

新規グアニンヌクレオチド交換因子 SmgGDS による RhoA 認識機構の構造基盤

清水光¹, 藤間祥子¹, 紺谷圏二², 堅田利明², 清水敏之¹

¹ 東京大学大学院薬学系研究科, ² 明治薬科大学, ³ 武蔵野大学

Structural basis of RhoA recognition by novel guanine nucleotide exchange factor SmgGDS

Hikaru SHIMIZU¹, Sachiko TOMA-FUKAI¹, Kenji KONTANI², Toshiaki KATADA³ & Toshiyuki SHIMIZU¹

¹ Graduate School of Pharmaceutical Science, The University of Tokyo, ² Meiji Pharmaceutical University, ³ Musashino University

Abstract

SmgGDS は Rho のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として働くだけでなく低分子量 G 蛋白質 C 末端の CaaX モチーフを認識するシャペロンとしても働く。CaaX モチーフは翻訳後脂質修飾を受ける Cys 残基を有するが, SmgGDS はスプライズバリエーション依存的に脂質修飾の有無を認識していることが示唆されていた。SmgGDS は Armadillo-repeat motif (ARM) のみから構成され, 他の GEF やプレニル基認識分子とは全く異なる構造を有しており, その構造生物学的な作用様式はこれまで明らかになってこなかった。今回我々はヒト SmgGDS と RhoA との複合体の X 線結晶構造解析に成功した。本稿ではその結果について紹介する。

1. はじめに

Ras や Rho をはじめとする低分子量 G 蛋白質は細胞増殖や骨格形成といった多様な細胞内イベントの鍵となる制御因子であり, これらの変異や機能不全は様々な癌の原因となる [1,2]。低分子量 G 蛋白質は GTP 結合型の活性型と GDP 結合型の不活性型とを行き来することで分子スイッチとして働く。低分子量 G 蛋白質のコアドメインである G-domain は 3 つの保存モチーフから成り, それぞれ phosphate-binding loop (P-loop), switch I, switch II と呼ばれている (Fig. 1A)。この 3 つのモチーフが協調的にグアニンヌクレオチドと補欠因子である Mg イオンを認識し GTP 加水分解を担う。低分子量 G 蛋白質には G-domain の他に C 末端に Hypervariable region (HVR) と呼ばれる部分がある (Fig. 1A)。さらにこの末端 4 残基は CaaX モチーフと呼ばれ, その Cys 残基が翻訳後にファルネシル化あるいはゲラニルゲラニル化といった脂質修飾を受ける [3]。脂質修飾は低分子量 G 蛋白質の膜への局在と正常な生理活性に必須である。

一般に, 低分子量 G 蛋白質の固有の GTP 加水分解活性は低く, GTPase-activating protein (GAP) によって活性化される。低分子量 G 蛋白質からの GDP の解離は GEF によって促進され新たな GTP が結合する。GTP が結合すると低分子量 G 蛋白質は再び下流のエフェクター分子と相互作用できるようになる。GAP と GEF は低分子量 G 蛋白質の活性を素早く循環させるために重要な因子である (Fig. 1B)。

SmgGDS は Rho に対する GEF の一つだが, GEF としての役割の他に低分子量 G 蛋白質の CaaX モチーフを

認識するシャペロンとして働くことで知られている [4-9]。SmgGDS は非小細胞肺癌 [10,11], 前立腺癌 [12], 乳癌 [11,13], 膵臓癌 [11] において発現の上昇が見られる。SmgGDS は ARM という繰り返し単位のみで構成されており, ARM1 つの違いをもつ SmgGDS-558, SmgGDS-607 というスプライズバリエーションから成る (Fig. 1A)。これらの

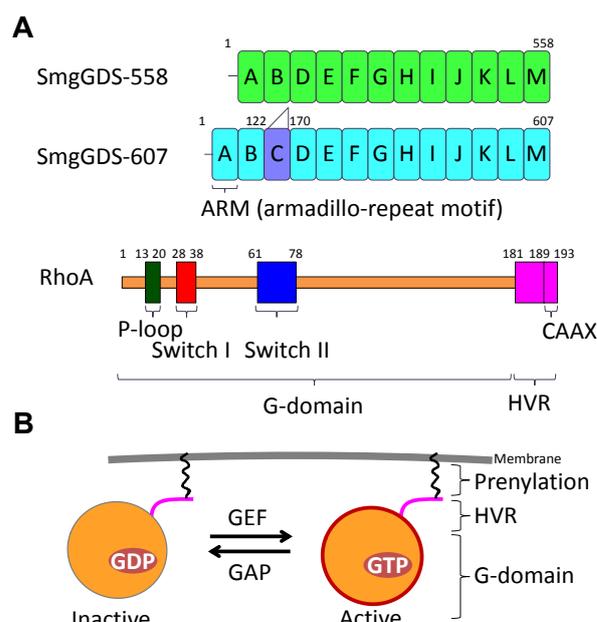


Figure 1 Domain structure and function of SmgGDS and RhoA. A) Domain structure of both variants of SmgGDS and RhoA. B) Schematic view of the cycle of small GTPases and membrane localization.

バリエーションは低分子量 G 蛋白質の脂質修飾状態を認識し、前者は脂質修飾されたものを、後者は未修飾のものを良く認識するということが先行研究 [7,8] と我々が以前に行った研究 [14] により示されていた。ARM のみで構成されている GEF やプレニル基認識蛋白質はこれまで報告例がなく、SmgGDS の低分子量 G 蛋白質への構造生物学的作用機序はこれまで全く明らかでなかった。

今回我々は SmgGDS-558 と脂質修飾された RhoA の複合体の結晶構造解析に成功した。RhoA の大きな構造変化が G-domain の 3 つのモチーフを開いた状態にすることで GDP/GTP の交換を促進していることが明らかになった。RhoA の脂質修飾部分は SmgGDS-558 の隠された疎水性ポケットに収容されており、これは我々が以前に解いた単体 SmgGDS-558 構造からは予期できないものであった。これらの発見は SmgGDS の機能についての知見と低分子量 G 蛋白質に対する創薬戦略に役立つものだと考えている。

2. SmgGDS-558 による RhoA 認識機構

2-1. 試料調製と構造決定

SmgGDS-558 は脂質修飾を受けた RhoA を強く認識するため、我々は RhoA の脂質修飾体の調製を行った。大腸菌発現系にて未修飾の全長 RhoA を精製したのち、*in vitro* でファルネシル基転移酵素と基質を混合し RhoA に脂質を付加した。RhoA は本来、炭素数 20 のゲラニルゲラニル化を受けるが、物性の都合上本研究では炭素数 15 のファルネシル化を優位に受ける変異体を用いた。ゲル濾過でファルネシル基転移酵素を除去したのち、SmgGDS-558 と混合して複合体化し結晶化した。得られた結晶は Photon Factory BL-1A, BL-17A あるいは SPring-8 BL41XU, BL44XU にて回折強度データの収集を行った。各分子の単体構造をもとに分子置換で位相を決定し、3.5Å の分解能で構造を決定した。

2-2. SmgGDS-558 による G-domain 認識機構

結晶構造において SmgGDS-558 は主として RhoA の 2 か所を認識していた。1 つは Switch II であり、もう 1 つは CaaX モチーフのファルネシル化 Cys 残基であった (Fig. 2A)。複合体結晶中の RhoA は大きくディスオーダーしており、P-loop と Switch I のすべて、および Switch II の一部の電子密度は確認されなかった。既知の RhoA 単体構造と複合体中での RhoA 構造を比較すると、Switch II が外側に動かされ、G-domain が大きく開かれた様子が見てとれた (Fig. 2B)。グアニンヌクレオチドと Mg イオンも観察されなかったことから、本構造は RhoA の G-domain が SmgGDS-558 により開かれ、グアニンヌクレオチドと Mg イオンを放出した直後の状態を捉えたものと考えられる。

Switch II は SmgGDS-558 の凹面にあたる ARM E-I と広く相互作用しており (Fig. 2A)、先行研究における変異体解析の結果と高く一致していた。例えば SmgGDS-558 における N338 残基は RhoA への相互作用と GEF 活性に不可欠であるということが報告されていたが [6,14,15]、この残

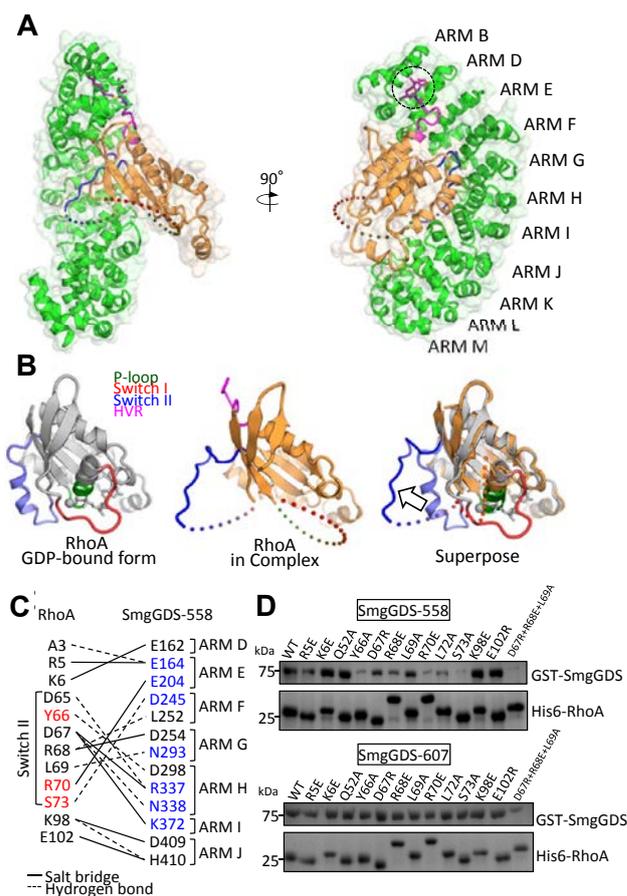


Figure 2 Structure of the SmgGDS-558/farnesylated RhoA complex. A) Crystal structure of SmgGDS-558/farnesylated RhoA. SmgGDS-558 is shown in green. RhoA is shown in orange, and the three nucleotide recognition domains (P-loop, switch I, switch II) are shown in dark green, red, and blue respectively. HVR is shown in purple and S-farnesylated RhoA was enclosed by a dotted circle. B) Comparison of RhoA structure. Core domain of GDP-bound RhoA (PDBID: 1FTN) and RhoA located are colored in grey and orange, respectively (left, middle). Superposition of these two structures is shown on the right, and the arrows represent the movement of switch II. C) Interaction between RhoA and SmgGDS-558. Dashed and solid lines represent the presence of a hydrogen bond and salt bridge, respectively. RhoA residues showing reduced binding to SmgGDS by mutation in this study are shown in red. SmgGDS residues that are reported to be important for interaction are shown in blue. D) Mutational analysis of SmgGDS-558 and SmgGDS-607. Pull-down results in which His-RhoA was used as bait are shown.

基は RhoA の D67 と水素結合を形成していた。Switch II の他には RhoA の N 末端 (A3, R5, K6) や C 末端側の 2 つの残基 (K98, E102) を認識していた (Fig. 2C)。結晶構造の妥当性をさらに調べるため、我々は RhoA に対する変異体を 13 個用意し、プルダウンアッセイによる変異体解析を実施した。Y66A, R70E, S73A および D67R + R68E + L69A において顕著に SmgGDS-558 への結合力が低下したことから確かに Switch II は SmgGDS-558 との結合のカギとなる領域であることが示された (Fig. 2C, D)。SmgGDS-607 では結合力の低下は見られなかったが、本実験では未修飾

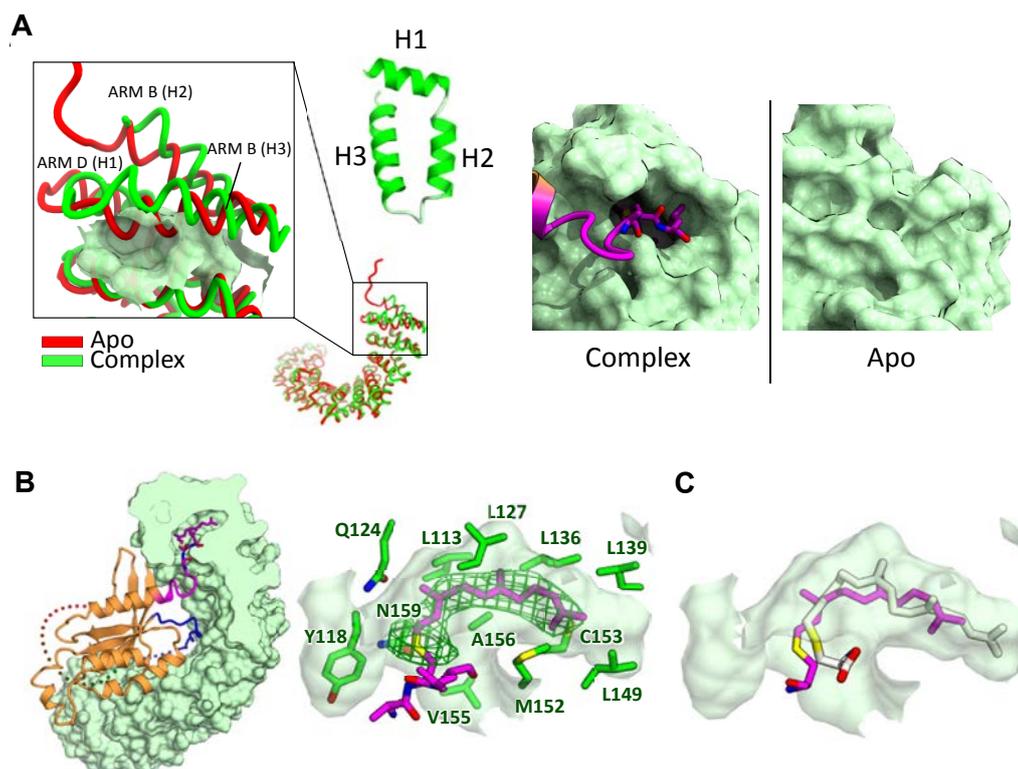


Figure 3 Farnesyl group of RhoA C190 inserted into the cryptic pocket of SmgGDS-558. A) Left, Typical armadillo-repeat motif (ARM) and movement of alpha helices of SmgGDS-558, as determined by making a complex with farnesylated RhoA. A typical ARM (H1-3) is shown as a ribbon model. Apo and RhoA-bound form of SmgGDS-558 is shown in red and green, respectively. Enlarged view of the N-terminal ARMs is shown in an inset. The surface of the cryptic pocket is shown. Right, enlarged view of surface model of SmgGDS-558 apo and complex forms. B) Cross-section (left) and enlarged views (middle) of the insertion of farnesyl group of RhoA C190 into SmgGDS-558. RhoA is shown in orange using the ribbon model. S-farnesylated C190 and L191 of RhoA are shown as stick models. Molecular surface of SmgGDS-558 is shown in gray and side chains of SmgGDS-558, which form the pocket, are shown as a green stick model. The electron density map (mFo-DFc) of the side chain of S-farnesylated C190 contoured at 2.5 σ is shown in green mesh. C) Docking model of S-geranylgeranylated cysteine to the crystal structure. Docking model of S-geranylgeranylated cysteine is shown as a white stick model.

の RhoA を用いており、SmgGDS-607 への結合力がとても強い ($K_d = 0.8$ nM) ためと考えている [14]。

以上で見たように SmgGDS は RhoA の Switch II を結合することで G-domain の 3 つのモチーフを開放し基質との重要な相互作用を壊し GEF 活性発揮する。このような作用機序を持つ GEF は他に類をみないことから、SmgGDS は新規の GEF であると言えるだろう。

2-3. SmgGDS-558 によるファルネシル化 Cys 認識機構

興味深いことに RhoA の CaaX モチーフ上の脂質修飾された Cys 残基 (ファルネシル化 Cys) は SmgGDS-558 の隠されたポケットに挿入されていた。このポケットは ARM B と D の間に存在するが、我々が以前に決定した SmgGDS-558 の単体構造では確認されなかった。脂質修飾された RhoA を結合することにより ARM B と D のヘリックスが構造変化し、ファルネシル基を収容する新たなポケットが形成されると分かった (Fig. 3A)。SmgGDS-558 が脂質収容ポケットを持つ一方で、SmgGDS-607 はこのポケット位置にもう一つの ARM である ARM C を有する。SmgGDS-607 では ARM C により別の表面構造が形成され、未修飾の CaaX モチーフを持つ RhoA に優位な結合

様式をとれるものと考えられる。SmgGDS-558 のポケットは主として疎水性残基で構成され、炭素数 15 のファルネシル基を収容していた。得られた結晶構造にプログラム AUTODOCK [16] を用いて炭素数 20 のゲラニルゲラニル化 Cys をドッキングしてみたところ、こちらを収容するのに十分な大きさで深さを持っていた (Fig. 3B)。これにより SmgGDS-558 はファルネシル化、ゲラニルゲラニル化両方の脂質修飾をもつ低分子量 G 蛋白質も受容できると考えられる。

3. まとめ

本研究では SmgGDS-558 と脂質修飾された RhoA の複合体構造を決定し、SmgGDS は RhoA の大きな構造変化を誘起すること、プレニル基を収容するポケットを形成することを明らかにした。これらの発見は GEF 活性作用機序とプレニル基収容機構の両面から新しいと言えるものであった。

ヒトにおいて Rho に対するものだけでも 80 種類の GEF が知られている [17,18]。これらの RhoGEF は典型的な Dbl ファミリーと非典型的の Dock ファミリーに属するものに分けられる。両 GEF の活性ドメインの構造は既に知られ

ており、どちらも GDP に対する立体障害や静電反発によって GDP/GTP の交換を促進する。一方で SmgGDS はどちらのファミリーにも該当せず異なる GEF 作用機序を持つ。SmgGDS-558 はその凹面に RhoA の switch II を引き寄せることで RhoA のグアニンヌクレオチド結合モチーフをディスプレイさせる。この RhoA の構造変化は非常にユニークで現在のところ蛋白質構造データベースである Protein Data Bank に類似の RhoA 構造は見当たらない。

低分子量 G 蛋白質のプレニル基収容蛋白質としては RhoGDI と PDE δ というシャペロン分子の構造が報告されている。これらの分子はプレニル基を遮蔽することで低分子量 G 蛋白質を凝集や分解から保護したり、細胞内での拡散を促進すると考えられている [19-21]。SmgGDS-558 も RhoA のプレニル基をポケットに収容することが本研究により明らかとなったことから SmgGDS-558 も同様の機能を持つシャペロンとして働くことが強く示唆された。しかしながら構造的には SmgGDS-558 はこれら既知のタンパク質とは全く異なる。RhoGDI と PDE δ はどちらも二つの逆平行 β -sheet からなる immunoglobulin-like fold によってプレニル基を収容するが、SmgGDS-558 は α -helix から成るポケットにより RhoA のプレニル基を収容する。さらにこのポケットは SmgGDS-558 単体では観察されず、RhoA が結合する際にはじめて形成され、別のアイソフォームである SmgGDS-607 では ARM C の挿入によりポケットは存在しないと考えられる。

上記のように SmgGDS-558 は RhoA に対してユニークな相互作用様式をとることが明らかとなった。我々の発見は SmgGDS や低分子量 G 蛋白質を標的とした創薬研究に役立つものと考えられる。また、SmgGDS の生理学的意義や構造変化の駆動力などの詳細な分子機構などいまだ分からない点も多く残っている。今後は X 線結晶構造解析だけでなく多様な実験手法や観点からの研究が求められることになるだろう。

4. 謝辞

本研究は明治薬科大学紺谷園二教授、武蔵野大学堅田利明教授との共同研究によるものである。また、本研究における X 線回折実験は共同利用実験課題 (2016G597) によって行われた。この場を借りてチームラインスタッフの皆様に深く御礼申し上げます。

引用文献

[1] Sahai, E., and Marshall, C. J., *Nat. Rev. Cancer* **2**, 133-143 (2002).
[2] Fernández-Medarde, A., and Santos, E., *Genes & cancer*, **2**, 344-358 (2011).
[3] Casey, P. J., and Seabra, M. C., *J. Biol. Chem.*, **271**, 5289-5292 (1996).
[4] Yamamoto, T., Kaibuchi, K., Mizuno, T., Hiroyoshi, M., Shirataki, H., and Takai, Y., *J. Biol. Chem.*, **265**, 16626-16634 (1990).

[5] Mizuno, T., Kaibuchi, K., Yamamoto, T., Kawamura, M., Sakoda, T., Fujioka, H., Matsuura, Y., and Takai, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **88**, 6442-6446 (1991).
[6] Hamel, B., Monaghan-Benson, E., Rojas, R. J., Temple, B. R., Marston, D. J., Burrridge, K., and Sondek, J., *J. Biol. Chem.*, **286**, 12141-12148 (2011).
[7] Berg, T. J., Gastonguay, A. J., Lorimer, E. L., Kuhnmuensch, J. R., Li, R., Fields, A. P., and Williams, C. L., *J. Biol. Chem.*, **285**, 35255-35266 (2010).
[8] Schuld, N. J., Vervacke, J. S., Lorimer, E. L., Simon, N. C., Hauser, A. D., Barbieri, J. T., Distefano, M. D., and Williams, C. L., *J. Biol. Chem.*, **289**, 6862-6876 (2014).
[9] Williams, C. L., *Cell Cycle*, **12** (18), 2933-2934 (2013).
[10] Tew, G. W., Lorimer, E. L., Berg, T. J., Zhi, H., Li, R., and Williams, C. L., *J. Biol. Chem.*, **283**, 963-976 (2008).
[11] Schuld, N., Hauser, A., Gastonguay, A., Wilson, J., Lorimer, E., and Williams, C., *Cell Cycle*, **13**, 941-952 (2014).
[12] Zhi, H., Yang, X., Kuhnmuensch, J., Berg, T., Thill, R., Yang, H., See, W., Becker, C., Williams, C., and Li, R., *J. Pathol.*, **217**, 389-397 (2009).
[13] Hauser, A. D., Bergom, C., Schuld, N. J., Chen, X., Lorimer, E. L., Huang, J., Mackinnon, A. C., and Williams, C. L., *Mol. Cancer Res.*, **12**, 130-142 (2014).
[14] Shimizu, H., Toma-Fukai, S., Saijo, S., Shimizu, N., Kontani, K., Katada, T., and Shimizu, T., *J. Biol. Chem.*, **292**, 13441-13448 (2017).
[15] Ogita, Y., Egami, S., Ebihara, A., Ueda, N., Katada, T., and Kontani, K., *J. Biol. Chem.*, **290**, 20245-20256 (2015).
[16] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., and Olson, A. J., *J. Comput. Chem.*, **30**, 2785-2791 (2009).
[17] Rossman, K. L., Der, C. J., and Sondek, J., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 167-180 (2005).
[18] Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A., *Cell*, **129**, 865-877 (2007).
[19] Kuhlmann, N., Wroblowski, S., Knyphausen, P., de Boor, S., Brenig, J., Zienert, A. Y., Meyer-Teschendorf, K., Praefcke, G. J., Nolte, H., and Krüger, M., *J. Biol. Chem.*, **291**, 5484-5499 (2016).
[20] Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burrridge, K., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 493 (2011).
[21] Dharmiaiah, S., Bindu, L., Tran, T. H., Gillette, W. K., Frank, P. H., Ghirlando, R., Nissley, D. V., Esposito, D., McCormick, F., and Stephen, A. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **113**, E6766-E6775 (2016).

(原稿受付日: 2018 年 5 月 15 日)

著者紹介

清水 光 Hikaru SHIMIZU



東京大学大学院薬学系研究科
薬科学専攻 博士後期課程 3 年
〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
TEL: 03-5841-4841
e-mail:hikaru-shimizu660@g.ecc.u-tokyo.
ac.jp
趣味：スポーツ観戦（主にテニス）。

藤間祥子 Sachiko TOMA-FUKAI



東京大学大学院薬学系研究科 助教
〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
TEL: 03-5841-4841
e-mail: tomas@mol.f.u-tokyo.ac.jp
略歴：2007 年 東京大学大学院薬学系研
究科助教 博士（理学）。

最近の研究：創薬標的ヒト蛋白質の構造生物学。

趣味：読書。

清水敏之 Toshiyuki SHIMIZU

東京大学大学院薬学系研究科 教授



〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
TEL: 03-5841-4840
e-mail: shimizu@mol.f.u-tokyo.ac.jp
略歴：2010 年東京大学大学院薬学系研
究科教授 博士（薬学）。
最近の研究：タンパク質構造機能相関。

趣味：愛犬との散歩。