

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06575

研究課題名(和文)細胞運動を調節するタンパク質の構造的基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the structural basis of proteins that regulate cell motility

研究代表者

柊元 睦子(Kukimoto, Niino)

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

研究者番号：30321756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞運動を制御する足場タンパク質であるELMOに着目し、Racの活性化因子であるDOCKおよび上流制御因子との複合体の構造解析を行い、ELMO-DOCK-Racによる細胞骨格の制御機構を明らかにすることを目的とした。ELM01-DOCK5-Rac1複合体の全体構造をクライオ電子顕微鏡により決定し、ELM01が遷移状態のRac1に結合し、DOCK5によるRac1活性化の効率を高めていることを明らかにした。また、ELM01とその上流制御因子の一つであるRhoGとの複合体のX線結晶構造解析から、ELM01による新しいGタンパク質結合様式が存在を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DOCK5は、上皮細胞の浸潤・転移を促進し、がんの進行に関与することが知られている。また、DOCK5は、破骨細胞が骨吸収する際の骨への接着機能を制御しており、抗骨粗鬆症薬の開発ターゲットとしても期待されている。本研究により、DOCK5や他のDOCKファミリータンパク質がGタンパク質を活性化を制御するメカニズムがさらに解明されれば、これらの疾患に対する新しい治療薬の開発に道が拓けると期待される。また、今回発見したELM01-RhoG複合体における新規の会合面は、がんの浸潤を制御するための低分子化合物などの設計に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on ELMO, a scaffold protein that regulates cell motility, and analyzed its three-dimensional structure in complex with DOCK, an activator of Rac, and upstream regulators to clarify the mechanism of cytoskeletal regulation by ELMO-DOCK-Rac. The overall structure of the ELM01-DOCK5-Rac1 complex was determined by cryo-EM and revealed that ELM01 binds to Rac1 in the transition state and enhances the efficiency of Rac1 activation by DOCK5. X-ray crystallographic analysis of ELM01 in complex with RhoG, one of its upstream regulators, revealed the existence of a novel G-protein binding mode by ELM01.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 クライオ電子顕微鏡 Gタンパク質 シグナル伝達 細胞骨格 Rac DOCK ELM0

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞運動は、免疫細胞の遊走や神経突起の伸長など生体内で重要な役割を果たすとともに、がんの浸潤や転移にも関連している。低分子量 G タンパク質である Rac は、GTP 結合型 (活性型) と GDP 結合型 (不活性型) の間を循環して、アクチン細胞骨格を制御する分子スイッチである。活性化した Rac は、細胞の形態変化を誘導することでがん細胞の運動を促進する。したがって、Rac の活性化因子であるグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) は、がん治療薬のターゲットになる可能性があると考えられている。

DOCK (Dedicator of cell motility) は、Rho ファミリー G タンパク質の GEF であり、古くから知られる DH ファミリーの Rho GEF とは異なる構造と触媒機構を持っている。11 の DOCK ファミリー分子に共通するドメイン DHR-1 と 2 は、それぞれ細胞膜への結合と GEF 触媒活性を担っている。さらに 5 分子 (DOCK1~DOCK5) は、SH3 ドメインを持ち、足場タンパク質である ELMO (Engulfment and cell motility) と結合して Rac を活性化し、細胞運動を誘導する。DOCK1 の活性は、SH3 と DHR-2 ドメインの分子内相互作用によって抑制され、ELMO の結合によってその自己抑制が解除されることが明らかにされている。しかし、DOCK と ELMO の部分構造の解析は行われているものの、全体構造は不明であり、両者が協調して Rac を活性化する構造基盤は不明であった。

また、近年、低分子量 G タンパク質 RhoG、ヘテロ三量体 G タンパク質サブユニット G<sub>i</sub> と G<sub>q</sub>、接着性 GPCR BAI など、いくつかのタンパク質が ELMO に結合し、ELMO-DOCK-Rac シグナルを活性化することが明らかにされている。しかし、これらの上流制御因子が ELMO に結合する構造的な根拠は不明なままであった。

### 2. 研究の目的

本研究では、DOCK および ELMO とその上流の制御因子との複合体の立体構造を、X 線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡を用いて解析し、ELMO-DOCK-Rac による細胞運動誘導シグナルの制御機構を明らかにすることを目的とした。また、これらのタンパク質構造に基づき、Rac シグナルを特異的に阻害する新規タンパク質間相互作用の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ELMO と上流制御因子の結晶構造解析

ELMO1 (全長 727 アミノ酸残基) は、N 末端から Ras 結合ドメイン (RBD)、ELMO 抑制ドメイン、ELMO ドメイン、PH ドメイン、ELMO 自己制御ドメイン、プロリンリッチドメイン (PxxP) から構成される足場タンパク質である。

まず、上流制御因子との共結晶構造解析を目的として、大腸菌セルフリータンパク質合成系を用いて、ELMO1 の構造解析に最適な発現領域の検討を行った。上流制御因子については、バキュロウイルス発現系を用いて、RhoG、ヘテロ三量体 G タンパク質サブユニット G<sub>i1</sub> および G<sub>q</sub> の高純度タンパク質を調製した。これらの上流因子と ELMO1 の複合体の結晶化条件を探索した。また、表面プラズモン共鳴法 (Surface plasmon resonance: SPR) による相互作用解析を行った。

#### (2) ELMO-DOCK のクライオ電子顕微鏡構造解析

次に、ELMO-DOCK の全体構造を明らかにするため、HEK293F 細胞発現系を用いて ELMO1 と DOCK5 を共発現し、ELMO1-DOCK5 複合体を調製した。さらに基質 G タンパク質である Rac1 を結合した状態の ELMO1-DOCK5 複合体を調製し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行った。解析した構造に基づき、ELMO1 変異体の生化学的解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ELMO と上流制御因子の結晶構造解析

ELMO1 の RBD ドメインと RhoG の共結晶化スクリーニングの結果、良好な回折を示す結晶が得られた。結晶化条件を最適化した後、SPRING-8 の BL26B2 ビームラインを利用して、両者の複合体の結晶構造を 1.6 オングストローム分解能で決定することに成功した。結晶の空間群は P2<sub>1</sub>、格子定数は a = 75, b = 64, c = 115 オングストローム、 $\beta = 100^\circ$  であった。先に決定している ELMO1-RBD 単独の NMR 構造 (未発表) と活性型 Ras の構造 (PDB ID: 4GON) を用いて、分子置換法により構造を決定した。

結晶の非対称単位には、ELMO1-RBD と活性型 RhoG の複合体が 4 つ含まれていた。ELMO1-RBD は、Ras のエフェクターである Raf などの RBD と同様のユビキチンフォールドを取る一方で、予想外にも Ras のエフェクターとは全く異なる結合様式で G タンパク質と結合することが明らかになった (図 1)。すなわち、構造既知の Ras エフェクターはすべて G タンパク質 (Ras) のスイッチ 1 に結合するのに対し、ELMO1-RBD は RhoG のスイッチ 1 と 2 の両方に結合していた。

結晶構造を検証するために、ELM01の6つのアミノ酸残基の点変異体を作成し、SPRにより各アミノ酸残基のRhoGへの結合への寄与を評価した。その結果、ELM01-RBDのRhoGとの静電的相互作用および疎水的な相互作用に関わるLys9、Glu13、Leu21をそれぞれアラニンに置換すると、GTP S結合型RhoGに対する結合能が大幅に低下することがわかった。相互作用

面周辺の2つの変異もRhoGとの結合親和性をわずかに低下させた。一方、遠位の変異は結合にほとんど影響を与えなかった。これらの結果から、今回決定した結晶構造は、溶液中のELM01-RBDとRhoGの相互作用を反映していることが示唆された。

これらの成果について、現在、論文投稿準備を進めている。

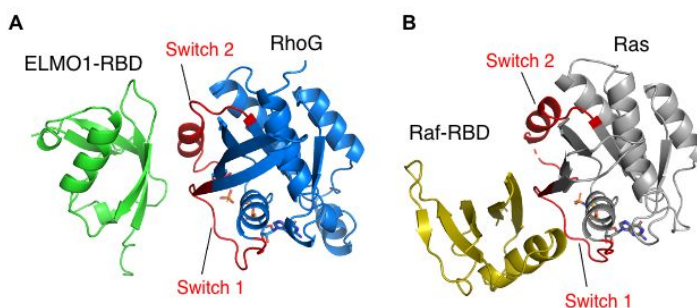


図1 (A) 決定したELM01-RBDとRhoGの複合体の結晶構造 (B) 既知のRaf-RBDとRasの複合体の結晶構造 (PDBコード: 4GON)

## (2) ELM0-DOCKのクライオ電子顕微鏡構造解析

ELM0がDOCKのGEF活性にどのように関わるのかを明らかにするために、Rac1が結合した状態のELM01-DOCK5複合体のクライオ電子顕微鏡の単粒子解析を行った。ELM01-DOCK5-Rac1複合体の2回対称性のある明確なマップを構築し、全体分解能で3.8オングストロームのクライオ電子顕微鏡の密度マップが得られた。類縁構造から作成したDHR-1、DHR-2、SH3の各ドメインのホモロジーモデルをマップに当てはめ、さらに未知領域の三次構造予測計算を行い、最終的にほぼ完全長のDOCK5(全長1,840アミノ酸残基のうちC末端領域を除く1,642アミノ酸残基)の構造を決定した(図2)。

決定した構造は、ELM01-DOCK5-Rac1のヘテロ三量体が2つ会合したホモ二量体の構造をとっていた。この二量体はDOCK5のDHR-2ドメインを中心とする湾曲した構造をとり、両端に位置するDHR-1ドメインが同じ方向を向くことで、細胞膜に安定して結合できると考えられた。

また、決定したELM01-DOCK5-Rac1複合体では、ELM01のC末端にあるPHドメインがRac1およびDOCK5のDHR-2ドメインとの三者間で相互作用して

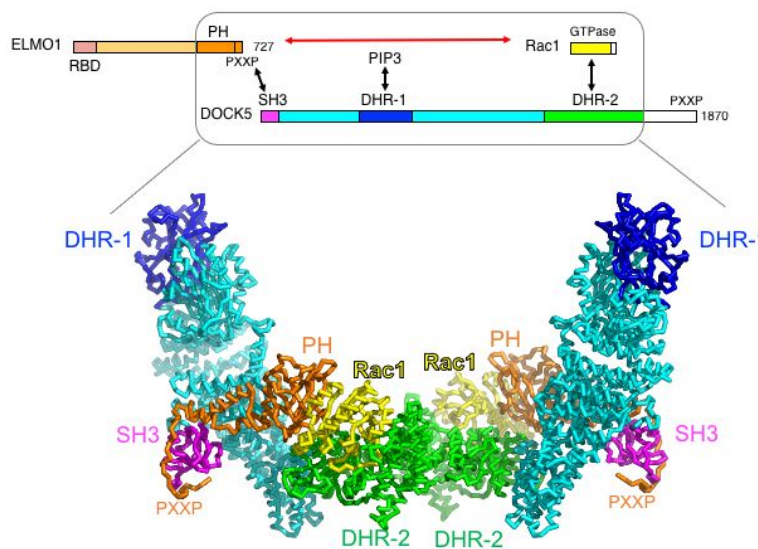


図2 ELM01-DOCK5-Rac1三者複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析

いることがわかった。これまで、Rac1とDHR-2ドメインの結合様式は知られていたが、DOCK5の結合パートナーであるELM01とRac1が直接、相互作用することが示されたのは、今回が初めてであった。一方、ELM01のN末端から530アミノ酸残基の領域(RBDからELM0ドメインまで)は、クライオ電子顕微鏡密度マップが観測されなかった。ELM01のN末端領域は、(1)で解析したRhoGなどの上流制御因子との結合に関与することが知られており、今回の解析から、この機能のために柔軟な構造をとっていることが示唆された。

解析した構造を検証するため、ELM01のRac1やDOCK5との相互作用に関与するアミノ酸残基の点変異体を作成し、GEF活性への影響を調べた。その結果、ELM01-DOCK5複合体においてRac1との結合に関わるELM01のPHドメインに2つの変異を導入すると、Rac1活性化率が30%減少した。これらの結果から、ELM01のC末端領域がRac1活性化に重要であり、ELM01がRac1との特異的な相互作用を通じてDOCK5によるRac1活性化を制御していることが示唆された。

本研究成果は、2021年に*Science Advances*誌で発表した。この発表論文は、理化学研究所プレスリリースにおいても公開した(2021年7月)。また、RIKEN Research Highlightにも採択された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakurai Tetsuya, Kukimoto-Niino Mutsuko, Kunimura Kazufumi, Yamane Nana, Sakata Daiji, Aihara Ryosuke, Yasuda Tomoharu, Yokoyama Shigeyuki, Shirouzu Mikako, Fukui Yoshinori, Uruno Takehito	4. 巻 4
2. 論文標題 A conserved PI(4,5)P2-binding domain is critical for immune regulatory function of DOCK8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000873
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kukimoto-Niino Mutsuko, Katsura Kazushige, Kaushik Rahul, Ehara Haruhiko, Yokoyama Takeshi, Uchikubo-Kamo Tomomi, Nakagawa Reiko, Mishima-Tsumagari Chiemi, Yonemochi Mayumi, Ikeda Mariko, Hanada Kazuharu, Zhang Kam Y. J., Shirouzu Mikako	4. 巻 7
2. 論文標題 Cryo-EM structure of the human ELM01-DOCK5-Rac1 complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabg3147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abg3147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kukimoto-Niino Mutsuko, Ihara Kentaro, Murayama Kazutaka, Shirouzu Mikako	4. 巻 71
2. 論文標題 Structural insights into the small GTPase specificity of the DOCK guanine nucleotide exchange factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 249 ~ 258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sbi.2021.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新野睦子、津田健吾、津曲千恵美、伊原健太郎、白水美香子
2. 発表標題 ELM01のN末端領域とRhoGの複合体の結晶構造解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新野 睦子、桂 一茂、Rahul Kaushik、江原 晴彦、横山 武司、加茂 友美、中川 れい子、津曲 千恵美、米持 まゆ美、池田 眞理子、花田和晴、Kam Zhang、白水 美香子
2. 発表標題 細胞運動の調節に関わるELM01-DOCK5-Rac1複合体のクライオ電子顕微鏡構造
3. 学会等名 第94回日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>理化学研究所 プレスリリース  <a href="https://www.riken.jp/press/2021/20210722_2/index.html">https://www.riken.jp/press/2021/20210722_2/index.html</a></p> <p>RIKEN Research Highlight  <a href="https://www.riken.jp/en/news_pubs/research_news/rr/20211101_1/index.html">https://www.riken.jp/en/news_pubs/research_news/rr/20211101_1/index.html</a></p>
---

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

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
---------	---------