

「がん細胞増殖シグナルを活性化するタンパク質複合体の構造生物学」

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

Dkkopf(DKK)は発生初期における体軸形成や器官形成を司るカノニカル Wnt シグナルを抑制する因子として知られている。DKK が DKK 受容体である LRP5/6 に結合すると、細胞内因子である Axin などの働きによって、転写活性化の働きを持つ β -catenin 分解が促進され、結果として Wnt 標的遺伝子の転写が抑制される。それとは無関係に新たに見つかった DKK 受容体の細胞外領域とも相互作用し、Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/AKT シグナルも活性化する。また、それによってがん細胞増殖を亢進する(図1)(Kimura *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2016)。

カノニカル Wnt シグナルにおける Axin の活性は、別の細胞内因子である Dishevelled (Dvl) によって抑制される。両因子には DIX と呼ばれるドメインがあり、DIXドメイン同士を介して複合体を形成すると考えられてきたが、両者の複合体の構造が明らかではなかったため、その分子機構は不明であった。Wnt シグナルの異常な亢進は細胞のがん化の原因となるため、DIX ドメインによる Axin-Dvl 複合体形成が適切に制御されることは、がん細胞発生を抑制するためには重要である。

一方、DKK/DKK 受容体シグナルは新規のがん細胞増殖シグナルで、構造生物学的に全く未知の領域である。新規 DKK 受容体には構造情報がないため、どのようにして DKK-DKK 受容体相互作用が PI3K/AKT シグナルを活性化するのか不明である。この疑問を解く鍵は、DKK と DKK 受容体、そして両者の複合体について原子レベルでの立体構造や、DKK 結合による DKK 受容体の構造変化を明らかにすることである。

本研究では、DKK が関わる2つのシグナル伝達に関わる複合体や因子、つまり DIX ドメイン複合体、そして DKK と DKK 受容体細胞外領域、及び両者の複合体の構造を明らかにすることである。

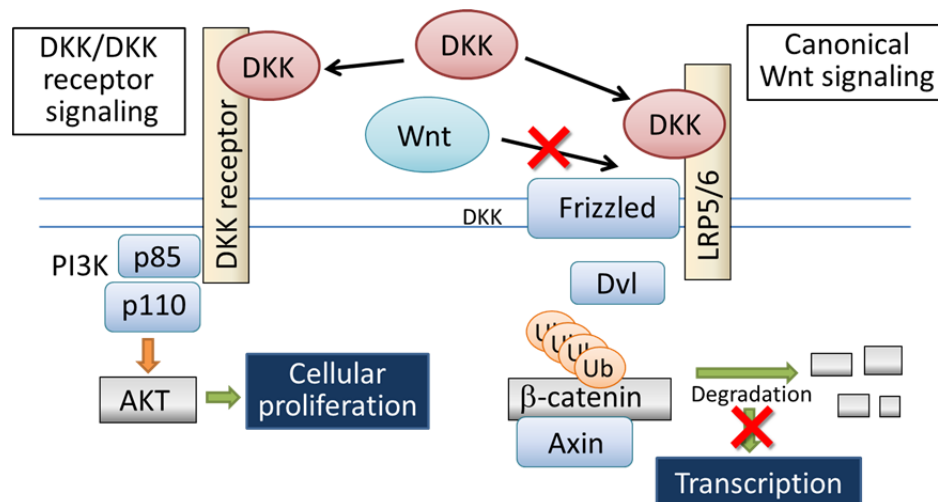


図1. DKK が作用するシグナル伝達系

左: DKK/ DKK 受容体シグナルによる PI3K/AKT シグナル活性化

PI3K/AKT シグナル活性化によって、がん細胞増殖が亢進される

右: カノニカル Wnt シグナル

発生初期における体軸形成や器官形成の制御に関わる

2 研究方法・研究内容

DKK 受容体細胞外領域には、3つのドメイン、N末端側 Coiled-coil (Ncoil), Leucine Zipper (LZ), C末端側 Coiled-coil (Ccoil)が存在する。DKK には CRD1 と CRD2 の2つのドメインが存在し、DKK 受容体細胞外領域との結合には CRD1 が必須である。また、DKK は DKK 受容体 (LZ-Ccoil)を含む領域に結合する。Ncoil は DKK と直接的には相互作用しないが、DKK 結合による DKK 受容体全体の構造変化を明らかにする上で重要な構造情報となる。

DKK 受容体細胞外領域と DKK は糖鎖や脂肪酸などの翻訳後修飾を受けないことが明らかになっており、大腸菌発現系を利用して試料調製を行っても問題ない。DKK 受容体細胞外領域全体は大腸菌発現系で可溶性画分として得られる。しかし、凝集性が高く、ゲルろ過で見積もった分子量約 600 万である。一般的に凝集性が高い試料からは結晶が得られる可能性が低いので、より短い領域毎に結晶化を行った。

－試料調製－

DKK 受容体細胞外領域、DKK1-CRD1 共に大腸菌発現系を利用してタンパク質の発現を行った。DKK 受容体細胞外領域のうち、Ncoil2 と Ncoil3 を含む領域(Ncoil23)と LZ から Ccoil を含む領域 (LZ-Ccoil) について、可溶性画分からアフィニティー精製と分子ふるいクロマトグラフィーによって、精製標品を調製した。上記のいずれのドメイン・領域でも可溶性画分として十分な量の試料が得られた (5 mg/L 培養液以上)。一方、DKK1-CRD1 は封入体として発現されるので、変性剤で可溶化後、リフォールディングを行い、同様にアフィニティー精製と分子ふるいクロマトグラフィーによって、精製標品を調製した。

－結晶化－

市販の結晶化スクリーニングキットを利用して結晶化条件を検索した。

－X 線構造解析－

X 線構造解析に必要な回折データセットは、放射光施設 (SPring-8, PhotonFactory) を利用して取得した。既に構造が明らかな Ccoil をもとに、LZ-Ccoil では分子置換法、それ以外では分子置換法と SeMet 置換体を用いた異常分散法によって構造解析を行った。DKK1-CRD1 については同じファミリーの DKK4-CRD1 の NMR による構造をモデルとして分子置換法によって構造解析を試みた他、SeMet 置換体を用いた異常分散法によって構造解析を行った。

一方、Dvl-DIX (DIX)と Axin-DIX (DAX)については、どちらもホモポリマーを形成する。そのため、両者を混ぜるだけでは DIX ホモポリマー、DAX ホモポリマー、DAX-DIX ヘテロポリマーが共存するため、DAX-DIX 複合体だけを含んだ均一な試料を調製することは困難である。DIX ドメインは、前側(Head)と後側(Tail)の接触面同士がつながってポリマー化する。DAX は Head, DIX は Tail の接触面に存在するアミノ酸残基を他の種類に置換することで、ポリマー化を抑制した。そうすることで、アミノ酸置換をしていない DAX の Tail と DIX の Head が結合して二量体を形成するが、アミノ酸置換した面では結合できなくなっているため、ポリマー化は起こりづらい。また、両者をリンカーで連結することによって二量体(DAX-DIX 二量体)の構造を安定に保った。X 線回折データセットは、SPring-8を利用して測定した。構造解析はすでに報告されている DIX 及び DAX ホモポリマーの構造をもとに分子置換法によって行った。

3 研究成果

DKK 受容体細胞外領域のうち, Ncoil23 と LZ-Ccoil, そして DKK1-CRD1 について, X 線構造解析が可能な結晶が得られた。Ncoil23 については SeMet 置換体を用いた異常分散法, LZ-Ccoil では Ccoil をモデルとした分子置換法, DKK1-CRD1 については SeMet 置換体による異常分散法と NMR 構造をモデルとした分子置換法によって構造解析を行った。図2に Ncoil23 と LZ-Ccoil の電子密度図とこれまでに構築した分子モデル, 図3に構造を決定した DKK1-CRD1 の最終構造を示す。

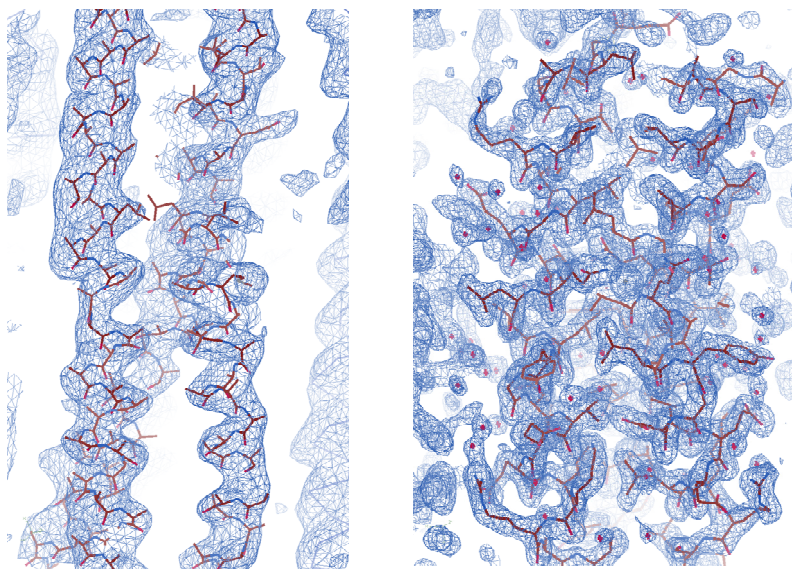


図2. DKK 受容体細胞外領域の電子密度とモデル

左: Ncoil23

右: LZ-Ccoil

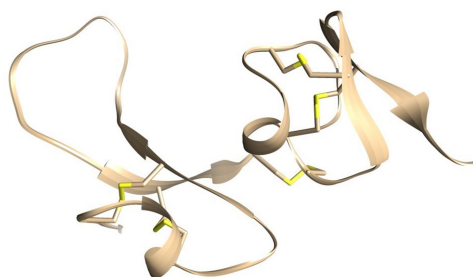


図3. DKK1-CRD1 の立体構造(リボンモデル)

一方, DAX-DIX 二量体では, 解析の結果, 予想通り, DAX の Tail と DIX の Head 接触面同士が結合していた(図4A)。DAX-DIX 二量体は DIX ホモポリマーや DAX ホモポリマーの連続する2分子とよく重なり合う(図4A)。また, DAX-DIX 二量体の構造を基にポリマーモデルを構築すると, DIX ホモポリマーや DAX ホモポリマーとよく似たヘテロポリマーが形成されることが示唆される(図4B)。

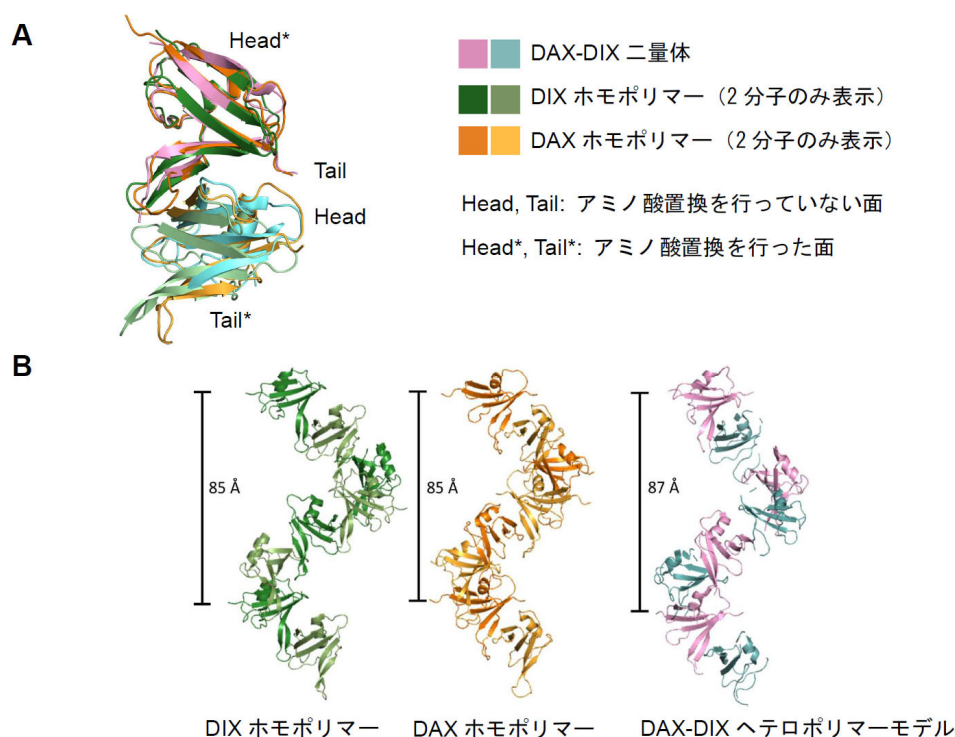


図4. DAX-DIX 二量体と DIX 及び DAX との構造比較

(A) DAX-DIX 二量体と DIX ホモポリマー及び DAX ホモポリマーの重ね合わせ. DIX ホモポリマー及び DAX ホモポリマーは重ね合わせに用いた 2 分子のみを表示している.

(B) DAX-DIX ヘテロポリマーモデルと DIX ホモポリマー及び DAX ホモポリマーの構造.

4 生活や産業への貢献および波及効果

Wnt 標的遺伝子の多くががんに関係しており, シグナルの制御に異常があると細胞のがん化の原因となる. 実際, 大腸がんの症例の多くでは Wnt シグナルの異常な活性化が起こっている. Dvl は Wnt シグナルを伝達するため, その働きを抑える物質は抗がん剤となる可能性がある. DIX の働きによるホモポリマー化を阻害すればシグナル活性を弱めることが出来るため, がん細胞の増殖を抑えることが可能になる. DIX と DAX はアミノ酸配列に約 50%の同一性があり, 立体構造にも類似性がある. DIX だけに結合し, DAX-DIX ヘテロポリマーや DAX のホモポリマー化には作用しない物質を創製するためには, DIX-DIX, DAX-DAX, DAX-DIX 間の相互作用部位における構造の違いを考慮することが必要である. 今回の DAX-DIX 二量体の立体構造は, その際の重要な情報となると期待される.

一方, 本研究では DKK 受容体細胞外領域全体のうち, 約 80%についておおまかな構造が明らかになったが, 今後 DKK 受容体細胞外領域全体や DKK-DKK 受容体複合体の構造が明らかになれば, より強力に複合体形成を阻害する抗体を取得するためのエピトープを見出すことができる. そのような抗体を得ることは効果の高い新しい抗がん剤の開発につながると期待される.