

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06987

研究課題名(和文)多様なドメイン連携によるRhoGEF制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanism of RhoGEF by multidomains cooperation

研究代表者

柊元 睦子(Kukimoto, Mutsuko)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・上級研究員

研究者番号：30321756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではRhoGEFタンパク質を全長またはマルチドメイン状態で立体構造解析し、GEFドメインと他の機能ドメインによる活性化制御機構の解明を目的とした。動的な光散乱および超遠心分析により、インターセクチン2は複数のSH3ドメインとDH-PHドメインがフレキシブルなループで繋がれ、分子全体として構造の自由度を獲得していることを見出した。DOCK5は制御因子ELM01と安定な複合体を形成して伸びた構造を取り、分子の側面でRac1と結合することを見出した。またX線結晶構造解析により、DOCK7 DHR-2ドメインのGタンパク質結合における構造変化を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the activation regulation mechanism of RhoGEF proteins by GEF domain and other functional domains by analyzing their structure in full length or multidomain state. By dynamic light scattering and ultracentrifugation analysis, we found that intersectin 2 has multiple SH3 domains and DH-PH domains connected by a flexible loop, and acquires the structural freedom as a whole molecule. We also found that DOCK5 forms a stable complex with the regulatory protein ELM01, takes up an extended structure, and binds to Rac1 on the side of the molecule. Finally, X-ray crystal structure analysis revealed structural changes of the DOCK7 DHR-2 domain in G protein binding.

研究分野：X線結晶構造解析

キーワード：X線結晶構造解析 シグナル伝達 Gタンパク質 Rhoファミリー グアニンヌクレオチド交換因子

## 1. 研究開始当初の背景

Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) タンパク質は、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質を直接、活性化し、細胞骨格を正に制御することから、癌をはじめとする様々な疾患と関わっている。

ヒトではおよそ 80 種類の RhoGEF タンパク質が見出されているが、そのうちの約 70 種類に及ぶ Dbl ファミリーは、分子内の連続する DH-PH ドメインにより RhoA、Rac1、Cdc42 といった G タンパク質の GEF 反応を触媒する。また 11 種類の非典型 RhoGEF として知られる DOCK ファミリーは、DH-PH ドメインの代わりに DHR-2 と呼ばれる固有の触媒ドメインを持ち、Rac1 や Cdc42 を活性化する。

これら RhoGEF タンパク質のほぼ全てにおいて、DH-PH、DHR-2 といった触媒ドメインに加えてさらに多様な機能ドメインが見出されており、活性が制御されている。すなわち上流のシグナルがまず触媒ドメイン以外の機能ドメインに伝わることで、RhoGEF 分子が活性化すると考えられる。

例えば、Dbl ファミリー分子のインターセクチンは、連続する SH3 ドメインと EH ドメインなどを持ち、これらが分子内や他のタンパク質の結合を介して活性を制御する役割を果たしている (Hussain et al., *Nat Cell Biol.* 2001, 10, 927-932)。また DOCK ファミリーの代表的分子である DOCK1 は、SH3 ドメインを介して制御タンパク質 ELMO と結合することにより、分子の活性や局在が制御される (Lu et al., *Curr. Biol.* 2004, 15, 371-377)。

これまで RhoGEF タンパク質の構造研究に関しては、10 種類以上の DH-PH ドメインについて立体構造解析がなされ、さらに G タンパク質との複合体についても構造が明らかにされている。また 3 種類の DHR-2 ドメインについて Rac1 あるいは Cdc42 との複合体の結晶構造が報告されている。

その一方で RhoGEF タンパク質のその他のドメインによる分子内制御機構に関する構造的知見は多くはない。

我々は本研究に先立ち、Dbl ファミリーの Asef タンパク質について、APC 結合領域-SH3-DH-PH ドメインを含んだマルチドメインでの結晶構造解析に初めて成功し、SH3 ドメインが DH ドメインの G タンパク質結合サイトを塞ぐことによりヌクレオチド交換反応を阻害していることを明らかにした (Murayama et al. *J. Biol. Chem.* 2007 282, 4238-4242)。また DOCK2 について、ELMO1 との結合領域同士の複合体の結晶構造解析にも成功し、DOCK と ELMO が互いの自己阻害を解除し活性化するための構造基盤を明らかにした (Hanawa-Suetsugu, Kukimoto-Niino et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 109, 3305-3310)。

こうした背景から、我々は RhoGEF タンパ

ク質の機能の解明においては、触媒ドメインに加えてそれ以外のドメインも含めたマルチドメインタンパク質としての解析が極めて重要であると考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、RhoGEF タンパク質の立体構造を、全長またはマルチドメイン (サブドメインを含む) 状態で X 線結晶構造解析等の手法を用いて解析し、分子の活性化制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Dbl ファミリーおよび DOCK ファミリーの複数の RhoGEF タンパク質について、無細胞・生細胞の系を用いて全長またはマルチドメイン領域での発現系を構築し、発現の確認されたものに関しては高純度で安定したサンプルを得るため調製条件を検討した。

(2) 精製したタンパク質の物理的・化学的性質 (多量体化、分子内相互作用、安定性など) をゲル濾過クロマトグラフィー、動的光散乱、超遠心分析等により解析し、構造解析に適した条件・発現領域を選択した。各ターゲットについて最適と考えられる状態で結晶化を行った。

## 4. 研究成果

### (1) インターセクチン 2

① SH3 ドメイン部分の発現と精製  
インターセクチン 2 は N 末端より 2 つの EH ドメイン、CC ドメイン、5 つの SH3 ドメイン、DH-PH ドメイン、そして最後に C2 ドメインを含むマルチドメインタンパク質である。我々は、インターセクチン 2 が様々なタンパク質と相互作用する SH3 ドメインとこの SH3 ドメインの構成に注目し、DH-PH ドメインに加えて SH3 ドメインを 1~5 個含む発現領域を検討し、タンパク質を調製した。

### ② 限定分解による解析

タンパク質のコンホメーション (揺らぎ) はプロテアーゼなどの感受性に大きく関連する。インターセクチン 2 についてトリプシンによる限定分解を行ったところ、5 つある SH3 ドメインのうち 1 番目と 2 番目の間のリンカー部分で切断されることがわかった。トリプシンのターゲットであるリジン、アルギニンは各ドメインを繋ぐリンカーのいずれにも含まれており、限定分解の結果はこの部分の揺らぎが大きい (プロテアーゼがアクセスしやすい) ことを示すものであると示唆された。実際、リンカーとしての長さもこの部分が一番長いと予想される。

### ③ 動的光散乱を用いた解析

動的光散乱ではまず溶液中での流体力学的半径が各ドメイン構成でどのように変化する

るか検討した。もしタンパク質のコンフォメーションが単にドメインの数(分子量)に依存するだけであれば、大きさと粒子径は単純な比例関係にあると思われるが、実際の結果ではドメインが増えるほどより大きくなることが示唆された。これはすなわち、ドメインが増える(例えば1→5)と分子全体の自由度または揺らぎが大きくなることを示している。さらに熱力学的プロファイルによるT<sub>m</sub>の解析では、構成ドメインの数が多いほど、T<sub>m</sub>は減少していた。よってインターセクテン2はマルチドメインであることで溶液中での不安定性を伴いながらも自由度を獲得していると考えられる。これは他で見られるマルチドメインのケース、すなわち、マルチドメイン化により分子内相互作用を増やし、安定化するという戦略とは異なるものであり、マルチドメインタンパク質であることのもうひとつの特性を示す結果であると考えられる。

これらの成果は2度の学会発表を通して広く成果を公開するとともに論文発表についても準備を進めているところである。

## (2) DOCK

### 全長での解析

すべてのDOCKファミリータンパク質(DOCK1-11)に共通して見出されるドメイン構成はDHR-1とDHR-2であり、そのうちの約半数(DOCK1-5)では、N末端にさらにSH3ドメインを持つ。またDOCK9-11では、SH3ドメインの代わりにPHドメインを持つ。

我々は、DOCKタンパク質のSH3ドメインに結合するELMO1による活性制御の分子メカニズムを明らかにするために、SH3からDHR-2までを含むほぼ全長領域の発現をDOCK1、DOCK4、DOCK5について検討した。その結果、DOCK1とDOCK5はそれぞれELMO1および基質Gタンパク質であるRac1と安定な三者複合体を形成した。その一方で、DOCK4はELMO1とは安定な複合体を形成するもののRac1との結合は比較的不安定であることが判明した。

これらのDOCKアイソフォームでの複合体の挙動の違いは、DHR-2-Rac1間の結合親和性の違いに起因することが、DOCK4 DHR-2の構造-機能解析から予想された。本成果に関しては学会発表を行い、また現在、論文発表の準備を進めている。

またSH3ドメインを持たないDOCK6、DOCK7についても全長あるいはDHR-1、DHR-2を含む複数の領域でのサンプル調製を検討した。その結果、DOCK6について、単独での全長サンプル調製に成功し、実際に精製したサンプルがCdc42に対するGEF活性を示すことを確認した。一方、DOCK7はそのN末端領域を介して、分子シャペロンであるHSP70と結合していることが判明した。そして、DOCK7単独での安定なサンプル調

製は困難であった。これらの結果から、HSP70がDOCK7分子の安定性の維持に寄与していることが予想された。

高純度で安定なサンプル調製が可能となったDOCK1-ELMO1、DOCK5-ELMO1、DOCK6についてRac1やCdc42との共結晶化を行ったところ、DOCK1-ELMO1-Rac1複合体に関して板状の結晶を得たが、良好なX線回折像が得られず構造決定には至っていない。そこでDOCK5-ELMO1複合体について、超遠心分析によりRac1の結合に伴う複合体分子の形状変化を解析した。沈降速度法による流体力学的パラメータ測定の結果、DOCK5-ELMO1複合体は長く伸びた自由度の高い構造を取ることが示された。一方、Rac1を含む複合体は、それを含まない複合体と比較してコンパクトな形状を示したことから、Rac1がDOCK5-ELMO1複合体の側面に沿うように結合することで分子の揺らぎが小さくなることが示された。

### DOCK7 DHR-2の結晶構造解析

DOCKファミリーの触媒ドメインであるDHR-2は、3つのローブから構成されるマルチサブドメイン構造をとることが知られている。これまでRacあるいはCdc42にそれぞれ特異性を示すDOCK2、DOCK9について、基質Gタンパク質との複合体の結晶構造が報告されているが、DOCKファミリーがGタンパク質を識別する分子機構の詳細は不明である。そこで多重特異性持つとされるDOCK6、DOCK7についてDHR-2の構造解析に取り組んだ。

まずDOCK6、DOCK7のDHR-2(2つのサブドメインを含む領域)を調製し、これらが*in vitro*でRac1とCdc42の両方に対するGEF活性を示すことを確認した。それぞれのタンパク質についてRac1やCdc42との共結晶化を行った結果、DOCK7 DHR-2についてCdc42複合体の状態での結晶構造の決定に成功した(図1)。

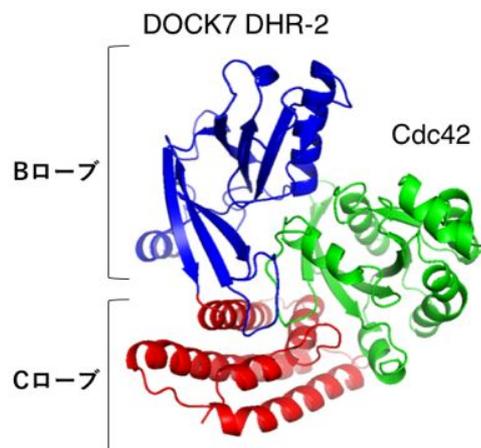


図1、DOCK7のDHR-2(青: Bローブ、赤: Cローブ)とCdc42(緑)の複合体結晶構造

さらに決定した結晶構造に基づいて DOCK7 DHR-2 と Rac1 の複合体構造モデルを構築し、分子動力学シミュレーションを行った。その結果、DOCK7 DHR-2 はアミノ酸残基の側鎖レベルのコンフォメーション変化、ならびに 2 つのローブ構造 (サブドメイン) 間の大きなコンフォメーション変化を利用して、Rac と Cdc42 の両方に対する親和性を獲得していることが示された。

本研究成果に関しては 2 件の学会発表を行っており、また現在、論文発表の準備を進めている。

#### ELMO1

乳癌細胞が浸潤する際、ELMO2-DOCK4 複合体が RhoG と会合して細胞質から細胞膜に移行し、Rac を活性化することによって細胞運動するとされている。そして ELMO の N 末端に位置する領域が RhoG とのヌクレオチド依存的な結合に関わるとされるが、その構造基盤はこれまで明らかにされていない。

そこで DOCK-ELMO 活性化機構解明の一環として、ELMO1 の N 末端領域の発現を検討するとともに、NMR 法により溶液中での立体構造を決定した。その結果、決定した構造は Raf キナーゼ、RalGDS、PI3K 等の構造既知の Ras 結合ドメインに類似したユビキチンフォールドを取ることが明らかになった。そして SPR を用いた相互作用解析により、実際に構造決定した領域が GTP 結合型の RhoG と特異的に結合することを確認した。現在、ELMO1 への変異導入により立体構造上の RhoG 会合面の同定を進めている。今後、本研究成果についても学会および論文発表を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tajiri H, Uruno T, Shirai T, Takaya D, Matsunaga S, Setoyama D, Watanabe M, Kukimoto-Niino M, Oisaki K, Ushijima M, Sanematsu F, Honma T, Terada T, Oki E, Shirasawa S, Maehara Y, Kang D, Côté JF, Yokoyama S, Kanai M, Fukui Y. Targeting Ras-Driven Cancer Cell Survival and Invasion through Selective Inhibition of DOCK1. *Cell Rep*. 2017;19(5):969-980. 査読有 DOI: [10.1016/j.celrep.2017.04.016](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.016)

〔学会発表〕(計 5 件)

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、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

村山和隆、村山加藤美幸、赤坂領吾、白水美香子、インターセクチン 2 の動的光散乱によるコンホメーション解析、2017 年 6 月 20 日~6 月 22 日、第 17 回日本蛋白質科学会年会、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

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、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

村山和隆、村山加藤美幸、赤坂領吾、杉森大助、白水美香子、インターセクチン 2 のコンホメーション解析、2016 年 11 月 25 日~11 月 27 日、第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

新野睦子、津曲千恵美、保坂俊彰、寺田貴帆、福井宣規、横山茂之、白水美香子、Dock4 DHR2 ドメインと Rac1 の複合体の結晶構造解析、2015 年 10 月 13 日~10 月 14 日、第 10 回無細胞生命科学研究会、理化学研究所横浜キャンパス交流棟ホール (神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.clst.riken.jp/ja/science/labs/ssb/struc/pfsb/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

柗元 睦子 (KUKIMOTO, Mutsuko)  
国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・上級研究員  
研究者番号: 30321756

(2)研究分担者

村山 和隆 (MURAYAMA, Kazutaka)  
東北大学・医工学研究科・准教授  
研究者番号: 40400452