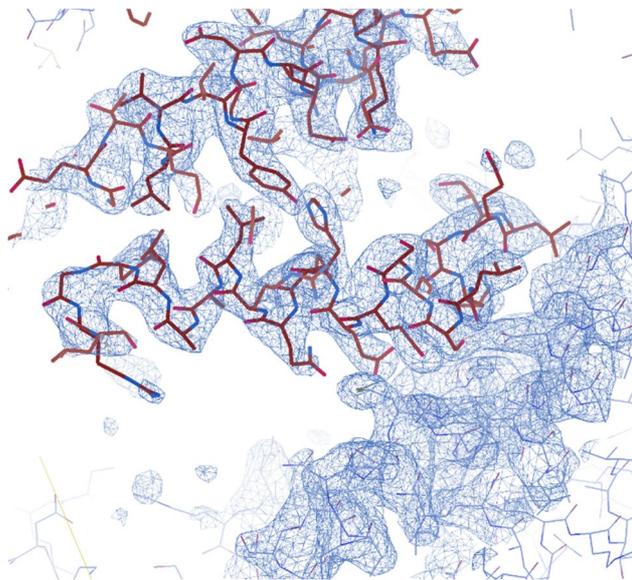


図2 . CKAP4 LZ ドメイン近傍の電子密度図および分子モデル

パネル中央付近に 431-464 の領域、上方に LZ 領域の電子密度とフィッティングした分子モデルを表示している。

密度図と精密化した分子モデルを示す。LZ と 431-464 の領域は 460 番のアミノ酸残基付近で折れ曲がっており、431-464 の領域が分子の外側に飛び出した状態になっていた。CKAP4 細胞外領域を 431 番のアミノ酸残基で切断した発現系を用いたため、431 番よりも N 末端側の構造による影響を受けなくなった結果、LZ 領域の分子表面と 431-464 にある疎水性アミノ酸残基の側鎖同士が疎水相互作用によって結合したために、このような構造になったと考えられる。

(2) CKAP4 細胞外領域 - DKK 複合体の結晶化

CKAP4 と DKK 間の相互作用は非常に弱く ($K_d = 5 \mu\text{M}$) ゲルろ過クロマトグラフィーでは分離してしまうため、CKAP4 細胞外領域と DKK-CRD1 はそれぞれ別々に試料調製を行い、両者を混合したものを用いて結晶化スクリーニングを行った。いくつかの条件で結晶は得られた(図3)が、回折実験および分子置換法で構造解析を行った結果、いずれも CKAP4 細胞外領域が単独で結晶になっていることが判明した。

(3) CKAP4 細胞外領域 - 抗 CKAP4 モノクローナル抗体複合体の構造解析

抗 CKAP4 モノクローナル抗体は、結晶化スクリーニングを十分に行うことができるだけの量がなかったため、より少ないサンプル量で解析を行うことができるクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を試みた。得られた画像から CryoSPARC において 2D classification によって Fab フラグメントが 3 分子集まってできたと思われる構造を確認することができた(図4)。現時点ではここから原子レベルでの立体構造モデルの構築には至っていないため、グリッド作成時の条件検討を行っている。

(4) CKAP4 細胞外領域 - 抗 CKAP4 モノクローナル抗体の相互作用解析

マウス抗 CKAP4 モノクローナル抗体 (mAb) と CKAP4 の相互作用解析は水晶振動子マイクロバランス (QCM) 装置を用いて行った。mAb をセンサーチップに直接固定し、CKAP4 細胞外領域試料として、LZ から C 末端までの領域を逐次的に反応槽にインジェクトした。CKAP4 細胞外領域の濃度が低い ($< 10 \text{ nM}$) 領域では振動数変化の再現性が悪かったため、正確な解離定数を得ることができなかったが、5-10 nM の範囲内にあると見積もられた。測定に用いた CKAP4 細胞外領域の試料は 10 nM 以下では高次構造が壊れるために mAb と相互作用しなくなる可能性が考えられる。CKAP4 細胞外領域は短い断片になると高次構造が壊れやすくなるため、CKAP4 細胞外領域全体を用いて測定を行う必要がある。

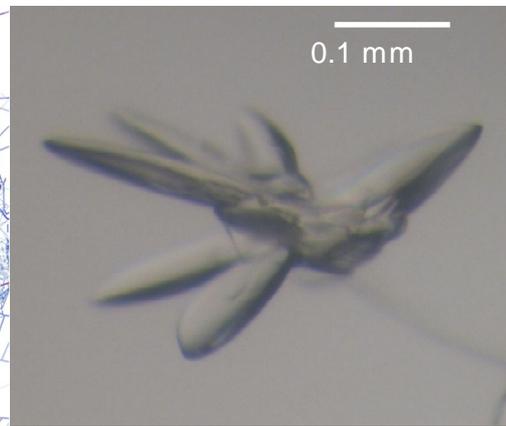


図3 . CKAP4 細胞外領域 DKK 混合試料の結晶

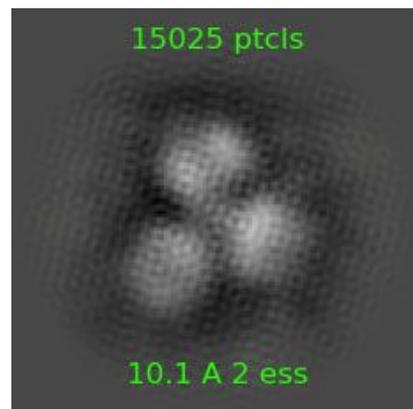


図4 . CKAP4 細胞外領域 抗 CKAP4 モノクローナル抗体複合体 (Fab) 複合体の 2D classification

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibata, N., Toraya, T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Structural basis for activation of cobalt-carbon bond and control of adenosyl radical in coenzyme B12 catalysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202300021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202300021	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 Negoro, S., Shibata, N., Kato, D., Tanaka, Y., Yasuhira, K., Nagai, K., Oshima, S., Furuno, Y., Yokoyama, R., Miyazaki, K., Takeo, M., Hengphasatporn, K., Shigeta, Y., Lee, Y., Higuchi, Y.	4. 巻 290
2. 論文標題 X-ray crystallographic and mutational analysis of the NylC precursor: catalytic mechanism of autocleavage and substrate hydrolysis of nylon hydrolase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 3400-3421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16755	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 Shibata, N., Higuchi, Y., Krautler, B., Toraya, T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Structural insights into the very low activity of the homocoenzyme B12 adenosylmethylcobalamin in coenzyme B12-dependent diol dehydratase and ethanolamine ammonia-lyase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem. Eur. J.	6. 最初と最後の頁 e202202196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/chem.202202196	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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