

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) Wnt シグナル伝達に特異的な動的オリゴマーを標的とするがん治療法の開発  
(英語) The development of cancer therapy targeting the dynamic polymer in Wnt signaling pathway

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人群馬大学 大学院理工学府分子科学部門 助教 寺脇慎一  
所属 役職 氏名： (英語) National University Corporation, Gunma University, Graduate School of Science and Technology, Assistant Professor, Shin-ichi Terawaki,

実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本年度は、がん細胞の進展に関わる Wnt シグナル伝達において、動的なオリゴマーを形成して機能する細胞内シグナリング複合体の X 線結晶構造解析と蛍光分光法を利用した分子構造変化の解析法の開発をおこなった。動的オリゴマー形成シグナリング複合体の形成に中心的な役割を担う機能領域について大腸菌を利用した遺伝子組換えタンパク質発現をおこない、カラムクロマトグラフィーによって数十 mg オーダーの高純度試料を調製して結晶化をおこなった。放射光施設 Photon Factory のタンパク質 X 線結晶構造解析用ビームライン BL-1A を利用して、抗凍結剤を利用した窒素気流中における極低温下での X 線回折実験をおこなったところ、分解能 2.8 Å の X 線回折データを収集することに成功した。収集した回折データを利用して動的オリゴマー形成因子の単独の立体構造を利用した構造解析を行い、動的オリゴマー形成シグナリング複合体の立体構造を決定して、分子間相互作用を解析し、動的オリゴマーが形成される仕組みの構造的な基盤となる情報を取得した。

動的オリゴマー形成因子のオリゴマー構造変化を蛍光分析するために、蛍光色素で標識した試料の調製を試みた。動的オリゴマー形成因子の機能領域試料に対して、過剰のモル比となるように蛍光色素を加えて反応させ、脱塩カラムによって余剰の蛍光色素を除去した。蛍光標識効率は、60-80%であることを吸収スペクトルから確認して、蛍光分光光度計 FP-

8300DS(日本分光)により蛍光強度を測定することで、オリゴマー構造変化の分析を試みた。その結果、蛍光標識した動的オリゴマー形成因子のホモオリゴマーとヘテロオリゴマーの形成を濃度依存的な蛍光強度の変化を指標に検出できることがわかった。

The project planned to analyze the molecular structure of the intracellular signaling complex consisting of dynamic oligomeric factors, which are the regulator for the Wnt signaling pathway by forming dynamic heterotypic and homotypic oligomers, using X-ray crystallography and the fluorescence spectroscopy in solution. The functional domains, which play an important role for dynamic oligomerization, in the dynamic oligomeric factors was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)Star and were purified by column chromatography. The purified sample of the heterotypic oligomeric complex was crystallized by the vapour-diffusion method. The crystals of the heterotypic oligomeric complex were flash-cooled at liquid nitrogen. X-ray diffraction experiment was performed on the BL-1A beamline at the Photon Factory, Tsukuba, Japan. The crystals of the heterotypic oligomeric complex diffracted to a resolution of 2.8 Å. Using X-ray diffraction data, the structure was determined by molecular replacement method using homotypic oligomeric forms of dynamic oligomeric factors as a search model. The crystal structure revealed the heterotypic interaction between the dynamic oligomeric factors and the regulatory mechanism for the activation of the Wnt signaling pathway.

Next, I tested whether the oligomer structure is changed by the molecular interaction in solution using fluorescence spectroscopy. Firstly, the oligomeric domains of the dynamic oligomeric factors were modified by the fluorescent dye. Excess fluorescent dyes were removed by the desalting column. The measurement of fluorescence spectrum was performed by the fluorospectro-photometer FP-8300DS (JASCO Corporation). The structural change of oligomers formed by the functional domain of dynamic oligomeric factors could analyze by measuring the fluorescent intensity as an indicator. The results suggested that the fluorescent spectroscopy is useful method for detecting the structural change of dynamic oligomeric factors.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 0 件）

1. 寺脇慎一、サリドマイド誘導体をもたらすユビキチンリガーゼ基質認識の変換機構、日本薬学会誌ファルマシア、2016、12、1157.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. GPCR 模倣ペプチドと結合した三量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニットの安定化法の検討、ポスター発表、小野塚樹、寺脇慎一、河野俊之、若松馨、第 89 回日本生化学会大会 2016/9/25/、国内.

2. Structural basis for limitation of Ccd1 activity by a unique homomeric interaction in the Wnt pathway, S. Terawaki, S. Fujita, T. Katsutani, K. Shiomi, K. Keino-Masu, M. Masu, K. Wakamatsu, N. Shibata & Y. Higuchi, The 42nd Naito Conference, 2016/10/5/, 国内
3. 動的光散乱分析を活用した離合集散型シグナル伝達因子複合体の結晶化、畑隼弥、寺脇慎一、箱嶋敏雄、若松馨、日本結晶学会年会、2016/11/17/, 国内
4. 逆行性輸送因子 BICD1 と核膜孔サブユニットとの複合体の結晶化、吉兼明日香、寺脇慎一、若松馨、日本結晶学会年会、2016/11/17/, 国内
5. ゼブラフィッシュ Ccd1 DIX ドメインの不活性型変異体の X 線結晶構造解析、寺脇慎一、石渡拓也、藤田翔平、榎正幸、樋口芳樹、若松馨、日本結晶学会年会、2016/11/17/, 国内
6. Wnt シグナル伝達因子 CCD1 の自己活性制御の構造的基盤、寺脇慎一、藤田翔平、塩見健輔、榎和子、榎正幸、若松馨、柴田直樹、樋口芳樹、第 2 回 AMED がん若手研究者ワークショップ、2016/11/29/, 国内
7. Preparation and Crystallization of Actin Regulating Complex for Formation of Dendritic Spine、S. Hata, T. Hakoshima, K. Wakamatsu and S. Terawaki, GUMI&AMDE 2016, 2016/12/9/, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし

(4) 特許出願  
なし