

## 小角 X 線散乱を用いたヒト P-cadherin ss-dimer、X-dimer の同定 Identification of the ss-dimer and X-dimer of human P-cadherin by small angle X-ray scattering

工藤翔太<sup>1</sup>, Jose M. M. Caaveiro<sup>1</sup>, 郷田秀一郎<sup>2</sup>, 長門石曉<sup>1</sup>, 津本浩平<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院工学系研究科, 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

<sup>2</sup> 長崎大学大学院工学研究科, 〒852-8521 長崎市文教町 1-14

Shota Kudo<sup>1</sup>, Jose M. M. Caaveiro<sup>1</sup>, Shuichiro Goda<sup>2</sup>, Satoru Nagatoishi<sup>1</sup> and Kouhei Tsumoto<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai,  
Minato-ku, Tokyo, 108-8639, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Engineering, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi,  
Nagasaki, 852-8521, Japan

### 1 はじめに

P-cadherin は細胞接着に関わる蛋白質であり、膵臓癌や肺癌等において特異的に高発現することから、有望な癌治療のターゲットとして期待されている[1]。しかしながら、E-cadherin や N-cadherin とは異なり、P-cadherin の分子レベル、細胞レベルでの接着機能および、接着形成メカニズムに関する研究はほとんど行われていない。癌形成における P-cadherin の役割の解明および、抗癌剤設計への応用を目指し、P-cadherin の接着メカニズムを解明することを本研究の目的とした。

Cadherin の接着メカニズムに関して、E-cadherin に関する先攻研究より、Cadherin は X-dimer と呼ばれる中間構造を経て、最終状態である ss-dimer を形成し、細胞同士を結びつけることが示唆されている[2]。また、X-dimer は ss-dimer 形成を阻害することで形成されることも明らかになっている。

本課題では、Asp から始まる P-cadherin 成熟型の EC12 と Met を Asp の前に付加し、ss-dimer 形成の阻害を狙った MEC12 の 2 種の蛋白質に関する SAXS 測定を行うことで、P-cadherin の ss-dimer および X-dimer の同定を行うことを目指した。

### 2 実験

ヒト P-cadherin EC12 と MEC12 を大腸菌発現系で発現させ、His<sub>6</sub>-tag 精製を行った後、Ulp1 を用いて SUMO-tag の切断を行った。SUMO-tag の切断されたサンプルをサイズ排除クロマトグラフィーによりさらに精製を行った。10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5 の Buffer に透析し、5.0 mg mL<sup>-1</sup> から 6.0 mg mL<sup>-1</sup> に濃縮後、SAXS 測定を行った。SAXS 測定は PF BL-10C で行った。カメラ長は 90 cm、検出器は R-AXIS VII を用いた。

FOXS プログラムを用いて E-cadherin ss-dimer、X-dimer、monomer の理論曲線を計算し、P-cadherin EC12 および MEC12 の散乱曲線との比較を行った。

各構造の PDB コードを以下に示す: ss-dimer (2O72), X-dimer (1FF5), monomer (1Q1P)。

### 3 結果および考察

ヒト P-cadherin の EC12 と MEC12 を用いて SAXS 測定を行った。蛋白質凝集の起こらない 5.0 mg mL<sup>-1</sup> で測定を行い、測定した散乱曲線を、FOXS プログラムを用いて計算した E-cadherin の ss-dimer、X-dimer および monomer の理論散乱曲線と比較した。

その結果、EC12 は E-cadherin の ss-dimer と同様の構造を形成していること (Fig. 1A)、MEC12 は E-cadherin の X-dimer と同様の構造を形成していることが明らかになった (Fig.1B)。

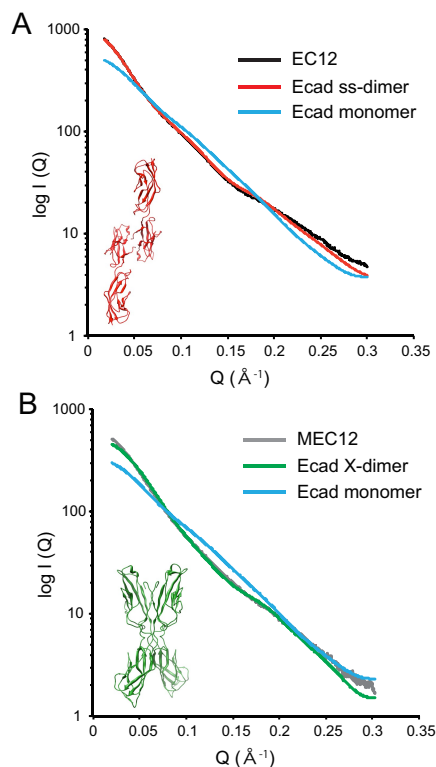


Fig. 1 X線散乱曲線 (A) 黒、赤、水色の曲線はそれぞれ P-cadherin EC12 の実験から得られた散乱曲線、E-cadherin ss-dimer の理論曲線、E-cadherin monomer の理論曲線を示している。(B) 灰、緑、水色の曲線はそれぞれ P-cadherin MEC12 の実験から得られた散乱曲線、E-cadherin X-dimer の理論曲線、E-cadherin monomer の理論曲線を示している。理論曲線は FOXS program [3]を用いて計算を行った。

#### 4 まとめ

SAXS 測定により、ヒト P-cadherin EC12 は ss-dimer を、MEC12 は X-dimer を溶液中で形成することが明らかになった。

#### 謝辞

SAXS 測定のビームタイムをいただき感謝申し上げます。また、測定の際は PF スタッフの方々に大変お世話になりました。感謝申し上げます。

#### 参考文献

- [1] K. Imai *et al.*, *Clin Cancer Res*, **14**, 6487-6495 (2008).
- [2] Oliver J Harrison *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol*, **17**, 348-357 (2010).
- [3] D. Schneidman-Duhovny *et al.*, *Nucleic Acids Res*, **38**, W540-544 (2010).

#### 発表論文

- S. Kudo *et al.*, *Mol. BioSyst*, **8**, 2050-2053 (2012).
- S. Kudo *et al.*, *Biochemistry*, **53**, 1742-1752 (2014).

\* tsumoto@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp