

(様式 1-2)

提出日：2021 年 5 月 3 日

2020 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	膜糖タンパク質 CDCP1 を介するがん進展制御の分子基盤	
研究代表者	氏名	岡田 雅人
	所属機関名・部局名	大阪大学・微生物病研究所
	職名	教授
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題
	<input type="radio"/>	客員フェロー
蛋白研受入担当教員名	中川敦史 教授	
<p>当研究室では近年、がん原遺伝子産物 Src を脂質ラフトにリクルートして活性化する scaffold タンパク質として CUB domain containing protein 1(CDCP1)を同定した。CDCP1 は、細胞外にタンパク質相互作用を担う CUB domain を 3 つ持ち、細胞内に Src と結合する部位を持つ膜一回貫通型の糖タンパク質である。これまでに、CDCP1 ががんの浸潤転移を促進すること、HGF 受容体 MET、EGF 受容体やインテグリンなど膜受容体と相互作用すること、がんの進展や再発に伴って発現誘導され予後不良と相関することが知られている。さらに CDCP1 は、細胞外ドメインがプラスミンなどにより切断されることによって活性化することも明らかにされている。これらのことから、CDCP1 ががん進展制御に有効な治療標的と考えられてきているが、その作用機序、特に細胞外ドメインの切断による CDCP1 の活性化機構は不明のままである。</p> <p>そこで本課題では、全長型 CDCP1 と切断型 CDCP1 の細胞外ドメインの分子構造を、X 線結晶構造解析により決定し、CDCP1 の作用機序および活性化機構の分子基盤を明らかにすることを目的とした研究を行った。</p> <p>CDCP1 の細胞外ドメインを細胞外分泌型として産生させるために、膜貫通ドメインを His-tag に置換したコンストラクトを pcDNA3 ベクターに組み込んだ。CDCP1 はヘテロな糖鎖修飾を受けるため、Expi293F (GnT1-) 細胞を用いた一過性の発現系を構築した。培養外液から CDCP1 細胞外ドメインを TALON カラムで回収し、切断型 CDCP1 は Matriptase 処理により調製した。次に、TEV プロテアーゼにより His-tag を除去し、さらに EndoH で処理したサンプルを Resource ISO カラムにより分離した。最後に、MonoS カラムによる分画を行った。得られた精製サンプルについて、品質を DLS により評価し、結晶化スクリーニングは、robot を用いた sitting drop 法などにより行った。得られたタンパク質結晶を UV 照射や SDS-PAGE などにより確認した後、SPring8 の蛋白研ビームライン (BL44XU) により X 線回折データを収集した。</p> <p>これまでに、全長型 CDCP1 については 3.3 Å の分解能での回折像が得られている。しかし、CDCP1 に類似した構造を有するタンパク質が限られているため、分子置換法の適用が困難な状況にあり、未だに構造決定に至っていない。今後精製純度をさらに高めるなど様々な段階を改善することにより分解能の向上を目指す。また、分子置換法が適用できない場合には重原子置換による位相決定を試みる。</p>		