

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08289

研究課題名(和文) ADPリボシル化酵素C3のRhoGTPase認識機構の解明

研究課題名(英文) Rho GTPase Recognition Mechanism of ADP-ribosylating C3 exoenzyme

研究代表者

津下 英明 (TSUGE, Hideaki)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：40299342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：RhoA特異的ADPリボシル化酵素C3酵素(毒素)と基質RhoAの複合体結晶を作成し、複合体の結晶構造を明らかにした(Toda et al, JBC 2015)。C3酵素(毒素)のRho GTPase認識機構を明らかにした。C3がタンパク質基質RhoA全体を認識し、さらにADPリボシル化するAsn41を特異的に認識する。特に後者の認識は重要で、C3のARTT-loopのQXEのGln183がRhoA Asn41と水素結合を作ることで、特異的なAsn41のADPリボシル化を保證する。ARTT-loopの修飾アミノ酸の認識を結晶構造で捉え、目で見える形で明らかにしたことは世界で初めてである。

研究成果の概要(英文)：C3 exoenzyme is a mono-ADP-ribosyltransferase (ART) that catalyzes transfer of an ADP-ribose moiety from NAD(+) to Rho GTPases. C3 has long been used to study the diverse regulatory functions of Rho GTPases. How C3 recognizes its substrate and how ADP-ribosylation proceeds are still poorly understood. We determined the crystal structure of the C3 exoenzyme-RhoA complex. It reveals that C3 recognizes RhoA via the switch I, switch II, and interswitch regions. In C3-RhoA(GTP) and C3-RhoA(GDP), switch I and II adopt the GDP and GTP conformations, respectively, which explains why C3 can ADP-ribosylate both nucleotide forms. Based on structural information, we successfully changed Cdc42 to an active substrate with combined mutations in the C3-Rho GTPase interface. The structure shows directly for the first time that the ARTT loop is the key to target protein recognition, and they also serve to bridge the gaps among independent studies of Rho GTPases and C3.

研究分野：構造生物学、生物物理学

キーワード：ADPリボシル化 基質特異性 C3 RhoA Cdc42 タンパク質複合体 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

RhoA特異的ADPリボシル化酵素C3 exoenzymeはRhoAのAsn41を特異的にADPリボシル化する毒素であり、1989年に見出された。代表的なRhoファミリー分子にはRhoA, Rac1, Cdc42があるが、C3はRhoAのみをADPリボシル化する。この特異性を利用して、Alan Hall (メモリアルスローンケタリングがんセンター)らは、RhoAがストレスファイバーと接着斑を、Rac1が葉状仮足を、Cdc42が糸状仮足を、それぞれ誘導することを見出した。このような生物学的に重要な知見をもたらしたC3のRhoAに対する特異性に、RhoAの研究者を含む多くの研究グループが興味を抱いてきたが、その相互作用とADPリボシル化の機構はよくわかっていなかった。最初に見つかったボツリヌス菌のC3 exoenzymeに続いて、現在7つの異なる種類のC3が見出されている。ボツリヌス菌由来のC3bot1、C3bot2、*C. limosum*由来のC3lim、黄色ブドウ球菌由来のC3stau1、C3stau2、C3stau3およびセレウス菌由来のC3cerがある。それぞれのC3でRho GTPaseに対する特異性は少しずつ異なるが、C3cerはRhoAのみを修飾する。RhoAとよく似たsmall GTPaseであるRac1、Cdc42はRhoAでADPリボシル化されるAsn41と同じ位置にAsnを持っているにもかかわらずC3の基質とならない。

2. 研究の目的

この研究の目的はC3毒素-基質タンパク質RhoAの複合体の結晶構造解析を行うことで、C3の基質タンパク質の認識機構すなわち(1) C3がRhoAをどのように認識し、(2) RhoAのAsn41をADP-リボシル化するのに答えることにある。細菌が持つADPリボシル化する毒素はC3以外にも多くある。以前から我々のグループで研究しているアクチン特異的ADPリボシル化毒素IaはアクチンのArg177を修飾する。最終的には、このように多様なADPリボシル化酵素の基質タンパク質特異性と修飾するアミノ酸の特異性の理解を目的とする。

3. 研究の方法

C3毒素と基質タンパク質ヒトRhoAを発現、精製して結晶化し、X線結晶構造解析によりその複合体の構造を決定する。単体の結晶化に比べて複合体の結晶化は難しく、ADP-リボシル化酵素(ARTC)と基質タンパク質複合体の構造で明らかになっているのは他に我々が明らかにしたIa-アクチンのみである(Tsuge et al. PNAS (2008), Tsurumura et al. PNAS (2013))。酵素-タンパク質基質RhoAは2つの型のGDP型、GTP型が存在し、細胞内のシグナルスイッチとして働く。RhoAのシグナル伝達スイッチとして機能する可変領域(switch Iとswitch II)はRhoA(GDP)とRhoA(GTP)で大きく構造が異なることが知られている。C3はどちら

の型もADP-リボシル化することがわかっており、どちらも結晶化を試みる。また、本来の基質であるNAD⁺であるが、ADPリボシル化反応をしないNADHを用いて、結晶化を行う。できた結晶は当大学のインハウスX線装置および高分解能データはシンクロトロンでのデータ収集を行う。位相解析など結晶構造解析は当研究室で行う。また得られた複合体構造情報から点変異体を作成し、基質となるRhoA、基質とならないCdc42の基質変更実験を行う。

4. 研究成果

我々はセレウス菌由来のC3を用いて、GTPが結合したRhoA(RhoA(GTP))とC3の複合体および、GDPが結合したRhoA(RhoA(GDP))とC3の複合体の結晶化に初めて成功し、その立体構造(apo-C3-RhoA(GTP))を決定した。さらに、この結晶をNADHを含む溶液にソーキングした後にX線回折データを収集することで、NADH、RhoA、C3の3者複合体の結晶構造NADH-C3-RhoA(GTP)とNADH-C3-RhoA(GDP)を明らかにした(図1)。

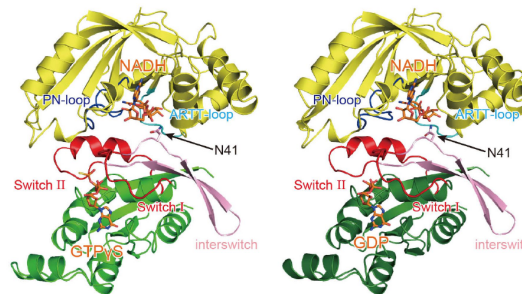


図1: Left, Overall structure of the NADH-bound C3cer-RhoA(GTP). Right, Overall structure of the NADH-bound C3cer-RhoA(GDP).

RhoA(GDP)とRhoA(GTP)のC3による認識構造

RhoAのシグナル伝達スイッチとして機能する可変領域(switch Iとswitch II)はRhoA(GDP)とRhoA(GTP)で大きく構造が異なることが知られていた。しかしながら、C3が結合した複合体構造ではC3-RhoA(GDP)およびC3-RhoA(GTP)はどちらも同じ可変領域の構造をとっていた(switch Iは単体のRhoA(GDP)と同じ、switch IIは単体のRhoA(GTP)と同じ)(図2)。これはC3の結

合によりこの部分が構造変化をおこしたと考えられる。このような結合により、C3はRhoA(GDP)とRhoA(GTP)のどちらの状態でもADPリボシル化することが可能である。

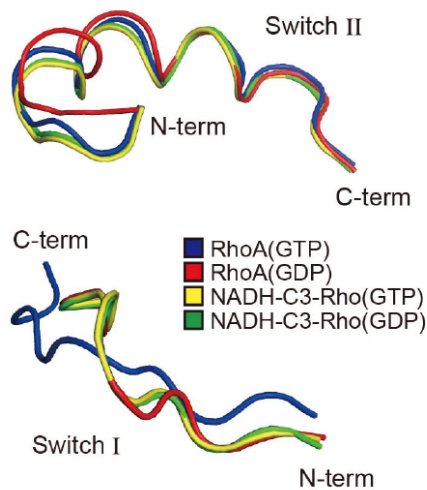


図2： Conformations of the main chains in switch I and switch II of RhoA

C3-RhoAの相互作用

C3はRhoAをNAD近傍の4つのループと少し離れた1つのループVIで認識する。これらのループはloop II (45-52: 活性部位ループ), loop III (100-110: アデニンループ), loop IV (148-156: リン酸ニコチンアミドループ (PN-loop)), loop V (175-183: ADPリボシル化毒素ターンターナループ (ARTT-loop)), loop VI (206-209: NADから離れた位置に存在するループ)である。RhoA側から見ると、C3で認識される部位は、シグナルによって構造が変わるswitch I(28-38)とswitch II(61-78)とそこに存在するinter switch領域(39-60)であった。

C3はなぜRhoAに対して特異的か

Rho GTPaseのswitch II(61-78)領域は、RhoA, Rac1, Cdc42 3つで保存されており、そのRhoA特異性に関与していないと考えられた。switch Iとinter switchで幾つかの保存されていないアミノ酸が特異性に関わっていると考え、RhoAでこれらのアミノ酸を変異させると大きく活性が下がった。一方基質とならないCdc42にこれらの4重変異を加えることにより、良い基質とすることに成功した(図3)。重要な4つのアミノ酸はTrp58, Glu54, Glu40, Val43であった。

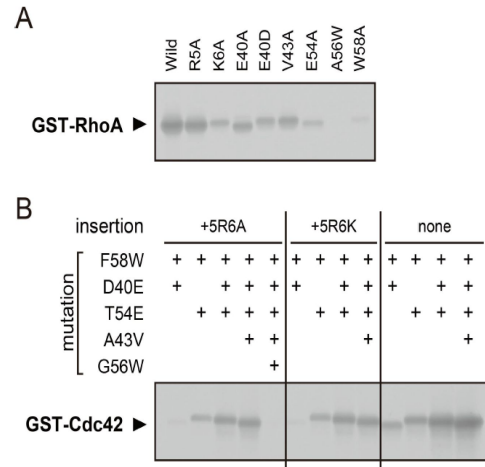


図3： ADP-ribosylation of RhoA and Cdc42 mutants by C3cer.

ARTTループがADPリボシル化される基質アミノ酸の特異性を決める

IaとC3はどちらも似た構造を持つADPリボシル化毒素であるが、その基質はアクチンのArg177とRhoAのAsn41である。毒素には共通したADP-ribosylation turn turn loop (ARTT loop)があり、最初のターンに存在する疎水性側鎖が基質RhoAの認識をし、次のターンに存在するQXEのグルタミンが修飾されるRhoA Asn41の認識に関わると予測されていた。一方IaではEXEであり、最初のグルタミン酸が修飾されるアクチンのArg177の認識に関わる、すなわち、修飾アミノ酸に選別は、このように行われていると予測されていたが、その実験的な証明はされていなかった。C3-RhoAの複合体構造は、Gln(QXE)がRhoA Asn41と水素結合を形成して、特異的な認識をし、さらに、この近傍にNADHのNC1が存在していることを明らかにした(図4)。また最初のターンに存在する疎水性側鎖Tyr180がRhoAの疎水性領域に結合している様子も初めて明らかにした。この関係はADPリボシル化にとって理想的な関係であると考えられる。

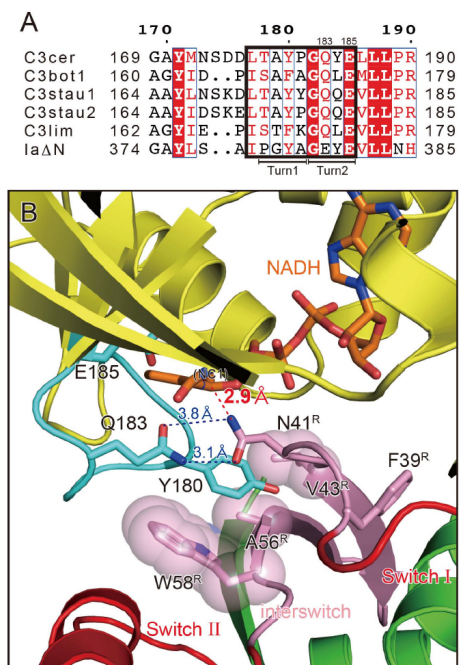


図 4 : RhoA recognition by the ARTT-loop of C3 exoenzyme. A, Sequence alignment of the ARTT-loop (blackbox) in C3 and Ia. B, C3cer, RhoA, the switch regions and interswitch region are color red, yellow, green, red, and pink, respectively. The ARTT-loop is shown as cyan.

今後の研究で明らかにするべき点

既に解析に成功している、Ia-アクチンでは、ADP リボシル化反応の前と後での複合体結晶構造を明らかにした。今後明らかにした複合体構造を Ia-アクチンと C3-RhoA で詳細に比べることにより、さらなる ADP リボシル化毒素の基質認識と反応機構の共通の知見がわかってくると考えている。Ia-アクチンでは、提唱されている「ARTT ループが ADP リボシル化される基質アミノ酸の特異性を決める」すなわち EXE の前者のグルタミン酸がアクチンの Arg177 を認識する構造は得られていない。また、Arg177 がのるアクチンの β シート部分は構造が固く、この Arg が動くことは考えにくい。考えられるのは Ia の EXE が反応の過程で動き、この認識に働いているのかもしれない。今後、動的結晶構造解析を更に進めることで、そのような過渡的状态でのスナップショットが得られるかもしれないと考えている。

*この研究内容は JBC(2015)に発表し、European Workshop on Bacterial Protein Toxins (ETOX17)に招待され講演を行った。また **Photon Factory Highlights 2015** に選定された。

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 8 件)

1. Kobayashi H, Otsubo T, Teraoka F, Ikeda K, Seike S, Takahashi E, Okamoto K, Yoshida T, Tsuge H, Yamanaka H. Involvement of the Arg566 residue of *Aeromonas sobria* serine protease in substrate specificity. **PLoS One**. 12(10): e0186392. doi: 10.1371/journal.pone.0186392. (2017) 査読有
2. Toniti W, Yoshida T, Tsurumura T, Irikura D, Monma C, Kamata Y, Tsuge H. Crystal structure and structure-based mutagenesis of actin-specific ADP-ribosylating toxin CPILe-a as novel enterotoxin. **PLoS One**. 12(2):e0171278. doi:10.1371/journal.pone.0171278. (2017) 査読有
3. Yoshida T, Ogola HJ, Amano Y, Hisabori T, Ashida H, Sawa Y, Tsuge H, Sugano Y. Anabaena sp. DyP-type peroxidase is a tetramer consisting of two asymmetric dimers. **Proteins**. 84(1):31-42. doi: 10.1002/prot.24952. (2016) 査読有
4. Toda A, Tsurumura T, Yoshida T, Tsumori Y, Tsuge H. Structural Basis of Rho GTPase recognition by C3 Exoenzyme. **Photon Factory Highlights 2015**. 58-59 (2016) 査読無
5. Tsuge H, Yoshida T, Tsurumura T. Conformational plasticity is crucial for C3-RhoA complex formation by ARTT-loop. **Pathog Dis**. 73(9) doi: 10.1093/femspd/ftv094. (2015) 査読有
6. Toda A, Tsurumura T, Yoshida T, Tsumori Y, Tsuge H. Rho GTPase Recognition by C3 Exoenzyme Based on C3-RhoA Complex Structure. **J Biol Chem**. 7;290(32):19423-32. doi: 10.1074/jbc.M115.653220. (2015) 査読有
7. Kobayashi H, Yoshida T, Miyakawa T, Tashiro M, Okamoto K, Yamanaka H, Tanokura M, Tsuge H.

Structural Basis for Action of the External Chaperone for a Propeptide-deficient Serine Protease from *Aeromonas sobria*.
J Biol Chem. 24:290(17):11130-43. doi: 10.1074/jbc.M114.622852.
(2015) 査読有

8. Tsuge H, Tsurumura T.
Reaction Mechanism of Mono-ADP-Ribosyltransferase Based on Structures of the Complex of Enzyme and Substrate Protein.
Curr Top Microbiol Immunol. 384:69-87. doi: 10.1007/82_2014_415.
(2015) 査読有

[学会発表](計 12 件)

1. 津下英明: ヒト ADP リボシル化酵素 (PARP) と細菌モノ ADP リボシル化毒素との構造と機能の比較、
第 450 回 ビタミン B 研究協議会、
京都大学友会館 (京都) 2017.10.28
2. Toru Yoshida, Hidetomo Kobayashi, Hiroyasu Yamanaka, Hideaki Tsuge:
Structure determination of *Clostridium perfringens* iota-like enterotoxin by X-ray crystallography. ETOX18, Institut Pasteur (Paris), 2017.06.27
3. Waraphan Toniti, Toru Yoshida, Toshiharu Tsurumura, Daisuke Irikura, Chie Monma, Yoichi Kamata, Hideaki Tsuge: Crystal structure and structure-based mutagenesis of actin-specific ADP-ribosylating toxin CPILe-a as novel enterotoxin ETOX18, Institut Pasteur (Paris), 2017.06.27
4. 津下英明: ウェルシュ菌の食中毒に関わる新規 ADP リボシル化毒素 CPILe: Iota 毒素との比較、
第 447 回 ビタミン B 研究協議会、
大阪大学中之島センター (大阪) 2017.3.4
5. 津下英明, 戸田暁之, 鶴村俊治, 吉田徹: シンポジウム「モノ・ポリADPリボシル化によるシグナル伝達系の意義」 C3 exoenzyme と RhoA 複合体の結晶構造解析に基づく基質特異性、日本分子生物学会、パシフィコ横浜 (横浜) 2016.12.2
6. Toru Yoshida, and Hideaki Tsuge: ADP-ribosylation of RhoA by C3 exoenzyme. ICC05-AEM2016

Unazuki(Toyama), 2016.9.8

7. Waraphan Toniti, Toru Yoshida, Toshiharu Tsurumura, Daisuke Irikura, Chie Monma, Yoichi Kamata, and Hideaki Tsuge: Characterization of Actin ADP-ribosyltransferase from *Clostridium perfringens* iota-like enterotoxin. ICC05-AEM2016 Unazuki(Toyama), 2016.9.8

8. 津下英明: 細菌由来 ADP リボシル化毒素の作用機構と基質特異性、
大阪府立大学(大阪)、獣医学専攻オープンセミナー、2016. 7.22

9. 津下英明: ワークショップ「細菌病原性の分子機序研究の最前線」
ADP リボシル化毒素 C3 がシグナル伝達阻害を引き起こすしくみ、
日本細菌学会、大阪国際交流センター (大阪) 2016.3.25

10. 竹内理子、吉田徹、津下英明: 「DNAライブラリーから発現量の多い可用性領域を迅速に選択する手法の開発」、日本生化学会、神戸ポートアイランド(神戸)、2015.12.1-4

11. 吉田徹、小林秀丈、宮川拓也、田代充、岡本敬の介、山中浩泰、田之倉優、津下英明: 「*Aeromonas sobria* 由来プロペプチド欠損プロテアーゼの外部シャペロンによるフォールディング機構」日本生化学会、神戸ポートアイランド(神戸)、2015.12.1-4

12. Hideaki Tsuge: Structural basis of Bacterial ADP-ribosyltransferase and Human Protein Complex. ETOX17(European Workshop on Bacterial Protein Toxins) (Braga), 2015 6.20-24 (招待講演)

[その他]
ホームページ等
http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~tsuge/Home_Japanese.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

津下 英明 (TSUGE, Hideaki)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号: 40299342

(2)研究協力者

吉田 徹 (YOSHIDA, Toru)
京都産業大学・総合生命科学部・研究助教
研究者番号: 30724546