

令和元年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15072

研究課題名(和文)「場」の成熟を見極めて機能する新規RabGEFの構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural analysis of novel RabGEF proteins

研究代表者

伊藤 桜子 (ITO, Sakurako)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：60597152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量GTPaseであるRabファミリータンパク質は、真核生物のメンブレントラフィックの主要な制御因子であり、Rabグアニンヌクレオチド交換因子(RabGEF)によって活性化される。本研究では、新規のRabGEFであるSH3BP5とRab11aとの複合体の立体構造解析を行った。SH3BP5は2つのコイルドコイルからなるV字型構造で、Rab11aのスイッチ1領域を外側に引き出してヌクレオチド交換を促進していた。変異体を用いたGEF活性実験により、Rab11aのN末端領域、スイッチ1領域、インタースイッチ領域、スイッチ2領域とSH3BP5の相互作用の中に活性に必須な相互作用が見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RabGEFのヌクレオチド交換触媒ドメインは多様であることが知られている。本研究では、SH3BP5-Rab11a複合体の立体構造解析により、新規のRabGEFであるSH3BP5の反応機構を解明した。また、連携研究者である群馬大学の佐藤健研究室との共同研究により、SH3BP5の細胞内挙動を解析した。論文執筆中に、カナダのグループからSH3BP5-Rab11a複合体構造についての論文がnature communicationsに発表されてしまった。その内容は我々の研究成果と一致するものであり、我々の結果を裏付けた。得られた研究成果をまとめてLife Science Allianceに発表した。

研究成果の概要(英文)：We have determined the crystal structure of a complex of Rab11a and its novel GEF, SH3BP5. SH3BP5 harbors the V-shaped structure composed of two coiled coils. SH3BP5 pulls out the switch I region of Rab11a, and thereby promotes the nucleotide exchange. Mutational analysis based on the structure elucidated important interactions between SH3BP5 and Rab11a.

研究分野：X線結晶構造解析

キーワード：Rab GEF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内は絶えず流動的に変化しており、輸送小胞を用いた物質輸送や細胞小器官の成熟化などが起こっている。Rab ファミリータンパク質は、ヒトで65種以上もある低分子量GTPaseであり、各Rabは、対応する細胞小器官の目印として膜表面に局在している。細胞質で、不活性型Rab(GDP)は、グアニンヌクレオチド解離阻害因子(GDI)に結合して、膜局在に必要な疎水性脂質基を覆われて可溶化している。適切なタイミングになると、RabはGDIから引き抜かれて膜に挿入され、Rabグアニンヌクレオチド交換因子(RabGEF)がRabをGTP結合活性型に変換すると、下流のエフェクター因子がリクルートされる。RabGEFのヌクレオチド交換触媒ドメインは多様で、未だ約半数のRabは対応するGEFが同定されていない。これは、ほぼ全てのRabGTPase活性化タンパク質(RabGAP)の活性ドメインがTBCドメインであることと比較すると、RabGEFの機能的な多様性を示唆する。更に、RabGEFは活性ドメイン以外にも多様なドメインを持つ。代表的なRabGEF活性ドメイン(DENNドメイン型、Vps9ドメイン型、コイルドコイル型など)については立体構造に基づいた反応機構が解明されつつあるが、RabGEFの機能の全容は明らかでない。

2. 研究の目的

Rab11はリサイクリングエンドソームや分泌経路における重要な制御因子である。2015年、協同研究者である群馬大学の佐藤教授らがREI-1/SH3BP5をRab11のGEFとして同定した[Sakaguchi et al., *Dev Cell*, 2015]。本研究では、新規のRabGEFであるSH3BP5の反応機構を解明することを目的に、SH3BP5-Rab11a複合体の立体構造解析を行った。なお、研究当初は、同じく新規RabGEFであったヘテロダイマー型Rab7GEF(Mon1-Ccz1)も研究対象としていたが、2017年1月にドイツのグループから立体構造が発表されたため、本研究ではSH3BP5の研究を中心に行った。

3. 研究の方法

本研究では、ヒトRab11のGEFであるSH3BP5について、SH3BP5単体とSH3BP5-Rab11a複合体の立体構造をX線結晶構造解析法により決定した。得られた立体構造情報は、SH3BP5およびRab11a双方の変異体を用いた活性測定を行うことにより検証した。

4. 研究成果

SH3BP5は2つのコイルドコイルからなるV字型構造を取っており、一方のコイルドコイルのみがRab11aとの結合と触媒活性に十分であることが、生化学的な解析により明らかになった。SH3BP5はRab11aのヌクレオチド結合を担うスイッチ1領域を外側に引き出すことによって、ヌクレオチド交換を促進していた。

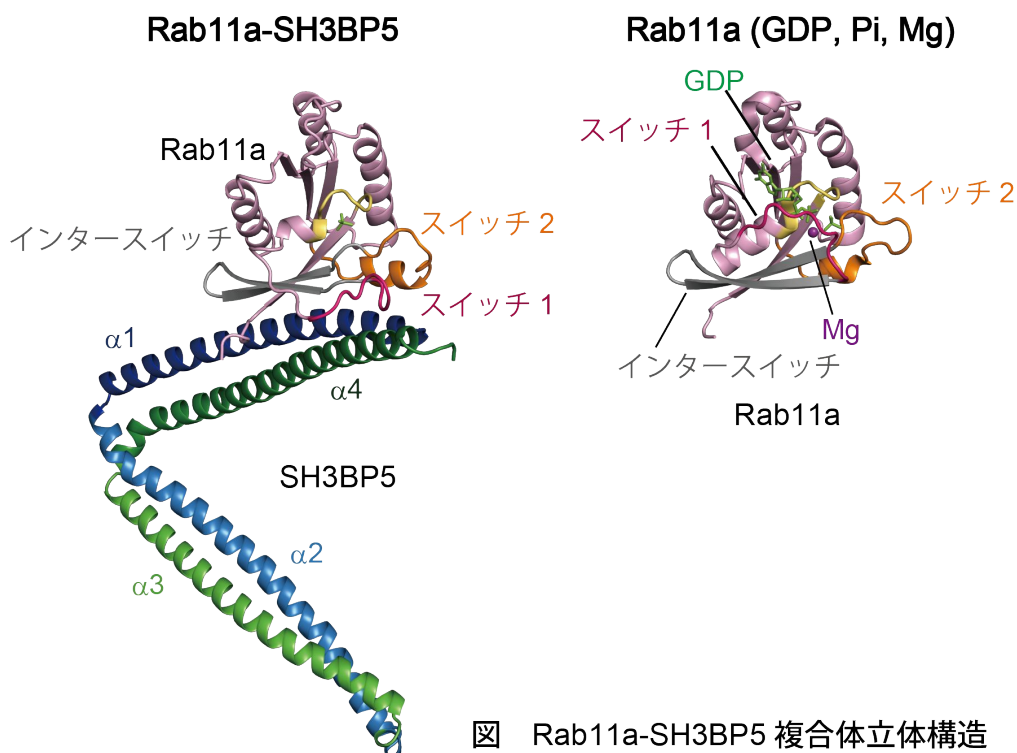


図 Rab11a-SH3BP5 複合体立体構造

変異体を用いたGEF活性実験により、Rab11aのスイッチ1領域とSH3BP5との相互作用が活性に必須であることが明らかになった。更に、Rab11aのN末端領域、インタースイッチ領域、ス

スイッチ 2 領域と SH3BP5 の相互作用の中にも、活性に必須である相互作用が見いだされた。アミノ酸の保存性解析により、SH3BP5 の V 字型構造や見いだされた反応機構はヒト以外の生物種でも保存されていることが強く示唆された。

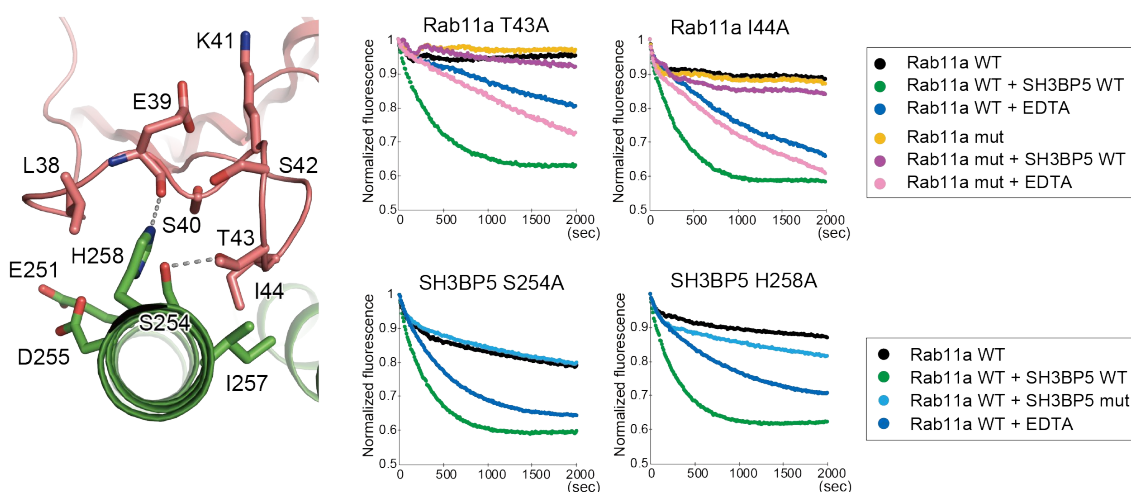


図 Rab11a スイッチ 1 領域と SH3BP5 相互作用と変異体の GEF 活性

また、連携研究者である群馬大学の佐藤健研究室との共同研究により、SH3BP5 と SH3BP5-like protein がリサイクリングエンドソーム上で Rab11a と共局在すること、SH3BP5 と SH3BP5-like protein が Rab11 ファミリー (Rab11a, Rab11b, Rab25) 特異的な活性を持つことを明らかにした。

論文執筆中に、カナダのグループから、SH3BP5-Rab11a 複合体の立体構造についての論文が nature communications に発表されてしまった。その内容は我々の研究成果と一致するものであり、我々が得た結果が裏付けられる形となった。我々も、得られた研究成果をまとめて Life Science Alliance に発表した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Structural basis of guanine nucleotide exchange for Rab11 by SH3BP5.

Goto-Ito S, Morooka N, Yamagata A, Sato Y, Sato K, Fukai S.

Life Sci Alliance. 2019 Mar 14;2(2). pii: e201900297. doi: 10.26508/lsa.201900297. Print 2019 Apr.

査読あり

Structural insights into modulation and selectivity of transsynaptic neurexin-LRRTM interaction.

Yamagata A, Goto-Ito S, Sato Y, Shiroshima T, Maeda A, Watanabe M, Saitoh T, Maenaka K, Terada T, Yoshida T, Uemura T, Fukai S.

Nat Commun. 2018 Sep 27;9(1):3964. doi: 10.1038/s41467-018-06333-8.

査読あり

Structural basis of trans-synaptic interactions between PTPδ and SALMs for inducing synapse formation.

Goto-Ito S, Yamagata A, Sato Y, Uemura T, Shiroshima T, Maeda A, Imai A, Mori H, Yoshida T, Fukai S.

Nat Commun. 2018 Jan 18;9(1):269. doi: 10.1038/s41467-017-02417-z.

査読あり

Structural basis for specific cleavage of Lys6-linked polyubiquitin chains by USP30.

Sato Y, Okatsu K, Saeki Y, Yamano K, Matsuda N, Kaiho A, Yamagata A, Goto-Ito S, Ishikawa M, Hashimoto Y, Tanaka K, Fukai S.

Nat Struct Mol Biol. 2017 Nov;24(11):911-919. doi: 10.1038/nsmb.3469. Epub 2017 Sep 25.

査読あり

Structural basis of the interaction between Topoisomerase IIIβ and the TDRD3 auxiliary factor.

Goto-Ito S, Yamagata A, Takahashi TS, Sato Y, Fukai S.

Sci Rep. 2017 Feb 8;7:42123. doi: 10.1038/srep42123.

査読あり

Crystal structure of Sec10, a subunit of the exocyst complex.

Chen J, Yamagata A, Kubota K, Sato Y, Goto-Ito S, Fukai S.

Sci Rep. 2017 Jan 18;7:40909. doi: 10.1038/srep40909.

査読あり

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 佐藤 健

ローマ字氏名: (SATO, Ken)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。