

グアニンヌクレオチド交換因子 DOCK7 の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of the guanine nucleotide exchange factor DOCK7

新野睦子*, 白水美香子

理化学研究所, ライフサイエンス技術基盤研究センター,
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22
Mutsuko NIINO* and Mikako SHIROUZU
RIKEN Center for Life Science Technologies,
1-7-22 Shehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, 230-0045, Japan

1 はじめに

非典型グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として知られる DOCK ファミリーは、細胞の運動や形態維持の鍵分子 Rho ファミリー G 蛋白質を直接、活性化することにより、細胞骨格を正に制御している。ヒトでは 11 種類の DOCK ファミリー蛋白質 (DOCK1-DOCK11) が見出されており、近年、癌の浸潤・転移や免疫難病 (自己免疫疾患・アレルギー) など細胞運動の関連するさまざまな疾患との関わりが示されている。

通常の DH-PH ドメインを含む古典的 GEF と異なり、DOCK ファミリーは固有の DOCK Homology Region-2 (DHR-2) を用いて Rac や Cdc42 の GEF 反応を促進する。DOCK1-DOCK5 は Rac に特異的な GEF であり、DOCK6-DOCK11 は主に Cdc42 に対する GEF である。このうち DOCK6/7/10 は Rac に対しても GEF 活性を示すことが知られている。

これまで DOCK2/8/9 に関して、それぞれの DHR-2 ドメインと基質 G 蛋白質の複合体の結晶構造が解析された (DOCK2-Rac1 複合体 [1] [2]、DOCK8-Cdc42 複合体 [3]、DOCK9-Cdc42 複合体 [4])。これらの立体構造から、G 蛋白質の結合および GEF 活性に必要な領域は DHR-2 ドメインの C 末端側であることが示された。すなわち、DOCK ファミリーの GEF 活性領域は 2 つのローブ構造 (B ローブと C ローブ) から構成され、G 蛋白質のスイッチ 1 領域を中心とした N 末端側に対して結合することが明らかになった。

DOCK ファミリーと G 蛋白質の特異性に関しては、これまでに Rac1 と Cdc42 の間の限られたアミノ酸残基の違い (Lys27_{Rac1}/Ala27_{Cdc42} や Trp56_{Rac1}/Phe56_{Cdc42} など) が G 蛋白質の DOCK に対する選択性を決定していることが報告されている [1]。一方、DOCK 側については、DOCK2 と DOCK9 の間ではアミノ酸配列の相同性が低く、また立体構造上もローブ間の相対配置などにおいてかなりの違いが見られる。このため、DOCK ファミリーが基質 G 蛋白質を識別する分子メカニズムの詳細は明らかにされていなかった。

本研究では、Rac/Cdc42 の両方に対して GEF 活性を示す DOCK7 の触媒ドメインの立体構造を解析す

ることにより、DOCK ファミリーがどのような仕組みにより基質 G 蛋白質を区別しているかを明らかにすることを目的とした。

2 実験

ヒト由来 DOCK7 DHR-2 ドメインの B ローブと C ローブを含むフラグメント、ならびに低分子量 G 蛋白質 Rac1、Cdc42 は、大腸菌無細胞合成系を利用して発現、精製した。精製した DOCK7 DHR-2 に対して Rac1 あるいは Cdc42 をモル比 1:1 になるように混合し、複合体形成させた後、それぞれ結晶化スクリーニングを行った。析出した結晶について KEK-PF の構造生物学ビームラインを利用して回折チェックを行い、良好な回折像が得られた結晶について波長 1.0 Å を用いた単波長によるデータセット収集を収集した。

3 結果および考察

DOCK7 DHR-2 と Rac1 の共結晶化スクリーニングから複数の条件で結晶が析出し、これらの結晶について 2.3-2.7 Å 分解能の native データセットを取得した。しかしながら構造解析の結果、結晶中に DOCK7 DHR-2 は含まれず Rac1 単独であることが判明した。DOCK7 DHR-2 と Rac1 の複合体結晶が得られなかった理由として、両者の間の結合親和性が十分に高くないことが考えられる。

一方、DOCK7 DHR-2 と Cdc42 の複合体結晶については、最終的に 3.3 Å 分解能の native データセットを取得することができた。結晶系は $P2_12_1$, $a=196.5$, $b=105.6$, $c=118.1$ Å と決定し、分子置換法により構造決定した (図 1)。

DOCK7-Cdc42 複合体の全体構造は DOCK9-Cdc42 複合体とよく類似していた。しかしながら DOCK7/9 の間で、Cdc42 の Phe56 に対する結合部位の構造に注目すべき差異が見出された。すなわち、Phe56 結合部位を構成する DOCK7 の Gln1995 は、DOCK9 の同じグルタミン残基 (Gln1944) と異なり Phe56 に対して離れたコンフォメーションを取っていた (図 2)。このため、DOCK7 では Cdc42 の Phe56 よりも側鎖の大きい Rac1 の Trp56 も結合可能であると予想される。周辺構造を DOCK7/9 間で比

較した結果、興味深いことに Cdc42 の結合には直接的には関与しないアミノ酸残基の違いが、Phe56 結合部位におけるグルタミン残基のコンフォメーションに影響していることが判明した。

また Cdc42 の側においても、DOCK7-Cdc42 複合体と DOCK9-Cdc42 複合体の間では、Cdc42 の Glu31 (スイッチ 1 領域内) のコンフォメーションに顕著な違いが見出された (図 3)。すなわち、DOCK9 では Arg1871 が Cdc42 の Glu31 (分子間) および DOCK9 の Asp1813 (分子内) と水素結合を形成している。一方、この位置に相当する DOCK7 の残基は Ala1922 であり、同様の水素結合を形成していなかった。したがって DOCK9 と比較して DOCK7 では、Cdc42 結合時の構造が不安定化していると同時に、Rac1 とも結合するように構造の自由度を獲得していると考えられる。実際に DOCK7-Cdc42 複合体と DOCK2-Rac1 複合体を重ね合わせてみると、DOCK7 の B ロープと Rac1 のスイッチ 1 領域が立体障害を起こす。このことから、DOCK7 が Rac1 と結合する際には、B ロープや Rac1 スイッチ 1 領域のコンフォメーション変化が起きると予測された。

4 まとめ

DOCK7 の GEF 活性領域と Cdc42 の複合体の結晶構造を決定した。Cdc42 特異性を持つ DOCK9 や Rac 特異性を持つ DOCK2 との構造比較から、DOCK7 の示す Rac/Cdc42 多重特異性に関する構造基盤を明らかにすることができた。

参考文献

- [1] K. Kulkarni *et al.*, *J. Biol. Chem.* **286**, 25341 (2011).
- [2] K. Hanawa-Suetsugu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 3305 (2012).
- [3] Y. Harada *et al.*, *Blood* **119**, 4451 (2012).
- [4] J. Yang *et al.*, *Science* **325**, 1398 (2009).

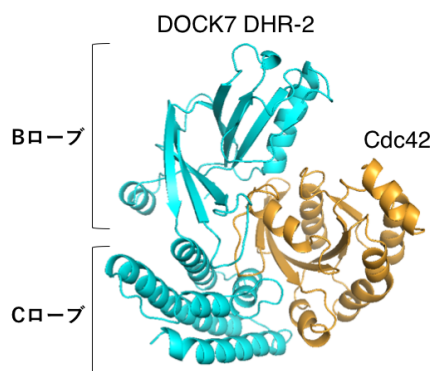


図 1 : DOCK7 DHR-2 (シアン) と Cdc42 (橙色) の複合体の結晶構造

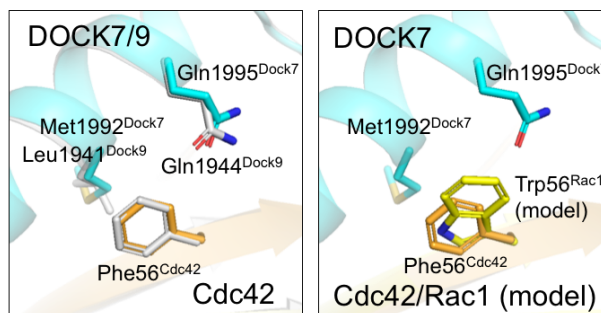


図 2 : DOCK7 (シアン) の Cdc42 Phe56 (橙色) に対する結合部位
(左) DOCK9-Cdc42 複合体構造 (灰色) との比較
(右) Rac1 モデル構造 (黄色) との比較

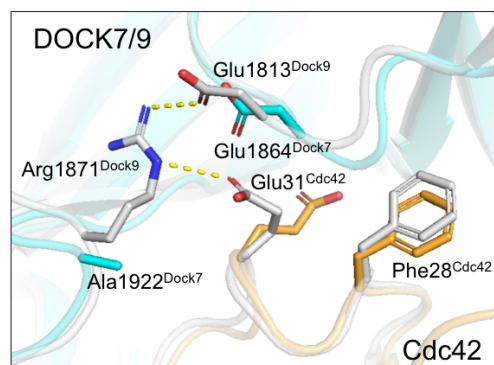


図 3 : DOCK7 (シアン)、DOCK9 (灰色) 結合時の Cdc42 Glu31 (それぞれ橙、灰色) の構造変化

成果

1. 新野睦子、伊原健太郎、津曲千恵美、大沢登、白水美香子、Cdc42 とその活性化因子 Dock7 の遷移状態複合体の結晶構造解析、2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日、第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜)
2. 新野睦子、津曲千恵美、津田健吾、伊原健太郎、井上みお、花田和晴、白水美香子、DOCK7 蛋白質の GEF 機能を担う DHR-2 ドメインの結晶構造と機能改変、2017 年 6 月 20 日～6 月 22 日、第 17 回日本蛋白質科学会年会 (仙台)

* kukimoto@riken.jp