

## プレスリリース

公立大学法人兵庫県立大学

国立大学法人群馬大学

令和元年12月10日

報道解禁日（テレビ・ラジオ・WEB）令和元年12月11日 午前4時、  
（新聞）12月11日付朝刊

### 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

#### 【研究成果のポイント】

- ・ 細胞の分化・増殖を制御し、がん発症にも関わる Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路の細胞内因子 Dishevelled (Dvl) と Axin に含まれる DIX ドメイン複合体の立体構造を解明した。
- ・ Dvl-DIX (DIX) と Axin-DIX (DAX) はいずれも $\beta$ -シート構造を持ち、アミロイドのように線維状に多量体（ポリマー）化する性質があり、それによって Dvl や Axin をホモポリマー化する。今回、DIX と DAX が直接相互作用することで、Dvl/Axin ヘテロポリマーも形成することが明らかになった。
- ・ DIX を他のポリマー化ドメインに置換（キメラ Dvl）すると、キメラ Dvl はポリマー化するが、Axin とは相互作用せず、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達活性がほとんど失われた。
- ・ DIX と DAX によるヘテロポリマーの形成によって Dvl と Axin が相互作用し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが伝達されることが明らかになった。

#### 【概要】

細胞の増殖・分化を制御する Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路（Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル）において、分泌タンパク質 Wnt が細胞表面の受容体に結合すると、細胞内因子の1つである Dishevelled (Dvl) のポリマー化が促進されることがきっかけとなり、細胞内でシグナルが伝達されると考えられています。一方、大腸がんの症例の多くで、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが異常に活性化されていることも知られています。Dvl は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを阻害するタンパク質 Axin に結合し、その働きを抑えます。Dvl と Axin には DIX ドメインが存在し、Dvl-DIX (DIX) と Axin-DIX (DAX) はそれぞれ単独でらせん状にホモポリマー化します。両者が共存すると DIX と DAX の両方を含んだヘテロポリマーとなると考えられてきましたが、そのポリマー化の分子機構の詳細は不明でした。今回、兵庫県立大学大学院生命理学研究科の柴田直樹准教授、樋口芳樹教授、山西勲平博士（研究当時一貫制博士課程学生）、群馬大学大学院理工学府分子科学部門の寺脇慎一助教、MRC 分子生物学研究所（UK）の Mariann Bienz らの研究グループは、大型放射光施設 SPing-8 を利用して DAX-DIX 複合体の立体構造を明らかにし、両者が直接結合することを証明しました。また、DIX を他のポリマー化ドメインに置換すると活性が失われたことから、Dvl が機能するためには DIX 部分でポリマー化するだけでなく、相手の DAX と相互作用することが必要であることを明らかにしました。本研究の成果は、2019 年 12 月 10 日（アメリカ東部標準時間午後 2 時）付で、「Science Signaling」に掲載されます。

## 1. 研究の背景

Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路 (Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル) は、細胞の増殖・分化などを制御しており、分泌タンパク質である Wnt がその受容体に結合することで活性化されます。Wnt が受容体に結合すると Wnt/受容体複合体が集合しクラスター化します。本研究グループは、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルにおいて、重要な細胞内因子の1つである Dishevelled (Dvl) のポリマー化が Wnt/受容体複合体のクラスター化によって促進され、それがきっかけとなりシグナルが伝達されるモデルを提唱しています (図 1)。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化されると、最終的に $\beta$ -catenin が Wnt 標的遺伝子の転写を促進します。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルがオフの状態では、 $\beta$ -catenin は Axin などの Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル因子の働きによって分解されることで細胞内濃度が低く保たれ、Wnt 標的遺伝子の転写は抑えられます。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルがオンの場合、Dvl は Axin の働きを抑えることによって $\beta$ -catenin が分解されないようにします。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが正常に働くことによって、細胞の増殖・分化が適切に制御されていますが、異常が生じると、がんなど種々の疾患の原因となります。

Axin は足場タンパク質の一種で、 $\beta$ -catenin を分解に導くために必要な因子同士を結び付けるハブとしての機能があります。Axin はポリマー化し、局所濃度が高まることで、 $\beta$ -catenin や他の因子との親和性が上がり、結合しやすくなります。一方、Dvl も同様にポリマー化することで他の因子と結合しやすくなります。このようなポリマー化は、DIX ドメインと呼ばれる Dvl と Axin に共通して存在する領域が担っていることが分かっていました。また、Dvl と Axin の結合も DIX ドメインが担っていると考えられてきましたが、両者の複合体の構造が不明であったため、その詳細は謎でした。

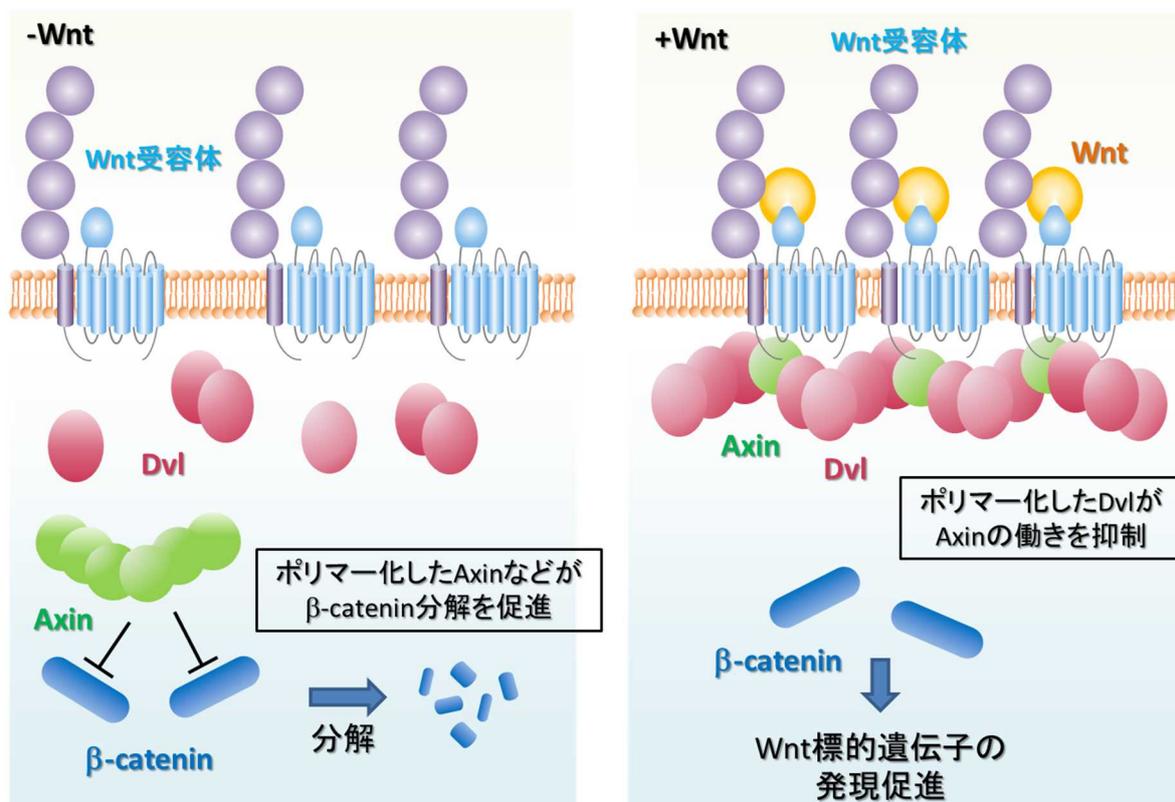


図 1. Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路の概要

(左) -Wnt: Wnt 受容体は局在せず, Axin 等の働きによって $\beta$ -catenin が分解される。

(右) +Wnt: Wnt/Wnt 受容体複合体が集合し, それによって Dvl のポリマー化が促進される。Axin の働きが抑制され,  $\beta$ -catenin は核内に移行し, Wnt 標的遺伝子の発現を促進する。

## 2. 研究内容と成果

今回、兵庫県立大学大学院生命理学研究科の柴田直樹准教授，樋口芳樹教授，山西勲平博士（研究当時一貫制博士課程学生），群馬大学大学院理工学府分子科学部門の寺脇慎一助教，MRC 分子生物学研究所 (UK) の Mariann Bienz らは，Dvl-DIX (DIX) と Axin-DIX (DAX) 複合体の立体構造を大型放射光施設・SPring-8 BL44XU ビームラインを利用することで決定し，両者の相互作用について詳細に明らかにしました。DIX, DAX どちらもホモポリマーを形成します。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す。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します。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ました。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しますが，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ません。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) の構造を安定に保ちました。以上の方法によって均一な DAX-DIX 複合体試料を調製すること成功しました。構造解析の結果，予想通り DAX-DIX 二量体は，DAX の Tail と DIX の Head 接触面同士が結合していました (図 2A)。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います (図 2A)。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ます (図 2B)。

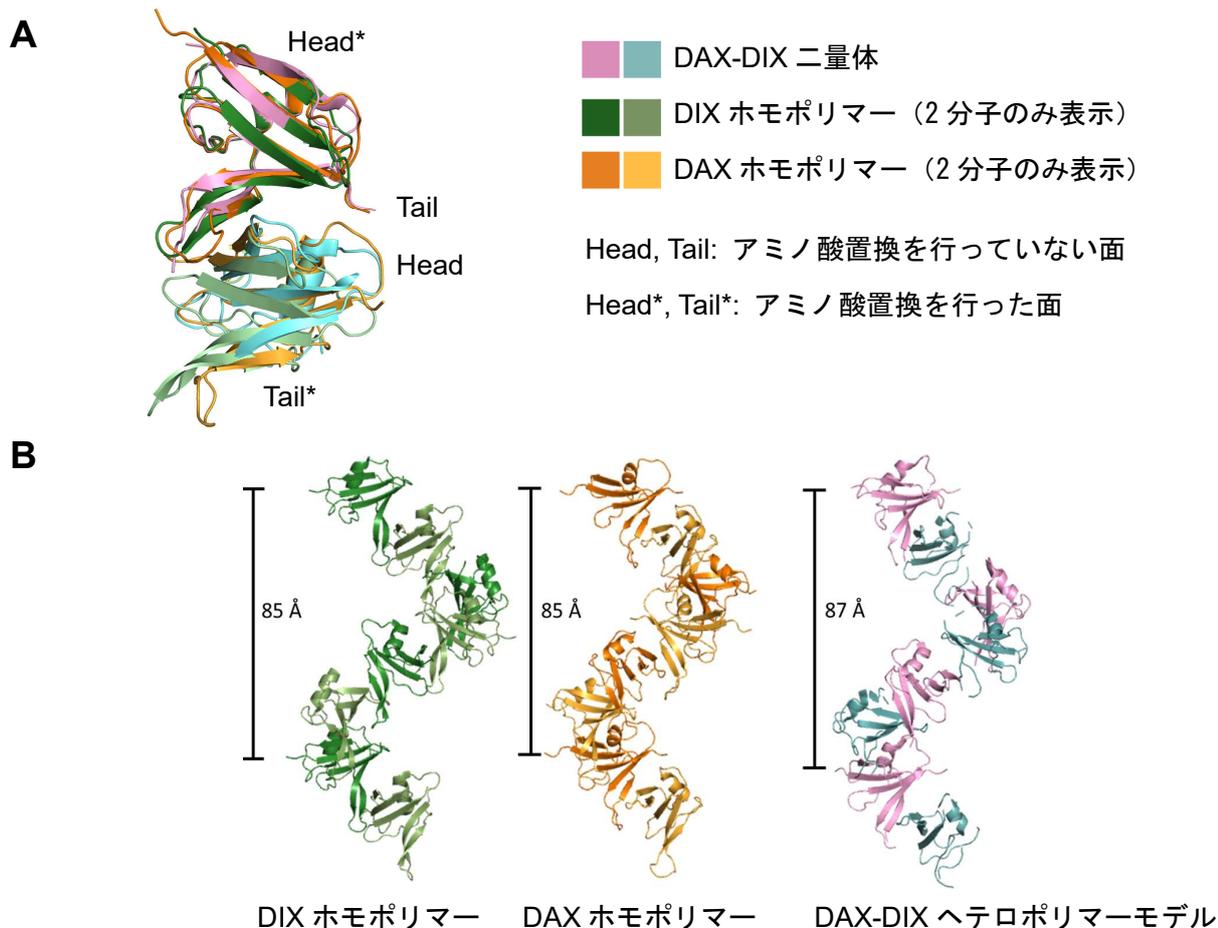


図 2. DAX-DIX 二量体と DIX 及び DAX との構造比較

(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。

次に、DIX と DAX の相互作用がシグナル活性に必須かどうか明らかにするため、DIX を Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルとは無関係のポリマー化ドメイン (SAM 及び PB1) に置換したキメラ Dvl (キメラ Dvl2 (PB1), キメラ Dvl2 (SAM)) を使ってシグナル活性を調べました。キメラ Dvl2 (PB1), キメラ Dvl2 (SAM) は共にシグナル活性を示さなかったことから、Dvl はポリマー化するだけではシグナル活性を持たず、DIX が必要であることが明らかになりました (図 3A)。

Dvl と Axin は細胞内に分散せず、点状に局在することが知られています。また、Dvl と Axin は相互作用するため、同じ場所に局在 (共局在) します。Dvl, Axin 共に DIX, DAX を欠失し、ポリマー化できなくなると点状に局在せず、分散して存在することが分かっていました。キメラ Dvl では点状に局在していることから、ポリマー化は起こっていますが、点の位置が異なり、共局在していません (図 3B)。これは、キメラ Dvl は DIX が欠失しても SAM または PB1 の働きでポリマー化は起こりますが、Axin とは相互作用できないことを意味しています。以上の結果により、DIX と DAX の相互作用がシグナル活性に必須であることが明らかになりました。

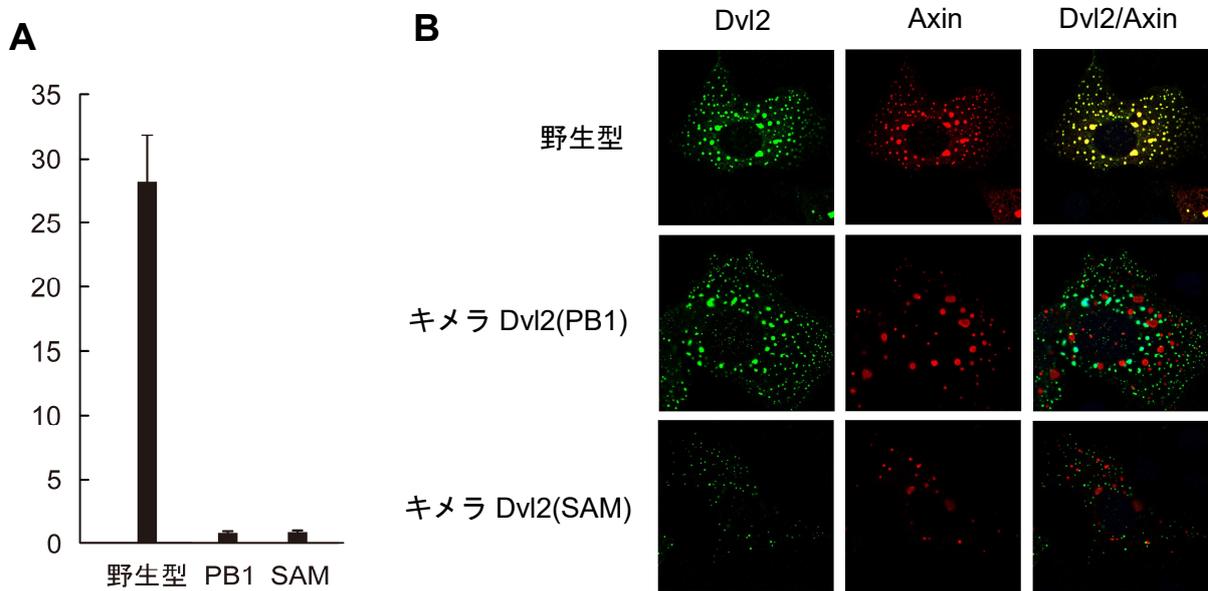


図 3. キメラ Dvl の活性 (A) 及び細胞内で Dvl と Axin が局在する様子 (B)

(A) PB1 と SAM はそれぞれキメラ Dvl2 (PB1), キメラ Dvl2 (SAM) を表す。

(B) Dvl2 及び Axin が細胞内で存在する位置が、それぞれ緑色、赤色の蛍光で示されている。両者が共局在すると黄色になる。野生型 Dvl2 は Axin と共局在する (上段右) が、DIX を PB1 または SAM に置換したキメラ Dvl2 では共局在しない (中段右と下段下)。これは DIX を介して Axin と相互作用することを示す。

### 3. この研究の社会的意義と今後の展望

Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは、動物の初期発生や成体における組織の恒常性に重要な役割を果たしています。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ります。実際、大腸がんの症例の多くでは Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの異常な活性化が起こっています。Dvl は Wnt/ $\beta$ -catenin 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ります。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ります。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ります。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す。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ます。

#### 4. 論文情報

掲載誌： Science Signaling

題名： A direct heterotypic interaction between the DIX domains of Dishevelled and Axin mediates signaling to  $\beta$ -catenin

著者： Kumpei Yamanishi<sup>1</sup>, Marc Fiedler, Shin-ichi Terawaki, Yoshiki Higuchi<sup>1</sup>, Mariann Bienz, Naoki Shibata

掲載予定日： 2019 年 12 月 10 日 (アメリカ東部標準時間 午後 2 時)

#### 5. 問い合わせ先

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 准教授 柴田直樹

電話： 0791-58-0178, E-mail： shibach@sci.u-hyogo.ac.jp

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 教授 樋口芳樹

電話： 0791-58-0179, E-mail： hig@sci.u-hyogo.ac.jp

群馬大学大学院理工学府分子科学部門 助教 寺脇慎一

電話： 0277-30-1449, E-mail： terawaki@gunma-u.ac.jp

#### 6. 機関窓口

兵庫県立大学播磨理学キャンパス経営部 次長兼総務課長 中谷忠彦

TEL： 0791-58-0101, FAX：0791-58-0131, E-mail： u\_hyogo\_harima@ofc.u-hyogo.ac.jp

群馬大学理工学部庶務係 広報担当 福島美羽

TEL：0277-30-1014, FAX：0277-30-1020, E-mail： t-kouhou@jimu.gunma-u.ac.jp

本研究は、文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「細胞シグナリング複合体によるシグナル検知・伝達・応答の構造的基礎」(課題番号 23121526, 25121731, 23121527, 25121705), ひょうご科学技術協会学術研究助成による支援を受けて進められました。

#### 【用語解説】

##### Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路

分泌タンパク質である Wnt が受容体に結合することがきっかけとなり、細胞の運命、増殖などに影響を与える。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路に関わる因子の遺伝子変異は先天性異常やがんなどの疾病の原因となることが多い。

##### Wnt 標的遺伝子

Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路によって転写が制御される遺伝子のことを指す。

##### 大型放射光施設 SPring-8

兵庫県にある大型共同利用施設。光速にほぼ等しい速度まで加速された電子が、磁石などによってその進行方向を変えられた時に細く強力な電磁波を発生し、これを放射光という。電子のエネルギーが高く、進行方向の変化が大きいほど、X線などの短い波長を含むようになる。

### **ホモポリマー，ヘテロポリマー**

ポリマーとは分子が連続的に結合して鎖状や網状になったもので，一種類の分子だけで出来たポリマーをホモポリマー，複数種の分子が組み合わさって出来たものをヘテロポリマーと言う．

### **キメラ**

ここでは複数の異なる遺伝子またはそれらの断片を融合して出来た遺伝子産物（タンパク質）のことを意味する．