

ADP リボシル化酵素 C3 とその特異的基質 RhoA 複合体の X 線結晶構造解析
 Crystal Structure Analysis of the Complex of ADP-ribosylating C3 exoenzyme with RhoA

津下英明*, 鶴村俊治, 戸田暁之, 吉田徹

京都産業大学, 総合生命科学部, 〒603-8555 京都市北区上賀茂本山

Hideaki Tsuge*, Toshiharu Tsurumura, Akiyuki Toda, and Toru Yoshida

Kyoto Sangyo University, Motoyama Kamigamo Kita-ku, Kyoto, 603-8555, Japan

1 はじめに

ADP リボシル化は、タンパク質の翻訳後修飾のひとつで、多くの重要な生命現象のスイッチを入れる役割を果たしている。また、多くの病原菌の ADP リボシル化酵素は、ヒトの G タンパク質を ADP リボシル化することにより、生体内シグナル伝達を狂わせる「毒素」として働くことが知られている。この酵素の基質となる Rho ファミリー G タンパク質は、細胞の形態維持や運動性に関わる細胞骨格を制御する役割を果たしており、代表的な Rho ファミリー G タンパク質として、RhoA、Rac1、Cdc42 の3つがよく知られている。1989 年 RhoA のみを特異的に ADP リボシル化する毒素 C3 がボツリヌス菌で発見された。この特異性を利用して、アメリカの細胞生物学者アラン・ホールらは、RhoA が葉状仮足、Cdc42 が糸状仮足という、それぞれ異なる種類の細胞運動に関わる細胞質の変化を誘導することを見出した。こうした生物学的に重要な知見をもたらした C3 の RhoA に対する特異性に、多くの研究グループが興味を抱いてきたが、C3 と RhoA の複合体の構造が明らかではないために、その相互作用と ADP リボシル化の機構はよくわかっていなかった。

2 実験

セレウス菌由来の C3 を用いることで、GTP が結合した RhoA (RhoA(GTP)) と C3 の複合体および、GDP が結合した RhoA (RhoA(GDP)) と C3 の複合体の結晶化に初めて成功した (図 1)。

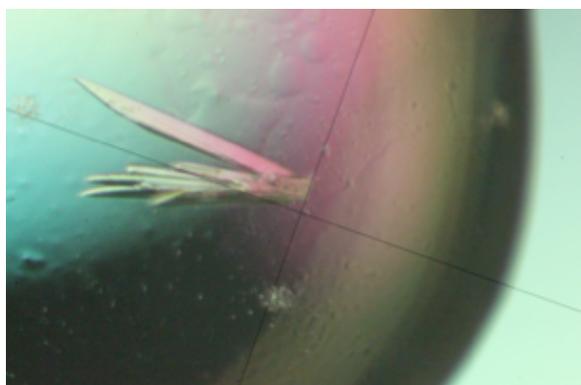


図 1 : C3-RhoA(GTP) の結晶

さらに、これらの結晶を NADH を含む溶液にソーキングした後に X 線回折データを収集することで、NADH、RhoA、C3 の 3 者複合体の結晶構造 (NADH-C3-RhoA(GTP) と NADH-C3-RhoA(GDP)) を明らかにした (図 2) [1]。

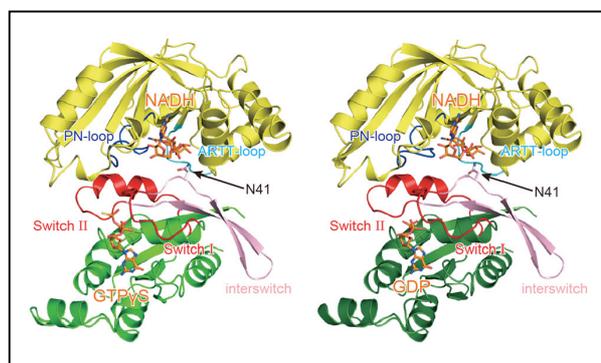


図 2 : NADH-C3-RhoA(GTP) と NADH-C3-RhoA(GDP) の結晶構造

3 結果および考察

C3 と複合体を形成していない時、RhoA の 2 つの領域 (switch I と switch II) は、GTP が結合しているか GDP が結合しているかによって異なる形状 (コンフォメーション) を取り、そのコンフォメーションの変化がシグナル伝達のスイッチとなることが知られている。

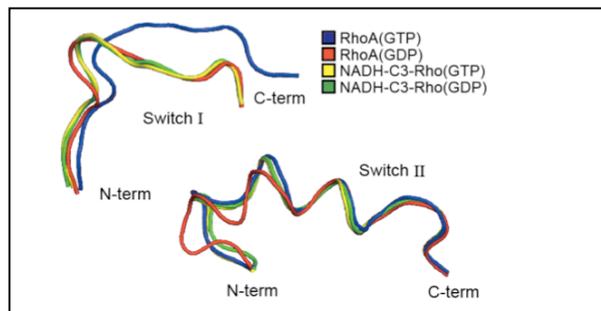


図 3 : 複合体中での RhoA switch 領域の構造比較

面白いことに、今回明らかにした3者複合体の構造では、結合しているヌクレオチド（GTPあるいはGDP）が異なるにもかかわらず、RhoAのswitch領域はどちらも同じコンフォメーションであり、switch IはGDPが結合したRhoAと同じコンフォメーションを、switch IIはGTPが結合したRhoAと同じコンフォメーションを、それぞれがとっていた（図3）。このことはC3がRhoA(GTP) RhoA(GDP)も基質とすることを良く説明する。

さらに修飾されるアミノ酸特異性はどのように生み出されているのか。C3はRhoAを認識した後、RhoAのAsn41を特異的にモノADPリボシル化する。C3のADP-Ribosylation Turn Turn loop (ARTT loop)の、最初のターンに存在する疎水性側鎖Tyr180が基質RhoAの認識をし、次のターンに存在するQXEのGln183が修飾されるRhoA Asn41の認識に関わり、修飾アミノ酸を決定することが、構造から明らかになった（図4）。また、C3酵素と基質RhoAとの結合が、ADPリボシル化反応に最適な構造（環境）を生み出していることを見いだした。

4 まとめ

我々は、アクチンのアルギニンを特異的にADPリボシル化する酵素Iaとアクチン複合体の結晶構造解析に取り組み、その特異性や反応機構を明らかにしてきた[2][3]。今回明らかにした複合体は、同じADPリボシル化酵素（C3）だが、異なる基質（RhoA）を認識し、アスパラギンをADPリボシル化する。非常に似た構造をした酵素（IaとC3）が、異なる基質を認識し、異なるアミノ酸をADPリボシル化する仕組みが、これらの複合体を比較することで、明らかになると考えている。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費 基盤研究C「ADPリボシル化酵素C3のRhoGTPase認識機構の解明」（15K08289）新学術領域研究（研究領域提案型）細胞シグナリング複合体によるシグナル検知・伝達・応答の構造的基盤「複合体構造解析による細菌毒素の標的結合タンパク質認識機構の解明」（25121733）の支援を受けて行われた。

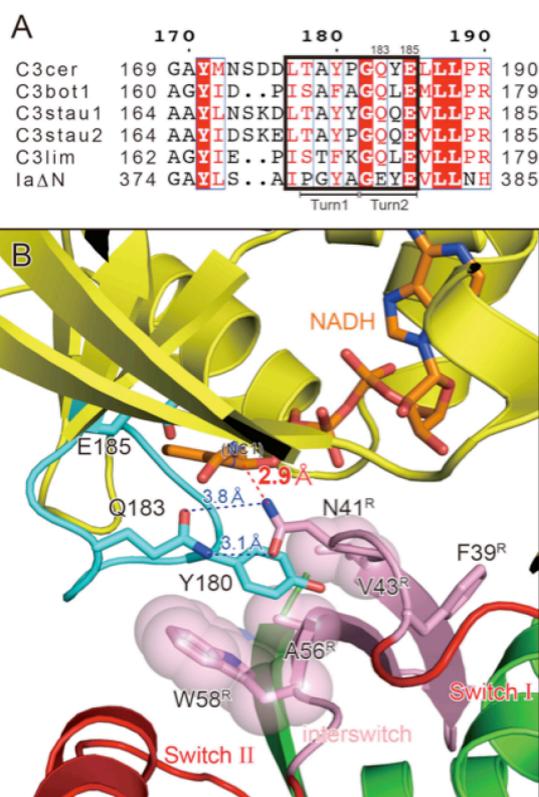


図4：A. C3ファミリーとIaに保存されるARTT loop B. C3のARTTループのY180とQ183によるRhoAの認識

参考文献

- [1] A. Toda, T. Tsurumura, T. Yoshida, Y. Tsumori, and H. Tsuge *JBC* **290**(32),19423-32 (2015)
- [2] H. Tsuge, M. Nagahama, M. Oda, S. Iwamoto, H. Utsunomiya, V.E. Marquez, N. Katunuma, M. Nishizawa, and J. Sakurai *PNAS* **105**, 7399-7404 (2008)
- [3] T. Tsurumura, Y. Tsumori, H. Qiu, M. Oda, J. Sakurai, M. Nagahama, and H. Tsuge *PNAS* **110**, 4267-4272 (2013)

成果

1. 物構研トピックスで紹介（2015年6月）
ADPリボシル化酵素C3がシグナル伝達障害を引き起こすしくみ
2. PF Highlight 2015 ハイライト記事 ”Structural basis of Rho GTPase recognition by C3 exoenzyme”

* tsuge@cc.kyoto-su.ac.jp