

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04034

研究課題名(和文) G13-RhoGEF細胞情報伝達系の構造と分子間相互作用機構の解明

研究課題名(英文) Structure and analysis of Ga13-RhoGEF signaling mechanism

研究代表者

小笹 徹 (Kozasa, Tohru)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70202059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：G12/13-RhoGEFシグナル伝達系の分子機構を解明するために、Ga13とRhoGEF複合体の構造解析、およびG13-RhoGEFの動的相互解析を行なった。構造解析は、X線決勝構造解析およびクライオ電子顕微鏡を用いて解析を進めた。動的相互作用解析は、構造解析の情報をもとに行う計画であったが、複合体の構造決定ができなかったため、十分に解析をすることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCRシグナル伝達系は、様々な整理機能を調節していることが知られているが、G12/13-RhoGEF伝達系については、未だ十分に分子機構が解明されていない。この伝達系の分子機構を理解するために、そのG12/13-RhoGEFの複合体の構造解析、およびその動的分子間相互作用の解析を試みた。特に、本伝達系はがんの進展に関わっていることが報告されており、本研究の成果は、細胞情報伝達機構の理解だけでなく、新たな抗がん剤の開発につながることを考える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism of G13-RhoGEF signaling pathway, we tried to determine the structure and Ga13-RhoGEF complex, and dynamic mechanism of Ga13-RhoGEF interaction. As we could not determine the complex structure of G13-RhoGEF, we could not perform detailed interaction mechanism of G13 and RhoGEF.

研究分野：薬理学、生化学

キーワード：細胞情報伝達 Gタンパク質 G12/13 RhoGEF X線結晶構造解析 クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(A) 癌増殖・悪性促進機構における Gα12/13~RH-RhoGEF~Rho シグナル伝達系

Gα12/13~RH-RhoGEF~Rho シグナル伝達系の活性化は癌の増殖・悪性促進機構 EMT (epithelial-mesenchymal transition ; 上皮間葉転換) に深く関連している。実際に、癌と関連する GPCR の殆どは G12/13 と共役し、G12/13 共役 GPCR が乳癌、大腸癌等で異所性に過剰発現されている)。また、転移性の高い乳癌において Gα13 が高発現していることも示され、大腸癌・乳癌・白血病等の増殖・転移浸潤に G12/13 シグナルが決定的に作動していることが明らかとなった。そのため G12/13 シグナルは癌治療薬の新標的として極めて重要である。

(B) RH-RhoGEF によるシグナルの双方向性制御 (図1)

三量体 G 蛋白は、G 蛋白共役型受容体 (GPCR) によって活性化され、不活性型”Gα-GDP”から活性型”Gα-GTP”に変換される。Gα-GTP は、エフェクターを活性化させ、生体応答を惹起する。一方、GTPase 活性化蛋白 (GAP) である RGS (Regulator of G protein signaling) 蛋白は、Gαの内在性 GTP 加水分解能を促進して Gα-GTP を不活性型 Gα-GDP に変換し、シグナルを遮断する。

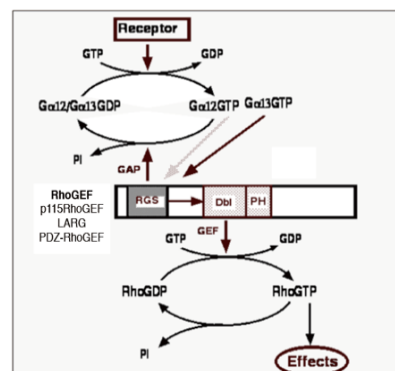
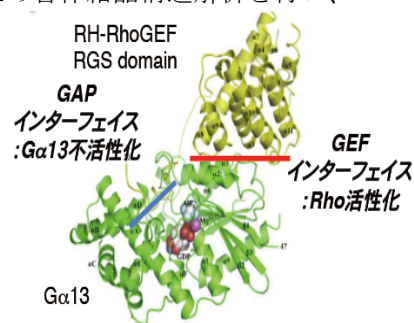


図1 Gα12/13-RhoGEFシグナル伝達系

Gα12/13 は、エフェクターである Rho 活性化因子 (Rho guanine nucleotide exchange factor : RhoGEF) を活性化して、Rho を活性型に変換してシグナルを伝える。この RhoGEF は、RGS ホモロジードメイン (RH) を所有し (RH-RhoGEF と呼ばれる。p115RhoGEF、leukemia-associated RhoGEF (LARG) PDZ-RhoGEF/GTRAP48 があり、N 端に RH domain、C 端に DH/PH domain を持つ)、この RH ドメインを介して上流のシグナルを遮断する。RH-RhoGEF は 1 分子内に RH ドメインと GEF 活性を持つ DH/PH (Dbl homology/pleckstrin homology) ドメインを持ち、シグナルを双方向性に制御して、その時間的空間的分解能を高精度に保っている。

(C) Gα13 と RH-RhoGEF の RH ドメインの結晶構造解明の成功

私達は、Gα12/13 による RH-RhoGEF の活性化機序を解明するため合体結晶構造解析を行い、Gα13 と RH-RhoGEF の RH ドメインの結晶構造を解明した (Kozasa et al. J Biol Chem 186, 2011) (図2)。Gα13 と RH ドメインの結合が GEF 活性化に決定的である事、また GEF 活性化と GAP 活性化それぞれに重要な領域を同定することができた。しかし、GEF 活性化には Gα13 と DH/PH ドメインの相互作用も重要である事が示唆されている。そこで本研究では、Gα13 と RH、DH/PH 両ドメインを含む複合体結晶構造の解明および、Gα13 と RhoGEF の動的相互作用の解明を目指した。



(図2) 複合体インターフェイス

2. 研究の目的

三量体 G 蛋白質 G12 サブファミリー (G12/13) を介した G12/13-RH-RhoGEF-RhoA シグナル伝達系は、様々な癌の増殖・悪性促進機構に深く関わっていて、創薬のターゲットとして極めて重要である。しかし、上述のように、その分子作動機構の詳細は未だに不明であり、新規治療薬開発の障害となっている。G 蛋白シグナルは、蛋白質複合体の構造変化により伝達される。この構造変化は少数のアミノ酸残基からなる hot spot によって制御されている。本課題では X 線結晶構造解析 (平衡状態) と、精製タンパク質の再構成系を用いた熱力学的・反応速度論的解析 (非

平衡状態)を併用することにより、複合体構造変化に伴う分子間相互作用を解明し、構造変化での hot spot を同定して、そこを標的とした癌に対する創薬の基盤を創ることを目標とする。

3. 研究の方法

本課題では、Gal3, RhoGEF, RhoA を Sf9-Baculovirus 発現系を用いて精製して、それらの複合体の X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡による構造解析を試みた。また、精製タンパク質の再構成系と SPR(表面プラズモン共鳴)法を用いた熱力学的・反応速度論的解析により、構造変化での hot spot の同定を試みた。

4. 研究成果

G12/13-RhoGEF 複合体の結晶構造解析では、様々な RhoGEF のコンストラクトを用いたが複合体のタンパク質が不安定で、結晶化には至らなかった。そのため、クライオ電子顕微鏡を用いた解析法を試みた。クライオ電子顕微鏡では、複合体粒子の像は得られたが、解像度が低く、また複数の構造が混在しているため、最終的な構造を決定することはできなかった。そのため、残念ながら複合体構造変化に伴う、hot spot の同定には至らなかった。今後とも、クライオ電子顕微鏡による G12/13-RhoGEF 複合体構造解析を進めて、相互作用における hot spot の同定を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柘元 睦子 (Kukimoto Mutuko) (30321756)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関