

「Wnt シグナル伝達系因子の SUMO 修飾に関する構造生物学」
 兵庫県立大学大学院生命理学研究科 柴田 直樹

1 研究の背景と目的

Wnt シグナル伝達経路は体軸形成、細胞の分化・分裂などの制御などに関わっている。Wnt シグナル伝達経路因子の1つである Axin はユビキチン化修飾または SUMO 化修飾を受けることでシグナル伝達制御に変化をもたらす(図1)。SUMO 化修飾は Axin のユビキチン修飾化を阻害し、Axin の安定化を促す。Axin の SUMO 化部位は C 末端にあることが報告されている。また、HECT 型 SUMO E3 リガーゼである PIAS1, PIASx β , PIASy が SUMO 化に関与している。

Axin には、申請者等が構造を明らかにしたユビキチンフォールドドメイン DIX が存在する。Axin-DIX (DAX)の C 末端には SUMO 修飾部位が存在し、SUMO 修飾化によって、細胞極性や細胞骨格の制御に関与する Wnt-JNK/PCP 経路における、c-Jun N-terminal kinase (JNK) が活性化されることが分かっている(Rui *et al.*, *JBC*, 2002)。SUMO 修飾化による Axin の機能制御の分子機構は不明である。申請者は DAX と SUMO が共にユビキチンフォールドであることに注目し、SUMO と DAX がどのような相互作用様式を示すのか解明するために DAX の SUMO 修飾に関する構造生物学的研究に着手した。

DAX は Head-to-tail 型の相互作用によってオリゴマー/ポリマー化する。DAX のオリゴマー構造と SUMO 化部位の相対的な位置関係を詳細に検討すると、DAX が SUMO 修飾を受けると、立体障害によってホモオリゴマー化や Axin と相互作用する Dishevelled (Dvl)との結合が阻害される可能性が高いことが分かった(図2)。つまり、DAX の SUMO 修飾化による立体障害によって Dvl との相互作用を阻害する機構が考えられる。カノニカル経路では Dvl が Axin の働きを阻害するが、逆に PCP 経路では Axin が Dvl の働きを阻害していて、Axin の SUMO 修飾化により Dvl に対する阻害効果が抑制されるという仮説に至った。また、DAX の SUMO 化修飾の分子機構を明らかにするために PIAS1 との複合体の構造解析も目指す。

2 研究方法・研究内容

1. SUMO 修飾化 DAX の構造生物学的研究

2-I-1. 大腸菌発現系を利用した SUMO 修飾化 DAX の発現

SUMO 修飾化 DAX を調製するために、大腸菌共発現系による SUMO 化タンパク質産出システム(Uchimura *et al.*, *FEBS Lett.* **564**, 85-90 (2004))を参考に、SUMO 修飾化 DAX に適した系に改変したものを利用した。具体的には Aos1/Uba2 ダイマー(SUMO E1)+

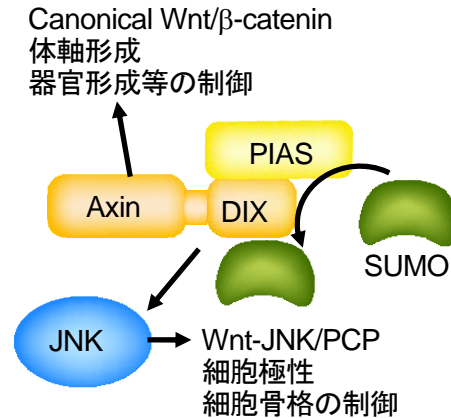


図1 Axin の SUMO 化による生命機能制御

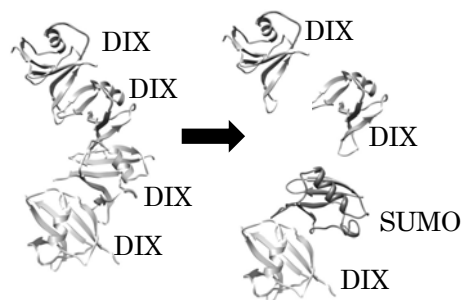


図2 SUMO 化による Axin-DIX オリゴマー分解モデル

ユビキチンフォールドである DIX ドメインの一部が SUMO に置き換わると DIX オリゴマーが分解される

Ubc9 (SUMO E2), DAX+SUMO-1 をそれぞれ pCOLADuet, pETDuet ベクター上に挿入し, 大腸菌内で SUMO 修飾化 DAX を産出するものである. 野生型 DAX は多量体を形成すると SUMO 修飾化効率が低下するため, 多量体化を抑制する点変異を導入した.

2-I-2. SUMO 修飾化 DAX の精製

上記の大腸菌発現系を用いて, 大腸菌の大量培養を行い, 6xHis タグタンパク質として発現させた SUMO 修飾化 DAX を得た. これをアフィニティークロマトグラフィーにて精製し, SUMO 化されなかった DAX を分子ふるいクロマトグラフィーによって, 分離・精製した.

2-I-3. 精製標品の結晶化

SUMO 修飾化 DAX の構造解析を行うことを目指して, 市販の結晶化スクリーニングキットを利用して精製標品の結晶化を行った. 使用した結晶化スクリーニングキットは以下の通りである.

PACT premier, Proplex, Precipitant Synergy, JBScreen PEG/Salt, JBScreen Pentaerythritol, Pi-PEG Screen, PGA Screen, Midas

2-I-4. ペプチドリンカーで連結した2つの DIX での SUMO 修飾化効率の検討と SUMO 修飾化における多量体化の影響の分子機構

DAX は多量体化すると SUMO 修飾化効率が低下するが, このことは逆に, SUMO 修飾化によって Axin の多量体化や Dvl との相互作用が阻害されることを意味する可能性が高い. Head-to-tail 相互作用の阻害は, 恐らく DIX ドメインの SUMO 修飾化による立体障害によって引き起こされるので, SUMO は DAX の Head 側, Tail 側のいずれかに存在すると考えられる. そこで, 以下のような発現系群を構築し, SUMO 修飾化効率の差違から SUMO 存在部位を推定した. 2つの DAX をペプチドリンカーで接続し, DAX-DAX 間の Head-to-tail 相互作用によって, SUMO 修飾化効率が低下するか調べた. また, DAX-DAX 間の Head-to-tail 相互作用部位に点変異を導入することで相互作用を弱くすると (図3, 図4), SUMO 修飾化効率が回復するか調べた.

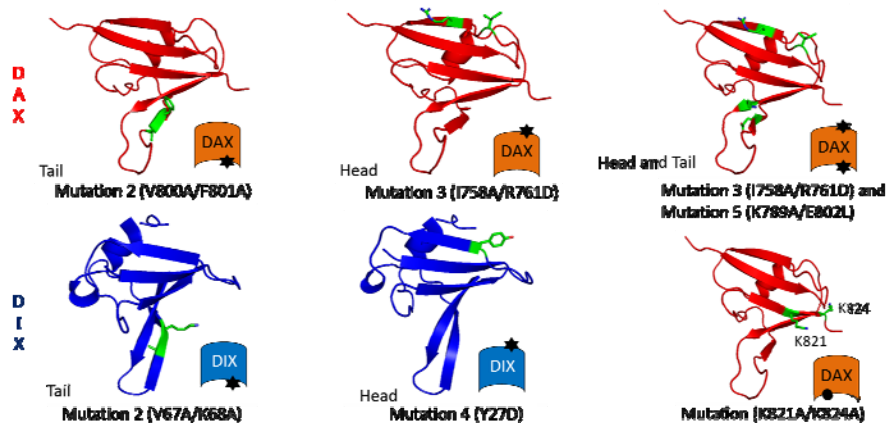


図3 DAX に導入した点変異箇所

Head mutation (★): Mutation 3 及び Mutation 4, Tail mutation: Mutation 2

SUMO 化部位 (●): K821A (major site)/K824A (minor site: 全ての DAX に導入)

また, Dvl にも DIX ドメイン(DIX) が存在し, DAX-DIX 間の Head-to-tail 相互作用によって両者が結合する. DAX と DIX をペプチドリンカーで連結した場合にも SUMO 修飾化効率が変化するか調べた. もし, 顕著な SUMO 修飾化効率の低下が起これば, Head-to-tail 相互作用による立体障害によって SUMO 修飾化が抑制されたことを意味す

る。また、点変異によって SUMO 修飾化効率が回復していれば、Head-to-tail 相互作用が弱くなったことによって立体障害が緩和されたことを意味する。DAX-DAX の場合は、2箇所の SUMO 修飾化部位が発生するので、どちらか一方の SUMO 修飾化残基 (K821) をアラニンに置換した (図 3)。

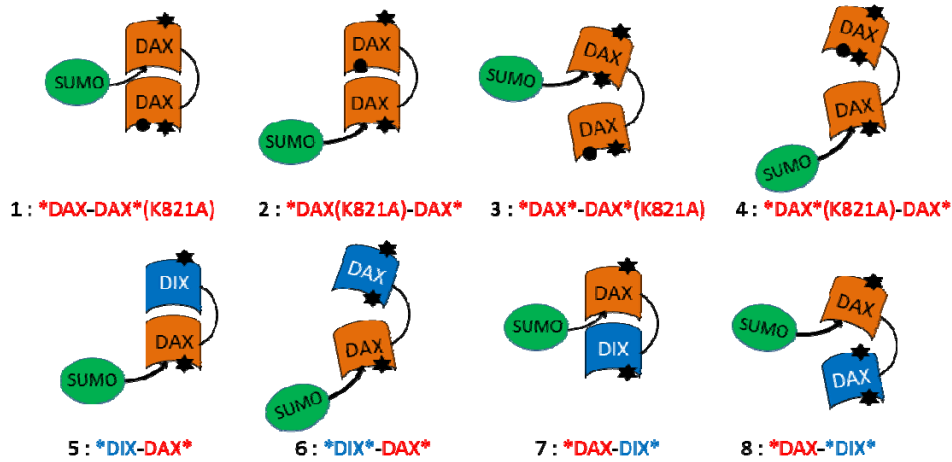


図 4 2つの DIX ドメインを連結した場合の SUMO 修飾化モデル
 矢印の太さは SUMO 修飾化の起こりやすさ (太い方が起こりやすい) を示す。
 ★: Head または Tail mutation
 ●: K821 A mutation (K824A は全ての DAX に導入)

[II. PIAS1 (SUMO E3)–Ubc9–Axin-DIX 複合体による DAX SUMO 化の分子機構解明]

II – 1 大腸菌発現系を利用した PIAS1, Ubc9 の調製

PIAS1, Ubc9 共に pCold ベクター系による大腸菌発現系を用いて調製した。DAX の調製については上記の通りである。

3 研究成果

3 – I – 1. 大腸菌発現系を利用した SUMO 修飾化 DAX の発現

大腸菌発現系によって、結晶化のための試料を発現させた。

3 – I – 2. SUMO 修飾化 DAX の精製

図 5 に SUMO 修飾化 DAX の Ni レジンカラムを用いて精製した結果を示す。得られた試料をゲル濾過クロマトグラフィーで更に精製し、濃縮した精製標品を結晶化試料とした。

3 – I – 3. 精製標品の結晶化

SUMO 修飾化 DAX の結晶化は、市販の結晶化スクリーニングキットを利用し精製標品の結晶化を行った。現在の所、X 線回折実験に適した結晶は得られていない。

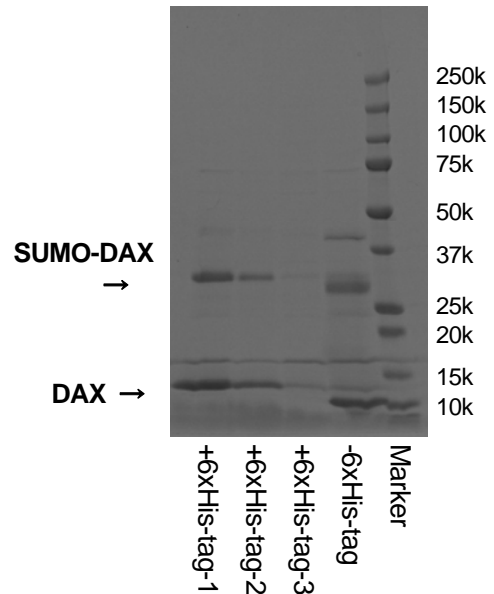


図 5. SUMO 修飾化 DAX Ni 樹脂からの溶出と His-tag の切断

3-I-4. ペプチドリンカーで連結した2つのDIXドメインのSUMO修飾化効率の検討とSUMO修飾化における多量体化の影響の分子機構

Head-to-tail 相互作用部位に点変異を導入していない(野生型の構造を維持)場合には, Head側(1つ目)のDAXへのSUMO修飾化はほとんど起こっていなかった(1: *DAX-DAX*(K821A))(図6). 一方, Tail側(2つ目)のDAXにはSUMO修飾化が起こっていることが確認出来た(2: *DAX(K821A)-DAX* 及び 4: *DAX*(K821A)-DAX*). Head-to-tail 相互作用部位に点変異を導入すると, Head側のDAXへのSUMO修飾化が認められた(3: *DAX*-DAX*(K821A)).

DIXを含む発現系では, 5: *DIX-DAX* と 6: *DIX*-DAX* でもTail側にあるDAXにSUMO修飾化が認められたが, 7: *DAX-DIX*では, Head側のDAXへのSUMO修飾化はほとんど起こらなかった. Head-to-tail 相互作用部位に点変異を導入した 8: *DAX*-DIX* については, SUMO修飾化が起こると予想していたが, ほとんど起こっていなかった. 8: *DAX*-DIX* については予想とは異なる結果となったが, 全体的には, Head-to-tail 相互作用が強いと, Head側のDAXにはSUMO修飾化は起こりづらいが, Tail側のDAXにはSUMO修飾化される傾向にあることがわかった. このことから, SUMOはDAXのTail側近傍に存在する可能性が高いことが分かった.

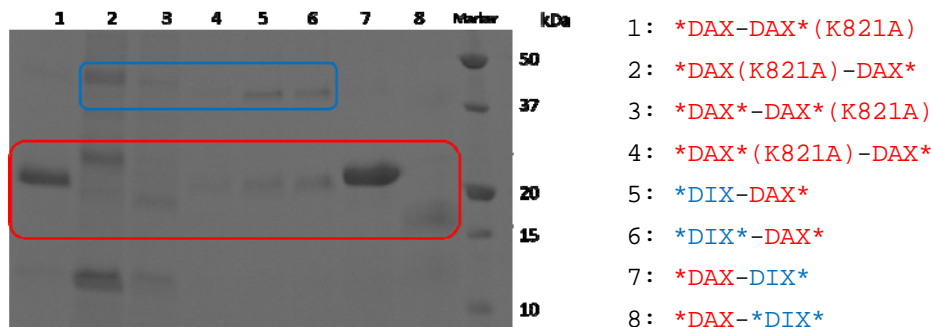


図6 2つのDIXドメインを連結した場合のSUMO修飾化

赤枠で囲んだ領域に未修飾のDAX, 青枠にSUMO修飾化されたものが現れている
Coomassie 染色

3-II-1 大腸菌発現系を利用したPIAS1, Ubc9の調製

PIAS1は大腸菌発現系では発現量が少なかったため, 結晶化実験には至らなかった. Ubc9については発現量が多く, 試料調製を行うことが出来たが, 複合体の調製には至らなかった. PIAS1についてはタグを含めた発現系の改良が必要である.

4 生活や産業への貢献および波及効果

Wntシグナル伝達経路は細胞の分化・分裂などの制御などに関わるため, 関連する遺伝子に異常が生じると, 種々のヒト疾患, 特に悪性腫瘍の原因となる. また, 最近では遺伝子検査によって, 悪性腫瘍などの発生確率を予測することが可能となりつつあることから, Wntシグナル伝達経路に関わる遺伝子の異常がどの程度, 疾患の発生確率を引き上げるか明らかにすることが重要となっている. 遺伝子の異常はその産物であるタンパク質の変異を引き起こし, タンパク質の機能に悪影響を及ぼす. その理由は, 変異によるタンパク質の立体構造の変化に起因することが多い. そのため, 立体構造を明らかにすることは, どのような遺伝子の異常(タンパク質の変異)が重大な障害を引き起こす可能性が高いのか, 予測するための重要な手がかりになる. Wntシグナル伝達経路に関わるタンパク質について, 構造生物学的研究は, 重大な疾患に対して予防措置を取るための指針を与える研究手段として貢献するものである.