

グアニンヌクレオチド交換活性の上昇した DOCK7 変異体の構造解析 Structural basis for enhanced guanine nucleotide exchange activity by DOCK7 mutant

新野睦子*, 白水美香子

理化学研究所, 生命機能科学研究センター

〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Mutsuko NIINO* and Mikako SHIROUZU

RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, 230-0045, Japan

1 はじめに

DOCK7 は Rho ファミリー低分子量 G タンパク質のグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)であり、G タンパク質の活性化を介して神経細胞の増殖・分化において重要な役割を果たしている。ヒトでは 11 種類の DOCK ファミリー-RhoGEF が見出されており、配列上、保存された Dock homology region-2 (DHR-2) を介して、G タンパク質に特異的な GEF 活性を發揮する。すなわち、DOCK1-5 は Rac に対する特異性を示し、DOCK6-11 は Cdc42 に対する特異性を示す。また DOCK6, 7, 10 は Rac に対する特異性も示すことが報告されている。

結晶構造解析により、これまで DOCK2、DOCK9 の DHR-2 ドメインがそれぞれ Rac1、Cdc42 に対して選択的に結合する様式が明らかにされている [1][2][3]。また最近、我々は KEK-PF の構造生物学ビームラインを利用して DOCK7 DHR-2 ドメインと Cdc42 の複合体の結晶構造を決定し、DOCK7 が Rac と Cdc42 に対する二重特異性を示す構造的基盤を明らかにした [4]。さらに部位特異的な変異を用いて DOCK7 の基質特異性の改変を行い、その過程において、DOCK7 の Rac1 および Cdc42 に対する GEF 活性が I1836Y 変異により大幅に上昇することを見出した (野生型 DOCK7 と比較してそれぞれ 3.7 倍および 38 倍上昇)。

Rac 特異的な DOCK1-5 では、DOCK7 の Ile1836 に相当する残基は Tyr である。したがって当初、我々は DOCK7 の I1836Y 変異により RacGEF 活性が特異的に上昇すると予想した。しかしながら実際、DOCK7 の I1836Y 変異は Rac だけでなく Cdc42 に対する GEF 活性も上昇させた。そこで本研究では、X 線結晶構造解析により、DOCK7 の I1836Y 変異による活性上昇の分子メカニズムの解明を目的とした。

2 実験

GEF 活性の上昇した I1836Y 変異型 DOCK7 DHR-2 ドメインとその基質 G タンパク質 Rac1、Cdc42 の共結晶化を行い、得られた結晶の回折チェックを行った。最終的に 3.23Å 分解能の DOCK7(I1836Y)-Cdc42 複合体の native データセットを取得した。

3 結果および考察

DOCK7(I1836Y)-Cdc42 複合体の結晶構造を分子置換法により決定した。DOCK7 の DHR-2 ドメインは 2 つのローブ (B ローブと C ローブ) により構成され、I1836Y 変異は B ローブ上の Cdc42 会合面に位置する (図左)。先に決定した野生型 DOCK7-Cdc42 複合体との構造比較を行った結果、変異型 DOCK7 は野生型 DOCK7 と比較して B ローブと Cdc42 の距離が約 0.7Å 近づいていた。B ローブ-Cdc42 会合面では、DOCK7 変異体の Tyr1836 側鎖が Cdc42 の Thr43 と新たに CH/ π 結合を形成しており (図右)、これにより B ローブと Cdc42 との相互作用を安定化していると考えられた。

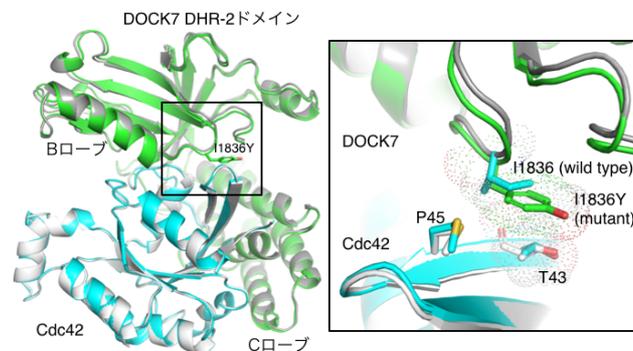


図 : I1836Y 変異型 DOCK7 (緑) -Cdc42 (シアン) 複合体構造と野生型 DOCK7 (灰色) -Cdc42 (白) 複合体構造の比較

4 まとめ

GEF 活性の上昇した DOCK7 I1836Y 変異体と Cdc42 との複合体の結晶構造を決定し、DOCK7 変異による Cdc42 との相互作用の安定化を明らかにした。このことから、DOCK7 の B ローブを介した相互作用が基質 G タンパク質に対する親和性決定に重要であると考えられる。

Photon Factory Activity Report 2018 #36 (2019)

参考文献

- [1] J. Yang *et al.*, *Science* **325**, 1398 (2009).
- [2] K. Kulkarni *et al.*, *J. Biol. Chem.* **286**, 25341 (2011).
- [3] K. Hanawa-Suetsugu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 3305 (2012).
- [4] Photon Factory Activity Report 2017 **35**, 186 (2018).

成果

1. M. Kukimoto-Niino *et al.*, *Structure* **27**, 741-748 (2019).

* kukimoto@riken.jp