

# DIX ドメインを介する Wnt シグナル伝達因子及び複合体の結晶構造解析 Structural Biology of DIX domains involved in Wnt signaling pathway

柴田直樹<sup>1,2\*</sup>, 山西勲平<sup>1,\*</sup>, 熊野亘<sup>1,\*</sup>, 樋口芳樹<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>兵庫県立大学大学院生命理学研究科, 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

Naoki Shibata<sup>1,\*</sup>, Kunpei Yamanishi<sup>1</sup>, Wataru Kumano<sup>1</sup>, and Yoshiki Higuchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan

## 1 はじめに

Wingless (Wnt) は細胞の増殖や分化・運動・初期胚発生時の体軸形成や器官形成等の生物学的機能を制御する。Wnt シグナルの細胞内への伝達はそのレセプターである Frizzled が LRP5/6 と共役して働くことにより達成される。Wnt シグナルの正の因子として働く細胞内因子 Dishevelled (Dvl) 及び LRP5/6 の細胞内領域が負の因子である Axin の働きを抑制することによって Wnt シグナルがオンになると考えられている (図 1)。

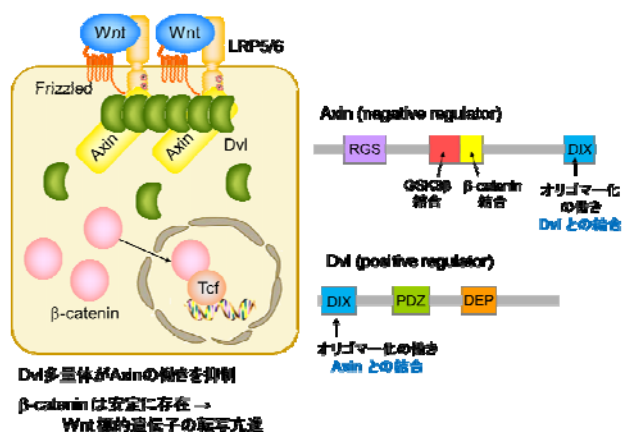


図 1 : (左) カノニカル Wnt シグナル伝達系モデル  
(右) Axin 及び Dvl のドメイン

Axin、Dvl 共にユビキチンフォールドを持つ DIX ドメインが存在し、これが各々のホモオリゴマー化を引き起こす (図 1)。我々が解析した Axin-DIX の結晶構造では、DIX ドメインがらせん状に配列していた (図 3 参照) [1,2]。一方、Dvl-DIX では二重らせん構造を取る場合があることが分かっている[3]。また、Axin-Dvl 間の相互作用については DIX ドメインが極めて重要な役割を果たすことが分かりつつある。これまで、NMR によって Dvl2-DIX と Axin-DIX の相互作用領域が推定され、1本のらせん内に両者が混在するモデルが提唱されているが[4]、

複合体の構造が明らかでは無いため相互作用の詳細については明らかになっていない。

## 2 実験

Axin-DIX は分子間でジスルフィド結合を形成しやすく、そのためにシステイン残基を保護しないと良質の結晶が得られなかった。従来、水銀化合物をチオール基の保護剤として用いてきたが、水銀化合物は Axin-DIX の分子表面に結合するので、Axin-Dvl 複合体形成の障害になる可能性が考えられる。そのために水銀化合物を用いずに安定な試料を調製する必要があった。結晶化試料に添加する還元剤を再検討したところ、Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)を用いることで従来とは異なるタイプの結晶が得られた (図 2)。得られた結晶を PF-AR NW12A において X線回折データ測定を行った。



図 2 : TCEP 存在下での Axin-DIX (Axin-DIX-TCEP) の結晶

我々は Axin-DIX と Dvl-DIX の複合体 (DIX 複合体) についても結晶化に取り組んできたが、複合体調製法の検討や、TCEP の利用による効果もあって、図 3 に示す結晶を得ることに成功した。この結晶中には両 DIX ドメインが含まれることが確認されており、構造解析に成功すれば初めての DIX ドメイン間の複合体構造解

析の成功例となる。DIX 複合体結晶については BL-1A において回折実験を行った。



図 3 : DIX 複合体の結晶

### 3 結果および考察

TCEP 存在下での Axin-DIX (Axin-DIX-TCEP) の結晶から 4.10 Å 分解能のデータセットを取得した。分子置換法による解析の結果、Axin-DIX-TCEP でもらせん構造に大きな違いは見られなかった(図 3)。これにより、水銀化合物を導入しなくても構造解析可能な結晶が得られることが分かった。

表 1: Axin-DIX-TCEP の結晶学的データ

|                                  | Axin-DIX-TCEP       |
|----------------------------------|---------------------|
| Data collection                  |                     |
| Beamline                         | PF-AR NW12A         |
| Wavelength (Å)                   | 1.000               |
| Space group                      | $P2_12_1$           |
| Cell dimentions ( $a, b, c$ ; Å) | 64.1, 81.7, 91.7    |
| Resolution (Å)                   | 50-4.10 (4.17-4.10) |
| Measured reflection              | 28,003              |
| Unique reflection                | 4,120               |
| Completeness                     | 99.8 (100.0)        |
| $I/\sigma(I)$                    | 15.5 (3.2)          |
| Refinement                       |                     |
| $R_{work}$                       | 0.266               |
| $R_{free}$                       | 0.346               |

DIX 複合体については X 線の損傷によって完全なデータセット取得には至らなかったため、空間群と格子定数の決定を行うことが出来なかったが、約 4 Å 分解能までの回折点を確認することが出来た(図 4)。

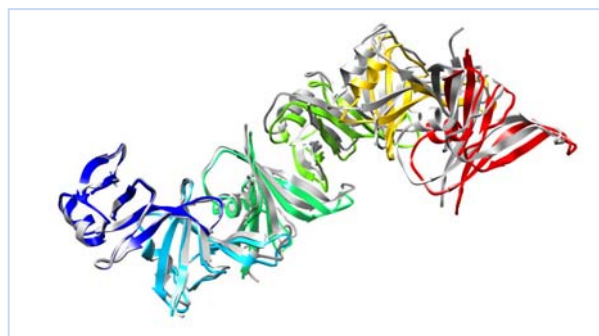
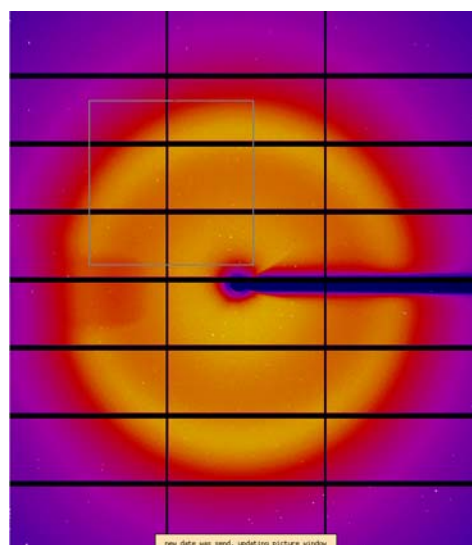


図 3 : Axin-DIX オリゴマーのらせん構造, 青-赤: 水銀化合物無し, 灰色: 水銀化合物有り



図

4 : DIX 複合体の X 線回折像

### 4 まとめ

Axin-DIX は分子間 S-S 結合形成を防ぐため、従来の水銀化合物の代わりに導入した TCEP 存在下で構造解析可能な結晶が得られた。DIX 複合体についても 4 Å 分解能までの回折点を確認することが出来たことから構造解析に向けて大きく前進した。

### 謝辞 (オプション)

PF/PF-AR ビームラインスタッフの方々には大変世話になりました。この場を借りてお礼申し上げます。

### 参考文献

- [1] T. Schwarz-Romond *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 484 (2007).
- [2] N. Shibata *et al.*, *Acta Cryst.* **F63**, 529 (2007).
- [3] Y. T. Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **286**, 8597 (2011).
- [4] M. Fiedler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **108**, 1937 (2011).

\* shibach@sci.u-hyogo.ac.jp