

博士論文

グアニンヌクレオチド交換因子 SmgGDS による
RhoA 認識機構の構造基盤

清水 光

目次

表目次.....	5
略語一覧.....	6
1. 背景.....	7
1.1. 低分子量 G タンパク質について.....	7
1.2. 低分子量 G タンパク質のドメイン構成と構造.....	9
1.3. RhoGEF の分類と作用機序.....	11
1.4. SmgGDS について.....	13
1.5. 本研究の目的.....	15
2. 方法.....	16
2.1. SmgGDS-558 単体の結晶構造解析.....	16
2.1.1. SmgGDS の発現系 (pGEX6P-1).....	16
2.1.2. SmgGDS の発現系 (pET-44a (+)).....	18
2.1.3. 結晶化初期スクリーニング.....	20
2.1.4. 結晶化条件の最適化.....	20
2.1.5. X 線結晶構造解析.....	21
2.1.6. MODELLER を用いた SmgGDS-607 ホモロジーモデルの作成.....	22
2.2. SmgGDS の RhoA に対する機能解析.....	23
2.2.1. RhoA の発現系.....	23
2.2.2. ファルネシルトランスフェラーゼ (FTase) の発現系.....	24
2.2.3. <i>In vitro</i> における RhoA のファルネシル化.....	27
2.2.4. X 線小角散乱と多波長光散乱による溶液構造解析.....	27
2.2.5. ゲル濾過クロマトグラフィーによる結合試験.....	28
2.2.6. 表面プラズモン共鳴による相互作用解析.....	29
2.2.7. 等温滴定型カロリメトリによる相互作用解析.....	29
2.2.8. GEF 活性測定試験.....	30
2.2.9. プルダウンアッセイ.....	31
2.3. SmgGDS-558/ファルネシル化 RhoA 複合体の結晶構造解析.....	32
2.3.1. 結晶化初期スクリーニング.....	32
2.3.2. 結晶化条件の最適化.....	32
2.3.3. X 線結晶構造解析.....	32
2.3.4. AUTODOCK4 を用いたドッキングシミュレーション.....	33
3. 結果.....	34
3.1. SmgGDS-558 単体の結晶構造解析.....	34
3.1.1. SmgGDS 各アイソフォームの精製.....	34
3.1.2. 結晶化.....	38

3.1.3.	構造決定	41
3.1.4.	全体構造	43
3.2.	SmgGDS の RhoA に対する相互作用・機能解析	47
3.2.1.	RhoA の精製	47
3.2.2.	FTase の精製	49
3.2.3.	ファルネシル化 RhoA の調製	51
3.2.4.	SPR による解離定数の算出	53
3.2.5.	ITC による RhoA HVR ペプチド結合試験	56
3.2.6.	X 線小角散乱と多波長光散乱による溶液構造解析	58
3.2.7.	SmgGDS 正電荷領域への変異体解析	63
3.2.8.	SmgGDS-558 の全長と 61-558 での GEF 活性比較	70
3.2.9.	ファルネシル化 RhoA と SmgGDS との結合試験	72
3.3.	SmgGDS-558/ファルネシル化 RhoA 複合体の結晶構造解析および変異体解析 ..	74
3.3.1.	結晶化	74
3.3.2.	構造決定	77
3.3.3.	全体構造	79
3.3.4.	RhoA switch 領域の構造変化と固有の GEF メカニズム	85
3.3.5.	RhoA への変異体解析	89
3.3.6.	SmgGDS-558 の cryptic pocket と変異体解析	94
3.3.7.	SmgGDS-607 のホモロジーモデルと変異体解析	98
4.	考察	102
4.1.	SmgGDS による RhoA 認識機構	102
4.2.	SmgGDS の GEF としての特異性	107
4.3.	SmgGDS と他ファミリー GEF との比較	109
4.4.	SmgGDS と ARM タンパク質の比較	114
4.5.	SmgGDS の生理学的役割についての考察	118
5.	付録	121
5.1.	昆虫細胞発現系によるイソプレニル化 RhoA の調製・結晶化の検討	121
5.1.1.	方法	121
5.1.2.	結果	125
6.	参考文献	129
7.	謝辞	135

図目次

図 1	Ras スーパーファミリーの系統樹	8
図 2	低分子量 G タンパク質のドメインと構造	10
図 3	RhoGEF と低分子量 G タンパク質の複合体構造	12
図 4	SmgGDS のドメイン図	14
図 5	FTase 発現コンストラクト模式図	26
図 6	SmgGDS 全長体の精製過程	35
図 7	SmgGDS-558 (61-558) の精製過程	36
図 8	SmgGDS-607 (77-558) の精製過程	37
図 9	SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶	39
図 10	SmgGDS のドメイン構成と SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造	45
図 11	SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造静電ポテンシャル図	46
図 12	RhoA の精製過程	48
図 13	FTase の精製過程	50
図 14	ファルネシル化 RhoA 調製後のゲル濾過カラムクロマトグラフィー	52
図 15	SPR 測定結果	54
図 16	ITC 測定結果	57
図 17	散乱曲線の比較	60
図 18	ダミーアトムモデルと SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造の比較	61
図 19	SmgGDS-558/未修飾 RhoA の SEC-MALS プロファイル	62
図 20	ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる結合試験	64
図 21	GEF 活性試験プロファイル	66
図 22	GEF 活性試験解析結果	67
図 23	ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる競合阻害試験	69

図 24	SmgGDS-558 の全長と 61-558 の GEF 活性比較	71
図 25	ファルネシル化 RhoA と SmgGDS との結合能試験	73
図 26	SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体結晶	75
図 27	複合体結晶構造における非対称単位中の 4 つのヘテロダイマー	81
図 28	SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体の全体構造	82
図 29	複合体結晶中での SmgGDS-558 表面図	83
図 30	Switch II 結合部位周辺の電子密度ステレオ図	84
図 31	RhoA の構造比較と SmgGDS との結合部位	86
図 32	SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体の相互作用	87
図 33	GEF/低分子量 G タンパク質複合体の構造比較	88
図 34	プルダウンアッセイと GEF 活性試験	91
図 35	GEF 活性試験プロファイル	92
図 36	RhoA の K187 周辺の拡大図	93
図 37	SmgGDS-558 の cryptic pocket と変異体解析	95
図 38	ドッキングシミュレーション結果	96
図 39	GEF 活性試験	97
図 40	SmgGDS-558 結晶構造と SmgGDS-607 ホモロジーモデルの比較	99
図 41	ITC 測定結果	100
図 42	SmgGDS による RhoA 認識機構	104
図 43	RhoA 単体と RhoGEF/低分子量 G タンパク質複合体の構造比較	105
図 44	イソプレニル基受容蛋白質/低分子量 G タンパク質複合体の構造比較	106
図 45	低分子量 G タンパク質のアミノ酸配列アライメント	108
図 46	SmgGDS と他ファミリー GEF の構造比較	113
図 47	SmgGDS と ARM タンパク質の構造比較	116

図 48	ARM タンパク質/リガンド複合体の構造比較.....	117
図 49	SmgGDS による低分子量 G タンパク質の翻訳後修飾制御モデル.....	120
図 50	昆虫細胞用各タンパク質発現コンストラクト.....	124
図 51	昆虫細胞におけるイソプレニル基転移酵素の発現確認.....	126
図 52	昆虫細胞発現系におけるイソプレニル化 RhoA の精製過程.....	127
図 53	SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体結晶.....	128

表目次

表 1	SmgGDS の発現領域一覧.....	19
表 2	SmgGDS の精製・単体結晶化状況一覧.....	40
表 3	SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶の回折強度データセット収集と構造精密化の統計値.....	42
表 4	SPR により算出された結合パラメータ.....	55
表 5	SAXS の測定条件および測定・解析結果の統計値.....	59
表 6	SmgGDS の精製・SmgGDS/ファルネシル化 RhoA 複合体結晶化状況一覧.....	76
表 7	SmgGDS-558 (77-558) /RhoA 複合体結晶の回折強度データセット収集と構造精密化の統計値.....	78
表 8	ITC 測定結果.....	101
表 9	GEF/低分子量 G タンパク質複合体一覧.....	110

略語一覽

A ₂₆₀	absorbance at 260 nm
A ₂₈₀	absorbance at 280 nm
ARM	armadillo-repeat motif
BODYPY	boron-dipyrromethene
CBB	coomassie brilliant blue
CV	column volume
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FPP	farnesyl pyrophosphate
GDP	guanosine diphosphate
GTP	guanosine triphosphate
GMPPNP	5'-Guanylyl imidodiphosphate
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
ITC	isothermal titration calorimetry
K_D	dissociation constant
MALS	multi angle light scattering
MES	2- (<i>N</i> -morpholino) ethanesulfonic acid
OD ₆₀₀	optical density at 600 nm
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
R _g	radius of gyration
r.m.s.d.	root mean square deviation
Rho	ras homolog gene family
SAXS	small angle X-ray scattering
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEC	size exclusion chromatography
SmgGDS	small G protein guanine-nucleotide dissociation stimulator
SPR	surface plasmon resonance
Tris	tris (hydroxymethyl) - aminomethane

1. 背景

1.1. 低分子量 G タンパク質について

低分子量 G タンパク質は GTP 結合型の活性型と GDP 結合型の不活性型とを行き来することで分子スイッチとして働く分子群である。1980 年に初めて同定された Ha-Ras と Ki-Ras は細胞増殖の制御を担い多くのヒト腫瘍において変異が見つかることから、癌におけるもっとも重要な創薬標的として位置づけられてきた¹。本研究で対象とした Rho は Ras のホモログとして 1985 年に発見され、細胞骨格形成の制御を担う¹。今日では 150 種類以上の低分子量 G タンパク質が同定されており²、構造上の特徴から Ras, Rho, Ran, Arf, Rab の 5 つに、三量体 G 蛋白質 α サブユニット (G α) も含めれば 6 つに分類され、Ras スーパーファミリーと呼ばれる (図 1)。一般に、低分子量 G タンパク質の固有の活性は低く、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) や GTPase 活性化タンパク質 (GAP) によって調節されている。

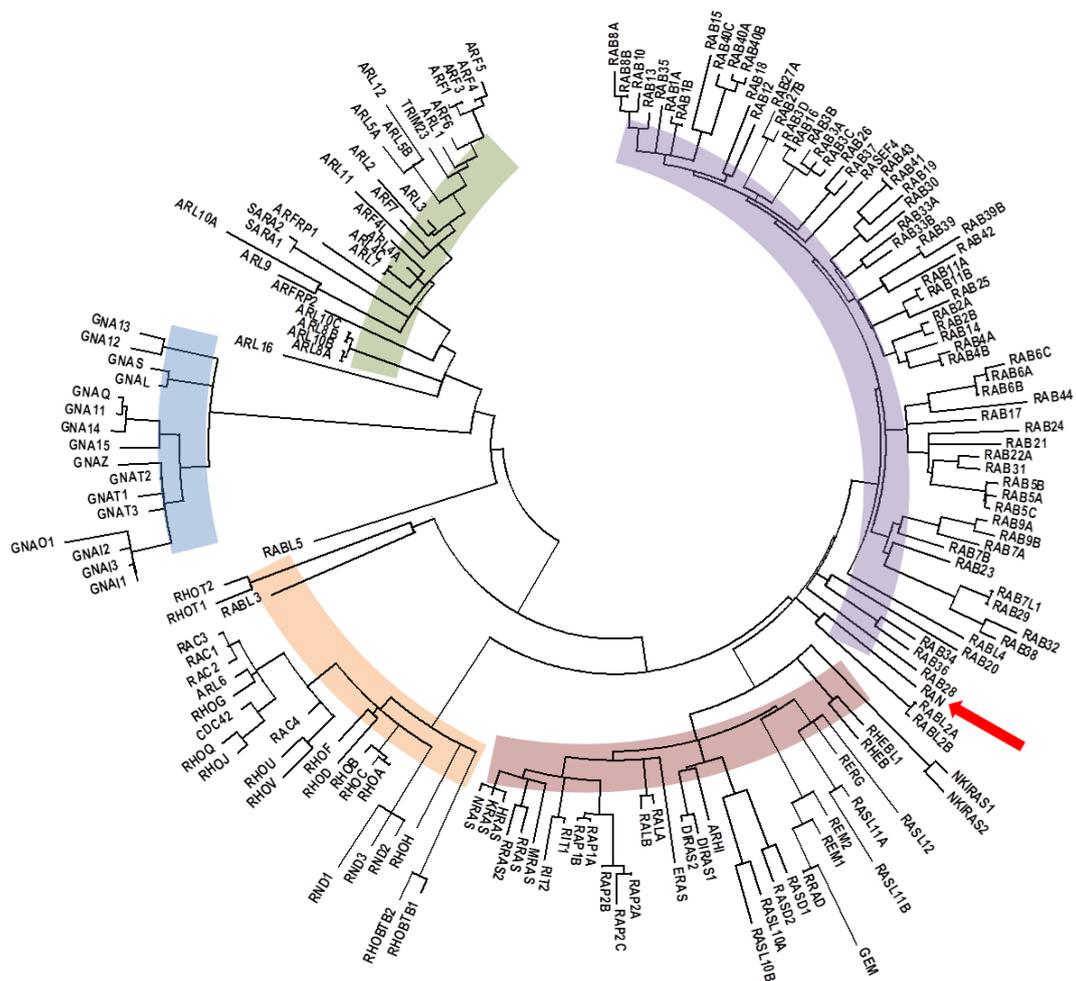


図 1 Ras スーパーファミリーの系統樹

赤、橙、緑、紫、青の網掛けは各々Ras、Rho、Arf、Rab、Gαを示した。赤色の矢印でRanの位置を示した。本系統樹は Colicelli, 2004³を参考にMEGAを用いて作成した⁴。

1.2. 低分子量 G タンパク質のドメイン構成と構造

アミノ酸配列の比較によると低分子量 G タンパク質は基本的な構造を保存しており、30-55%の相同性を有している⁵。低分子量 G タンパク質は GTP の加水分解を担う G-domain と分子毎に配列の多様性が見られる C 末端の Hypervariable region (HVR) から成る (図 2A)。

全ての低分子量 G タンパク質の G-domain はコンセンサスアミノ酸配列を有しており¹、これらが GDP と GTP に対する特異的な結合と GTP 加水分解活性に重要である。4 か所あるコンセンサス配列と活性領域は合わせて G-box と呼ばれ、そのうち N 末端側 3 つの周辺領域はそれぞれ P-loop、Switch I、Switch II とも呼ばれている (図 2A)。3 つのモチーフ (P-loop、Switch I、Switch II) は協調してグアニンヌクレオチドと Mg イオンの認識を行う (図 2B)。

G-domain が低分子量 G タンパク質間で比較的良好に保存されているのに対し、HVR は多様性に富んだ領域である。多くの低分子量 G タンパク質は HVR の末尾の 4 残基すなわち C 末端の 4 残基に CaaX モチーフを持っており、この部分は翻訳後脂質修飾を受けるシステイン残基がある。CaaX モチーフへの翻訳後修飾はシステイン残基のイソプレニル化、末端 3 残基の切断、末端カルボキシ基のメチル化の三段階で進行する⁶。イソプレニル化は 2 種類あり、炭素数 20 のゲラニルゲラニル基か炭素数 15 のファルネシル基が付加される (図 2C)。どちらの脂質が優位に付加されるかは C 末端残基 (CaaX の X 部分) のアミノ酸の種類によって決まる。X = L では geranylgeranyltransferase (GGTase) によってゲラニルゲラニル基が、X = A では farnesyltransferase (FTase) によってファルネシル基が付加される。脂質の付加は細胞質で起こるのに対し、残りの二段階の修飾は小胞体膜上にある酵素 (それぞれ Ras converting enzyme1 (RCE1)、isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT)) によって行われる。これらの修飾は細胞膜への局在に重要である。

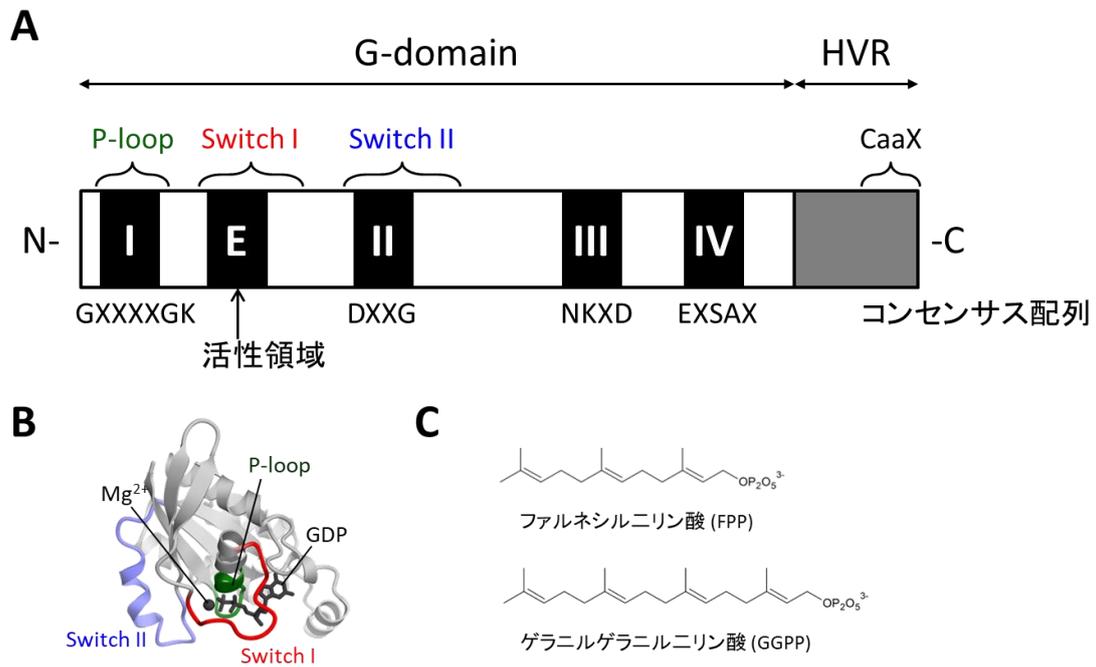


図 2 低分子量 G タンパク質のドメインと構造

(A) 低分子量 G タンパク質のドメイン構成。(B) GDP 結合型 RhoA の結晶構造 (PDB ID: 1FTN)。(C) CaaX モチーフへのイソプレニル化に必要な基質。

1.3. RhoGEF の分類と作用機序

GEF のうち Rho に作用するものは RhoGEF と呼ばれる。RhoGEF は活性ドメインの違いにより、Dbl ファミリータンパク質、Dock ファミリータンパク質、SmgGDS の 3 つのタイプが報告されている。ヒトにおいて 69 種類の Dbl ファミリーと 11 種類の Dock ファミリーに属するタンパク質が同定されており、SmgGDS は 1 種類しか知られていない⁷。前者 2 つのタイプの RhoGEF は Rho との複合体の結晶構造が明らかになっており、詳細な GEF メカニズムが解明されている。Dbl ファミリータンパク質は典型的な RhoGEF であるとして、その活性ドメインである DH ドメインは Rho の Switch 領域と相互作用することで Switch 領域の再配置を行い、ヌクレオチド結合部位を壊すとともに Mg イオンの結合部位を直接的に障害する⁷。一方、Dock ファミリータンパク質は非典型 RhoGEF として、活性ドメインである DHR2 ドメインは Val 残基を直接的に Rho の Mg イオン結合部位へと挿入することで立体障害と静電反発により Mg イオンを脱離させ、結果としてグアニンヌクレオチドの交換を促進する^{8,9}。SmgGDS については構造解析がなされておらず、構造生物学的知見は得られていなかった。

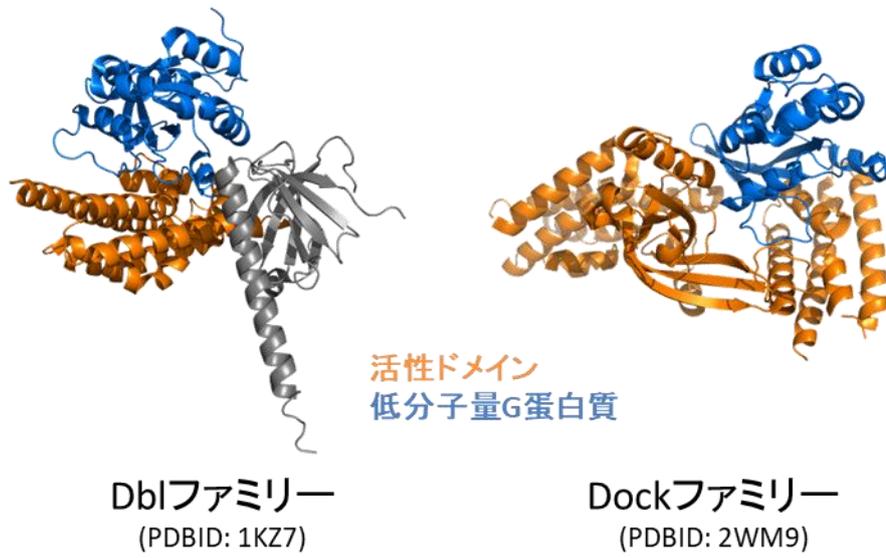


図 3 RhoGEF と低分子量 G タンパク質の複合体構造

Dbs/Cdc42 複合体(PDB ID: 1KZ7) (左) と Dock9/Cdc42 複合体(PDB ID: 2WM9) (右)

1.4. SmgGDS について

本研究で対象とした SmgGDS は Ras, Rho ファミリーにおける多くの低分子量 G タンパク質の GEF として同定された^{10,11}。SmgGDS は RhoA, Rac1, K-Ras4B, Rap1A, Di-Ras2 などの HVR に polybasic region (PBR) と呼ばれる塩基性残基を多く含む領域をもつ多様な低分子量 G タンパク質と結合できるという特徴がある¹²⁻¹⁴。近年の研究で SmgGDS は RhoA, RhoC に特異的な GEF であると改められた¹⁵。GEF としては働くことのない低分子量 G タンパク質に対しても広範な結合能を有することから SmgGDS は GEF 以外にも低分子量 G タンパク質の輸送・局在制御やシャペロンとしての役割があるのではないかと考えられている¹⁶。SmgGDS は他の RhoGEF と異なり分子全体を通して Armadillo-repeat motif (ARM) から成ると予測されたため、新たな GEF 活性発揮機序を持つと想定される。SmgGDS には ARM 数の異なる 2 つのスプライスバリエントアイソフォームがあり、それぞれ SmgGDS-558、SmgGDS-607 と呼ばれる (図 4)。SmgGDS-558 は脂質修飾をされた RhoA を SmgGDS-607 は脂質未修飾の RhoA を強く認識すると報告されており、これら分子は細胞内で異なる役割を持つ可能性がある¹⁶⁻¹⁸。

SmgGDS は非小細胞性肺癌¹⁹、前立腺癌²⁰、乳癌^{21,22}、膵臓癌²²において発現の増加が認められている。SmgGDS が過剰発現している乳癌患者は予後が悪く、SmgGDS-558 をノックダウンした乳癌の細胞では増殖能の低下が見られたという報告がある²¹。

SmgGDS は Rac1 の局在制御も担っている。最近の研究でスタチンにより SmgGDS の発現が上昇することで Rac1 の核への局在とプロテアソームによる分解が促進されると分かった²³。続く研究では SmgGDS はスタチンによる高脂血症改善作用の決定的な因子であると報告されている^{24 25 26}。

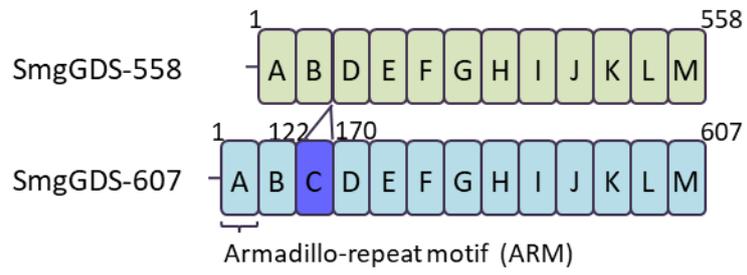


図 4 SmgGDS のドメイン図

配列から予測される SmgGDS 両アイソフォームのドメイン図。

1.5. 本研究の目的

RhoGEF の 3 つのタイプのうち Dbl ファミリー、Dock ファミリータンパク質の複合体構造は明らかになっている一方で、SmgGDS の構造解析はなされてこなかった。SmgGDS は ARM のみで構成され明確な活性ドメインを持たないこと、RhoA の脂質修飾を認識することから他の RhoGEF とは異質である。また、癌や高脂血症との関わりが報告されていることから、薬科学の面からも興味深い分子である。本研究では、SmgGDS による低分子量 G タンパク質認識機構を構造生物学の観点から解明すべく、SmgGDS の単体と RhoA との複合体の構造解析・相互作用解析に取り組んだ。2 章、3 章、4 章でそれぞれ方法、結果、考察を記した。この内容は、Shimizu *et al.* *JBC.*, 2017²⁷ および Shimizu *et al.* *PNAS.*, 2018²⁸ に記載した。

2. 方法

本研究で使用したタンパク質は全てヒト由来のものである。

2.1. SmgGDS-558 単体の結晶構造解析

2.1.1. SmgGDS の発現系 (pGEX6P-1)

大腸菌発現用ベクター pGEX6P-1 (GE Healthcare) の BamHI, EcoRI サイトに SmgGDS の各遺伝子を組み込んだものを使用した。作成した発現領域を表 1 にまとめた。また、各点変異体作成は PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa) の方法に従って行った。

以下に発現と精製方法を示した。作成したベクターを用いて BL21 (DE3) RIPL 大腸菌株を形質転換した。1 L あたり polypeptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, アンピシリン ナトリウム 100 mg, クロラムフェニコール 30 mg を添加した液体培地に、同培地にてプレカルチャーした形質転換済み BL21 (DE3) RIPL を加えた。37 °C で攪拌培養し、OD600 = 0.4-0.8 となった時点で IPTG を 0.1-1 mM となるように加え、18°C で一晩培養した。

菌体を遠沈し破碎用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) に懸濁したのち超音波破碎した。破碎液を 4 °C, 20000 rpm, 20 min 遠心しその上清を Glutathione Sepharose 4B 樹脂 (GE Healthcare) へ吸着させた。洗浄用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) を用いて 10 CV 以上洗浄した後、10 mL の樹脂に対して 10-30 mL の洗浄用緩衝液と GST を融合させたプレシジョンプロテアーゼを添加し、4°C で一晩タグを切断し目的蛋白質を樹脂から溶出させ上清を回収した。次に陰イオン交換カラムを用いて精製を行った。A 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT) を用いて上清を 2 倍に希釈し、5 mL Hitrap Q (GE Healthcare) へ吸着させた。B 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM DTT) を 10 CV の範囲で 0 %-50 % B 緩衝液となるように勾配をかけ SmgGDS を溶出させた。溶出ピークが複数ある場合には最初のピー

クを回収し、状況に応じて再度陰イオン交換カラムを用いて精製を行った。最後に Superdex 200 pg (GE Healthcare) をもちいたゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行い、溶出画分をアミコンウルトラ (Merck) で濃縮して最終標品とした。ゲル濾過の緩衝液には HEPES 緩衝液 (20 mM HEPES-KOH pH 7.3, 110 mM CH₃COOK, 1 mM DTT) あるいは Tris 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) を用いた。また状況に応じてイオン交換あるいはゲル濾過の過程を省略し、最終標品とした。

次に位相決定のための SmgGDS-558 (61-558) セレノメチオニン誘導体試料作製について記す。作成したベクターを BL21(DE3) RIPL 大腸菌株を形質転換した。大腸菌は最小培地 (1 L あたり 7 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, 0.4% (w/v) glucose, 20 mg Thiamine, 20 mg Biotin, 20 mg Adenosine, 20 mg Guanosine, 20 mg Cytidine, 20 mg Thymidine, 3 μM FeCl₃, 1 mM MgSO₄, 50 μM MnCl₂, 1 g NH₄Cl, 100 μM CaCl₂ を含む) にて培養した。OD₆₀₀ = 0.3 の時、培地 1 L あたり 100 mg Lys, 100 mg Phe, 100 mg Thr, 50 mg Ile, 50 mg Leu, 50 mg Val, and 60 mg SeMet を添加した。OD₆₀₀ = 0.7 となった時点で IPTG を 0.25 mM となるように加え、18°C で一晩培養した。タンパク質の精製方法は野生型 SmgGDS と同様であるので割愛する。

2.1.2. SmgGDS の発現系 (pET-44a (+))

大腸菌発現用ベクターpET-44a (+) (Novagen) の BamHI, EcoRI サイトに SmgGDS の各遺伝子を組み込んだものを使用した。N 末端側に His6 タグおよびプレシジョンプロテアーゼ認識配列を付加し His6 タグ融合タンパク質を発現させた。

以下に発現と精製方法を示す。作成したベクターを用いて BL21(DE3) 大腸菌株を形質転換した。1 L あたり polypeptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, アンピシリンナトリウム 100 mg を添加した液体培地に、同培地にてプレカルチャーした形質転換済み BL21 (DE3) を加えた。37 °C で攪拌培養し、OD600 = 0.4-0.8 となった時点で IPTG を 0.1 mM となるように加え、18°C で一晩培養した。

菌体を遠沈し破砕用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 20% (w/v) glycerol) に懸濁したのち超音波破砕した。破砕液を 4 °C, 20000 rpm, 20 min 遠心しその上清を cComplete His-Tag Purification Resin (Merck) へ吸着させた。洗浄用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 20% Glycerol, 20 mM Imidazole) を用いて 10 CV 以上洗浄した後、溶出用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 20% (w/v) glycerol, 40-160 mM Imidazole) で溶出させた。GST を融合させたプレシジョンプロテアーゼを添加し、4°C で一晩タグを切断させた。Glutathione Sepharose 4B 樹脂 (GE Healthcare) を素通りさせプレシジョンプロテアーゼを除去した。試料をアミコンウルトラ (Merck) で濃縮し1度目の Superdex 200 pg (GE Healthcare) を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーによりモノマー画分を分取し、濃縮後 2 度目のゲル濾過カラムクロマトグラフィーでモノマー位置にシングルピークを得た。溶出画分を濃縮して最終標品とした。ゲル濾過の緩衝液には Tris 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) を用いた。

表 1 SmgGDS の発現領域一覧

No.	タンパク質	発現領域		発現ベクター	No.	タンパク質	発現領域		発現ベクター
		N	C				N	C	
1	SmgGDS-558	1	558	pGEX6P-1	63	SmgGDS-607	1	607	pGEX6P-1
2	SmgGDS-558	36	558	pGEX6P-1	64	SmgGDS-607	11	607	pGEX6P-1
3	SmgGDS-558	48	558	pGEX6P-1	65	SmgGDS-607	21	607	pGEX6P-1
4	SmgGDS-558	51	558	pGEX6P-1	66	SmgGDS-607	31	607	pGEX6P-1
5	SmgGDS-558	53	558	pGEX6P-1	67	SmgGDS-607	36	607	pGEX6P-1
6	SmgGDS-558	55	558	pGEX6P-1	68	SmgGDS-607	41	607	pGEX6P-1
7	SmgGDS-558	57	558	pGEX6P-1	69	SmgGDS-607	48	607	pGEX6P-1
8	SmgGDS-558	59	558	pGEX6P-1	70	SmgGDS-607	51	607	pGEX6P-1
9	SmgGDS-558	61	558	pGEX6P-1	71	SmgGDS-607	61	607	pGEX6P-1
10	SmgGDS-558	62	558	pGEX6P-1	72	SmgGDS-607	71	607	pGEX6P-1
11	SmgGDS-558	63	558	pGEX6P-1	73	SmgGDS-607	77	607	pGEX6P-1
12	SmgGDS-558	64	558	pGEX6P-1	74	SmgGDS-607	346	607	pGEX6P-1
13	SmgGDS-558	65	558	pGEX6P-1	75	SmgGDS-607	1	590	pGEX6P-1
14	SmgGDS-558	66	558	pGEX6P-1	76	SmgGDS-607	1	580	pGEX6P-1
15	SmgGDS-558	67	558	pGEX6P-1	77	SmgGDS-607	1	570	pGEX6P-1
16	SmgGDS-558	68	558	pGEX6P-1	78	SmgGDS-607	77	563	pGEX6P-1
17	SmgGDS-558	69	558	pGEX6P-1	79	SmgGDS-607	1	560	pGEX6P-1
18	SmgGDS-558	70	558	pGEX6P-1	80	SmgGDS-607	1	550	pGEX6P-1
19	SmgGDS-558	71	558	pGEX6P-1	81	SmgGDS-607	1	540	pGEX6P-1
20	SmgGDS-558	72	558	pGEX6P-1	82	SmgGDS-607	1	530	pGEX6P-1
21	SmgGDS-558	73	558	pGEX6P-1	83	SmgGDS-607	1	519	pGEX6P-1
22	SmgGDS-558	74	558	pGEX6P-1	84	SmgGDS-607	1	519	pGEX6P-1
23	SmgGDS-558	75	558	pGEX6P-1	85	SmgGDS-607	11	519	pGEX6P-1
24	SmgGDS-558	76	558	pGEX6P-1	86	SmgGDS-607	36	519	pGEX6P-1
25	SmgGDS-558	77	558	pGEX6P-1	87	SmgGDS-607	48	519	pGEX6P-1
26	SmgGDS-558	78	558	pGEX6P-1	88	SmgGDS-607	61	519	pGEX6P-1
27	SmgGDS-558	79	558	pGEX6P-1	89	SmgGDS-607	77	519	pGEX6P-1
28	SmgGDS-558	80	558	pGEX6P-1	90	SmgGDS-607	346	519	pGEX6P-1
29	SmgGDS-558	81	558	pGEX6P-1	91	SmgGDS-607	1	501	pGEX6P-1
30	SmgGDS-558	82	558	pGEX6P-1	92	SmgGDS-607	1	458	pGEX6P-1
31	SmgGDS-558	83	558	pGEX6P-1	93	SmgGDS-607	1	368	pGEX6P-1
32	SmgGDS-558	84	558	pGEX6P-1	94	SmgGDS-607	1	345	pGEX6P-1
33	SmgGDS-558	85	558	pGEX6P-1	95	SmgGDS-607	1	254	pGEX6P-1
34	SmgGDS-558	122	558	pGEX6P-1	96	SmgGDS-607	18	254	pGEX6P-1
35	SmgGDS-558	77	557	pGEX6P-1	97	SmgGDS-607	40	254	pGEX6P-1
36	SmgGDS-558	77	556	pGEX6P-1	98	SmgGDS-607	49	254	pGEX6P-1
37	SmgGDS-558	77	555	pGEX6P-1	99	SmgGDS-607	61	254	pGEX6P-1
38	SmgGDS-558	77	554	pGEX6P-1	100	SmgGDS-607	1	212	pGEX6P-1
39	SmgGDS-558	1	551	pGEX6P-1	101	SmgGDS-607	40	212	pGEX6P-1
40	SmgGDS-558	71	551	pGEX6P-1	102	SmgGDS-607	49	212	pGEX6P-1
41	SmgGDS-558	1	541	pGEX6P-1	103	SmgGDS-607	61	607	pETHP
42	SmgGDS-558	71	541	pGEX6P-1	104	SmgGDS-607	77	607	pETHP
43	SmgGDS-558	1	531	pGEX6P-1	105	SmgGDS-607	77	563	pETHP
44	SmgGDS-558	71	531	pGEX6P-1					
45	SmgGDS-558	1	521	pGEX6P-1					
46	SmgGDS-558	71	521	pGEX6P-1					
47	SmgGDS-558	1	511	pGEX6P-1					
48	SmgGDS-558	71	511	pGEX6P-1					
49	SmgGDS-558	1	501	pGEX6P-1					
50	SmgGDS-558	71	501	pGEX6P-1					
51	SmgGDS-558	71	491	pGEX6P-1					
52	SmgGDS-558	1	481	pGEX6P-1					
53	SmgGDS-558	11	481	pGEX6P-1					
54	SmgGDS-558	21	481	pGEX6P-1					
55	SmgGDS-558	31	481	pGEX6P-1					
56	SmgGDS-558	41	481	pGEX6P-1					
57	SmgGDS-558	51	481	pGEX6P-1					
58	SmgGDS-558	61	481	pGEX6P-1					
59	SmgGDS-558	71	481	pGEX6P-1					
60	SmgGDS-558	1	470	pGEX6P-1					
61	SmgGDS-558	77	470	pGEX6P-1					
62	SmgGDS-558	122	470	pGEX6P-1					

2.1.3. 結晶化初期スクリーニング

得られた精製標品に対して Crystal Screen, Crystal Screen 2, SaltRX, PEG/Ion2, MembFac (Hampton Research), PEGs suite, PEGs II suite, JCSG+ suite, PACT suite, ProComplex suite, Cryos suite (QIAGEN), Morpeus (Molecular Dimensions), WizardI, Wizard II (deCODE genetics) のスクリーニングキットを用い、結晶化初期スクリーニングを実施した。スクリーニングを実施した発現系は 3.1.2 項、表 2 にまとめた。

2.1.4. 結晶化条件の最適化

結晶化初期スクリーニングで得た条件をもとに、蛋白質発現領域、蛋白質濃度、結晶化温度、PEG 濃度、PEG の種類、塩濃度、混合比、pH の条件を検討し、結晶化条件の最適化を行った。

最終的に終濃度 5 mg/mL の SmgGDS-558 (61-558) を結晶化試料とした。結晶化試料とリザーバー溶液 (100 mM HEPES-NaOH pH 8.1, 100 mM MgCl₂, 20 % PEG3350) を 1 : 1 の割合で混合し、10 °C でシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化した。

2.1.5. X線結晶構造解析

X線回折データ収集は野生型については SPring-8 BL44XU (兵庫) で、セレノメチオニン誘導体については Photon Factory BL17A (茨城) にて行った。放射光施設での実験に先立って結晶をクライオプロテクト溶液 (100 mM Hepes pH8.1, 100 mM MgCl₂, 20% PEG3350, 30% (w/v) glycerol) にクイックソークし、Cryo loop (Hampton Research) あるいは Litho loop (Molecular Dimensions) で拾った結晶を液体窒素で凍結しドライシッパーに移し、低温に保ったまま放射光施設へ輸送した。野生型結晶の回折強度データは波長 0.9000 Å, 振動角 0.5°/image, 全振動角 360°, 露光時間 0.5 sec/image, 測定温度 100K で測定した。また、強度データ収集に際し、結晶の放射線損傷を回避して回折強度データを収集するために、結晶への X線照射位置をデータセット収集中に徐々に移動させる Herical Scan 法で測定をおこなった。回折強度データの処理は HKL2000²⁹ で行った。セレノメチオニン誘導体結晶については波長 0.9720 Å, 振動角 0.1°/image, 全振動角 360°, 露光時間 0.1 sec/image, 測定温度 100K で測定した。同一結晶から収集した 3 つのデータセットを XDS³⁰ によってマージして解析した。位相決定は SHARP/autoSHARP³¹ を用いた単波長異常散乱法 (SAD 法) で行った。初期モデルを Buccaneer^{32 33} で構築し分子置換は Molrep³⁴ を用いた。Refmac5³⁵ で構造精密化し coot³⁶ によるモデル構築を行った。最終的な立体構造の妥当性評価を PROCHECK³⁷ で実施し、最終構造を蛋白質構造データベース Protein Data Bank (PDB) に登録した (PDB ID: 5XGC)。本論文における作図は PyMOL (<http://www.pymol.org>) または CueMol (<http://www.cuemol.org>) を用いた。

2.1.6. MODELLER を用いた SmgGDS-607 ホモロジーモデルの作成

MODELLER 9.18³⁸⁻⁴¹ を用いて SmgGDS-607 のホモロジーモデルを作成した。モデルの作成には SmgGDS-558 (PDB ID: 5XGC) と Beta-catenin (PDB ID: 1TH1) をテンプレートとして用いた。BLAST⁴² を用いて SmgGDS-607 (aa77-607) に SmgGDS-558 (aa 122-558) と Beta-catenin (aa 145-664) をアラインした。

また作成した SmgGDS-607 ホモロジーモデルと RhoA HVR ペプチドの相互作用界面を予測するため、CABS-dock server (<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSdock>)^{43,44} を用いた。

2.2. SmgGDS の RhoA に対する機能解析

本節では特に表記のない場合は全長の SmgGDS を用いた。

2.2.1. RhoA の発現系

大腸菌発現用ベクター-pET44a (+) の BamHI, HindIII サイトに RhoA の遺伝子を組み込んだものを使用した。N 末端側に His6 タグおよびプレシジョンプロテアーゼ認識配列を付加し His6 タグ融合タンパク質を発現させた。また、各点変異体作成は PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa) の方法に従って行った。

以下に発現と精製方法を示した。作成したベクターを用いて BL21 (DE3) RIPL 大腸菌株を形質転換した。1 L あたり polypeptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, アンピシリンナトリウム 100 mg を添加した液体培地に、同培地にてプレカルチャーした形質転換済み BL21 (DE3) を加えた。37 °C で攪拌培養し、OD600 = 0.4-0.8 となった時点で IPTG を 0.1 mM となるように加え、18°C で一晩培養した。

菌体を遠沈し破碎用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 20% (w/v) glycerol) に懸濁したのち超音波破碎した。破碎液を 4°C, 20000 rpm, 20 min 遠心しその上清を cComplete His-Tag Purification Resin (Merck) へ吸着させた。洗浄用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20% Glycerol, 20 mM Imidazole) を用いて 10 CV 以上洗浄した後、溶出用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20% (w/v) glycerol, 300 mM Imidazole) で溶出させた。溶出液を A 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20% Glycerol) で希釈したのち、5 mL Histrap (GE Healthcare) へ吸着させた。B 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) を 10 CV の範囲で 0%-100% B 緩衝液となるように勾配をかけ RhoA を溶出させた。溶出ピークを回収し GST を融合させたプレシジョンプロテアーゼを添加し、4°C で一晩タグを切断した。Glutathione Sepharose 4B 樹脂 (GE Healthcare) を素通りさせプレシジョン

プロテアーゼを除去した。試料をアミコンウルトラ(Merck) で濃縮し Superdex 75 pg (GE Healthcare) を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行い、溶出画分を濃縮して最終標品とした。ゲル濾過の緩衝液には Tris 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) を用いた。

2.2.2. ファルネシルトランスフェラーゼ (FTase) の発現系

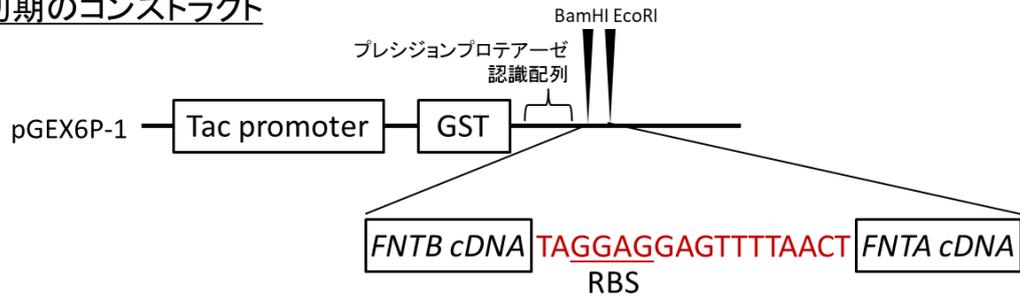
RhoA へのファルネシル基の付加を行うため、FTase の発現と精製を行った。FTase は二つのサブユニット α (遺伝子名: FNTA) と β (遺伝子名: FNTB) からなる。まず初めに Charles A らの方法⁴⁵ に従って大腸菌発現用ベクター pGEX6P-1 (GE Healthcare) の BamHI, EcoRI サイトに図 5 のような両サブユニットを共発現させるためこれらをタンデムに繋いだ DNA を挿入した。発現を確認するため、作成したベクターを用いて BL21 (DE3)、BL21 (DE3) RIPL、Rosetta2 (DE3)、DH5 α 各大腸菌株を形質転換し 1 L あたり polypeptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, アンピシリンナトリウム 100 mg を添加した液体培地 10 mL で液体培養した。OD₆₀₀ = 0.4-0.8 となった時点で IPTG を 0.1 mM とするように加え、18°C で一晩培養した。菌体を遠沈し破碎用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) に懸濁したのち超音波破碎し、菌破碎液を SDS-PAGE により確認した結果、BL21 (DE3)、DH5 α 各大腸菌株において β サブユニットの発現が見られたが、 α サブユニットは発現していなかった。そこで作成したベクターから PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa) の方法に従って GST タグとプレジジョンプロテアーゼ認識配列を欠損させたものと、pGEX6P-1 (GE Healthcare) の BamHI, EcoRI サイトに図 5 のような FNTB cDNA と FNTA cDNA をタンデムに繋いだ DNA を挿入したものを新たに作成し、以下の方法でそれぞれ培養と精製を行った。

以下に発現と精製方法を示した。作成した各ベクターを BL21 (DE3) 大腸菌株を形質転換した。1 L あたり polypeptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, アンピシリンナトリウム 100 mg を添加した液体培地に、同培地にてプレカルチャーした形質転換済み BL21

(DE3) を加えた。37 °Cで攪拌培養し、OD600 = 0.4-0.5 となった時点で IPTG を 0.1 mM と
なるように加え、18°Cで一晩培養した。

それぞれの培養液を混合して菌体を遠沈し、破碎用緩衝液 (5 mM Sodium phosphate
pH 7.2, 75 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM PMSF) に懸濁したのち超音波破碎した。破碎液
を 4 °C, 20000 rpm, 20 min 遠心しその上清を Glutathione Sepharose 4B 樹脂 (GE
Healthcare) へ吸着させた。洗浄用緩衝液 (5 mM Sodium phosphate pH 7.2, 75 mM NaCl,
5 mM DTT) を用いて 10 CV 以上洗浄した後、溶出用緩衝液 (5 mM Sodium phosphate pH
7.2, 75 mM NaCl, 5 mM DTT, 20 mM Glutathione (reduced form)) で溶出させた。溶出
液に GST を融合させたプレシジョンプロテアーゼを添加し、4°Cで一晩タグを切断させた。
反応液を A 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 μ M Zn(OAc)₂) で平衡化した 5 mL Hitrap
Q (GE Healthcare) へ吸着させた。B 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 10 μ M
Zn(OAc)₂) を 10 CV の範囲で 0 %-50 % B 緩衝液となるように勾配をかけ FTase を溶出さ
せ、溶出画分をアミコンウルトラ (Merck) で濃縮して最終標品とした。

A 初期のコンストラクト



B 変更後のコンストラクト

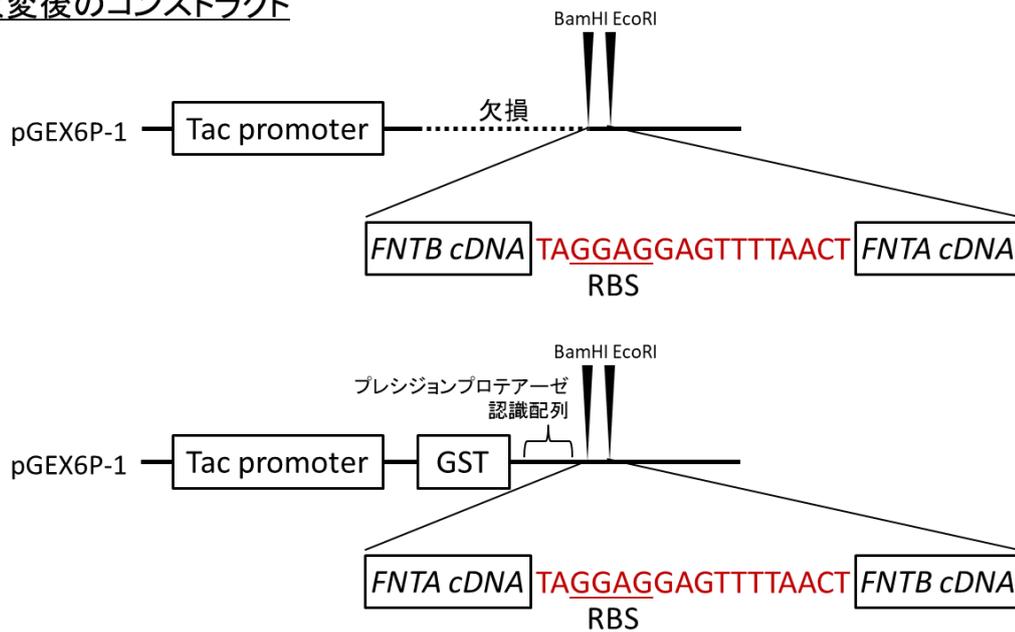


図 5 FTase 発現コンストラクト模式図

FTase を発現させたコンストラクトの模式図を示した。赤色の文字は FTase のサブユニット間の linker 配列。赤色の下線部はリボソーム結合部位 (RBS) を表す。また PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa) の方法により欠損させ繋いだ箇所を点線で表した。

2.2.3. *In vitro* における RhoA のファルネシル化

2.2.1 項の方法に従って調製した RhoA (L193A) に対して *In vitro* におけるファルネシル化を行った。ファルネシル化は Kuhlmann らの方法⁴⁶に従って行い、均質にファルネシル化された RhoA を取得した⁴⁶。以下ではその方法を示した。6 μ M FTase, 200 μ M RhoA (L193A), 300 μ M Farnesyl pyrophosphate ammonium salt (SIGMA-ALDRICH) を反応緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 μ M Zn(OAc)₂) 中で混合し 30°C, 1 時間インキュベート後、氷上でさらに 1 時間反応させた。反応は反応溶液を静置して行った。反応後沈殿物を遠沈して除去し、Superdex 75 pg (GE Healthcare) を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行い、溶出画分を濃縮して最終標品とした。ゲル濾過の緩衝液には Tris 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) を用いた。

以下ではこの項の方法でファルネシル化した RhoA (L193A) を単にファルネシル化 RhoA と表記する。また、脂質修飾をしていない RhoA (WT) を単に未修飾 RhoA と表記する。

2.2.4. X線小角散乱と多波長光散乱による溶液構造解析

X線小角散乱 (small angle X-ray scattering, SAXS) による溶液構造の解析を行った。本研究では SEC (size exclusion chromatography) -SAXS と呼ばれるゲル濾過カラムクロマトグラフィーからの溶出画分を直接 SAXS により測定する方法を用いた。また SEC-SAXS に先立ってゲル濾過カラムクロマトグラフィーを連結した多波長光散乱 SEC-MALS (multi angle light scattering) により試料の分子量と溶出位置の見積もりを行った。SmgGDS の両アイソフォームの単体と RhoA との複合体の SEC-SAXS データを Photon Factory BL10C (茨城) にて収集した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーには Superdex 200 increase (GE Healthcare) を用いた。ゲル濾過の緩衝液には Tris 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT) を用いた。SEC-SAXS では試

料がゲル濾過カラムから溶出し始めた時点で流速を 0.5 mL/min から 0.05 mL/min に変えて SAXS の測定を行った。溶出プロファイルは非放射位置で初期化された UV-Vis によって算出した。タンパク質濃度は A_{280} の値から計算した。SAXS におけるバックグラウンドデータ（緩衝液のみの散乱プロファイル）は試料溶出前の位置で収集した。10 枚のイメージを収集しその平均をバックグラウンドデータとした。測定温度 293 K、検出器の距離 2.0 m で測定を行った。200 枚以上のイメージを 1 つの実験から収集し、そのすべてに対して測定のデータ処理と慣性半径 (Radius of gyration, R_g) の計算を行った。これらの計算には SAngler⁴⁷ を用いた。SAXS の測定条件は 3.2.6 項、表 5 にまとめた。

以下に溶液構造の決定方法を示した。溶液構造の解析にはゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおけるトップピークに対する回折データを用いた。PRIMUS⁴⁸ を使いギニエプロットから慣性半径を求めた。また、GNOM⁴⁹ を使い $P(r)$ 関数を求めた。 $P(r)$ 関数は分子径の最大値 (D_{max}) と DAMMIN⁵⁰ によりダミーアトムモデルを構築する際に用いた。それぞれの試料に対し DAMMIN を 10 回行い 10 個の独立したモデルを作成後、DAMAVR⁵¹ によりそれらを平均化したモデルを初期モデルとして二度目の DAMMIN により最終的な溶液構造を決定した。

2.2.5. ゲル濾過クロマトグラフィーによる結合試験

SmgGDS と RhoA との結合能を調べることを目的として、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。カラムは Superdex 200 Increase (CV = 3 mL, GE Healthcare) あるいは Superdex 200 pg (CV = 24 mL, GE Healthcare) を用い、それぞれ 1 nmol, 2.5 nmol のタンパク質試料を注入した。ゲル濾過の緩衝液には Tris 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT) を用いた。RhoA HVR ペプチド (¹⁸¹ARRGKKKSGCLVL¹⁹³, 数字は残基番号) を用いた競合結合実験では、1 mM のペプチドをタンパク質試料に添加した。

2.2.6. 表面プラズモン共鳴による相互作用解析

SmgGDS と RhoA との結合能を調べることを目的として、表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance, SPR) による相互作用解析を行った。SPR アッセイには Biacore T100 instrument (GE Healthcare) を使用し、データ解析には T100 Evaluation software 2.0.4 (GE Healthcare) を用いた。およそ 500 R.U. の SmgGDS を CM5 センサーチップ上に固定化し、single-cycle kinetics アッセイを緩衝液 (10 mM HEPES-NaOH pH7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.005% Tween 20) 、測定温度 25°Cにて行った。流速 30 μ L/min にて RhoA を 240 秒間注入し、その後 600 秒間緩衝液を注入することで解離させた。Single-cycle kinetics アッセイでは 5 点の濃度系列の RhoA をチップの再生なしに連続的に注入した。野生型 RhoA の濃度系列は SmgGDS-558 に対し 10, 50, 100, 200, 400 nM、SmgGDS-607 に対し 0.4, 2, 10, 50, 100 nM、またファルネシル化 RhoA (L193A) の濃度系列は SmgGDS-558 に対し 2, 10, 50, 100, 200 nM、SmgGDS-607 に対し 0.4, 2, 10, 50, 100 nM とした。1:1 結合モデルを用いて結合速度定数 (k_{on})、解離速度定数 (k_{off})、解離定数 (K_D) を求めた。

2.2.7. 等温滴定型カロリメトリによる相互作用解析

SmgGDS と RhoA HVR ペプチドとの結合能を調べることを目的として、等温滴定型カロリメトリ (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) による相互作用解析を行った。ITC 実験は MicroCal iTC200 (GE Healthcare) を用い、緩衝液 (20 mM HEPES-NaOH pH 7.5 and 150 mM NaCl) 、測定温度 25°Cにて行った。セル側に SmgGDS を入れ、RhoA HVR ペプチド (181 ARRGKKKSGCLVL 193 , 数字は残基番号) を滴定した。ペプチドを 0.4 μ L, 1 回滴定後、2 μ L, 18 回滴定した。

2.2.8. GEF 活性測定試験

本研究では GEF 活性測定試験として蛍光標識 GDP である BODIPY FL GDP (Thermo Fisher Scientific) を予め付加した RhoA に SmgGDS を添加することで RhoA から BODIPY FL GDP が解離することによる蛍光強度変化を測定した。以下にその方法を示した。

まず、大腸菌から調製した 10 μM の未修飾またはファルネシル化 RhoA に対して 100 μM BODIPY FL GDP を反応緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT) 中で混合し 4°C, 一晚インキュベートした。反応液をゲル濾過カラムクロマトグラフィーあるいはアミコンウルトラ(Merck) による緩衝液の交換により過剰な BODIPY FL GDP を除去するとともに緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT) に置換した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーには Sephadex G-25 gel filtration column (GE Healthcare) あるいは Superdex 200 increase (GE Healthcare) を用いた。

GEF 活性試験は FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH) によって行った。測定条件は SmgGDS の正電荷領域の変異体解析をした際と、RhoA および SmgGDS-558 の隠されたポケットへの変異体解析の際で異なる。どちらの測定も 37°C で行い、各試料 $n = 3$ で測定した。

SmgGDS の正電荷領域の変異体解析をした際には、終濃度 0.2 μM の BODIPY-GDP を付加した RhoA、終濃度 0.02 μM の SmgGDS を 220 μL の緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 2.5 mM GDP) 中で混合し反応を開始した。励起波長 $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, 蛍光波長 $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ にて測定を行った。

RhoA および SmgGDS-558 の隠されたポケットへの変異体解析の際には、終濃度 0.2 μM の BODIPY-GDP を付加した RhoA、終濃度 0.04 μM の SmgGDS を 220 μL の緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 5 mM GMPPNP) 中で混

合し反応を開始した。励起波長 $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$, 蛍光波長 $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ にて測定を行った。

結果は GraFit ver7 によって解析した。未修飾 RhoA に対しては全測定点を解析に用いた。ファルネシル化 RhoA では測定点のうち最初の 10 点を解析に用いた。SmgGDS 未添加時の GDP リリース速度をコントロールとして添加時の相対速度を算出した。

2.2.9. プルダウンアッセイ

GST-SmgGDS および His6-RhoA をプルダウンアッセイに用いた。この試験は EDTA 含有緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT) を用いて行った。3 nmol の各タンパク質試料を 100 μL の cOmplete His-Tag Purification Resin (Merck) と混合し 4°C で 1 時間振盪した。EDTA 含有緩衝液で洗浄後、溶出用緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM Imidazole) で溶出させた。溶出した試料を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により電気泳動し、各ゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色した。

2.3. SmgGDS-558/ファルネシル化 RhoA 複合体の結晶構造解析

2.3.1. 結晶化初期スクリーニング

2.1.1項で得られた SmgGDS-558 (77-558) と 2.2.3項で得られたファルネシル化 RhoA をモル比 1 : 1 で混合し、SaltRX, PEG/Ion2, MembFac (Hampton Research), PEGs II suite, JCSG+ suite, PACT suite, ProComplex suite (QIAGEN), Morpeus (Molecular Dimensions) のスクリーニングキットを用い、結晶化初期スクリーニングを実施した。

2.3.2. 結晶化条件の最適化

結晶化初期スクリーニングで得た条件をもとに、蛋白質発現領域、蛋白質濃度、結晶化温度、PEG 濃度、PEG の種類、混合比、pH、マイクロシーディング、マクロシーディングの条件を検討し、結晶化条件の最適化を行った。

最終的に終濃度 5 mg/mL の SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA を結晶化試料とした。結晶化試料とリザーバー溶液 (0.2 M sodium malonate pH 6.0, 20% (w/v) PEG3350 あるいは 0.2 M tri-potassium citrate, 20% (w/v) PEG3350) を 1 : 1 の割合で混合し、10 °Cでシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化した。結晶を再現良く大量に作成するため、析出した結晶を Seed Bead Kits (Hampton Research) を用いて粉砕したものをマイクロシーディングの結晶核としてリザーバー液に少量混合し、結晶の再現に用いた。

2.3.3. X線結晶構造解析

X線回折データ収集は SPring-8 BL44XU (兵庫) にて行った。放射光施設での実験に先立って結晶をクライオプロテクト溶液 (各リザーバー溶液に終濃度 30% (w/v) glycerol を添加したもの) にクイックソークし、Cryo loop (Hampton Research) あるいは Litho loop (Molecular Dimensions) で拾った結晶を液体窒素で凍結しドライシッパーに移

して低温に保ったまま放射光施設へ輸送した。結晶によって脂質基の電子密度図（脂質の占有率）が異なったため、多数の回折像データから脂質基の占有率の高いデータの組み合わせを選択した。その方法を以下に示した。回折データセットは KAMO⁵²によって自動で処理された。回折像チェックのためのデータも含め 246 個のファイルが KAMO に読み込まれ、そのうち同一の格子定数を持つ 126 個に対して XDS³⁰による指数付けと積分計算がなされた。積分されたデータはデータ間の共相関に基づくヒエラルキークラスタリングにより組分けされ、各クラスター内のデータは XSCALE によってスケールリングされマージされた。またこの際に外れ値となる回折像は KAMO によって除去された。全てのクラスターに対して脂質基の *mFo-DFc* マップが計算された。我々はこの中から脂質基の電子密度が最も良好であった 2 つの結晶から得た 6 つのデータセットから成るクラスターを選択し、以降の精密化に用いた。分子置換には Molrep³⁴を用い、Refmac5³⁵と Phenix⁵³で構造精密化し coot³⁶によるモデル構築を行った。最終的な立体構造の妥当性評価を PROCHECK³⁷で実施し、最終構造を蛋白質構造データベース Protein Data Bank (PDB) に登録した (PDB ID: 5ZHX)。全ての回折像は Zenodo data depository (<https://doi.org/10.5281/zenodo.1134209>) に登録した。本論文における作図は PyMOL (<http://www.pymol.org>) または CueMol (<http://www.cuemol.org>) を用いた。ファルネシルシステインと相互作用のある残基の描画には LIGPLOT (+)⁵⁴を用いた。

2.3.4. AUTODOCK4 を用いたドッキングシミュレーション

SmgGDS-558 の隠されたポケットに対するグラニルグラニル化システインのドッキングシミュレーションを行った。シミュレーションには AUTODOCK4^{55,56}を用いた。SmgGDS-558 の complex II を剛体モデルとして用いた。シミュレーションは 1000 回実施し、最も結合エネルギーの小さいものを結果とした。

3. 結果

3.1. SmgGDS-558 単体の結晶構造解析

3.1.1. SmgGDS 各アイソフォームの精製

本項における SmgGDS の pGEX6P-1 ベクターを用いた発現系についての結果は多くが博士前期課程での研究結果に基づく。各発現領域における精製および結晶化結果の一覧は表 2 にまとめた。ここでは全長体と結晶化初期スクリーニングに用いた SmgGDS-558 (61-558) の精製過程のみ示した (図 6, 7)。

SmgGDS 全長体では両アイソフォームともにイオン交換カラムクロマトグラフィーを行ったところシングルピークとして溶出した。また、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーではモノマーの位置に溶出し、高純度単分散試料を調製できた。

SmgGDS-558 (61-558) をはじめとする SmgGDS-558 の N 末端側トランケーション体ではイオン交換カラムクロマトグラフィーにおいてダブルピークとなる場合がしばしば見られ前のピークを回収した。また、場合によってはもう一度イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。続くゲル濾過カラムクロマトグラフィーでは全長体同様モノマーの位置に溶出し、高純度単分散試料を調製できた。

トランケーション領域によって、菌体破碎後上清にこないもの、上清に来るがゲル濾過クロマトグラフィーにおいて多量体の位置に溶出してくるものが見られた。結果の一覧は表 2 にまとめた。

pGEX6P-1 ベクターを用いた発現系で SmgGDS-607 の N 末端トランケーション体は SmgGDS-607 (11-607 と 346-607) を除いて菌体破碎後上清に來なかつた。そのため、SmgGDS-607 の N 末端トランケーション体の調製には pET44a (+) ベクターを用いた発現系を用いた。ここでは SmgGDS-607 (77-607) の精製過程のみ図示した (図 8)。

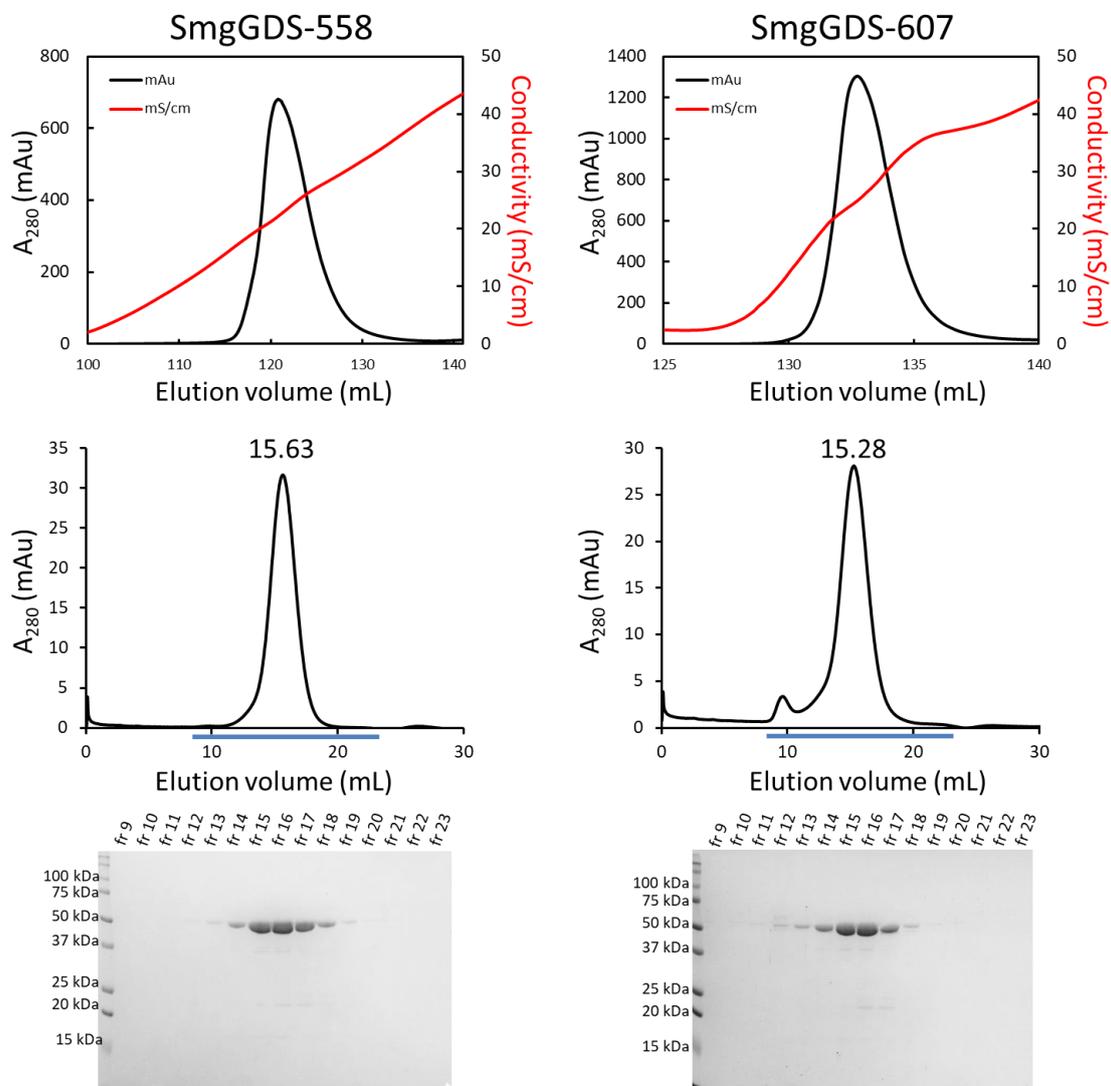


図 6 SmgGDS 全長体の精製過程

SmgGDS 全長体の精製過程のうちイオン交換カラム（上）とゲル濾過カラム（下）による精製の様子を示した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいて、トップピークの溶出位置をラベルし、青色線部分の溶出画分を SDS-PAGE し CBB 染色したものを示した。

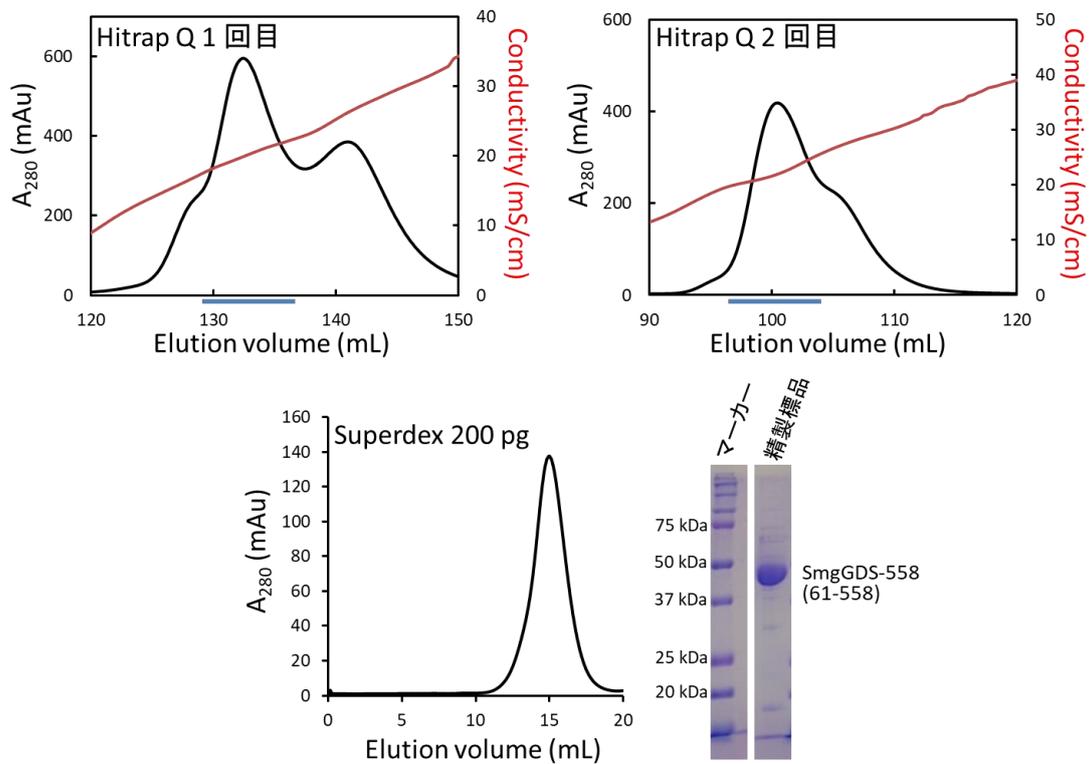


図 7 SmgGDS-558 (61-558) の精製過程

SmgGDS-558 (61-558) の精製過程のうちイオン交換カラム（上）とゲル濾過カラム（下）による精製の様子を示した。イオン交換カラムクロマトグラフィーにおいて回収した領域を青線で示した。また精製標品の SDS-PAGE を示した。

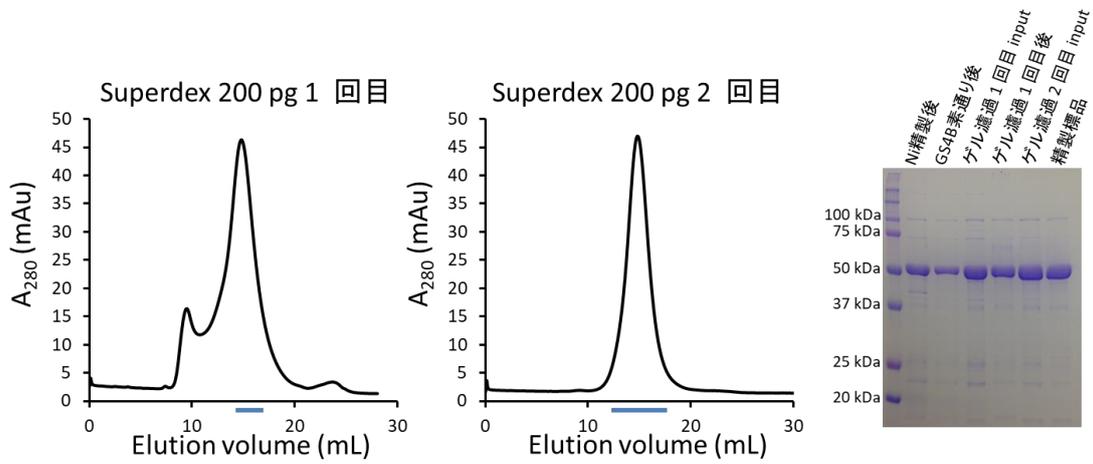


図 8 SmgGDS-607 (77-558) の精製過程

SmgGDS-607 (77-607) の精製過程のうちゲル濾過カラム (下) による精製の様子と cComplete His-Tag Purification Resin (Merck) 溶出後の精製過程の SDS-PAGE を示した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいて回収した領域を青線で示した。

3.1.2. 結晶化

3.1.1 項で得た各精製試料を用いて SmgGDS 単体の結晶化スクリーニングを実施した。結晶化スクリーニングを実施した発現領域は表 2 にまとめた。SmgGDS-558 (77-558) 単体の結晶化スクリーニングの結果、Protein Complex suite (QIAGEN) の No.24 (100 mM HEPES-NaOH pH 7, 100 mM MgCl₂, 15% PEG4000) で針状の微結晶が析出した (図 9)。この結晶化条件を最適化したところ 100 mM HEPES-NaOH pH 8.1, 100 mM MgCl₂, 20% PEG3350 をリザーバー液として 5 mg/mL のタンパク質溶液と 1:1 で混合し、sitting drop 蒸気拡散法、10°C でインキュベートするのが最良であった (図 9)。タンパク質溶液は Tris 緩衝液、HEPES 緩衝液どちらでも結晶を析出できた。また SmgGDS-558 の発現領域をスクリーニングしたところ、55-558, 57-558, 59-558, 61-558 でも結晶が析出した。最終的な構造解析には最も反射の良い 61-558 の発現領域を用いた。

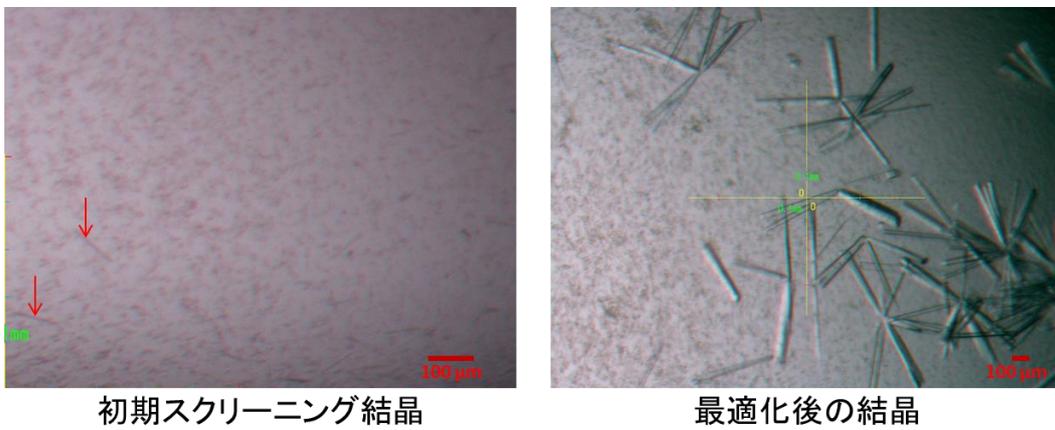


図 9 SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶

SmgGDS-558 の初期スクリーニング結晶 (左) と最適化後の結晶 (右)。初期スクリーニング結晶は小さいので矢印で示した。

表 2 SmgGDS の精製・単体結晶化状況一覧

精製列において、○は性状が良好だったもの、△は調製できるがゲル濾過カラムクロマトグラフィーにて多量体化の傾向が見られたもの、×は精製を試みたが破碎後上清に来なかったもの、－は調製を試みていないものを表した。また赤字で示した発現領域は結晶化スクリーニングを実施した。結晶列において○は結晶が析出したもの、×は結晶が析出なかったもの、－は結晶化を試みていないものを表した。また、No. 95, 100 に関しては GST タグをつけたまま結晶化スクリーニングを実施した。

No.	タンパク質	発現領域		発現ベクター	精製	結晶	No.	タンパク質	発現領域		発現ベクター	精製	結晶
		N	C						N	C			
1	SmgGDS-558	1 558		pGEX6P-1	○	×	63	SmgGDS-607	1 607		pGEX6P-1	○	×
2	SmgGDS-558	36 558		pGEX6P-1	△	-	64	SmgGDS-607	11 607		pGEX6P-1	○	×
3	SmgGDS-558	48 558		pGEX6P-1	△	×	65	SmgGDS-607	21 607		pGEX6P-1	×	-
4	SmgGDS-558	51 558		pGEX6P-1	○	×	66	SmgGDS-607	31 607		pGEX6P-1	×	-
5	SmgGDS-558	53 558		pGEX6P-1	○	-	67	SmgGDS-607	36 607		pGEX6P-1	×	-
6	SmgGDS-558	55 558		pGEX6P-1	○	○	68	SmgGDS-607	41 607		pGEX6P-1	×	-
7	SmgGDS-558	57 558		pGEX6P-1	○	○	69	SmgGDS-607	48 607		pGEX6P-1	×	-
8	SmgGDS-558	59 558		pGEX6P-1	○	○	70	SmgGDS-607	51 607		pGEX6P-1	×	-
9	SmgGDS-558	61 558		pGEX6P-1	○	○	71	SmgGDS-607	61 607		pGEX6P-1	×	-
10	SmgGDS-558	62 558		pGEX6P-1	-	-	72	SmgGDS-607	71 607		pGEX6P-1	×	-
11	SmgGDS-558	63 558		pGEX6P-1	-	-	73	SmgGDS-607	77 607		pGEX6P-1	×	-
12	SmgGDS-558	64 558		pGEX6P-1	-	-	74	SmgGDS-607	346 607		pGEX6P-1	○	×
13	SmgGDS-558	65 558		pGEX6P-1	○	-	75	SmgGDS-607	1 590		pGEX6P-1	△	-
14	SmgGDS-558	66 558		pGEX6P-1	-	-	76	SmgGDS-607	1 580		pGEX6P-1	△	-
15	SmgGDS-558	67 558		pGEX6P-1	-	-	77	SmgGDS-607	1 570		pGEX6P-1	×	-
16	SmgGDS-558	68 558		pGEX6P-1	-	-	78	SmgGDS-607	77 563		pGEX6P-1	×	-
17	SmgGDS-558	69 558		pGEX6P-1	○	-	79	SmgGDS-607	1 560		pGEX6P-1	△	-
18	SmgGDS-558	70 558		pGEX6P-1	-	-	80	SmgGDS-607	1 550		pGEX6P-1	△	×
19	SmgGDS-558	71 558		pGEX6P-1	-	-	81	SmgGDS-607	1 540		pGEX6P-1	△	-
20	SmgGDS-558	72 558		pGEX6P-1	-	-	82	SmgGDS-607	1 530		pGEX6P-1	△	-
21	SmgGDS-558	73 558		pGEX6P-1	○	-	83	SmgGDS-607	1 519		pGEX6P-1	×	-
22	SmgGDS-558	74 558		pGEX6P-1	-	-	84	SmgGDS-607	1 519		pGEX6P-1	×	-
23	SmgGDS-558	75 558		pGEX6P-1	○	-	85	SmgGDS-607	11 519		pGEX6P-1	×	-
24	SmgGDS-558	76 558		pGEX6P-1	○	-	86	SmgGDS-607	36 519		pGEX6P-1	-	-
25	SmgGDS-558	77 558		pGEX6P-1	○	○	87	SmgGDS-607	48 519		pGEX6P-1	-	-
26	SmgGDS-558	78 558		pGEX6P-1	○	-	88	SmgGDS-607	61 519		pGEX6P-1	-	-
27	SmgGDS-558	79 558		pGEX6P-1	○	-	89	SmgGDS-607	77 519		pGEX6P-1	×	-
28	SmgGDS-558	80 558		pGEX6P-1	-	-	90	SmgGDS-607	346 519		pGEX6P-1	×	-
29	SmgGDS-558	81 558		pGEX6P-1	○	-	91	SmgGDS-607	1 501		pGEX6P-1	×	-
30	SmgGDS-558	82 558		pGEX6P-1	-	-	92	SmgGDS-607	1 458		pGEX6P-1	○	-
31	SmgGDS-558	83 558		pGEX6P-1	-	-	93	SmgGDS-607	1 368		pGEX6P-1	×	-
32	SmgGDS-558	84 558		pGEX6P-1	-	-	94	SmgGDS-607	1 345		pGEX6P-1	○	-
33	SmgGDS-558	85 558		pGEX6P-1	○	×	95	SmgGDS-607	1 254		pGEX6P-1	×	×
34	SmgGDS-558	122 558		pGEX6P-1	×	-	96	SmgGDS-607	18 254		pGEX6P-1	×	-
35	SmgGDS-558	77 557		pGEX6P-1	○	-	97	SmgGDS-607	40 254		pGEX6P-1	×	-
36	SmgGDS-558	77 556		pGEX6P-1	○	-	98	SmgGDS-607	49 254		pGEX6P-1	×	-
37	SmgGDS-558	77 555		pGEX6P-1	○	-	99	SmgGDS-607	61 254		pGEX6P-1	×	-
38	SmgGDS-558	77 554		pGEX6P-1	○	-	100	SmgGDS-607	1 212		pGEX6P-1	×	×
39	SmgGDS-558	1 551		pGEX6P-1	△	×	101	SmgGDS-607	40 212		pGEX6P-1	×	-
40	SmgGDS-558	71 551		pGEX6P-1	×	-	102	SmgGDS-607	49 212		pGEX6P-1	×	-
41	SmgGDS-558	1 541		pGEX6P-1	△	×	103	SmgGDS-607	61 607		pETHP	○	×
42	SmgGDS-558	71 541		pGEX6P-1	×	-	104	SmgGDS-607	77 607		pETHP	○	×
43	SmgGDS-558	1 531		pGEX6P-1	△	×	105	SmgGDS-607	77 563		pETHP	△	×
44	SmgGDS-558	71 531		pGEX6P-1	×	-							
45	SmgGDS-558	1 521		pGEX6P-1	△	×							
46	SmgGDS-558	71 521		pGEX6P-1	×	-							
47	SmgGDS-558	1 511		pGEX6P-1	△	×							
48	SmgGDS-558	71 511		pGEX6P-1	×	-							
49	SmgGDS-558	1 501		pGEX6P-1	△	×							
50	SmgGDS-558	71 501		pGEX6P-1	×	-							
51	SmgGDS-558	71 491		pGEX6P-1	×	-							
52	SmgGDS-558	1 481		pGEX6P-1	△	×							
53	SmgGDS-558	11 481		pGEX6P-1	△	-							
54	SmgGDS-558	21 481		pGEX6P-1	△	-							
55	SmgGDS-558	31 481		pGEX6P-1	×	-							
56	SmgGDS-558	41 481		pGEX6P-1	×	-							
57	SmgGDS-558	51 481		pGEX6P-1	×	-							
58	SmgGDS-558	61 481		pGEX6P-1	×	-							
59	SmgGDS-558	71 481		pGEX6P-1	△	-							
60	SmgGDS-558	1 470		pGEX6P-1	○	-							
61	SmgGDS-558	77 470		pGEX6P-1	×	-							
62	SmgGDS-558	122 470		pGEX6P-1	×	-							

3.1.3. 構造決定

2.1.5 項に従って構造解析を行い，2.1 Å で構造決定した（表 3）。

表 3 SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶の回折強度データセット収集と構造精密化の統計

	値	
	hSmgGDS-558 (61-558)	
	野生型	Se-Met 誘導体
< Data collection >		
Space group	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2
wavelength (Å)	0.90000	0.9720
Unit cell (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , β)	194.3, 51.1, 52.4,	196.3, 50.8, 52.8,
X-ray source	Spring-8 BL44XU	PF BL17A
Resolution (Å) (outer)	50-2.1 (2.11-2.07)	50-2.6 (2.67-2.60)
No. of obs. ref.	348332	216767
No. of unique. ref.	32018	31254
Completeness (%)	99.9 (99.9)	99.8 (99.7)
$R_{p.i.m.}$ or R_{meas}	2.9 (45.9)	22.0 (217.1)
$I/\sigma(I)$	47.7 (2.4)	8.7 (1.5)
< Refinement >		
Resolution (Å)	49.4-2.1	
R_{work} (%) ^c	21.5	
R_{free} (%) ^d	25.2	
RMSD		
Bond length (Å)	0.008	
Bond angles (°)	1.239	
Number of atoms		
Protein	3458	
Ligand	74	
Ramachandran plots		
Favored	450 (96%)	
Allowed	19 (4%)	
Outlier	0	

^a 括弧内は最外殻での統計値を表す。

^b 野生型では $R_{p.i.m.}$ を Se-Met 誘導体では R_{meas} を示した。

^c F_o および F_c はそれぞれ実測および計算構造因子振幅であり、 $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$ とした。

^d 全反射の 5% を用いて計算した R 値が R_{free} であり、これらの反射は精密化には用いなかった。

3.1.4. 全体構造

SmgGDS-558 (61-558) の結晶構造は10個の完全なARM (ARM D-M) と残基番号79-87がアンフォールドした ARM B によって構成されていた (図 10)。結晶構造において N 末端側の 18 残基と C 末端側 1 残基は電子密度が観測されなかった。また C 末端側の 66 残基は電子密度が貧弱であったためモデル中では側鎖を置かず全てアラニンとした。結晶化のために欠損させた領域を含む SmgGDS-558 全長の N 末端側の 70 残基は ARM で構成されるとアミノ酸配列から予想されるため、SmgGDS-558 全長は 12 個の ARM によって成るだろう。またこのことから SmgGDS-607 全長は 13 個の ARM から成るものと考えられる。SmgGDS-558 は構造既知の Dbl ファミリー、Dock ファミリーとは異なる超螺旋型構造をとることが明らかとなった。

SmgGDS-558 (61-558) の結晶構造の静電ポテンシャル図を描いてみると SmgGDS-558 には特徴的な ARM B-F にかけての負に帯電した領域 (負電荷領域) と SmgGDS の凹面にあたる ARM H と I にかけての正に帯電した領域 (正電荷領域) が存在すると分かった (図 11)。近年の *in silico* ドッキングスタディと変異体解析によって SmgGDS-607 の酸性残基 (D239, E242, E246, E253, D255) は Rap1 の PBR との結合に重要であることが示唆された⁵⁷。また、SmgGDS-607 の酸性残基 (E213, E217, D239, E242, E246, E253, D255) への変異体は RhoA に対する GEF 活性を低下させると報告されている¹⁵。これらの残基をマッピングしてみると負電荷領域の周辺に位置していることから負電荷領域は低分子量 G タンパク質の PBR の認識に関わることが示唆された⁵⁷。

SmgGDS-558 の N338 残基 (SmgGDS-607 における N387 残基) は低分子量 G タンパク質との結合に不可欠であることで知られている^{14,15}。例えば、SmgGDS-558 の N338A 変異体は Di-Ras2 と相互作用できないことが示されている¹⁴。また、SmgGDS-607 の凹面にある保存された N342, R345, H379, S383, N387, K395 残基への変異体は RhoA への GEF

活性を低下させると報告されている。これらの残基は正電荷領域の周辺に位置しており、この領域も低分子量 G タンパク質の認識に重要であることが示唆された。

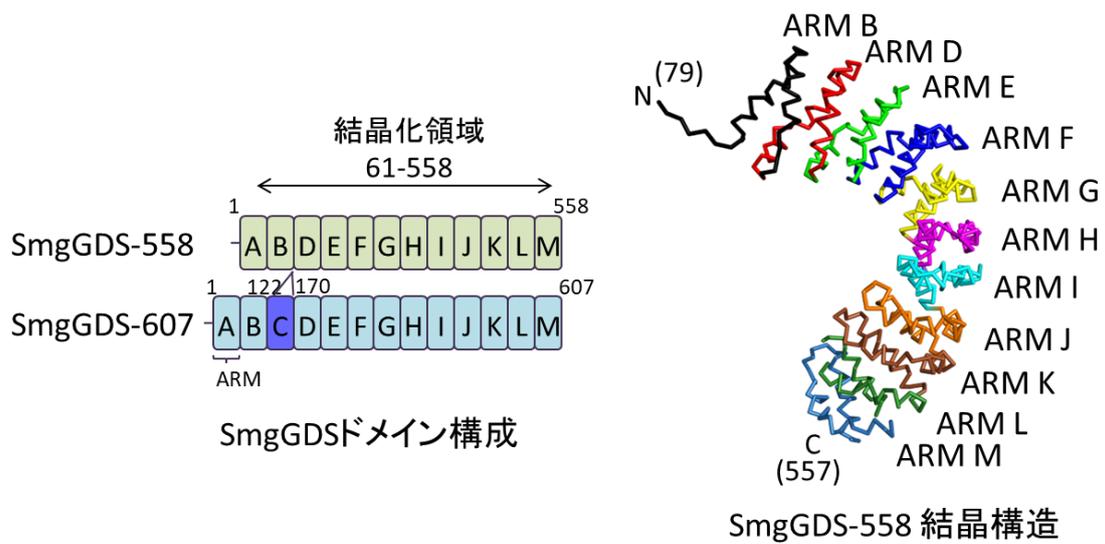


図 10 SmgGDS のドメイン構成と SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造

SmgGDS のドメイン構成 (左) と SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造リボン図 (右)。右図括弧内の数字は末端残基の残基番号を表す。

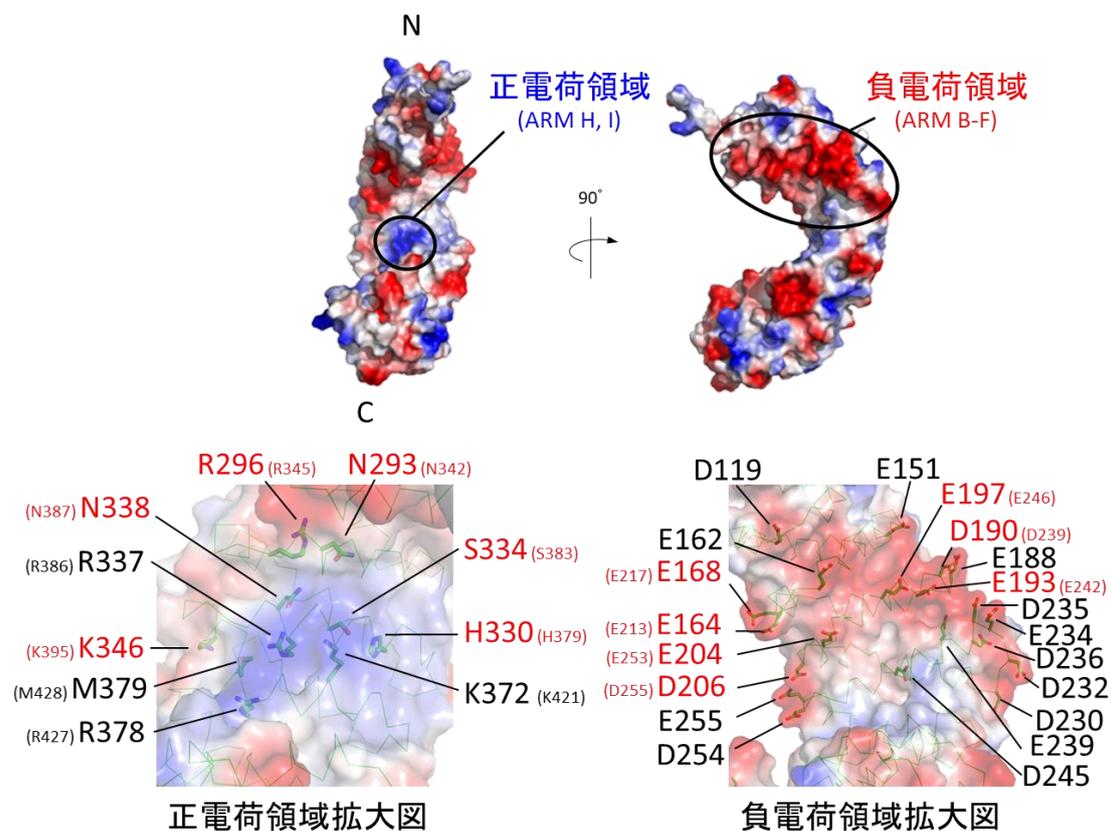


図 11 SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造静電ポテンシャル図

SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造静電ポテンシャル図 (上) と正電荷領域、負電荷領域の拡大図 (下) を示した。正電荷領域拡大図では先行研究で低分子量 G タンパク質の認識あるいは GEF 活性に重要であることが示唆された残基と本研究で変異体解析を行った残基をラベルした。負電荷領域拡大図では負に帯電した残基をすべてラベルした。括弧内は SmgGDS-607 の残基番号を表した。赤字で示された残基は先行研究において低分子量 G タンパク質の認識あるいは GEF 活性に重要であることが示唆された残基を表す。

3.2. SmgGDS の RhoA に対する相互作用・機能解析

3.2.1. RhoA の精製

本研究において野生型および変異体 RhoA は全て同様の調製方法により調製できた。本項における RhoA の調製結果は L193A 変異体のものを示した。Histrap (GE Healthcare) において RhoA はシングルピークとして溶出した。また、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーではモノマーの位置に溶出し、高純度単分散試料を調製できた (図 12)。

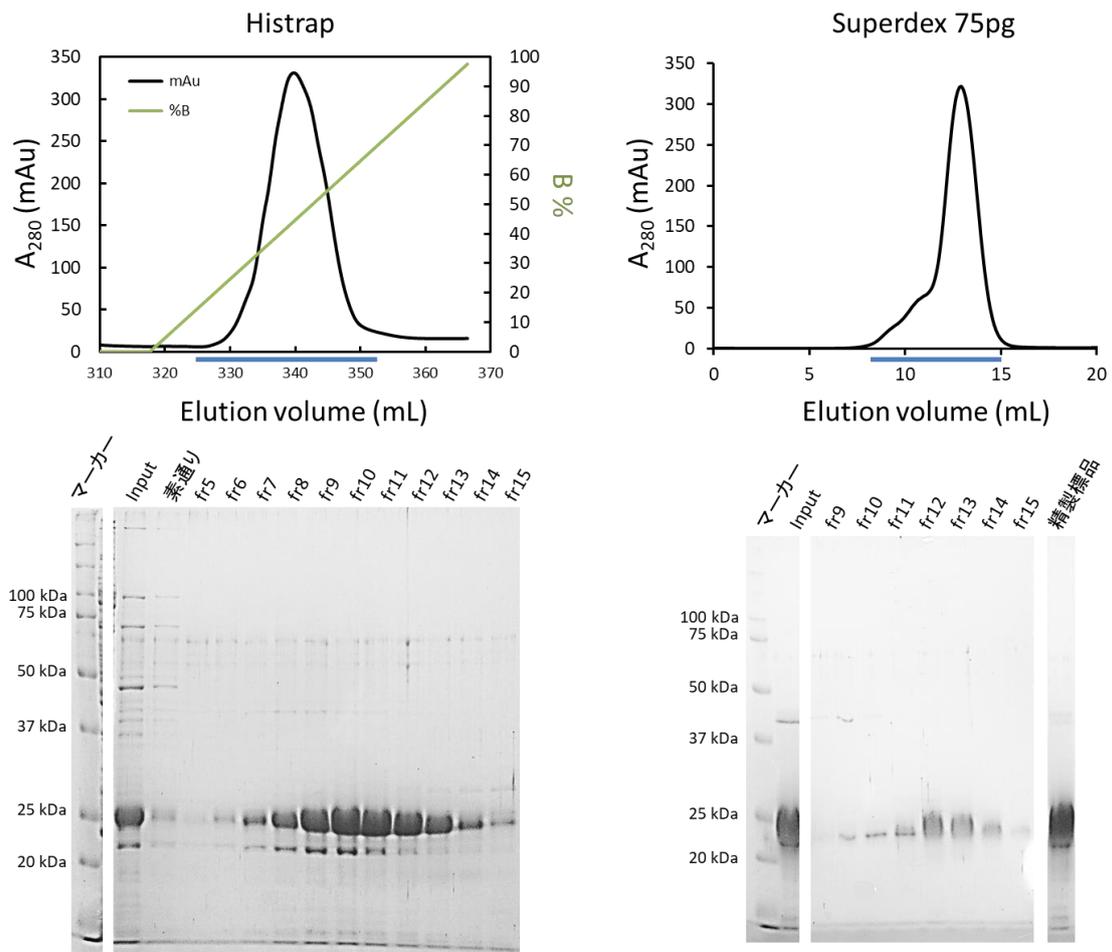


図 12 RhoA の精製過程

RhoA (L193A) の精製過程のうち Histrap カラム (左) とゲル濾過カラム (右) による精製の様子を示した。青色線部分の溶出画分を SDS-PAGE し CBB 染色したものを示した。

3.2.2. FTase の精製

2.2.2 項の方法に従って FTase を調製した。本項では Hitrap Q (GE Healthcare) による精製過程を示した (図 13)。

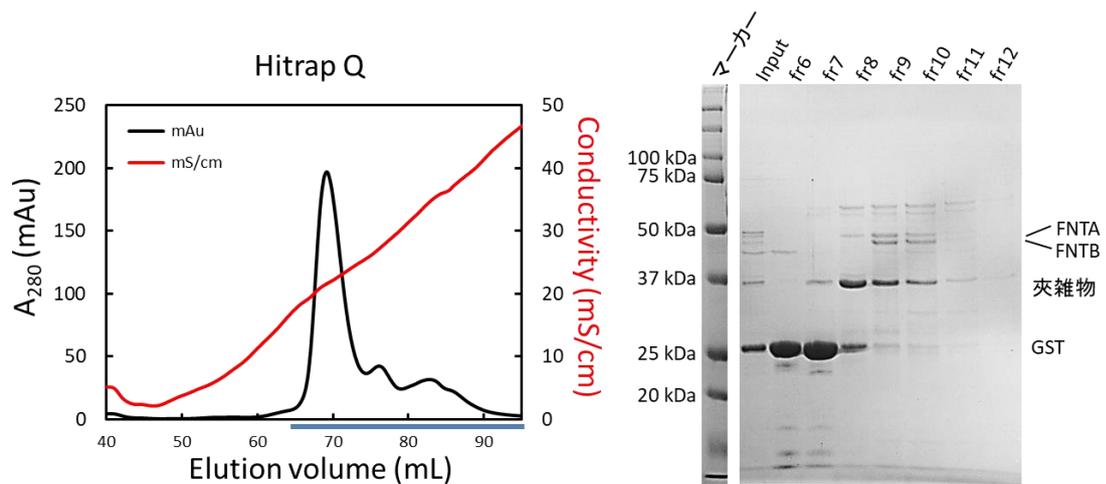


図 13 FTase の精製過程

FTase 調製過程におけるのゲル濾過カラムクロマトグラフィーの様子を示した。青色線部分の溶出画分を SDS-PAGE し CBB 染色したものを示した。

3.2.3. ファルネシル化 RhoA の調製

In vitro におけるファルネシル化処理後の試料をゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製したところ、FTase と FPP を分離することが出来た。ファルネシル化 RhoA はモノマーの位置に溶出し、高純度単分散試料を調製できた (図 14)。

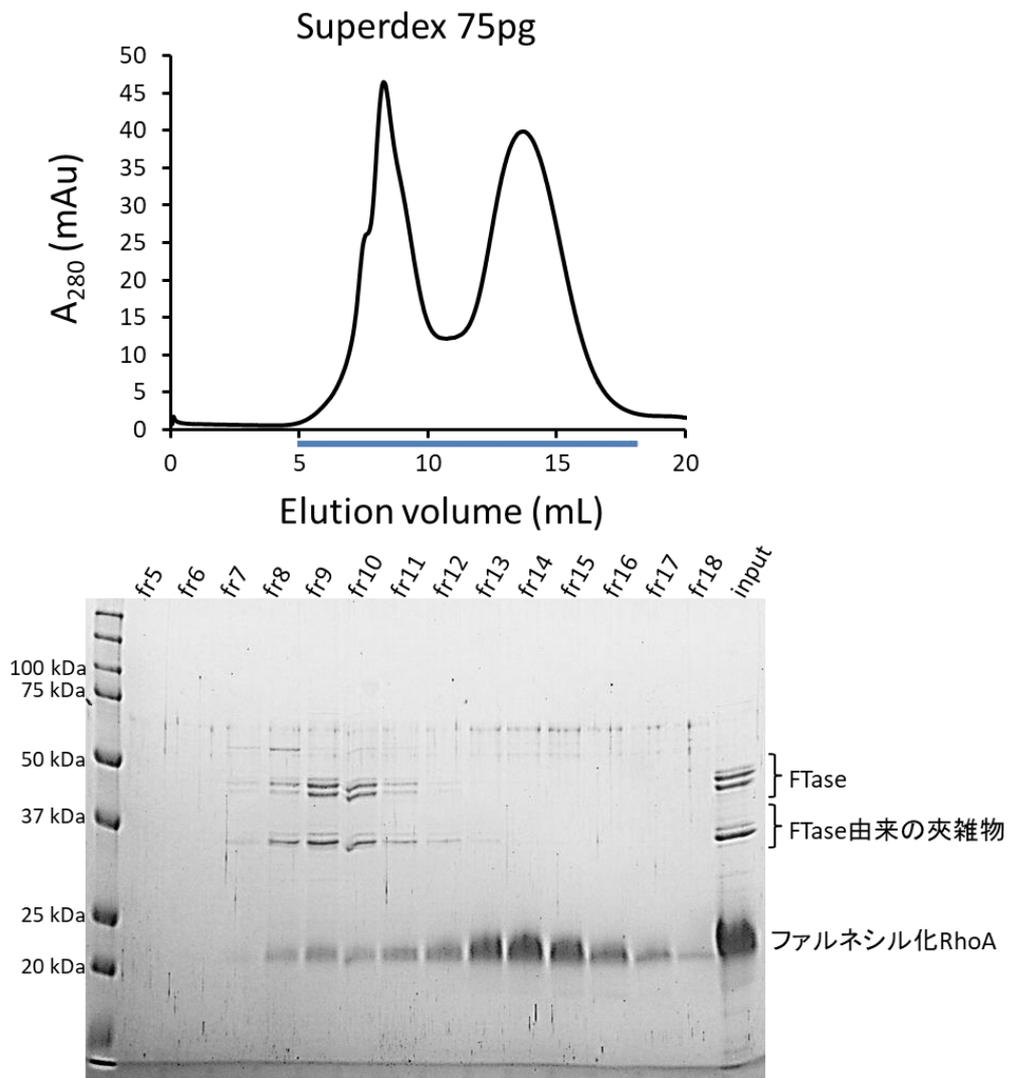


図 14 ファルネシル化 RhoA 調製後のゲル濾過カラムクロマトグラフィー

ファルネシル化 RhoA 調製後のゲル濾過カラムクロマトグラフィーの様子を示した。青色線部分の溶出画分を SDS-PAGE し CBB 染色したものを示した。

3.2.4. SPR による解離定数の算出

調製した SmgGDS、RhoA 試料を用いて SPR による解離定数の測定を行った。その結果、SmgGDS-558 では未修飾 RhoA よりもファルネシル化 RhoA をより強く結合した (K_D はそれぞれ 51.3 nM, 2.3 nM)。その一方で SmgGDS-607 ではファルネシル化 RhoA よりも未修飾 RhoA をより強く結合した (K_D はそれぞれ 3.1 nM, 0.8 nM)。測定プロファイルと算出された結合パラメータを図 15 と表 4 にまとめた。

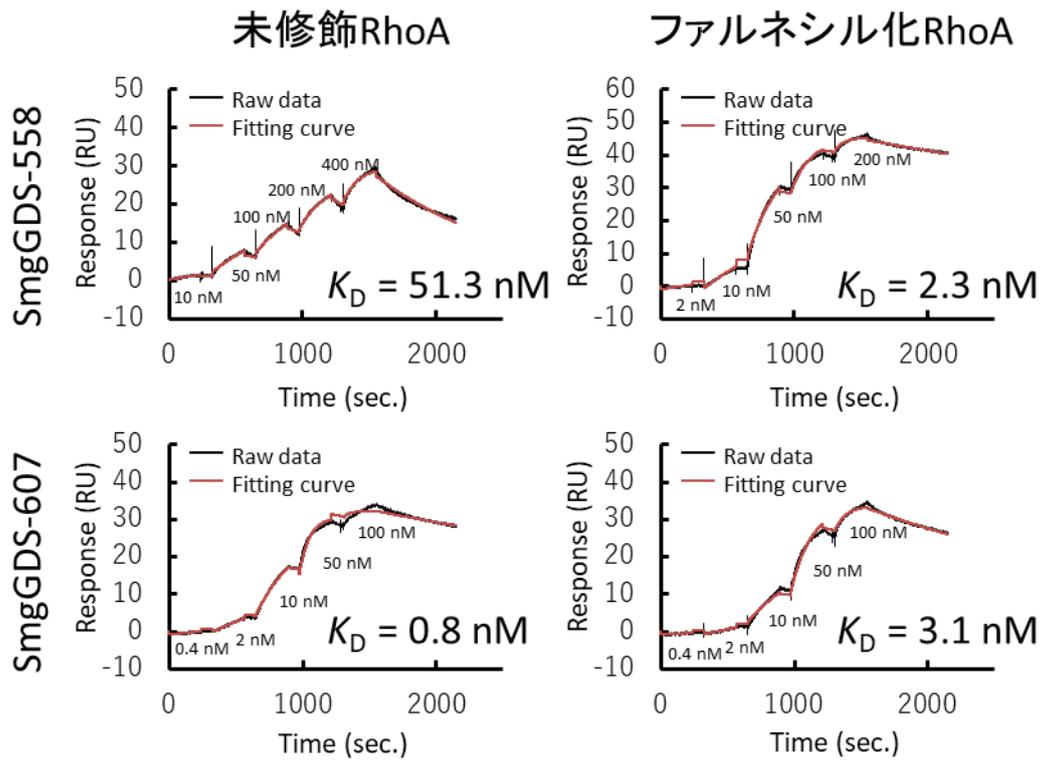


図 15 SPR 測定結果

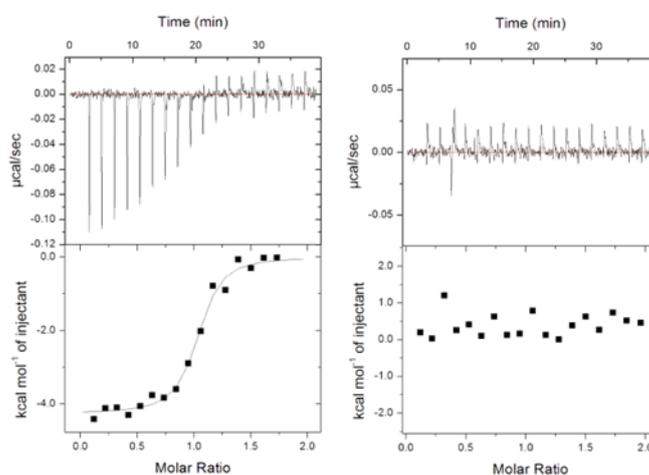
表 4 SPR により算出された結合パラメータ

SmgGDS-558	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_{D} (nM)
未修飾 RhoA	1.9×10^4	9.9×10^{-4}	51.3
ファルネシル化 RhoA	7.2×10^4	1.7×10^{-4}	2.3
SmgGDS-607	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_{D} (nM)
未修飾 RhoA	2.6×10^5	2.2×10^{-4}	0.8
ファルネシル化 RhoA	1.3×10^5	3.9×10^{-4}	3.1

3.2.5. ITC による RhoA HVR ペプチド結合試験

SmgGDS は低分子量 G タンパク質のうち、HVR に PBR を持つものと結合する。また、SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造の ARM B-F にかけて負電荷領域が存在していたことからこの領域が PBR と相互作用すると予想された。そこで RhoA の HVR に相当するペプチド ($^{181}\text{ARRGKKKSGCLVL}^{193}$, 数字は残基番号) に対する SmgGDS 両アイソフォームの結合能を、ITC を用いて評価した。その結果、SmgGDS-607 では強い親和性 ($K_D = 104$ nM) を示したのに対して、SmgGDS-558 では結合が見られなかった (図 16)。

10 μ M SmgGDS-607 10 μ M SmgGDS-558
 Titrated by Titrated by
 100 μ M RhoA HVR 100 μ M RhoA HVR



$K_D = 104$ nM

N.D.

図 16 ITC 測定結果

3.2.6. X線小角散乱と多波長光散乱による溶液構造解析

2.2.4 項に従って SmgGDS 全長体の両アイソフォームの単体および RhoA との複合体の SEC-SAXS 測定を行った。SAXS の測定条件および測定・解析結果の統計値を表 5 に示した。各測定における散乱曲線と解析により得られたダミーアトムモデルを図 17, 18 に示した。ダミーアトムモデルは SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造との比較を表した。また、SmgGDS-558/未修飾 RhoA 複合体について SEC-MALS を行った (図 19)。分子量は 74.0 kDa と見積もられた。SmgGDS-558 と RhoA の理論分子量はそれぞれ 61 kDa, 22 kDa であり、モル比 1 : 1 で結合していることが示された。

表 5 SAXS の測定条件および測定・解析結果の統計値

Data-collection parameters	SmgGDS-558	SmgGDS-558 + 未修飾 RhoA	SmgGDS-558 + ファルネシル化 RhoA	SmgGDS-607	SmgGDS-607 + 未修飾 RhoA	SmgGDS-607 + ファルネシル化 RhoA
Instrument	BL10C-SEC-SAXS	BL10C-SEC-SAXS	BL10C-SEC-SAXS	BL10C-SEC-SAXS	BL10C-SEC-SAXS	BL10C-SEC-SAXS
Wavelength (Å)	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
q range (Å ⁻¹) ^a	0.0124-0.2218	0.0145-0.2404	0.0124-0.2631	0.0161-0.2250	0.0140-0.2298	0.0134-0.2121
Exposure time (sec.)	20×1 frame	20×1 frame	20×1 frame	20×1 frame	20×1 frame	20×1 frame
Temperature (K)	293	293	293	293	293	293
Structural parameters						
$I(0)$ (cm ⁻¹) [from $I(r)$]	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Rg (Å) [from $P(r)$]	35.0 ± 0.30	33.2 ± 0.26	33.0 ± 0.12	36.9 ± 0.24	34.2 ± 0.16	35.6 ± 0.28
$I(0)$ (cm ⁻¹) [from Guinier]	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Rg (Å) [from Guinier]	34.0 ± 1.91	32.3 ± 1.53	32.8 ± 1.64	35.7 ± 1.46	33.7 ± 0.64	34.68 ± 2.43
D_{max} (Å)	120	111	100	120	116	126
Porod volume estimate (Å ³)	65438	105220	105815	77651	118137	113490
M.W calculated with porod volume ^b	40898.8	65762.5	66134.4	48531.9	73835.6	70931.3
Dry volume calculated from sequence ^c	73848	100164	100113	80235	106551	106501
Mean value of NSD	0.618 ± 0.014	0.653 ± 0.061	0.613 ± 0.004	0.654 ± 0.020	0.618 ± 0.021	0.636 ± 0.006
Software employed						
Primary data reduction	SAngher	SAngher	SAngher	SAngher	SAngher	SAngher
Data processing	PRIMUSQT	PRIMUSQT	PRIMUSQT	PRIMUSQT	PRIMUSQT	PRIMUSQT
<i>Ab initio</i> analysis	DAMMIN	DAMMIN	DAMMIN	DAMMIN	DAMMIN	DAMMIN
Validation and averaging	DAMAVER	DAMAVER	DAMAVER	DAMAVER	DAMAVER	DAMAVER
Three-dimensional graphics representation	PyMOL	PyMOL	PyMOL	PyMOL	PyMOL	PyMOL

^a 溶液構造決定に用いた q の範囲を表す。 $q = 4$ す。用いた nt。

^b Molecular weight = 0.625 * Porod volume

^c Peptide Property Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/proteincalc.html>) にて計算した Approximate Volume を表示した。ファルネシル基の体積は考慮していない。

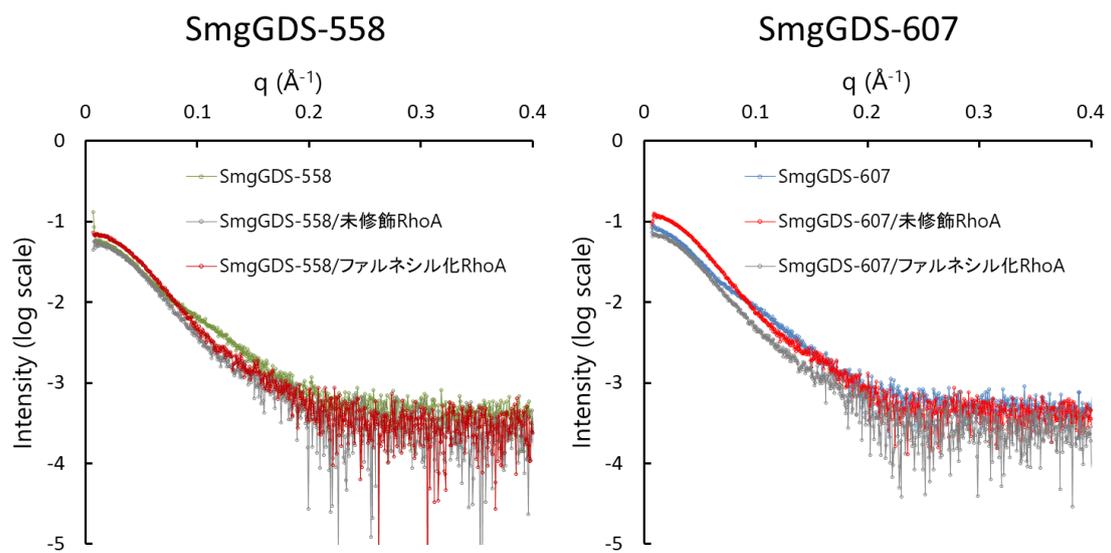


図 17 散乱曲線の比較

SEC-SAXS における散乱曲線を示した。ただし、横軸の q は $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ を表す。

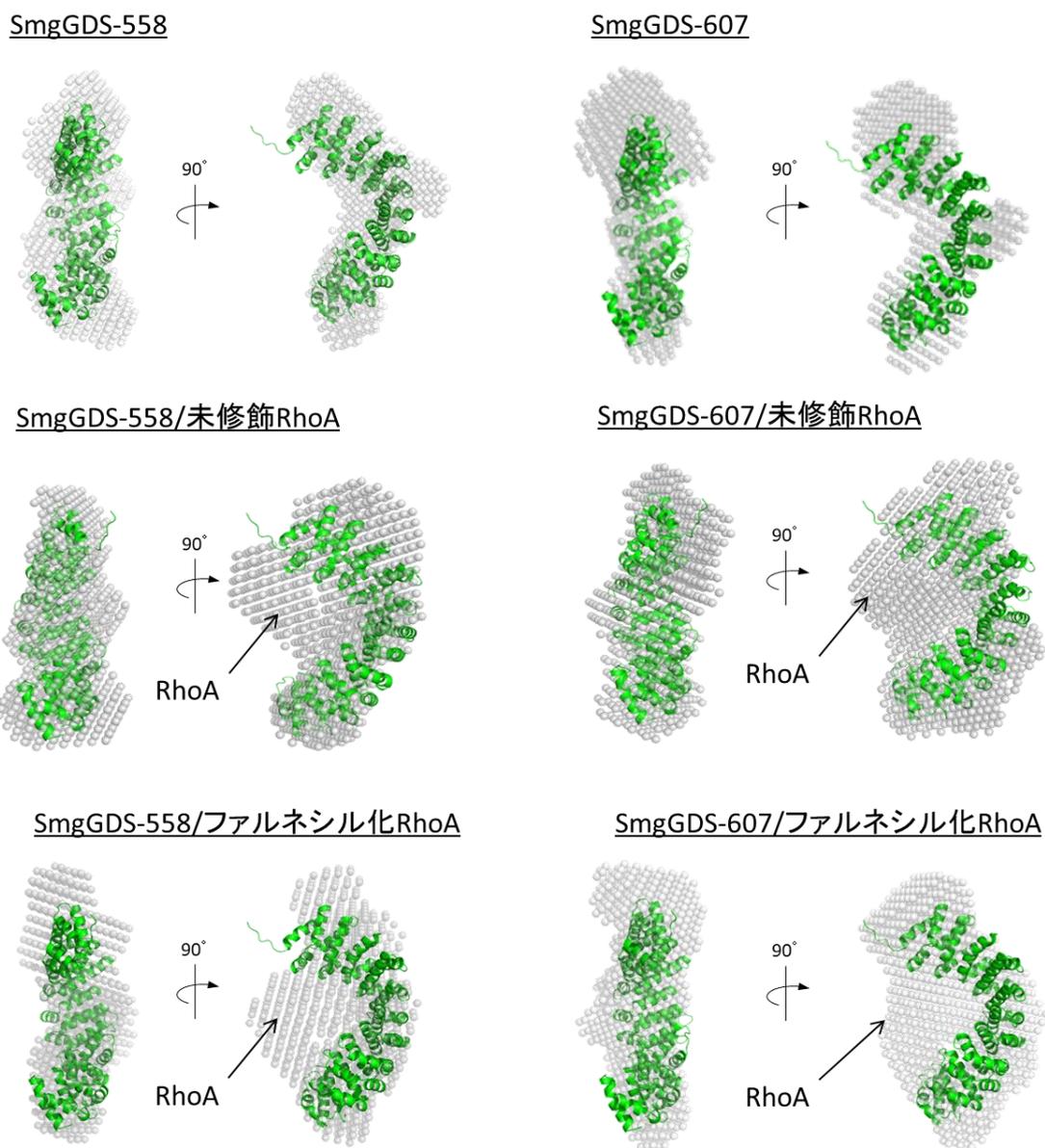


図 18 ダミーアトムモデルと SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造の比較

ダミーアトムモデルは白色のダミー原子で、SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶構造を緑色のリボン図で表示した。RhoA と考えられる溶液構造を矢印で示した。

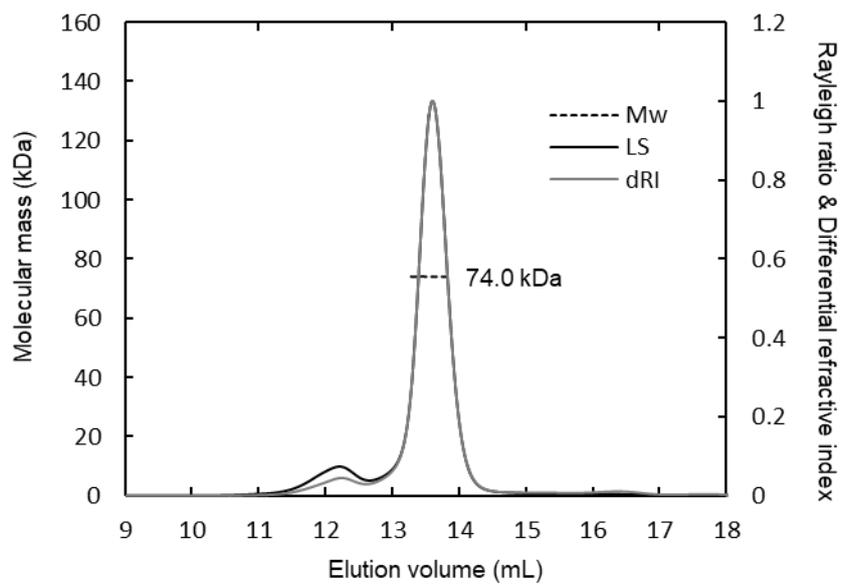


図 19 SmgGDS-558/未修飾 RhoA の SEC-MALS プロファイル

トップピークでの MALS からの計算分子量を図中に表示した。

3.2.7. SmgGDS 正電荷領域への変異体解析

3.2.7.1. 未修飾 RhoA との結合試験

SEC-SAXS によって SmgGDS の凹面に RhoA が結合することが示唆された。このため SmgGDS の凹面にある正電荷領域への変異体を作成し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる結合試験を行った (図 20)。本号では未修飾 RhoA を用いた。SmgGDS-607 では結合力の低下はほとんど見られなかったが、SmgGDS-558 では H330A, R337A, N338A, K372A 変異体において結合の解離が見られた。

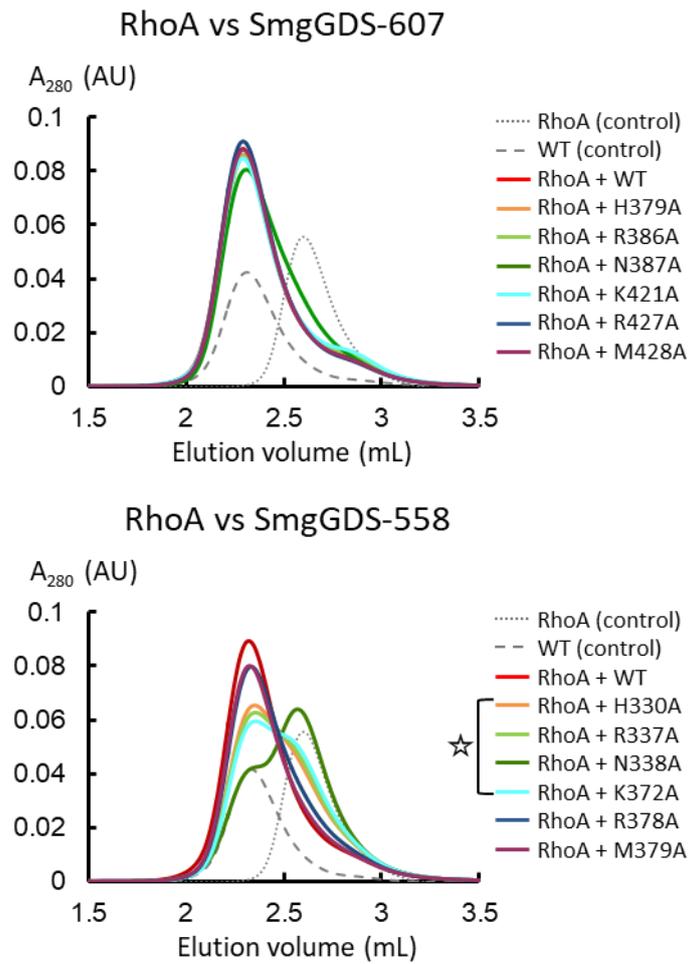


図 20 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる結合試験

RhoA と SmgGDS 単体のプロファイルを破線で、混合物のプロファイルを実線で表示した。SmgGDS 単体は代表として野生型のものを表示した。野生型に比べて結合力の低下が見られたものを星印で表した。

3.2.7.2. GEF 活性試験

SmgGDS の凹面にある正電荷領域への変異体を用いて GEF 活性試験を行った (図 21, 22)。野生型 SmgGDS-558 はファルネシル化 RhoA にのみ GEF 活性を示した一方で、SmgGDS-607 では未修飾の RhoA に対しより強い活性を持っていた。この傾向は SPR の結果と一貫するものであった。また、野生型と変異体の GEF 活性を比較すると、SmgGDS-607 の 5 つの変異体 (H379A, R386A, K421A, R427A, N387A) で顕著な活性の低下が見られた。この傾向は SmgGDS-558 でも同様であった。このことから正電荷領域は両アイソフォームに共通の GEF 活性に重要な領域であることが示唆された。

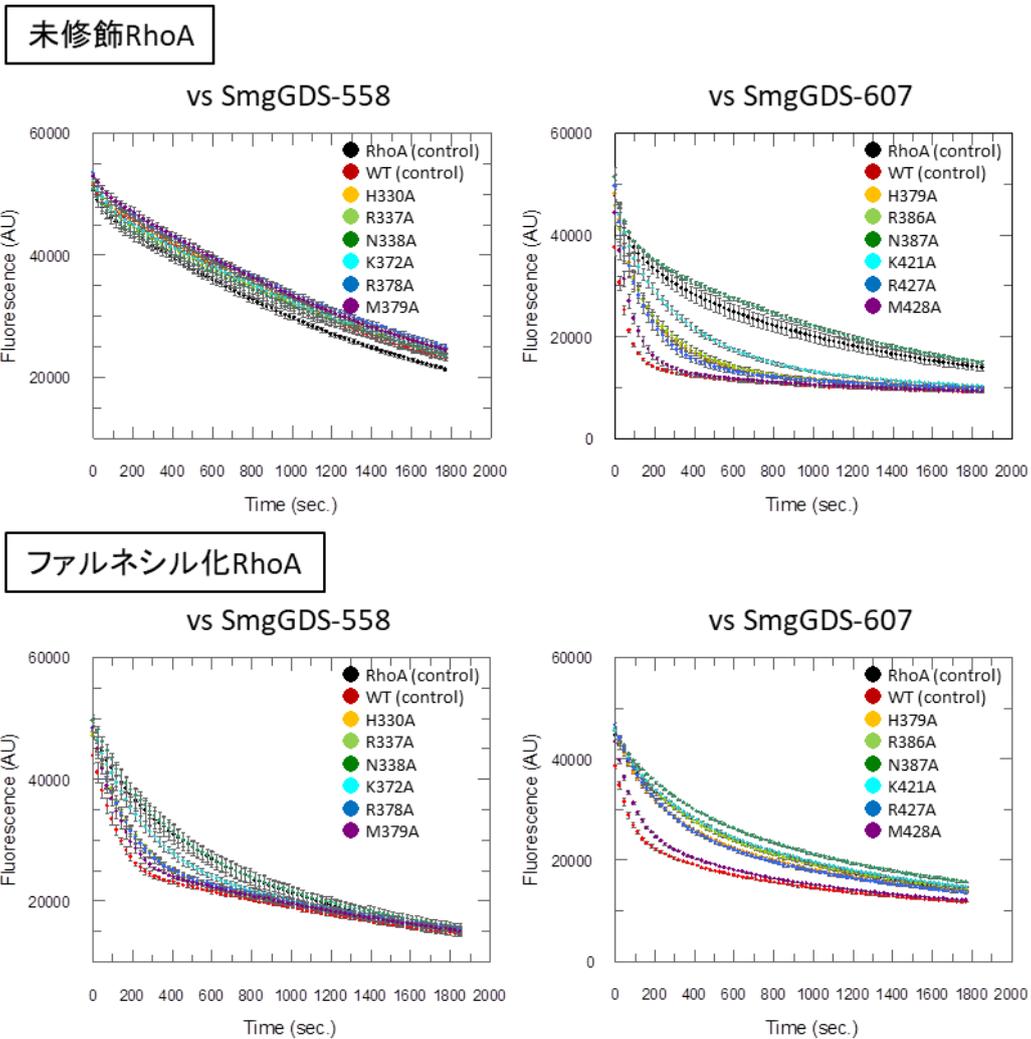


図 21 GEF 活性試験プロファイル

GEF 活性試験のプロファイルを示した。全ての測定は $n = 3$ で行われ、標準誤差をエラーバーとして表示した。

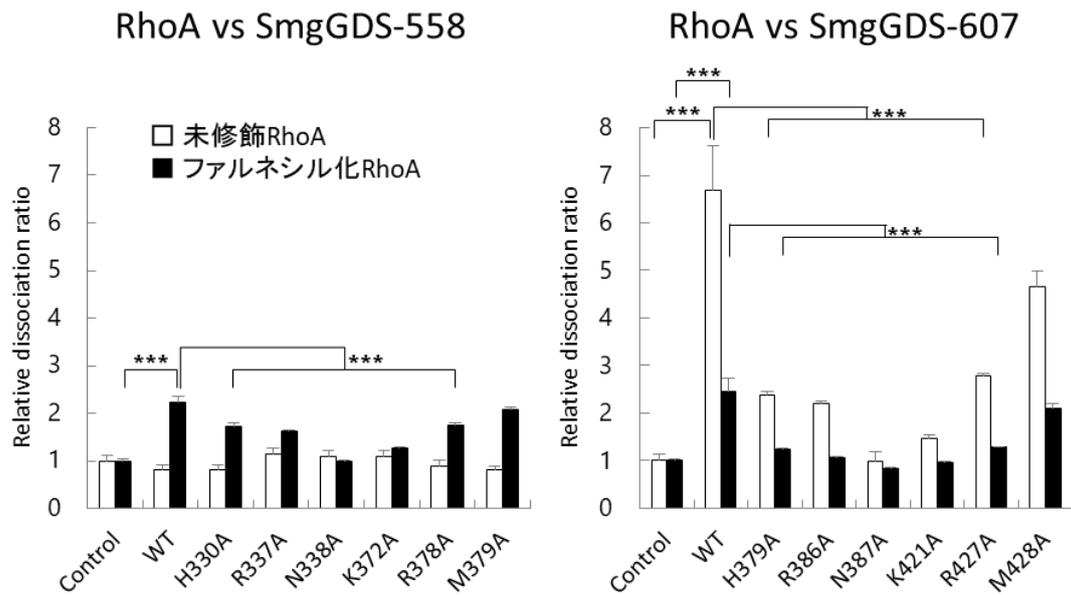


図 22 GEF 活性試験解析結果

SmgGDS 未添加時の GDP 解離速度を 1 としたときの相対的な GDP 解離速度を示した。全ての測定は $n = 3$ で行われ、標準誤差をエラーバーとして表示した。***は $p < 0.001$ を表す。

3.2.7.3. ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる競合阻害試験

3.2.7.1 号において SmgGDS-607 (N387A) 変異体は未修飾 RhoA との結合能を保っていたのに対し、3.2.7.2 号では GEF 活性を完全に失うということが明らかとなった。このことから筆者は SmgGDS には GEF 活性を担う凹面とは別に RhoA の HVR を結合する相互作用部位が存在すると仮説を立てた。これを検証するため、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる SmgGDS-607 (N387A) と RhoA の複合体化競合阻害試験を実施した (図 23)。SmgGDS-607 (N387A) と RhoA の複合体溶液に終濃度 1 mM となるように RhoA の HVR ペプチドを混合すると複合体のピークの高さが減少した。このことから SmgGDS-607 (N387A) はその凹面による RhoA との結合力は失っているものの、HVR 認識部位を用いて RhoA の HVR と結合できるということが示唆された。

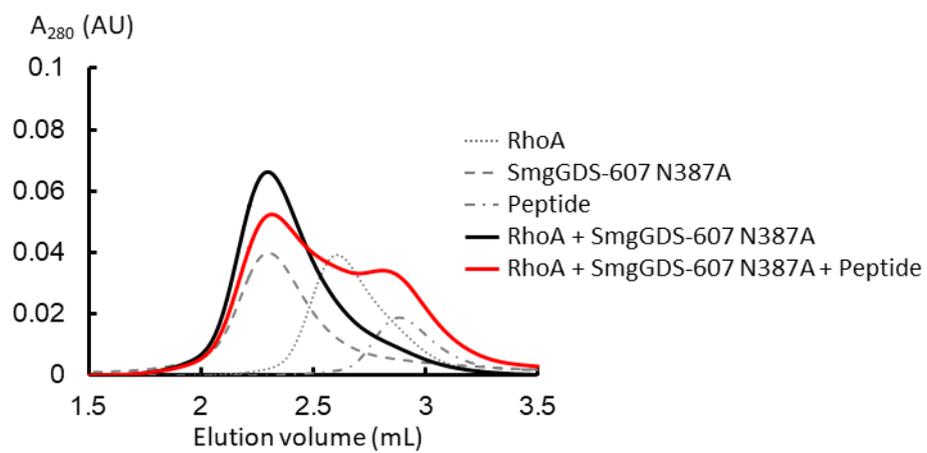


図 23 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーによる競合阻害試験

各単体のプロファイルを破線で、混合物のプロファイルを実線で表示した。

3.2.8. SmgGDS-558 の全長と 61-558 での GEF 活性比較

SmgGDS-558 単体の構造解析では N 末端を 60 残基削った領域を結晶化に用いた。結晶化領域が GEF 活性を保持しているかどうか調べるため、全長との活性の比較を行った (図 24)。その結果どちらもファルネシル化 RhoA に対して同等の活性を持っていた。

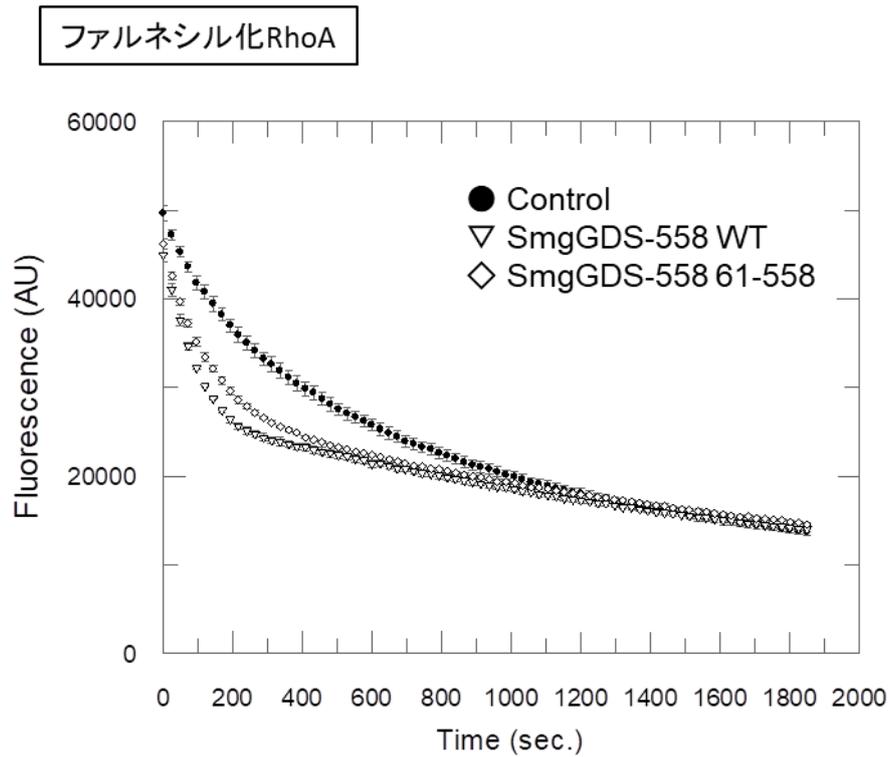


図 24 SmgGDS-558 の全長と 61-558 の GEF 活性比較

GEF 活性試験のプロファイルを示した。全ての測定は $n = 3$ で行われ、標準誤差をエラーバーとして表示した。

3.2.9. ファルネシル化 RhoA と SmgGDS との結合試験

ファルネシル化 RhoA と SmgGDS との結合能をゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより評価した (図 25)。SmgGDS には各アイソフォーム野生型と SmgGDS-558 (N338A)、SmgGDS-607 (N387A) 変異体を用いた。結果、どの組み合わせでも複合体を形成しており、ファルネシル化により RhoA は SmgGDS-558 (N338A) に対する結合能を高めていること、SmgGDS-607 (N387A) とも結合できるということが明らかとなった。

ファルネシル化RhoA

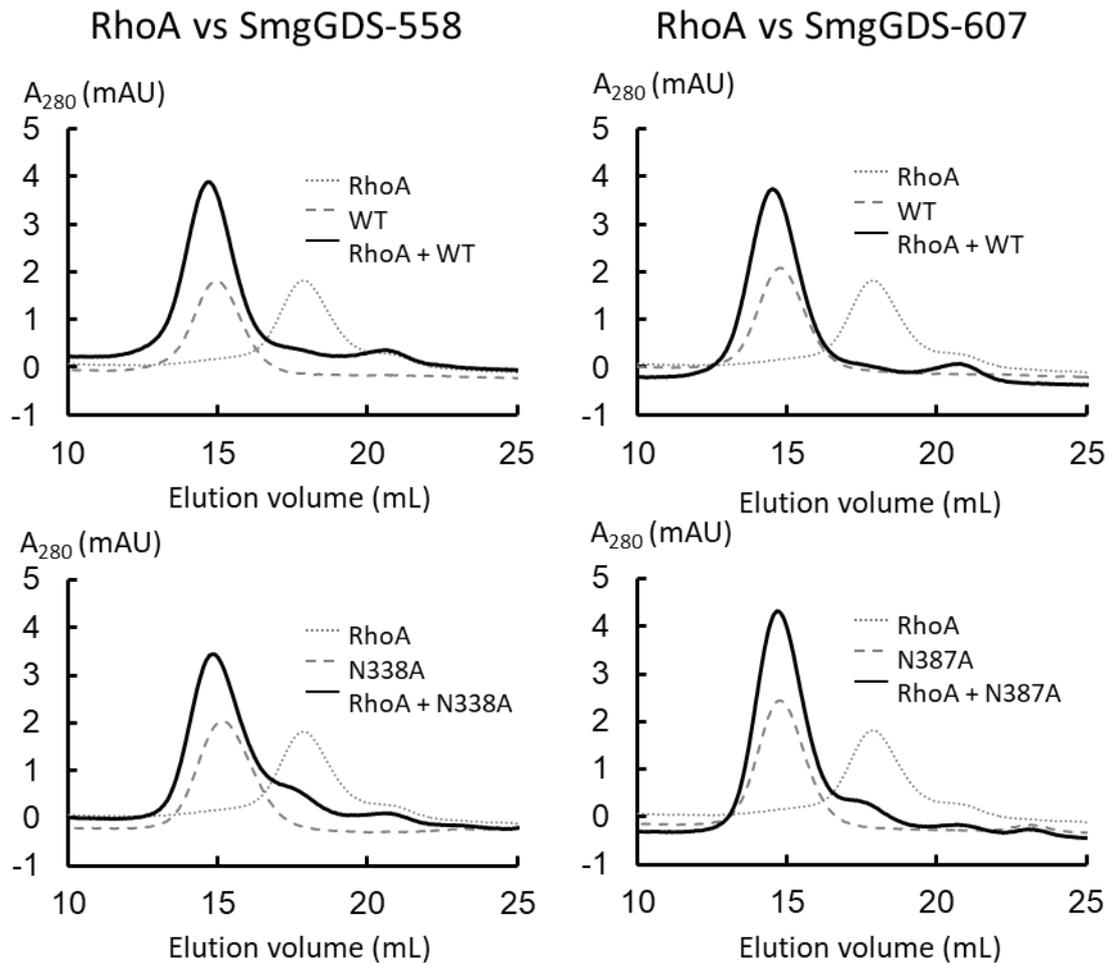


図 25 ファルネシル化 RhoA と SmgGDS との結合能試験

RhoA と SmgGDS 単体のプロファイルを破線で、混合物のプロファイルを実線で表示した。

3.3. SmgGDS-558/ファルネシル化 RhoA 複合体の結晶構造解析および変異体解析

3.3.1. 結晶化

SmgGDS-558 (61-558) 単体結晶中では SmgGDS-558 の N 末端 18 残基はディスオーダーしており 79 番目のアミノ酸からしか電子密度が観測されなかった。そこで複合体の結晶化では SmgGDS-558 (77-558) と SmgGDS-607 (77-607) を用いてファルネシル化 RhoA との結晶化スクリーニングを実施した。結晶化スクリーニングの結果 SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体について JCSG+ suite (QIAGEN) の No.24 (0.2 M tri-potassium citrate, 20% PEG3350) および PEG/Ion2 (Hampton Research) の No.6 (0.2 M Sodium malonate pH 6.0, 20% PEG3350) の条件で板状の微結晶が析出した (図 26)。結晶化条件を最適化したところ、終濃度 5 mg/mL の SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA を結晶化試料とし、結晶化試料とリザーバー溶液 (0.2 M sodium malonate pH 6.0, 20% (w/v) PEG3350 あるいは 0.2 M tri-potassium citrate, 20% (w/v) PEG3350) を 1 : 1 の割合で混合し、10 °C でシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化するのが最良であった (図 26)。また SmgGDS-558 の発現領域をスクリーニングしたところ、55-558, 57-558, 59-558, 61-558 でも結晶が析出した。65-558, 69-558, 73-558, 79-558 でも結晶が析出した。最終的な構造解析には最も反射の良い 77-558 の発現領域を用いた。結晶化の状況を表 6 にまとめた。

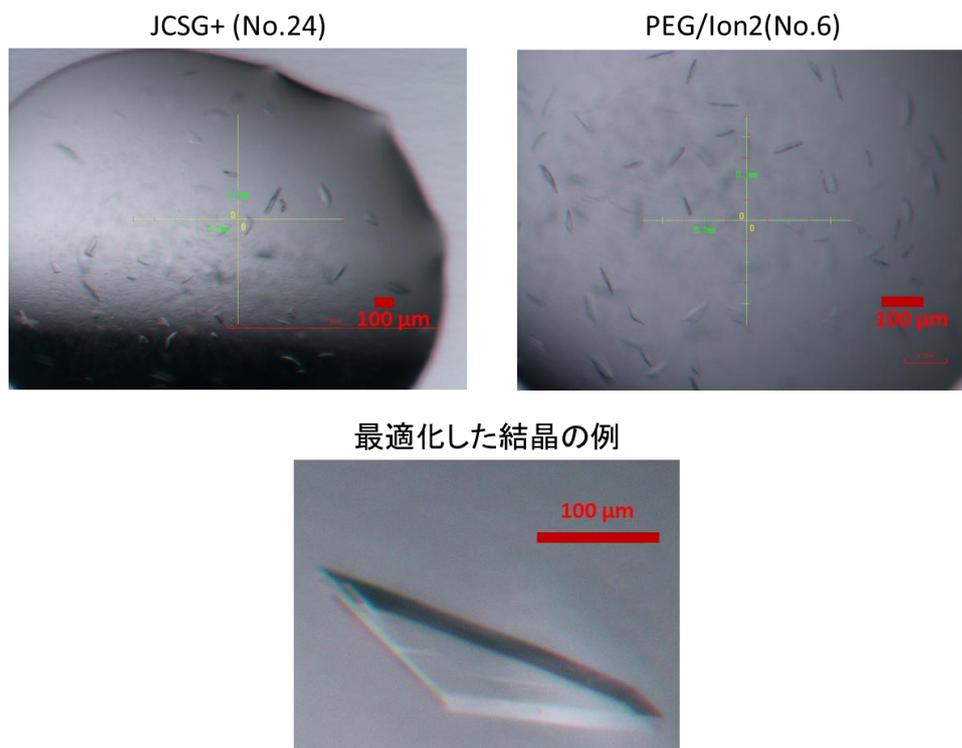


図 26 SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体結晶

SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体の結晶化スクリーニングで得られた結晶（上）と最適化した結晶の例（下）。

表 6 SmgGDS の精製・SmgGDS/ファルネシル化 RhoA 複合体結晶化状況一覧

精製列において、○は性状が良好だったもの、△は調製できるがゲル濾過カラムクロマトグラフィーにて多量体化の傾向が見られたもの、×は精製を試みたが破碎後上清に来なかったもの、－は調製を試みていないものを表した。また赤字で示した発現領域は結晶化スクリーニングを実施した。結晶列において○は結晶が析出したもの、×は結晶が析出しなかったもの、－は結晶化を試みていないものを表した。

No.	タンパク質	発現領域 N C	発現ベクター	精製	結晶	No.	タンパク質	発現領域 N C	発現ベクター	精製	結晶
1	SmgGDS-558	1 558	pGEX6P-1	○	-	63	SmgGDS-607	1 607	pGEX6P-1	○	-
2	SmgGDS-558	36 558	pGEX6P-1	△	-	64	SmgGDS-607	11 607	pGEX6P-1	○	-
3	SmgGDS-558	48 558	pGEX6P-1	△	-	65	SmgGDS-607	21 607	pGEX6P-1	×	-
4	SmgGDS-558	51 558	pGEX6P-1	○	-	66	SmgGDS-607	31 607	pGEX6P-1	×	-
5	SmgGDS-558	53 558	pGEX6P-1	○	-	67	SmgGDS-607	36 607	pGEX6P-1	×	-
6	SmgGDS-558	55 558	pGEX6P-1	○	-	68	SmgGDS-607	41 607	pGEX6P-1	×	-
7	SmgGDS-558	57 558	pGEX6P-1	○	-	69	SmgGDS-607	48 607	pGEX6P-1	×	-
8	SmgGDS-558	59 558	pGEX6P-1	○	-	70	SmgGDS-607	51 607	pGEX6P-1	×	-
9	SmgGDS-558	61 558	pGEX6P-1	○	×	71	SmgGDS-607	61 607	pGEX6P-1	×	-
10	SmgGDS-558	62 558	pGEX6P-1	-	-	72	SmgGDS-607	71 607	pGEX6P-1	×	-
11	SmgGDS-558	63 558	pGEX6P-1	-	-	73	SmgGDS-607	77 607	pGEX6P-1	×	-
12	SmgGDS-558	64 558	pGEX6P-1	-	-	74	SmgGDS-607	346 607	pGEX6P-1	○	-
13	SmgGDS-558	65 558	pGEX6P-1	-	○	75	SmgGDS-607	1 590	pGEX6P-1	△	-
14	SmgGDS-558	66 558	pGEX6P-1	-	-	76	SmgGDS-607	1 580	pGEX6P-1	△	-
15	SmgGDS-558	67 558	pGEX6P-1	-	-	77	SmgGDS-607	1 570	pGEX6P-1	×	-
16	SmgGDS-558	68 558	pGEX6P-1	-	-	78	SmgGDS-607	77 563	pGEX6P-1	×	-
17	SmgGDS-558	69 558	pGEX6P-1	○	○	79	SmgGDS-607	1 560	pGEX6P-1	△	-
18	SmgGDS-558	70 558	pGEX6P-1	-	-	80	SmgGDS-607	1 550	pGEX6P-1	△	-
19	SmgGDS-558	71 558	pGEX6P-1	-	-	81	SmgGDS-607	1 540	pGEX6P-1	△	-
20	SmgGDS-558	72 558	pGEX6P-1	-	-	82	SmgGDS-607	1 530	pGEX6P-1	△	-
21	SmgGDS-558	73 558	pGEX6P-1	○	○	83	SmgGDS-607	1 519	pGEX6P-1	×	-
22	SmgGDS-558	74 558	pGEX6P-1	-	-	84	SmgGDS-607	1 519	pGEX6P-1	×	-
23	SmgGDS-558	75 558	pGEX6P-1	○	×	85	SmgGDS-607	11 519	pGEX6P-1	×	-
24	SmgGDS-558	76 558	pGEX6P-1	○	×	86	SmgGDS-607	36 519	pGEX6P-1	-	-
25	SmgGDS-558	77 558	pGEX6P-1	○	○	87	SmgGDS-607	48 519	pGEX6P-1	-	-
26	SmgGDS-558	78 558	pGEX6P-1	○	×	88	SmgGDS-607	61 519	pGEX6P-1	-	-
27	SmgGDS-558	79 558	pGEX6P-1	○	○	89	SmgGDS-607	77 519	pGEX6P-1	×	-
28	SmgGDS-558	80 558	pGEX6P-1	-	-	90	SmgGDS-607	346 519	pGEX6P-1	×	-
29	SmgGDS-558	81 558	pGEX6P-1	○	×	91	SmgGDS-607	1 501	pGEX6P-1	×	-
30	SmgGDS-558	82 558	pGEX6P-1	-	-	92	SmgGDS-607	1 458	pGEX6P-1	○	-
31	SmgGDS-558	83 558	pGEX6P-1	-	-	93	SmgGDS-607	1 368	pGEX6P-1	×	-
32	SmgGDS-558	84 558	pGEX6P-1	-	-	94	SmgGDS-607	1 345	pGEX6P-1	○	-
33	SmgGDS-558	85 558	pGEX6P-1	○	×	95	SmgGDS-607	1 254	pGEX6P-1	×	-
34	SmgGDS-558	122 558	pGEX6P-1	×	-	96	SmgGDS-607	18 254	pGEX6P-1	×	-
35	SmgGDS-558	77 557	pGEX6P-1	○	-	97	SmgGDS-607	40 254	pGEX6P-1	×	-
36	SmgGDS-558	77 556	pGEX6P-1	○	-	98	SmgGDS-607	49 254	pGEX6P-1	×	-
37	SmgGDS-558	77 555	pGEX6P-1	○	-	99	SmgGDS-607	61 254	pGEX6P-1	×	-
38	SmgGDS-558	77 554	pGEX6P-1	○	-	100	SmgGDS-607	1 212	pGEX6P-1	×	-
39	SmgGDS-558	1 551	pGEX6P-1	△	-	101	SmgGDS-607	40 212	pGEX6P-1	×	-
40	SmgGDS-558	71 551	pGEX6P-1	×	-	102	SmgGDS-607	49 212	pGEX6P-1	×	-
41	SmgGDS-558	1 541	pGEX6P-1	△	-	103	SmgGDS-607	61 607	pETHP	○	-
42	SmgGDS-558	71 541	pGEX6P-1	×	-	104	SmgGDS-607	77 607	pETHP	○	×
43	SmgGDS-558	1 531	pGEX6P-1	△	-	105	SmgGDS-607	77 563	pETHP	△	-
44	SmgGDS-558	71 531	pGEX6P-1	×	-						
45	SmgGDS-558	1 521	pGEX6P-1	△	-						
46	SmgGDS-558	71 521	pGEX6P-1	×	-						
47	SmgGDS-558	1 511	pGEX6P-1	△	-						
48	SmgGDS-558	71 511	pGEX6P-1	×	-						
49	SmgGDS-558	1 501	pGEX6P-1	△	-						
50	SmgGDS-558	71 501	pGEX6P-1	×	-						
51	SmgGDS-558	71 491	pGEX6P-1	×	-						
52	SmgGDS-558	1 481	pGEX6P-1	△	-						
53	SmgGDS-558	11 481	pGEX6P-1	△	-						
54	SmgGDS-558	21 481	pGEX6P-1	△	-						
55	SmgGDS-558	31 481	pGEX6P-1	×	-						
56	SmgGDS-558	41 481	pGEX6P-1	×	-						
57	SmgGDS-558	51 481	pGEX6P-1	×	-						
58	SmgGDS-558	61 481	pGEX6P-1	×	-						
59	SmgGDS-558	71 481	pGEX6P-1	△	-						
60	SmgGDS-558	1 470	pGEX6P-1	○	-						
61	SmgGDS-558	77 470	pGEX6P-1	×	-						
62	SmgGDS-558	122 470	pGEX6P-1	×	-						

3.3.2. 構造決定

2.3.3 項に従って構造解析を行い、 3.5 \AA で構造決定した (表 7)。

表 7 SmgGDS-558 (77-558) /RhoA 複合体結晶の回折強度データセット収集と構造精密化の統計値

	SmgGDS-558/ファルネシル化 RhoA
Space group	$P2_12_12_1$
Wavelength (Å)	0.90000
No. of crystals	2
Unit cell (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i>)	93.3, 181.8, 205.3
X-ray source	SPring-8 BL44XU
Resolution (Å) (outer shell)	136.1-3.5 (3.71-3.50) ^a
No. of obs. ref.	1967740
No. of unique. ref.	44892
Completeness (%)	99.9 (100.0)
R_{meas}	0.565 (4.100)
$I\sigma(I)$	10.4 (1.2)
$CC1/2$	0.997 (0.623)
< Refinement >	
Resolution (Å)	136.1-3.5
R_{work} (%) ^b	25.0
R_{free} (%) ^c	30.6
RMSD	
Bond length (Å)	0.009
Bond angles (°)	1.420
Number of atoms per asymmetric	
Protein	18728
Ligand	0
Ramachandran plots	
Favored	2322 (94%)
Allowed	149 (6%)
Outlier	5 (0%)

^a 括弧内は最外殻での統計値を表す。

^b F_o および F_c はそれぞれ実測および計算構造因子振幅であり, $R = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$ とした。

^c 全反射の 5%を用いて計算した R 値が R_{free} であり, これらの反射は精密化には用いなかった。

3.3.3. 全体構造

最終構造では非対称単位中に4つの SmgGDS-558/ファルネシル化 RhoA ヘテロダイマーが存在していた (図 27)。これらを complex I - IV と呼ぶことにする。SmgGDS-558 とファルネシル化 RhoA は 1 : 1 のダイマーを形成することが SAXS および MALS の結果から明らかとなっているため、この4つのヘテロダイマーは結晶のパッキングによるものだと考えられる。

SmgGDS-558 について N 末端側の 10 残基 (残基番号 77-86) と C 末端側 3 残基 (残基番号 556-558) はディスオーダーしていた。SmgGDS-558 の C 末端側 63 残基は電子密度が貧弱であったためモデル中では側鎖を置かず全てアラニンとした。

RhoA に関してはまずすべての complex に対し N 末端側の 2 残基 (残基番号 1-2)、switch I 領域 (残基番号 28-39)、switch II 領域の一部 (残基番号 59-64)、C 末端側 2 残基 (残基番号 192-193) はディスオーダーしていた。Complex II, III については RhoA の PBR にあたる部分 (残基番号 181-189) の電子密度が観測されたものの貧弱であったため側鎖はおかず全てアラニンとした。また、P-loop とその周辺領域 (残基番号 13-27) はディスオーダーしていた。Complex I, IV については RhoA の PBR にあたる部分 (残基番号 181-189) の電子密度が観測されなかったものの、P-loop とその周辺領域 (残基番号 13-27) については電子密度が見られたためモデルを置いた。グアニンヌクレオチドと Mg イオンは観察されなかったため、SmgGDS-558 との結合によりこれらが解離したものと考えられる。

SmgGDS-558 による RhoA 結合部位は主に二か所であった (図 28, 29, 30)。一つは RhoA の Switch II 領域を結合する SmgGDS-558 の凹面であり、SmgGDS-558 の正電荷領域とその近傍に位置していた。また、もう一つの結合部位は ARM B と D の間に位置するポケットであった。RhoA の PBR は SmgGDS-558 の N 末端側に広がる負電荷領域へと伸びており、CaaX モチーフのファルネシル化システインはポケットに結合していた。PBR の電子密度は貧弱であったため負電荷領域との原子レベルでの相互作用は見られなかった

が、負電荷領域と PBR の位置関係から、これらの領域は静電的に引き合っていることが強く示唆された (図 28, 29)。

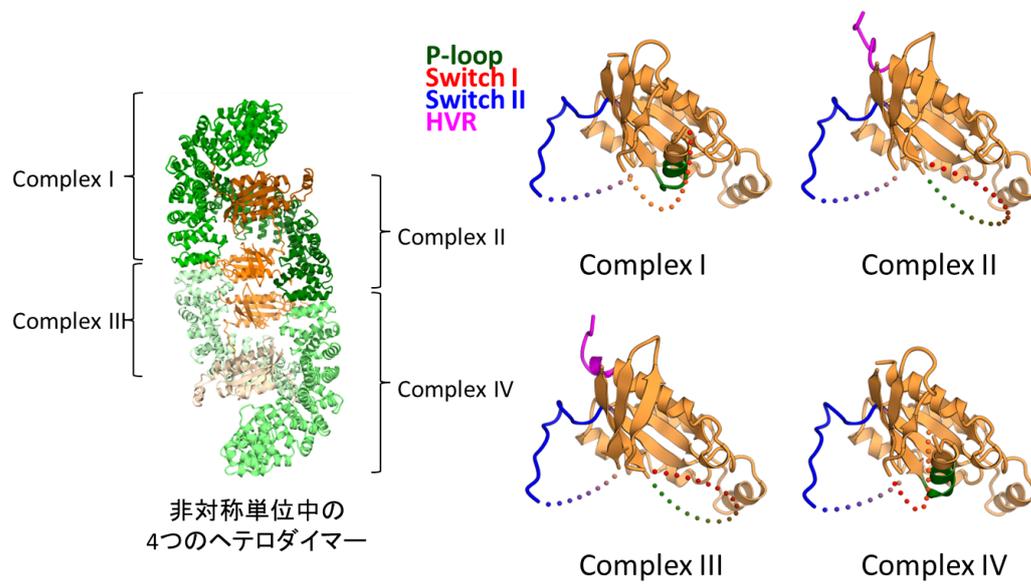


図 27 複合体結晶構造における非対称単位中の 4 つのヘテロダイマー

非対称単位の全体構造（左）と各 complex における RhoA の構造比較（右）。ディスオーダー領域は破線で示した。

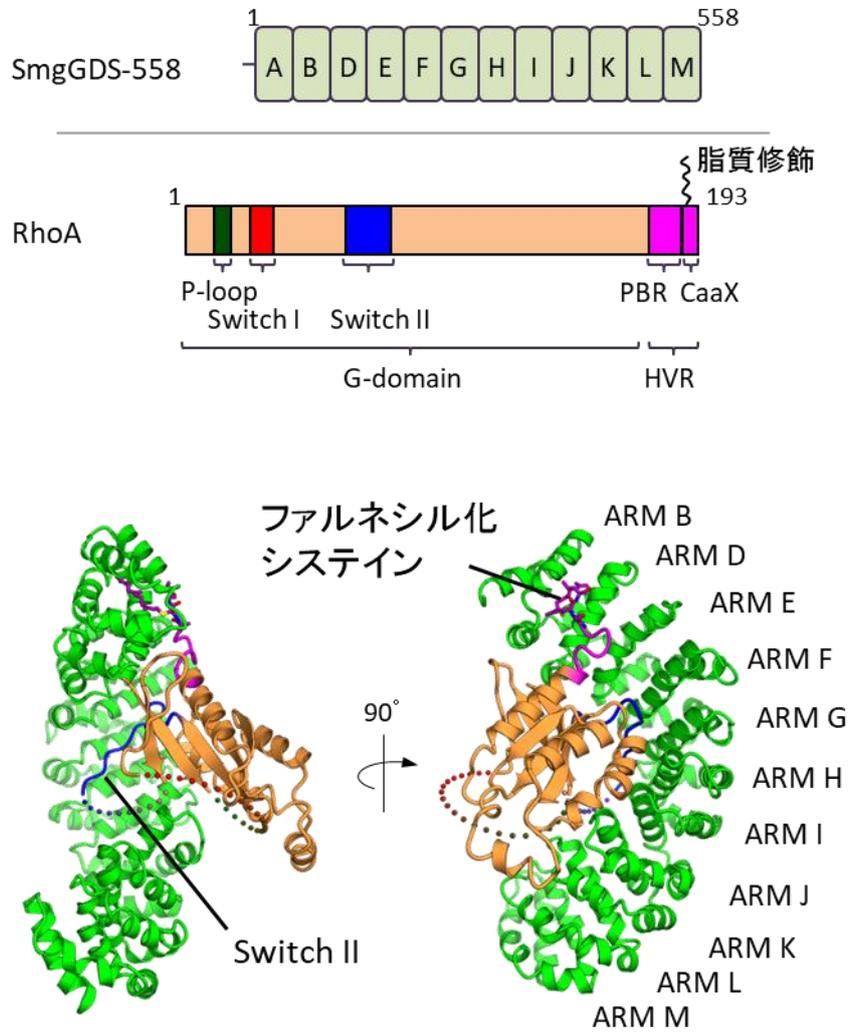


図 28 SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体の全体構造

各タンパク質のドメイン図 (上) と SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体 (complex II) の全体構造 (下) を示した。

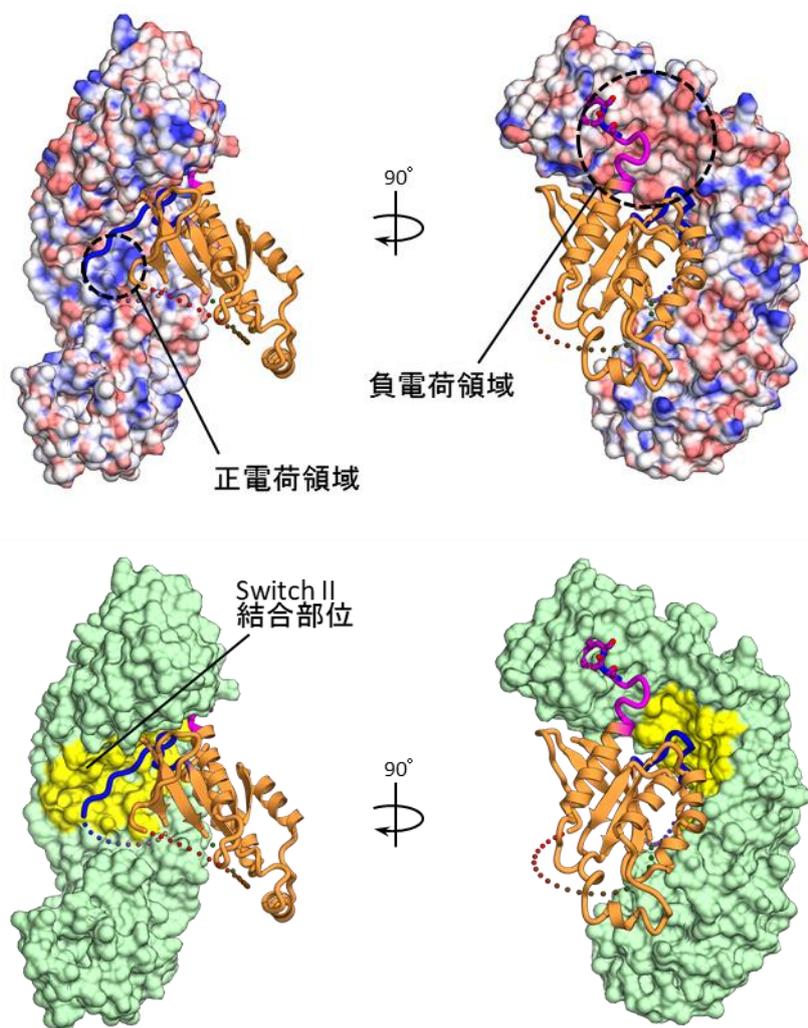
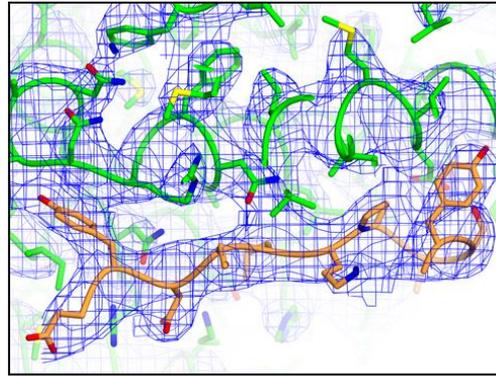
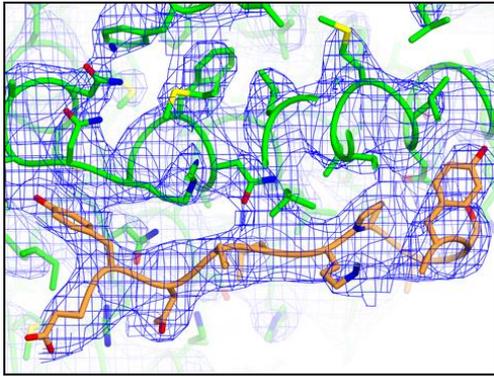


図 29 複合体結晶中での SmgGDS-558 表面図

SmgGDS-558 の静電ポテンシャル図（上）と switch II 結合部位を黄色で塗り分けた表面図（下）。



$2mFo-DFc = 1.0 \sigma$

図 30 Switch II 結合部位周辺の電子密度ステレオ図

3.3.4. RhoA switch 領域の構造変化と固有の GEF メカニズム

SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体の結晶構造において最も特筆すべきは switch 領域の構造変化にある。Switch I 領域は完全にディスオーダーしており、ヌクレオチドの結合に関与できない状態となっていた (図 31)。SmgGDS-558 は RhoA の switch II を自身の凹面へと引き寄せ、それによって $\alpha 2$ ヘリックスの破壊を伴う switch II の大きな構造変化が引き起こされる。この構造変化は RhoA とリガンドである Mg イオンおよびグアニンヌクレオチドの重要な相互作用を壊し、グアニンヌクレオチドの解離を促進すると考えられる。PISA⁵⁸によって解析した相互作用面を見ても switch II だけでなく N 末端、C 末端側を含む広い相互作用面を形成していた (埋没表面積 1816.8 Å²) (図 32)。他の GEF 複合体中における相互作用残基と比較してみると SmgGDS-558 だけが switch I を認識しておらず、一般的には GEF は switch I と II の両方を認識していた (図 33)。

2018年8月までに35個以上のRhoAの構造がProtein Data Bank (PDB) に登録されており、そのうち7個 (PDB ID: 1LB1, 1X86, 1XCG, 3T06, 4XH9, 5JHG, 5JHH) は Mg イオンおよびグアニンヌクレオチドが解離したものである。しかしながらこれらのいずれも SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体の結晶構造にみられるような switch 領域のディスオーダーを伴う大きな構造変化はしておらず、SmgGDS は固有の GEF メカニズムを持つものと考えられる。

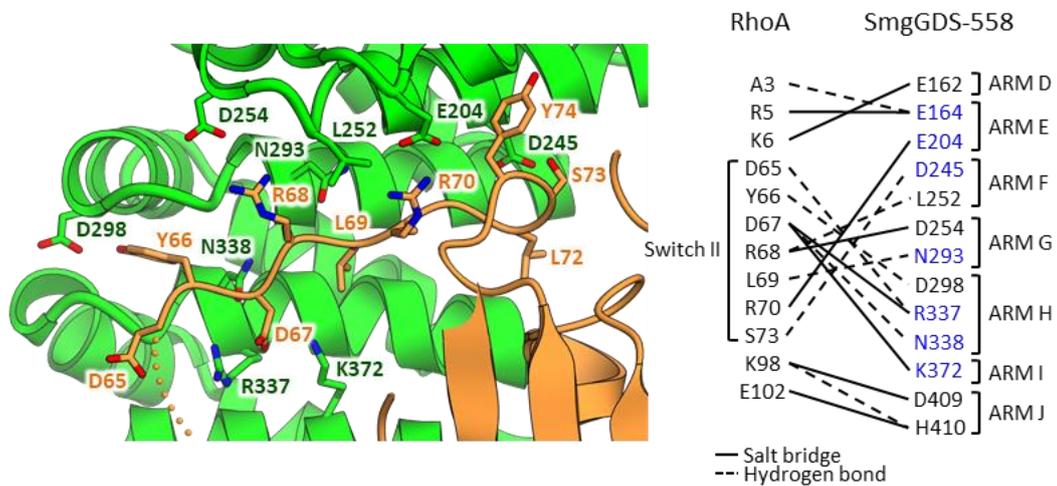


図 32 SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体の相互作用

RhoA switch II 領域の拡大図 (左) と相互作用残基一覧 (右)。右図青色で示した残基は先行研究において RhoA との結合あるいは GEF 活性に重要と報告された残基。

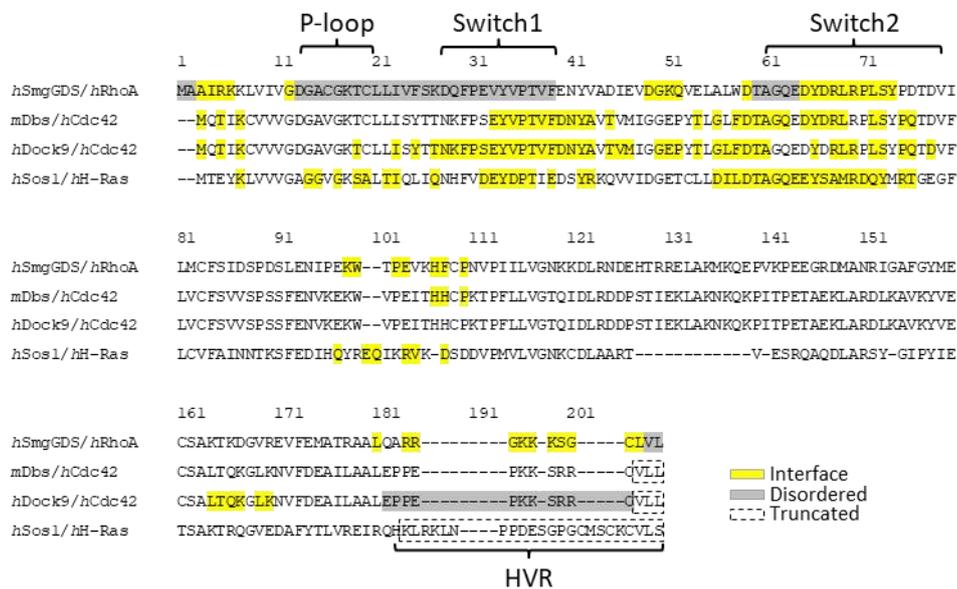
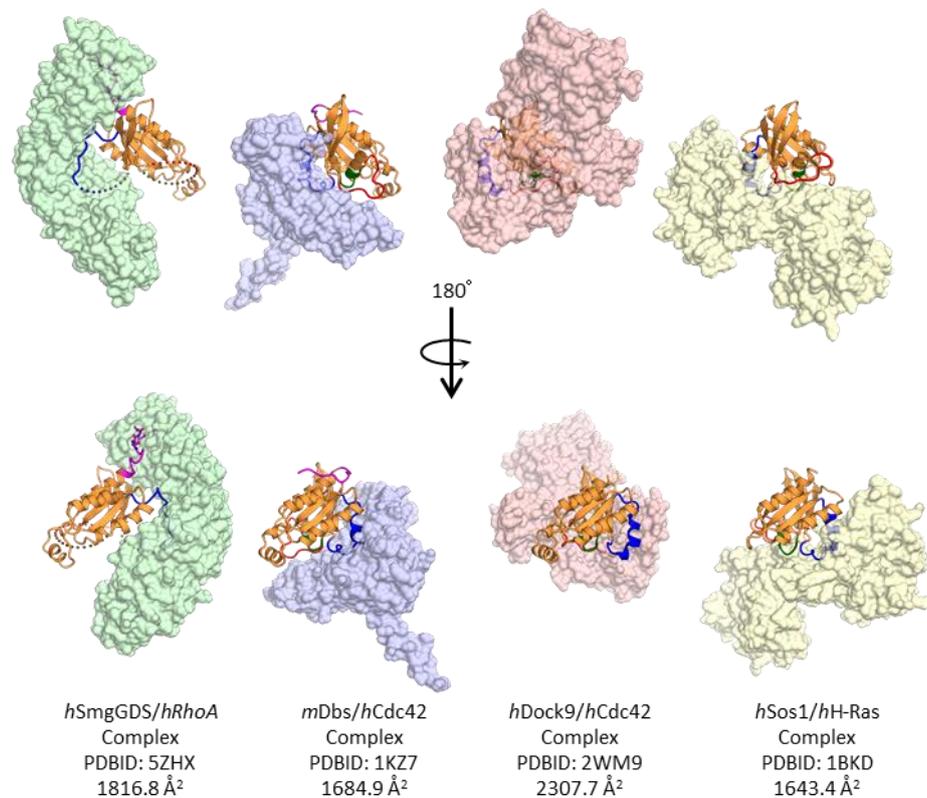


図 33 GEF/低分子重量 G タンパク質複合体の構造比較

4つの GEF/低分子重量 G タンパク質複合体結晶構造の比較 (上) と複合体中の低分子重量 G タンパク質の GEF との相互作用部位の比較 (下)。

3.3.5. RhoA への変異体解析

複合体構造によって明らかとなった SmgGDS-558/RhoA 間の相互作用面は先行研究の変異体解析とよく一致していた (図 32)。SmgGDS-558 の N338 残基は RhoA への GEF 活性に決定的であると示唆されていたが、結晶構造では RhoA の D67 と水素結合を形成していた。Switch II 領域と他のいくつかの残基 (A3, R5, K6, K98, E102) が SmgGDS-558 との相互作用ネットワークを形成していた。3.2.7 項で SmgGDS-558 の正電荷領域にある 4 つの残基 (H330, R337, N338, K372) は RhoA への GEF 活性に重要と示唆されていたが、結晶構造ではこのうちの 3 つ (R337, N338, K372) が RhoA の switch II と相互作用していた。

結晶構造の妥当性をさらに強固なものとするため、筆者らは結晶構造をもとに RhoA の変異体を作成し、プルダウンアッセイと GEF 活性試験を実施した (図 34, 35)。野生型と 12 種類の点変異体 (R5E, K6E, Q52A, Y66A, D67R, R68E, L69A, R70E, L72A, S73A, K98E, E102R)、1 つの 3 点変異体 (D67R + R68E + L69A) を用意した。プルダウンアッセイは未修飾 RhoA を用い、GEF 活性試験は未修飾 RhoA、ファルネシル化 RhoA の両者を用いた。

プルダウンアッセイにおいて Y66A, R70E, S73A および 3 点変異体 (D67R + R68E + L69A) は SmgGDS-558 に対する親和性が野生型と比べ顕著に低下した。さらに R68E と L72A 変異体も結合を弱めていたことから、RhoA の switch II は SmgGDS-558 との結合のカギとなる箇所であることが示唆された。N 末端側や C 末端側のいくつかの点変異体では結合力の低下が見られなかった。S73A 変異体では結合力の低下が見られたことから SmgGDS-558 の D245 は RhoA の認識に重要と考えられる。SmgGDS-558 とは対称的に、SmgGDS-607 では 3 点変異体を除いて結合力の低下は見られなかった。このことは SmgGDS-607 が未修飾 RhoA と強い相互作用を持つという 3.2.4 項に置ける SPR の結果を支持した。

GEF 活性試験の結果はプルダウンアッセイの結果とよく一致していた。SmgGDS-558 のプルダウンアッセイにおいて低い結合能を示した変異体では、低い GEF 活性を示した。これらの変異体は SmgGDS-607 の GEF 活性をも低下させており、両アイソフォームが共通の switch II を介した GEF 活性メカニズムを持つことを示唆した。

先行研究において SmgGDS-607 の D239K+E242K+E246K 変異体 (SmgGDS-558 における D190, E193, E197 の変異体) は RhoA への GEF 活性を低下させることが報告されている¹⁵。これらの残基は負電荷領域に位置しており、複合体結晶構造中では RhoA PBR の K187 残基が近接していた (図 36)。このことから負電荷残基の変異により静電的な相互作用が弱められたと考えられる。また、SmgGDS-607 の M356A 変異体 (SmgGDS-558 における M307 の変異体) も RhoA への GEF 活性を低下させることが報告されている¹⁵が、この残基は複合体結晶構造中で RhoA との相互作用を持っていなかった。M307 は SmgGDS-558 時人の残基と疎水コアを形成していたため、ここへの変異が何らかの形で RhoA との結合に影響したものと考えられる。筆者らの得た複合体結晶構造は先行研究や我々の得た実験データの殆どを説明できるものであった。

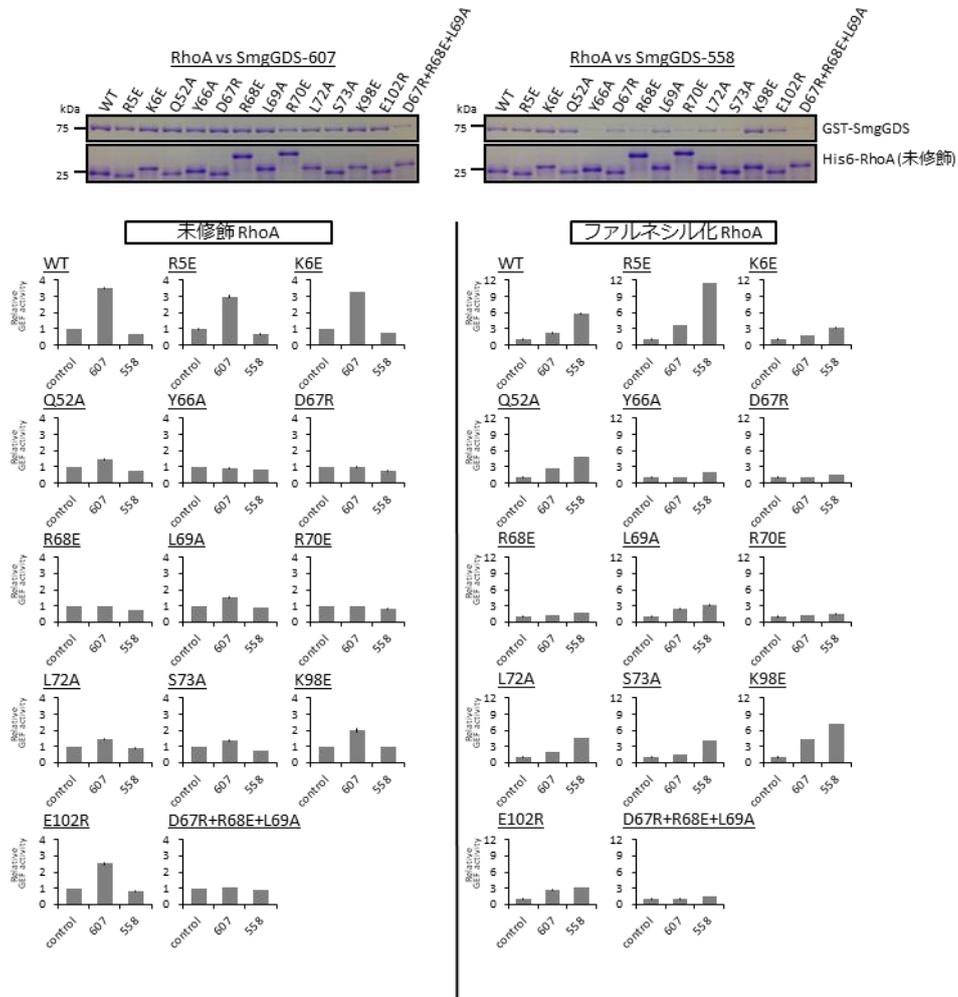


図 34 プルダウンアッセイと GEF 活性試験

プルダウンアッセイ（上）と GEF 活性試験（下）。GEF 活性試験では SmgGDS 未添加時の GDP 解離速度を 1 としたときの相対的な GDP 解離速度を示した。全ての測定は $n = 3$ で行われ、標準誤差をエラーバーとして表示した。

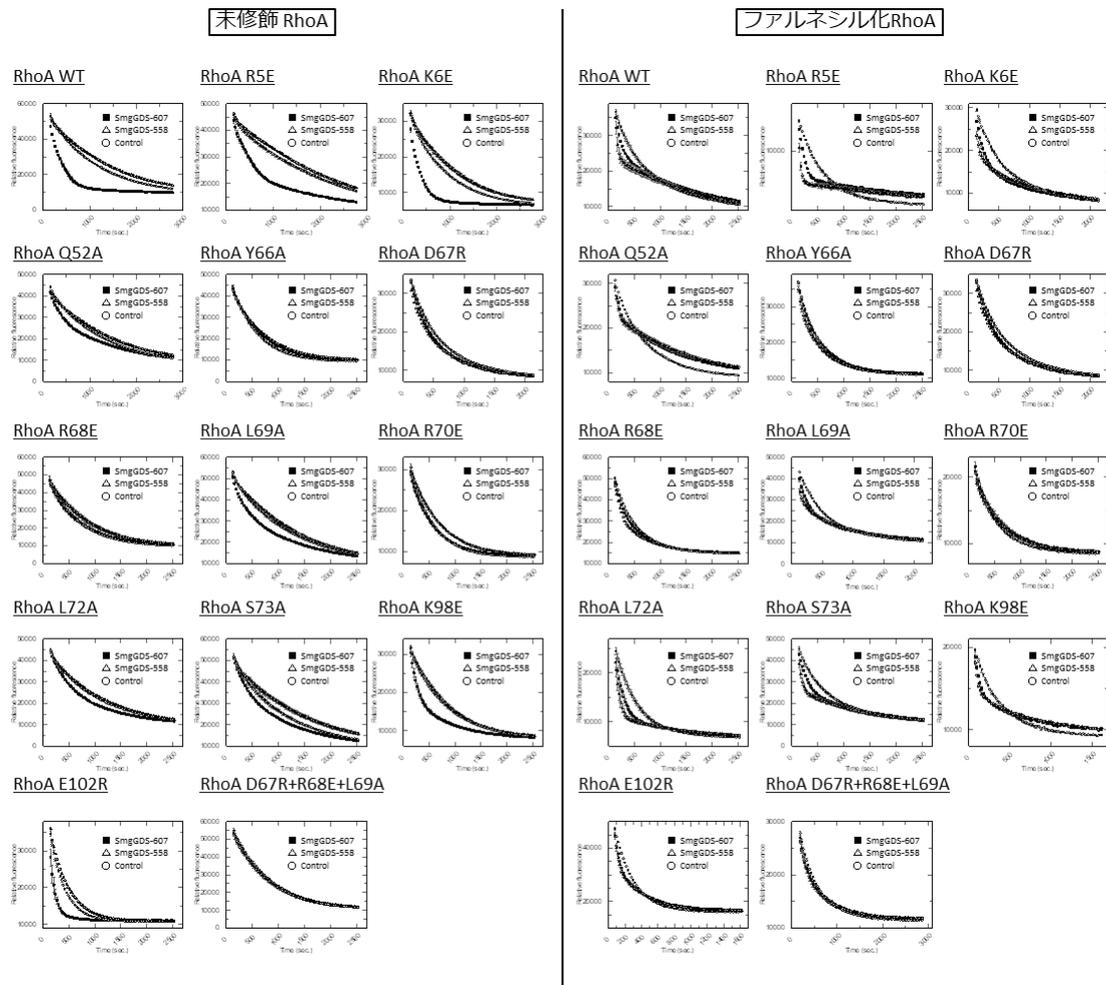


図 35 GEF 活性試験プロファイル

GEF 活性試験のプロファイルを示した。全ての測定は $n = 3$ で行われ、標準誤差をエラーバーとして表示した。

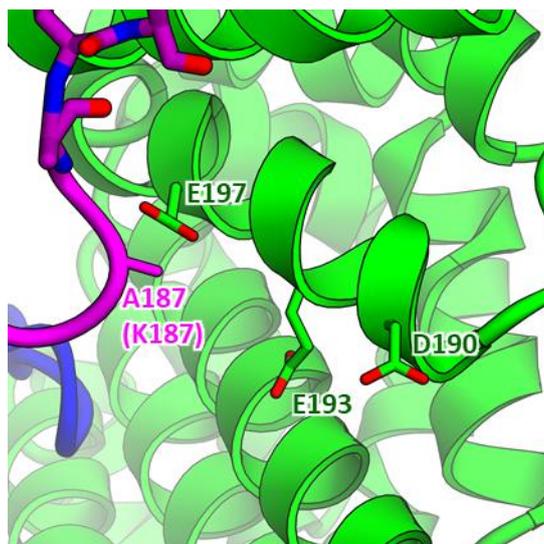


図 36 RhoA の K187 周辺の拡大図

RhoA の K187 残基は電子密度が貧弱であったため側鎖を置かずアラニンとしてある。

3.3.6. SmgGDS-558 の cryptic pocket と変異体解析

複合体結晶構造において、RhoA の CaaX モチーフにあるファルネシル化システインは SmgGDS-558 の ARM B と D の間にあるポケットに結合していた (図 37)。このポケットは SmgGDS-558 の単体結晶構造では観察されなかった。アルマジロリピートを形成する 3 つのヘリックスを H1-3 と呼ぶことにすると、ファルネシル化 RhoA との結合により ARM B の H2, H3 および ARM D の H1 が構造変化することで、ファルネシル基を受容する新たなポケットを形成していた。このポケットを cryptic pocket と呼ぶことにする。cryptic pocket の形成に関与しない SmgGDS-558 の他の部分に関しては単体構造と複合体構造で殆ど違いは見られず、root mean square deviation (r.m.s.d.) 値は 1.2 Å だった。

cryptic pocket は主として SmgGDS-558 の疎水的な残基によって構成されており (G110, L113, G114, Y118, Q124, L136, L139, L149, M152, C153, V155, A156, N159, L160)、炭素数 15 のファルネシル基を受容するのに適していた。RhoA は生体内では炭素数 20 のゲラニルゲラニル化される。筆者らは AUTODOCK4 を用いたドッキングシュミレーションを行い、ゲラニルゲラニル化システインをドッキングした (図 38)。その結果、ゲラニルゲラニル化システインは立体障害を起こすことなく cryptic pocket に収まり、このポケットはどちらの脂質修飾を受容するのに十分な深さと大きさを持つことが示唆された。

さらに cryptic pocket の機能の重要性を確かめるため、その表面残基に 3 つの Arg 変異体を作成 (G110R, G114R, A156R,) し、GEF 活性試験を行った (図 39)。これらの変異体はポケットへのファルネシル基の結合を阻害することを目的としたものであり、予想通り、変異体では GEF 活性が低下した。このことから CaaX モチーフの脂質修飾がポケットに結合することは SmgGDS-558 の GEF 活性に必要なことと分かった。G-domain と SmgGDS の脂質結合部位に直接の相互作用は見られないということから、ポケットへのプレニル基の結合により G-domain が SmgGDS-558 の凹面の近くに近接することが SmgGDS-558 の GEF 活性を促進していると考えられる。

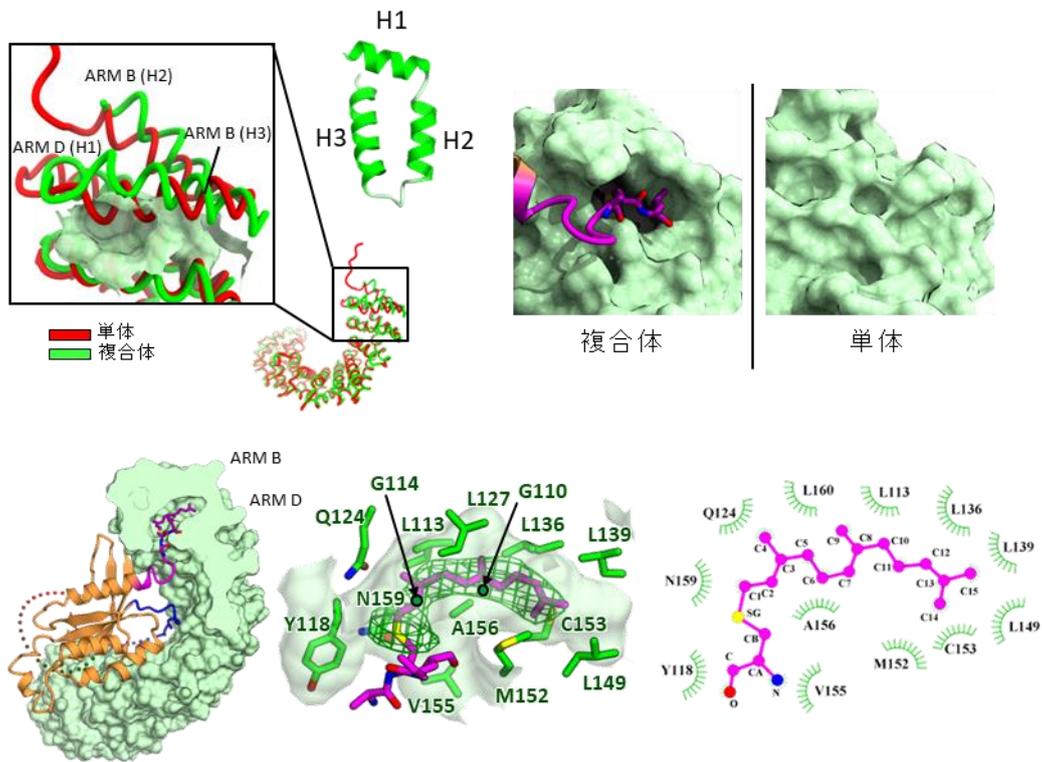


図 37 SmgGDS-558 の cryptic pocket と変異体解析

単体構造と複合体構造における SmgGDS-558 の構造比較 (上)。cryptic pocket の位置、表面残基と Ligprot (+) による相互作用残基一覧 (下)。

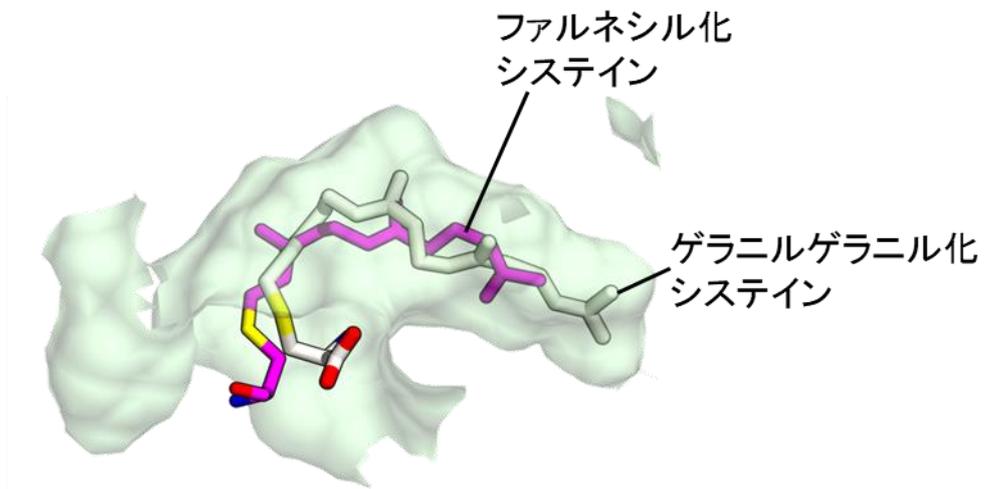


図 38 ドッキングシミュレーション結果

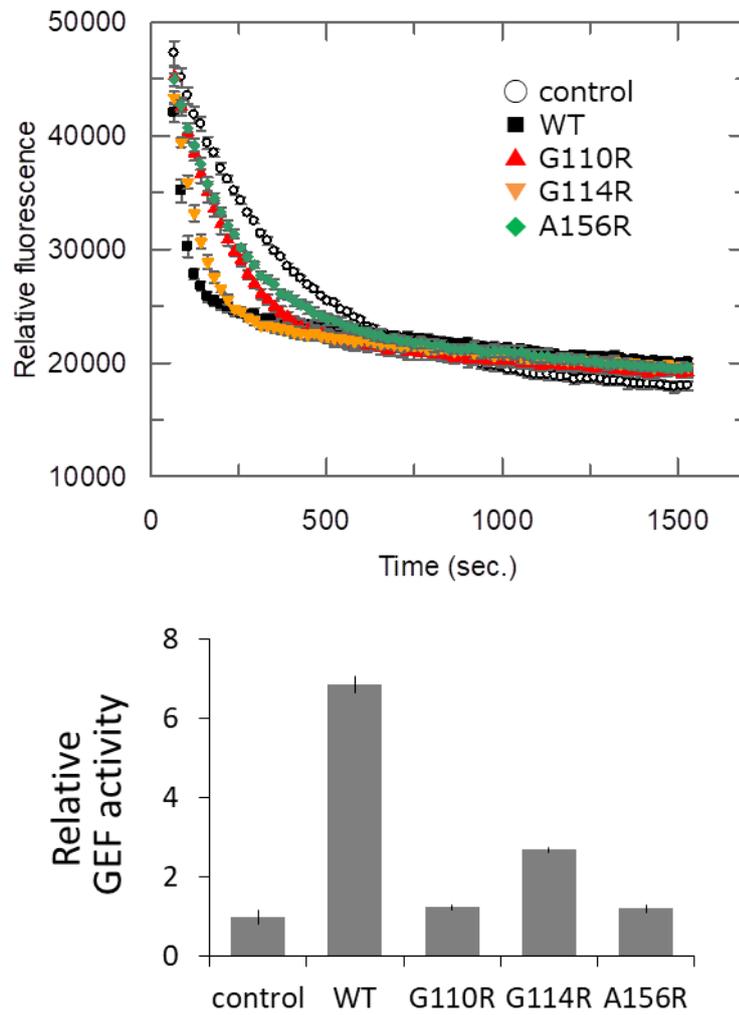


図 39 GEF 活性試験

SmgGDS 未添加時の GDP 解離速度を 1 としたときの相対的な GDP 解離速度を示した。全ての測定は $n = 3$ で行われ、標準誤差をエラーバーとして表示した。

3.3.7. SmgGDS-607 のホモロジーモデルと変異体解析

スプライズバリエントである SmgGDS-607 は RhoA に対して SmgGDS-558 とは異なる結合能と GEF 活性を示した。これらバリエントの違いを原子レベルの視点から理解するため、SmgGDS-607 のホモロジーモデルを作成した (図 40)。このモデル上では E168 と D170 が ARM C と D の間にあり、負電荷領域を拡張していた。また、ARM C は ARM B と D の間に挿入されており SmgGDS-558 と同じ cryptic pocket を形成することはできない。

実験的に SmgGDS-607 と RhoA HVR との結合面を決定するため、変異体解析を実施した。ARM C の H3 に対する 8 つの点変異体 (T156A, V157A, G160R, M163A, N164A, N167A, E168R, D170R) と 2 つの 2 点変異体 (G160R + N164A, E168R + D170R) を作成し、ITC によって RhoA の HVR に相当するペプチド (181ARRGKKKSGCLVL193, 数字は残基番号) に対する SmgGDS 両アイソフォームの結合能を評価した (図 41、表 8)。野生型の K_D 値 ($0.20 \mu\text{M}$) と比較して、G160 と N164 への変異体では顕著に結合能が低下し、それぞれ $5.5 \mu\text{M}$ と $12.8 \mu\text{M}$ だった。また G160R + N164A では $18.9 \mu\text{M}$ とさらに低下した。E168R と D170R の変異体ではわずかに結合能の低下が見られた (それぞれ $0.83 \mu\text{M}$ と $0.48 \mu\text{M}$)。このことから ARM C の H3 は RhoA の HVR を結合する新たな分子表面を作り出しているが、静電的な相互作用による寄与は少ないものと考えられる。PBR との結合よりも CaaX モチーフの相互作用が重要なのもかもしれない。

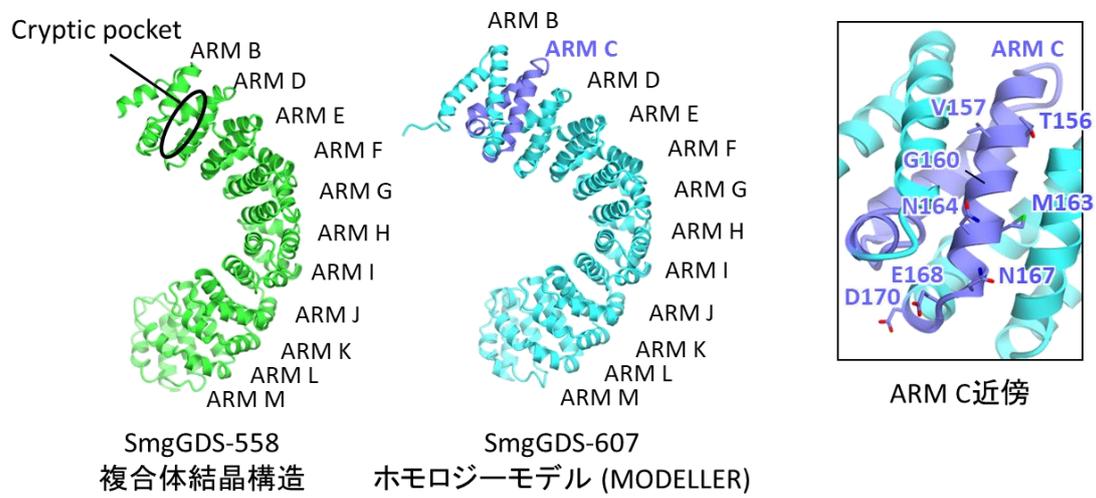


図 40 SmgGDS-558 結晶構造と SmgGDS-607 ホモロジーモデルの比較

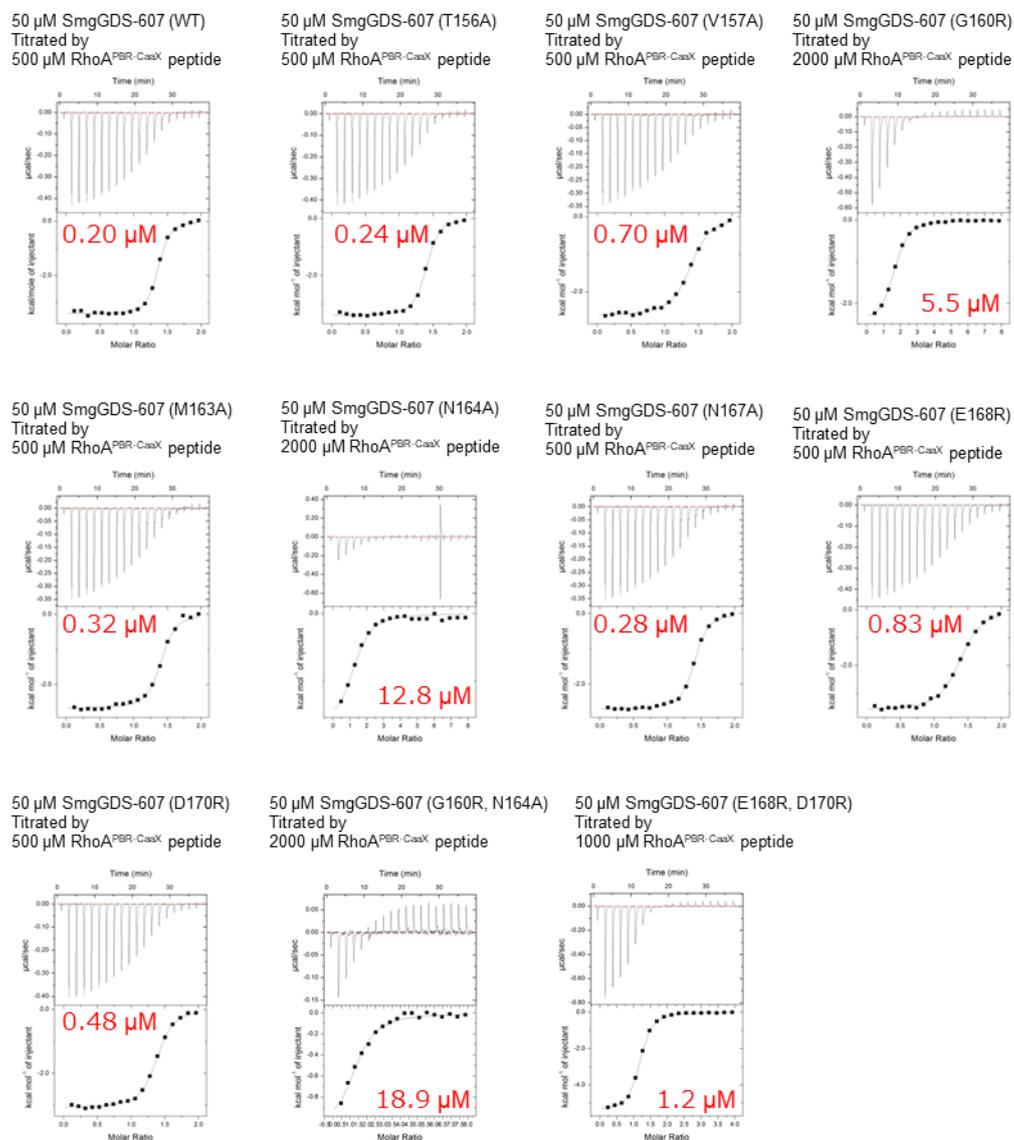


図 41 ITC 測定結果

ITC のプロファイルと各測定における K_D 値を示した。

表 8 ITC 測定結果

Cell (SmgGDS-607)		Titrant (RhoA ^{PBR-CaaX} peptide)				
Type	Conc. (μ M)	Conc. (μ M)	K_d (μ M)	ΔH (kcal/M)	ΔS (cal/mol/deg)	N
WT	50	500	0.20	-3.4	19.2	1.31
T156A	50	500	0.24	-3.4	18.9	1.36
V157A	50	500	0.70	-2.6	19.3	1.42
G160R	50	2000	5.5	-2.5	15.8	1.52
M163A	50	500	0.32	-2.6	20.7	1.36
N164A	50	2000	12.8	-1.7	16.5	1.19
N167A	50	500	0.28	-2.7	20.9	1.36
E168R	50	500	0.83	-3.6	15.7	1.35
D170R	50	500	0.48	-3.1	18.6	1.34
G160R, N164A	50	2000	18.9	-1.1	17.7	1.33
E168R, D170R	50	1000	1.2	-5.4	8.9	1.11

4. 考察

4.1. SmgGDS による RhoA 認識機構

本研究では SmgGDS-558 の単体および脂質修飾された RhoA との複合体構造を決定し、SmgGDS は RhoA の大きな構造変化を誘起すること、プレニル基を収容するポケットを形成することを明らかにした。これらの発見は GEF 活性作用機序とプレニル基収容機構の両面から新しいと言えるものであった。

SmgGDS には ARM の異なる 2 つのスプライスバリエントアイソフォーム (SmgGDS-558, SmgGDS-607) があり、両者が異なる方法で RhoA の HVR を認識する (図 42)。SmgGDS-558 は ARM B と D の間に存在する cryptic pocket によって脂質修飾された RhoA HVR のイソプレニル基を結合する。一方で SmgGDS-607 では SmgGDS-558 には存在しない ARM C によって異なる分子表面を形成し、脂質未修飾の RhoA HVR を結合する。それと同時にあるいは逐次的に各 SmgGDS の凹面は RhoA の switch II を引き寄せ構造変化させることで G-domain を不安定化し、GDP と Mg イオンの解離を促進する。これが SmgGDS の GEF メカニズムであると考えられる。

ヒトにおいて Rho に対するものだけでも 80 種類以上の GEF が知られている^{7,59}。これらの RhoGEF は Dbl ファミリー、Dock ファミリー、SmgGDS に分けられる。前者 2 つの GEF の活性ドメインの構造は既に知られており、switch 領域の再編成と Mg イオンに対する静電反発によって GDP のリリースを促進する。一方で SmgGDS はどちらのファミリーにも該当せず異なる GEF 作用機序を持つ。SmgGDS-558 はその凹面に RhoA の switch II を引き寄せることで RhoA のグアニンヌクレオチド結合モチーフ (P-loop, switch I, switch II) をディスオーダーさせる。この RhoA の構造変化は非常にユニークで RhoGEF との複合体構造を比較してみると全く異なる形をとっていることが分かる (図 43)。RhoGEF との複合体に限らず、現在のところ蛋白質構造データベースである Protein Data Bank に類

似の Rho の構造は見当たらない。

Rho のイソプレニル基収容蛋白質としては RhoGDI と PDE δ というシャペロン分子の構造が報告されている^{46,60,61}。これらの分子はプレニル基を遮蔽することで低分子量 G 蛋白質を凝集や分解から保護し、細胞内での拡散を促進すると考えられている^{46,61,62}。SmgGDS-558 も RhoA のイソプレニル基をポケットに収容することが本研究により明らかとなったことから SmgGDS-558 も同様の機能を持つシャペロンとして働くことが強く示唆された。しかしながら構造的には SmgGDS-558 はこれら既知のタンパク質とは全く異なる。RhoGDI と PDE δ はどちらも二つの逆平行 β -sheet からなる immunoglobulin-like fold によってイソプレニル基を収容するが、SmgGDS-558 は α -helix から成るポケットにより RhoA のイソプレニル基を収容する (図 44)。さらにこのポケットは SmgGDS-558 単体では観察されず、RhoA が結合する際にはじめて形成され、別のアイソフォームである SmgGDS-607 では ARM C の挿入によりポケットは存在しないと考えられる。ARM 数 1 つの違いによって SmgGDS 両アイソフォームは巧に RhoA の脂質修飾状態を見分け、GEF 活性を発揮しているのだろう。

SmgGDS の RhoA への結合能と GEF 活性は RhoA の HVR を欠損させると低下するということが知られており¹⁵、SmgGDS の GEF 活性発揮には RhoA の HVR を結合することが不可欠である。また、本研究における構造解析の結果から SmgGDS-558 の switch II 結合領域 (ARM E-I) と HVR 捕捉領域 (ARM B, D) は独立の部位であることが明らかとなった。このことから、HVR 捕捉による近接効果が RhoA の switch II を構造変化させ、SmgGDS 凹面に引き寄せる駆動力となっていることが想定される。HVR の認識はシャペロンとしての機能としてだけでなく GEF 活性にも重要である。

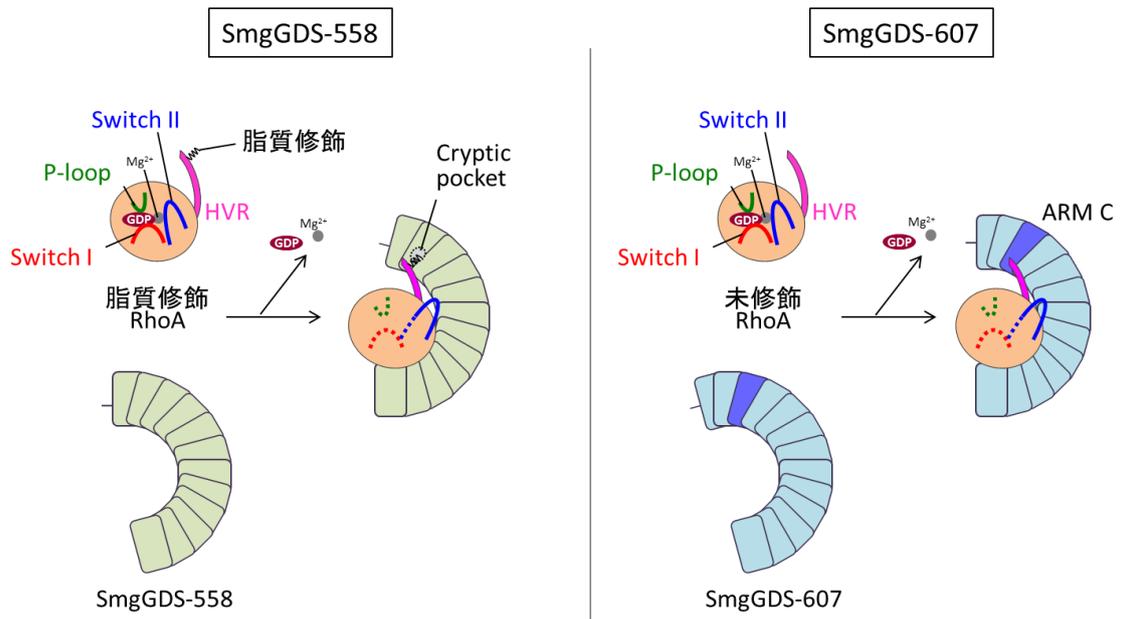


図 42 SmgGDS による RhoA 認識機構

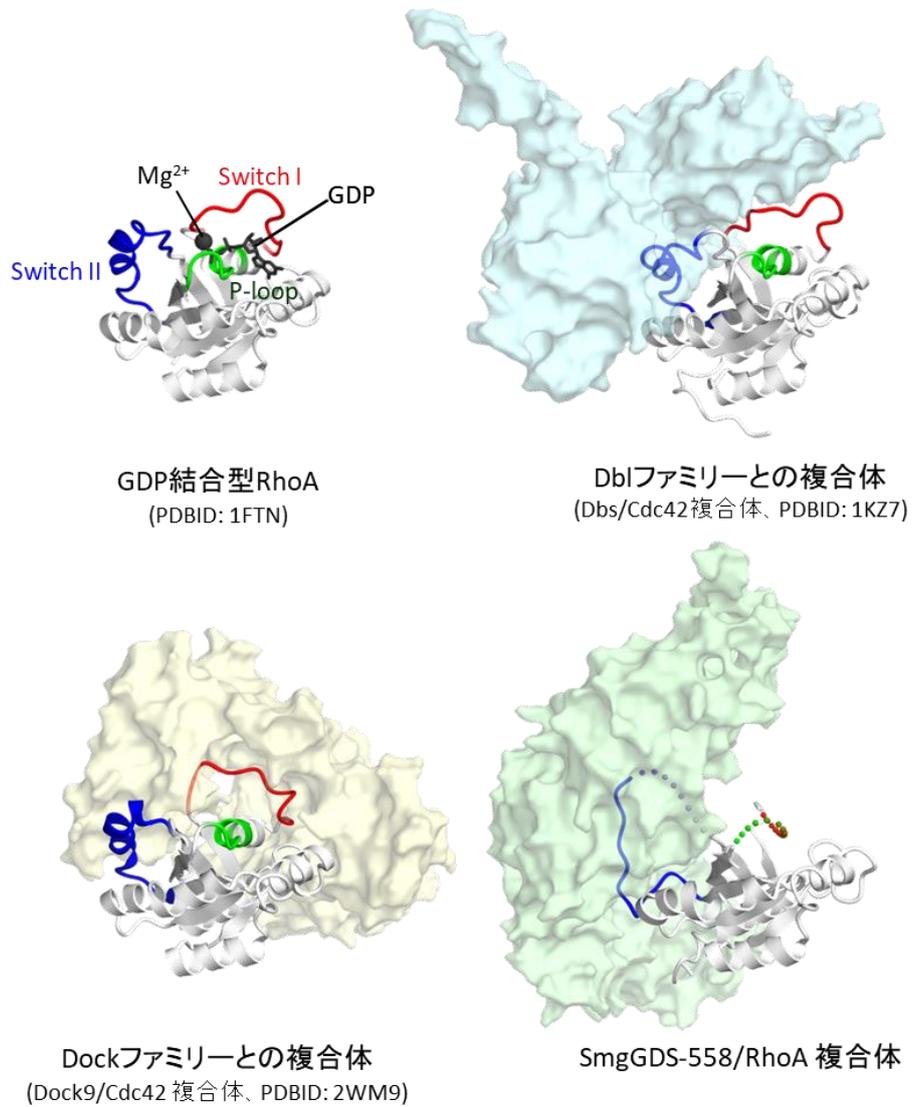


図 43 RhoA 単体と RhoGEF/低分子量 G タンパク質複合体の構造比較

RhoGEF は表面図、低分子量 G タンパク質はリボン図で示した。低分子量 G タンパク質を同じ方向に揃えた。低分子量 G タンパク質の P-loop, switchI, switch II はそれぞれ緑、赤、青で表示した。ディスオーダーした領域を破線で結んだ。

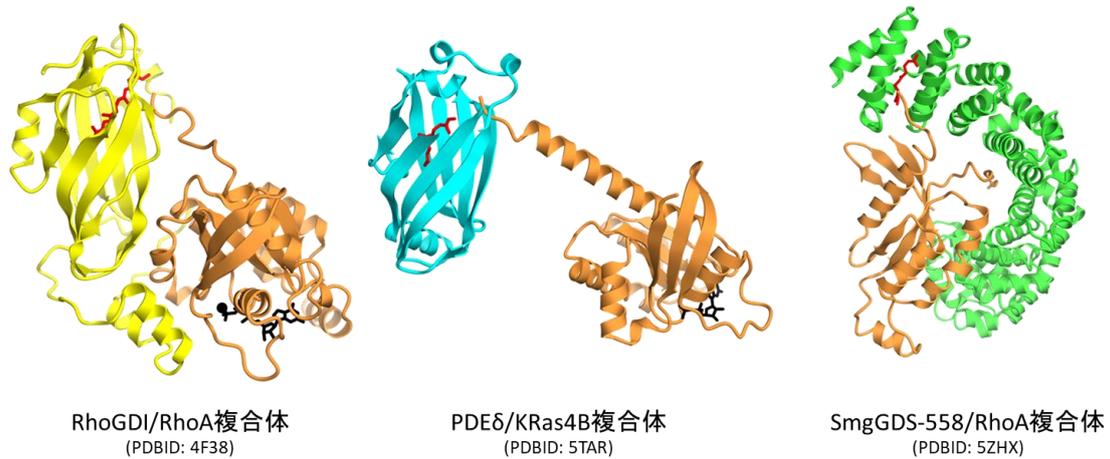


図 44 イソプレニル基受容蛋白質/低分子量 G タンパク質複合体の構造比較

左から RhoGDI (黄)/RhoA (橙) 複合体 (PDB ID:4F38)、PDEδ (水)/KRas4B (橙) 複合体 (PDB ID: 5TAR)、SmgGDS-558 (緑)/RhoA (橙) 複合体 (PDB ID: 5ZHX)。イソプレニル基を赤、Mg およびグアニンヌクレオチドを黒色で示した。

4.2. SmgGDS の GEF としての特異性

SmgGDS の GEF 活性は RhoA および RhoC に特異的であることが報告されている¹⁵。この報告で Hamel らは大腸菌より調製した未修飾の Cdc42, Rac1, Rac2, RhoA, RhoB, RhoC, K-Ras, Rap1A, Rap1B について SmgGDS-607 の GEF 活性を調べた。SmgGDS-558 については RhoA に対して SmgGDS-607 と同程度の GEF 活性を持っていたと記されているが、これは本研究における我々の実験結果とは一致しない。我々の研究では SmgGDS-558 は未修飾 RhoA に対して GEF 活性を持たなかった。測定条件による違いが影響したのかもしれないが、原因は不明である。

GEF としての特異性について本研究で得られた構造情報と低分子量 G タンパク質のアミノ酸配列アライメントからある程度の考察を行うことが出来る (図 45)。まず、RhoB は HVR に PBR を有していないため、SmgGDS との相互作用が弱く GEF として機能できないことが予想される。また、Ras ファミリーに属する K-Ras, Rap1A, Rap1B は switch II の配列が異なるため、GEF 活性を持たないのではないかと考えられる。Cdc42, Rac1, Rac2 については switch II の配列は RhoA と全く同じである。図 45 に示したすべての低分子量 G タンパク質が PBR を有しているがそのアミノ酸配列は異なっており、HVR の配列の違いによる SmgGDS との親和性の差異が GEF 活性の有無に表れているのかもしれない。

DiRas は低分子量 G タンパク質の中で唯一 HVR を欠損させても SmgGDS と強い相互作用を持つことで知られている¹⁴。また、Mg イオン存在下でも SmgGDS との強い結合を保つことができる。DiRas の switch II は RhoA とは異なる配列であるため、これにより switch II がより強く結合するかあるいは DiRas の別の部位が全く異なる結合様式をとる可能性もあり現段階では結合様式は解明できていない。DiRas は単独での GDP/GTP の解離が非常に速いということが分かっているため、DiRas の G-domain は構造変化を引き起こしやすく、switch II が柔軟で SmgGDS と容易に結合できるのかもしれない⁶³。SmgGDS の DiRas に対する GEF 活性は測定報告がなく明らかでない。

		P-loop	Switch I	
RHOA	--MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKQDFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALW			58
RHOC	--MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKQDFPEVYVPTVFENYIADIEVDGKQVELALW			58
RHOB	--MAAIRKKLVVVG DGACGKTCLLIVFSKDEFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALW			58
CDC42	----MQTIKCVVVG DGAVGKTCLLISYTTNKFPEYVPTVFDNYAVTVMIGGEPYTLGLF			56
RAC1	----MQAIKCVVVG DGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLW			56
RAC2	----MQAIKCVVVG DGAVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDSKPVNLGLW			56
KRAS	----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDIL			56
RAP1A	----MREYKLVVVGSGGVGKSALTVQFVGGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQCMLEIL			56
RAP1B	----MREYKLVVVGSGGVGKSALTVQFVGGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDAQQCMLEIL			56
DIRAS1	MPEQSNDRVAVFGAGGVGKSSLVLRVFKGTFRDYIPTIEDTYRQVISCDKSVCTLQIT			60
DIRAS2	MPEQSNDRVAVFGAGGVGKSSLVLRVFKGTFRESYIPTVEDTYRQVISCDKSICTLQIT			60
		Switch II		
RHOA	DTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVILMCFSIDSPDLENIPEKW--TPEVKHFQPNVPIILVG			116
RHOC	DTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVILMCFSIDSPDLENIPEKW--TPEVKHFQPNVPIILVG			116
RHOB	DTAGQEDYDRLRPLSYPDTDVILMCFSDVSDPSDLENIPEKW--VPEVKHFQPNVPIILVA			116
CDC42	DTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLVCFSVVSPSSFENVKEKW--VPEITHHCPTKPFLLVG			114
RAC1	DTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVSPASFENVRAKW--YPEVRHHCPNTPPIILVG			114
RAC2	DTAGQEDYDRLRPLSYPQTDVFLICFSLVSPASYENVRAKW--FPEVRHHCPSTPIILVG			114
KRAS	DTAGQEEYSAMRDQYMRTEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVK--DSEDVPMVLVG			115
RAP1A	DTAGTEQFTAMRDLYMKNQGGFALVYSITAGSTFNDLQDLREQILRVK--DTEDVPMILVG			115
RAP1B	DTAGTEQFTAMRDLYMKNQGGFALVYSITAGSTFNDLQDLREQILRVK--DTDDVPMILVG			115
DIRAS1	DTTGS HQFPAMQRLSISKGHAFILVFSVTSKQSL EELGPIYKLVQIKGSVEDIPVMLVG			120
DIRAS2	DTTGS HQFPAMQRLSISKGHAFILVYSITSRQSL EELKPIYEQICEIKGDVESIPIMLVG			120
RHOA	NKKDLRND EHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATR			176
RHOC	NKKDLRQDEHTRRELAKMKQEPVREEGRDMANRISAFGYLECSAKTKEGVREVFEMATR			176
RHOB	NKKDLRSDEHVRTELARMKQEPVRTDDGRAMAVRIQAYDYLECSAKTKEGVREVFETATR			176
CDC42	TQIDLRDDPSTIEKLAKNKQKPI TPETAELARDLKAVKYVECSALTQKGLKNVFDEAIR			174
RAC1	TKLDLRDDKDTIEKLKEKKLTPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIR			174
RAC2	TKLDLRDDKDTIEKLKEKKLAPITYPQGLALAKEIDSVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIR			174
KRAS	NKCDLPSRT-----V-DTKQAQDLARSY-GIPFIETSAKTRQRVEDAFYTLVR			161
RAP1A	NKCDLEDER-----VVGKEQQNLARQWNC AFLSSAKSKINVNEIFYDLVR			163
RAP1B	NKCDLEDER-----VVGKEQQNLARQWNNCAFLSSAKSKINVNEIFYDLVR			163
DIRAS1	NKCDET-QR-----EVDTREAQVAQEW-KCAFMETSAKMNYNVKELFQELLT			166
DIRAS2	NKCDESP SR-----EVQSSEAEALARTW-KCAFMETSAKLNHNVKELFQELLN			167
		HVR		
RHOA	AALQAR-----RGKK-KSG---CLVL			193
RHOC	AGLQVR-----KNKR-RRG---CPIL			193
RHOB	AALQKR-----YGSQ-N-GCINCKVL			196
CDC42	AALEPP-----EPKK-SRR---CVLL			191
RAC1	AVLCP-----PVKKRKRK---CLLL			192
RAC2	AVLCPQ-----PTRQQKRA---CSLL			192
KRAS	EIRQYRLKK-----ISKEEKTGCVKIKK---CIIM			189
RAP1A	QINRKT-----KK-KPK---KKS---CLLL			184
RAP1B	QINRKT-----GK-ARK---KSS---CQLL			184
DIRAS1	LETRNMSLNIDGKRSGKQKRT-DRVKGK---CTLM			198
DIRAS2	LEKRRTVSLQIDGKSKQKQKREKLGK---CVIM			199

図 45 低分子量 G タンパク質のアミノ酸配列アライメント

SmgGDS と結合能のある低分子量 G タンパク質のアミノ酸配列アライメント。アライメ

ント計算は *Clustal Omega*⁶⁴ を用いて行った。

4.3. SmgGDS と他ファミリー-GEF との比較

SmgGDS は RhoGEF に分類されるが、RhoGEF の中には同様の GEF 活性発揮機序を持つ分子は存在しなかった。SmgGDS による GEF 活性発揮機序は RhoA のグアニンヌクレオチド結合モチーフ (P-loop, switch I, switch II) をディスオーダーさせるものであった。そこで我々は PDB 上のすべての GEF-低分子量 G タンパク質複合体構造を検索し、低分子量 G タンパク質をディスオーダーあるいは大きく構造変化させている GEF を探索した (表 9)。

表を見ると分かるように SmgGDS と同じくすべてのモチーフをディスオーダーさせるような GEF は存在しなかった。また表には記していないが HVR を認識するような GEF は存在しなかった。GEF との結合によってディスオーダーを伴う場合、多くの場合で Switch I がディスオーダーするということが分かった。Switch II をディスオーダーさせる GEF は MSS4/Rab8 複合体 (No.79) と SidM-Drr4/Rab1 複合体 (No.74) だけあった。両構造を比較してみると、Switch I を大きく外側に構造変化させていることが分かる (図 46)。Switch II のディスオーダーは Switch I の構造変化に誘起されて起こるものと考えられるので、SmgGDS とは対象とする Switch モチーフが逆といえる。これらの比較から SmgGDS は既存のどの GEF と異なる新しい作用機序を持つ GEF であると考えられた。

表 9 GEF/低分子量 G タンパク質複合体一覧

2018年5月時点でPDBに登録されているGEFと低分子量Gタンパク質の複合体構造を一覧表にした。最右列にP-loop, switch I (sw1), switch II (sw2)の順にディスオーダーと特徴的な構造変化を記した。ディスオーダーしていない場合にはn, している場合はyesと表した。一部だけディスオーダーしている場合には残基数を括弧内に表示した。

No	PDB ID	GEF	低分子量 G タンパク質		分解能	ディスオーダー (p-loop,sw1,sw2)
0	5ZHX	SmgGDS	RhoA	RhoGEF	3.50	mol f,g (yes, yes, yes) ,
1	1LB1	Dbl-PH Dbs	RhoA	RhoGEF	2.80	n,n,n
2	1X86	DH/PH	RhoA	RhoGEF	3.22	n,n,n
3	1XCG	PDZRHOGEF	RhoA	RhoGEF	2.50	n,n,n
4	2RGN	p63RhoGEF	RhoA	RhoGEF	3.50	n,n,n
5	3KZ1	DH/PH	RhoA	RhoGEF	2.70	n,n,n
6	3LW8	IpgB2	RhoA	RhoGEF	1.85	n,n,n
7	3LWN	IpgB2	RhoA	RhoGEF	2.28	n,n,n
8	3LXR	IpgB2	RhoA	RhoGEF	1.68	n,n,n
9	3T06	PDZThoGEF	RhoA	RhoGEF	2.84	n,n,n
10	4D0N	AKAP13	RhoA	RhoGEF	2.10	n,n,n
11	4XH9	NET1(DH/PH)	RhoA	RhoGEF	2.00	n, yes, n
12	6BC0	PH domain of	RhoA	RhoGEF	2.20	n,n,n
13	5JHG	DH/PH	RhoA	RhoGEF	2.50	n,n,n
14	6BCA	LbcRHOGEF	RhoA	RhoGEF	2.00	n,n,n
15	6BCB	p114RhoGEF	RhoA	RhoGEF	1.40	n,n,n
16	5JHH	DH/PH	RhoA	RhoGEF	2.30	n,n,n
17	1FOE	TIAM	Rac1	RhoGEF	2.80	n,n,n
18	2NZ8	DHPH Trio	Rac1	RhoGEF	2.00	n,n,n
19	2VRW	Vav1	Rac1	RhoGEF	1.85	n,n,n
20	2YIN	Dock1	Rac1	RhoGEF	2.70	n,n,n, sw1,sw2 open
21	3B13	DHR-2	Rac1(T17N)	RhoGEF	3.01	n,n,n, sw1,sw2 open
22	3BJI	vav1	Rac1	RhoGEF	2.60	n,n,n
23	4YON	P-Rex1	Rac1	RhoGEF	1.95	n,n,n
24	5FI0	DH/PH	Rac1	RhoGEF	3.28	n,n,n
25	5O33	Kalirin DH1	Rac1	RhoGEF	1.64	n,n,n
26	6BC1	PH Domain of	Rac1	RhoGEF	2.90	n,n,n
27	1KZ7	DH/PH	Cdc42	RhoGEF	2.40	n,n,n sw1close

28	1GZS	SOPE	Cdc42	RhoGEF	2.30	n,n,n sw1close
29	1KI1	Dbl	Cdc42	RhoGEF	2.30	n,n,n sw1close
30	1KZG	DBS	Cdc42	RhoGEF	2.60	n,n,n sw1close
31	2DFK	Collybistin II,	Cdc42	RhoGEF	2.15	n,n,n sw1close
32	2WM9	DOCK9	Cdc42	RhoGEF	2.20	n sw1 open (slightly)
33	2WMN	DOCK9	Cdc42	RhoGEF	2.39	sw1 open (slightly)
34	2WMO	DOCK9	Cdc42	RhoGEF	2.20	sw1 open (slightly)
35	3GCG	L0028	Cdc42	RhoGEF	2.30	n, yes, n: sw1(4aa) ,
36	3QBV	ITSN1	Cdc42	RhoGEF	2.65	n, yes, n:
37	3VHL	DHR-2 Dock8	Cdc42	RhoGEF	2.09	n,n,n sw1 open
38	3CX6	PDZRhoGEF	Galpha-13	RhoGEF	2.50	n,n,n sw1 has long
39	3CX7	PDZRhoGEF	Galpha-13	RhoGEF	2.25	n,n,n sw1 has long
40	3CX8	PDZRhoGEF	Galpha-13	RhoGEF	2.50	n,n,n sw1 has long
41	1SHZ	p115RhoGEF	Gnai1	RhoGEF	2.85	n,n,n sw1 has long
42	2NTY	ROPGEF8	ROP4	RopGEF	3.10	n, yes, n :sw1(3aa)
43	2WBL	ROPGEF8	ROP7	RopGEF	2.90	n, yes, n: sw1(8aa)
44	1LFD	RALGDS	H-Ras	RasGEF	2.10	n,n,n sw1, sw2 moving
45	1BKD	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.80	n,n,n
46	1NVU	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.20	n,n,n
47	1NVV	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.18	n,n,n
48	1NVW	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.70	n,n,n
49	1NVX	SOS-1	H-Ras	RasGEF	3.20	n,n,n
50	1XD2	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.70	n,n,n
51	4NYJ	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.85	n,n,n
52	4NYM	SOS-1	H-Ras	RasGEF	3.55	n,n,n p-loop moving
53	4URU	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.83	n,n,n
54	4URV	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.58	n,n,n
55	4URW	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.76	n,n,n
56	4URX	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.49	n,n,n
57	4URY	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.47	n,n,n : sw2 bound RV1
58	4URZ	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.24	n,n,n
59	4US0	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.17	n,n,n
60	4US1	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.65	n,n,n
61	4US2	SOS-1	H-Ras	RasGEF	2.48	n,n,n
62	5CM8	RalGDS	RalA	RalGEF	2.60	n,n,n
63	3CF6	Epac2	Rap1B	RapGEF	2.20	n,n,n
64	4MGI	Epac1 and	Rap1b	RapGEF	2.80	n,n,n
65	4MGK	Epac1 and	Rap1b	RapGEF	2.70	n,n,n

66	4MGY	Epac1 and	Rap1b	RapGEF	2.60	n,n,n
67	4MGZ	Epac1 and	Rap1b	RapGEF	3.00	n,n,n
68	4MH0	Epac1 and	Rap1b	RapGEF	2.40	n,n,n
69	6AXG	RasGRP4	Rap1b	RasGEF	3.30	n,yes,n: sw1(6aa)
70	6AXF	RasGRP	Rap1B	RapGEF	3.10	n,n,n
71	2WWX	SidM-DrrA	Rab1	RabGEF	1.50	n,n,n sw1,2 moving
72	3L0I	SidM-DrrA	Rab1	RabGEF	2.85	n,n,n sw1,2 moving
73	3JZA	SidM-DrrA	Rab1b	RabGEF	1.80	n,n,n sw1,2 moving
74	5O74	SidM-DrrA	Rab1b	RabGEF	2.50	molF, (n,yes, yes:sw1
75	2OT3	RABEX	Rab21	RabGEF	2.10	n,yes,n :sw1(9aa)
76	3TW8	DENND	Rab35	RabGEF	2.10	n,yes,n :sw1(2~4aa)
77	1TU3	RABEP1	Rab5A	RabGEF	2.31	mol A,B,C E n,n,n,
78	4Q9U	RABGEF1	Rab5A	RabGEF	4.62	molB
79	2FU5	MSS4	Rab8	RabGEF	2.00	molC (n,yes,yes) , molD
80	4LHX	Rabin8	Rab8	RabGEF	3.05	n,n,n
81	4LHY	Rabin8	Rab8	RabGEF	3.10	n,n,n
82	4LHZ	Rabin8	Rab8	RabGEF	3.20	n,n,n
83	4LI0	Rabin8	Rab8	RabGEF	3.30	n,n,n
84	2EFD	AtVps9a	Ara7	RabGEF	3.00	n,yes,n :sw1(14aa)
85	2EFE	AtVps9a	Ara7	RabGEF	2.08	n,n,n
86	2EFH	AtVps9a	Ara7	RabGEF	2.10	n,yes,n :sw1(14aa)
87	2EFC	AtVps9a	Ara7	RabGEF	2.10	n,n,n
88	4G01	Vps9a	Ara7	RabGEF	2.20	n,n,n sw1 moving
89	2OCY	Sec2p	Sec4p	RabGEF	3.30	n,n,n
90	2EQB	Sec2p	Sec4p	RabGEF	2.70	n,n,n
91	4ZDW	Sec2p	Sec4p	RabGEF	2.90	n,n,n
92	3CUE	TRAPPI	Ypt1p	RabGEF	3.70	n,yes,n :sw1(5aa)
93	5LDD	Mon1-Ccz1	Ypt7	RabGEF	2.50	n,n,n
94	1RE0	GEA1	ARF1	ArfGEF	2.40	n,n,n
95	1R8Q	Arno	ARF1	ArfGEF	1.86	n,n,n
96	1R8S	Arno	ARF1	ArfGEF	1.46	n,n,n
97	1S9D	Arno	ARF1	ArfGEF	1.80	n,yes,n :sw1(6aa)
98	4C0A	IQSEC1	ARF1	ArfGEF	3.30	n,n,n
99	6FAE	IQSEC2	ARF1	ArfGEF	2.30	n,yes,n :sw1(6aa)
100	4KAX	Cytohesin-3	ARF6	ArfGEF	1.85	n,n,n
101	5EE5	ARFGEF1	ARL1	ArfGEF	2.28	n,n,n
102	5J5C	ARFGEF1	ARL1	ArfGEF	3.40	n,n,n
103	1I2M	RCC1	RAN	RanGEF	1.76	n,yes,n: s1(5aa)

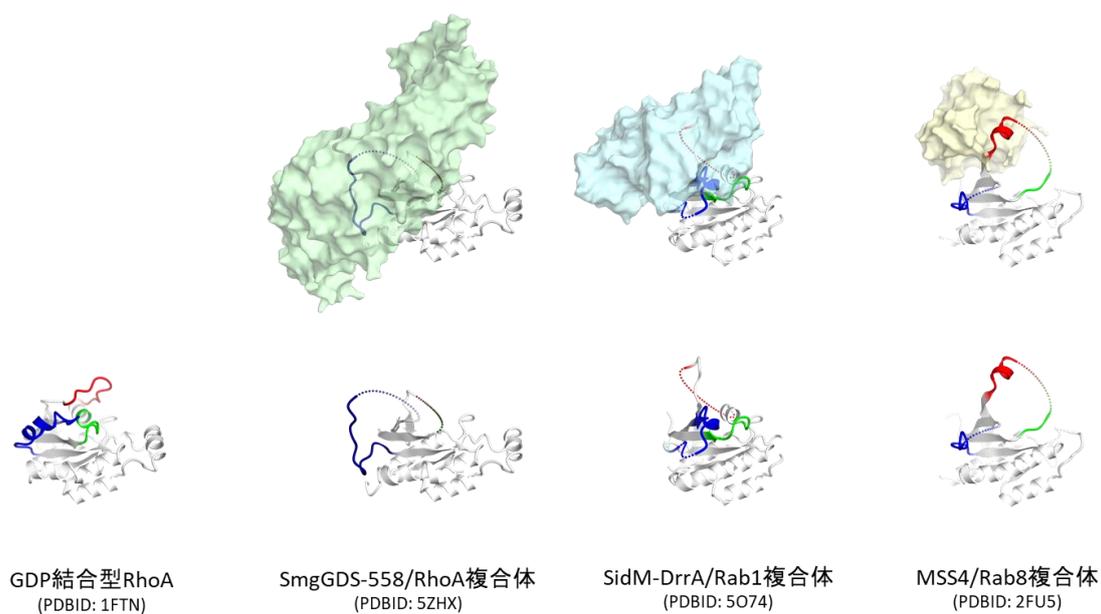


図 46 SmgGDS と他ファミリーGEF の構造比較

上段では GEF を表面図、低分子量 G タンパク質をリボン図で示した。下段では低分子量 G タンパク質のみを表示した。低分子量 G タンパク質を同じ方向に揃えた。低分子量 G タンパク質の P-loop, switch I, switch II はそれぞれ緑、赤、青で表示した。ディスオーダーした領域を破線で結んだ。

4.4. SmgGDS と ARM タンパク質の比較

SmgGDS は既知の GEF とは全く異なり全体を通して ARM で構成されていた。PDB に登録されている既知構造に対して DALI⁶⁵ を用いて類似構造を探索したところ、ARM タンパク質である OR497 (PDB ID:4RV1), インポーチン α サブユニット (PDB ID: 4BQK), β カテニン (PDB ID:1TH1) が最も類似していた (図 47)。OR497 は人工的に設計されたタンパク質であるので本議論から除外する。インポーチン α サブユニットは核移行シグナル配列 (NLS) をもつ積荷タンパク質と結合し、インポーチン β サブユニットと複合体を形成することで積荷を核内に運搬する輸送蛋白質である。 β カテニンは Wnt シグナルの下流でカギとなる分子であり、ARM 部分はリガンドタンパク質と結合する。

各分子のリガンド認識部位を比較してみると、どのタンパク質も ARM の表面にリガンドタンパク質のペプチド鎖を結合していた (図 48)。インポーチン α サブユニットは SmgGDS 同様に N 末端側に負領域を持ち、塩基性残基に富んだ NLS 配列を認識していた。また凹面に正領域を持つ傾向も見られた。

一般に ARM タンパク質は超螺旋構造によって、多くのタンパク質パートナーと相互作用し多目的なプラットフォームとして働く⁶⁶。ARM タンパク質はシグナル伝達、細胞骨格、鞭毛の構成成分、タンパク質分解、フォールディング (シャペロン) という広範な機能を持つことが知られており、その機能は分子によって様々である⁶⁶。構造比較により類似すると分かったインポーチン α サブユニットと β カテニンは細胞内でそれぞれ独立の機能を持っており、SmgGDS との r.m.s.d. は 3 \AA 以上である。また、SmgGDS との配列相同性はどちらも 15% 以下と高くないことから SmgGDS とこれら分子は独立の役割を持つものと考えられる。

ARM タンパク質で低分子量 G タンパク質と関係する分子に p120 catenine がある^{66,67}。この分子は RhoA の活性を阻害することが報告されているものの、ARM が直接結合するわけではなく、ARM に挿入されたループが RhoA を認識すると考えられており SmgGDS と

は異なる。また、RhoGEFである Dock ファミリーも ARM ドメインを有している⁹。しかしながらこのドメインの役割については明らかでない。よって今までのところ ARM タンパク質で GEF としての働きを持つのは SmgGDS のみである。

SmgGDS は GEF としての機能研究が進んでいるが、GEF として働かない低分子量 G タンパク質とも結合能を有することや ARM タンパク質の機能多様性を鑑みると GEF 以外の役割も持つことは十分に考えられ、さらなる研究が必要である。

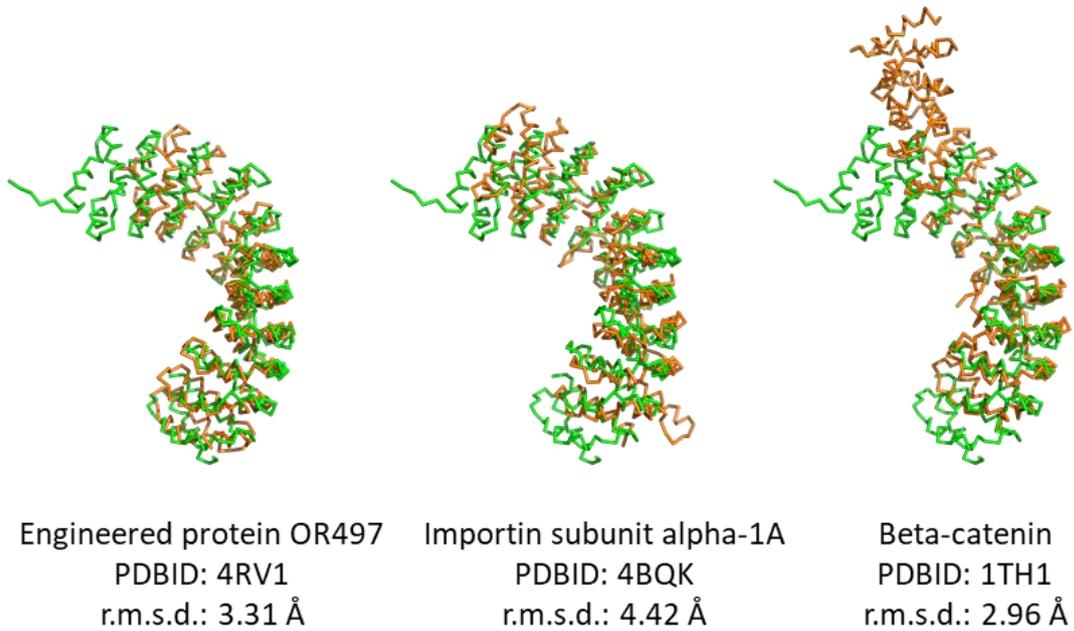


図 47 SmgGDS と ARM タンパク質の構造比較

SmgGDS-558 単体構造 (PDB ID:5XGC) を緑、橙は DALI⁶⁵により選ばれた各 ARM タンパク質を橙色で示した。重ね合わせと r.m.s.d.値の算出は CCP4 プログラムパッケージにある Lsqkab の Secondary Structure Matching method を利用した⁶⁸。

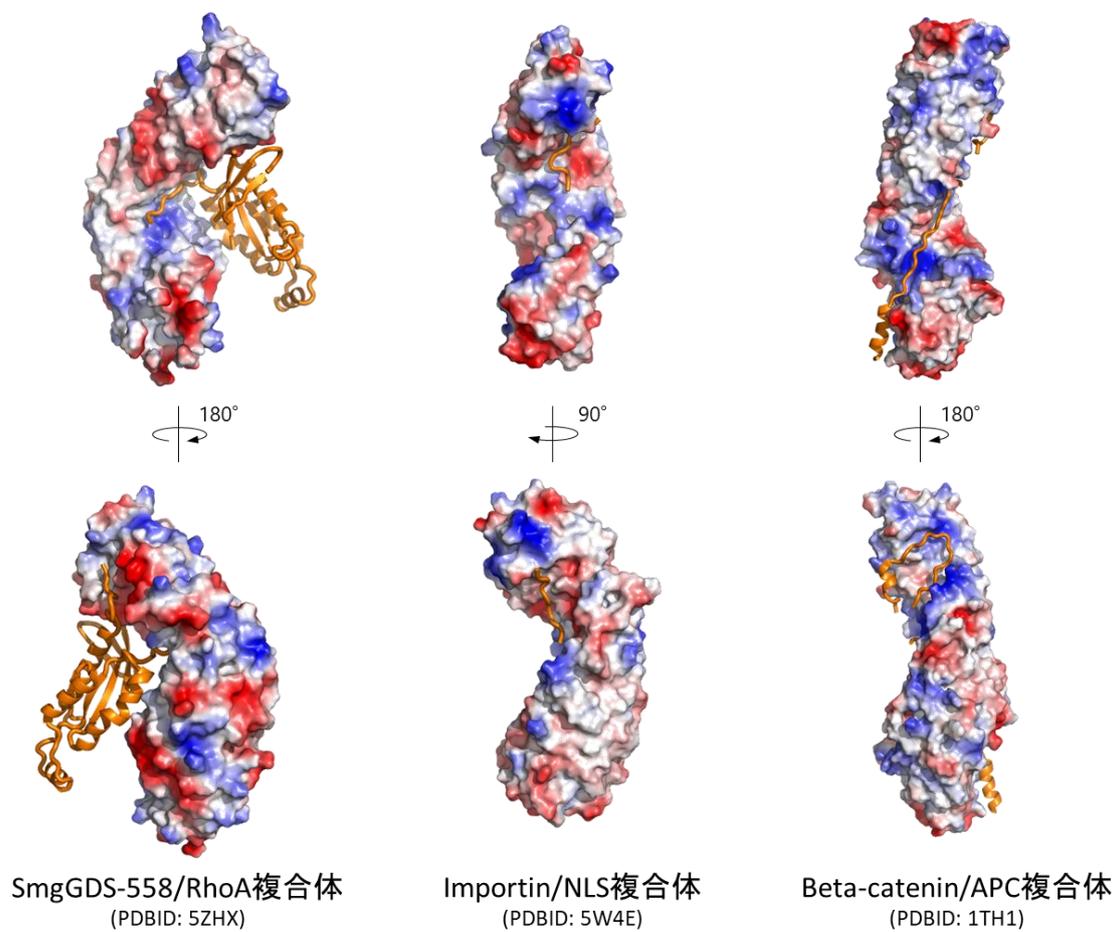


図 48 ARM タンパク質/リガンド複合体の構造比較

各 ARM タンパク質の静電ポテンシャル図とリガンドタンパク質 (橙) の構造を示した。

4.5. SmgGDS の生理学的役割についての考察

本研究で得られた結晶構造により SmgGDS-558 は直接的に RhoA の脂質修飾を受容し、GEF として機能することが明らかとなった。SmgGDS-607 は構造が得られていないが、ARM C の存在により未修飾の HVR を優位に認識するということが強く示唆された。ところが、一般に翻訳後修飾を完了した RhoA は HVR を介して細胞膜上に繋がれ機能する。SmgGDS が細胞膜上の RhoA に対して GEF として機能するためには一度膜から RhoA を引き抜く必要がある。これが可能なかどうかは現段階では明らかでない。細胞膜へ局在する前に RhoA を活性化することで RhoA のシグナルをオンにすることも考えられる。

Williams らのグループは長年 SmgGDS の研究を行ってきた。このグループは近年になり SmgGDS は低分子量 G タンパク質の翻訳後修飾の過程をリクルートするシャペロン様の役割を持つということを提唱した (図 49)。SmgGDS-607 は未修飾 HVR を認識しプレニル基転移過程の入り口を制御する。一方で SmgGDS-558 はプレニル化を受けた低分子量 G タンパク質の膜への輸送を支援する。低分子量 G タンパク質の脂質修飾と細胞内局在の制御過程はこれまでよくわかっていなかったが、SmgGDS がこの役割を担っている可能性がある。本研究で明らかとなった SmgGDS-558 の構造は SmgGDS-558 が SmgGDS-607 には存在しないポケットを使い、脂質修飾を認識するというものだった。この結果は Williams らが提唱した SmgGDS による脂質修飾制御機構を補助するものであると考える。SmgGDS-558 は RhoA の脂質修飾部位を保護することでシャペロンとして働き、凝集や細胞内での異常な局在を防ぎ、翻訳後修飾を円滑にする役割があるのではないだろうか。

また、本研究では *in vitro* にてファルネシル化を施した RhoA を用いた。しかしながら本来 CaaX モチーフへの翻訳後修飾はシステイン残基のイソプレニル化、末端 3 残基の切断、末端カルボキシ基のメチル化の三段階で進行する⁶。本研究では 1 段階目の処理が進行した状態の RhoA と SmgGDS-558 との複合体構造を明らかにしたものと考えられる。残りの 2 段階の翻訳後修飾は脂質修飾を細胞質で受けたあと、小胞体膜上の酵素 RCE1 と ICMT に

よってなされる。これらのすべての段階で SmgGDS-558 が RhoA をリクルートするのか、あるいは途中で役割を終え、低分子量 G タンパク質から解離するのかについては明らかになっていない。複合体構造では CaaX モチーフ部分は Cys 残基とそれに隣接する Leu のみが観測された。RCE1 によるプロセッシングによって aaX 部分が切断され、ICMT によるメチル化を受けると SmgGDS-558 との親和性がどのように変化するのかについては、非常に興味があるところであるが、プロセッシング途中の試料を調製する困難さから現在のところ研究が進んでいない。

本研究では SmgGDS-558 は RhoA に対してユニークな相互作用様式をとることを明らかにした。我々の発見は SmgGDS や低分子量 G 蛋白質を標的とした創薬研究に役立つものと考えられる。また、SmgGDS の生理学的意義や構造変化の駆動力などの詳細な分子機構などいまだ分からない点も多く残っている。今後は X 線結晶構造解析だけではなく多様な実験手法や観点からの研究が求められることになるだろう。

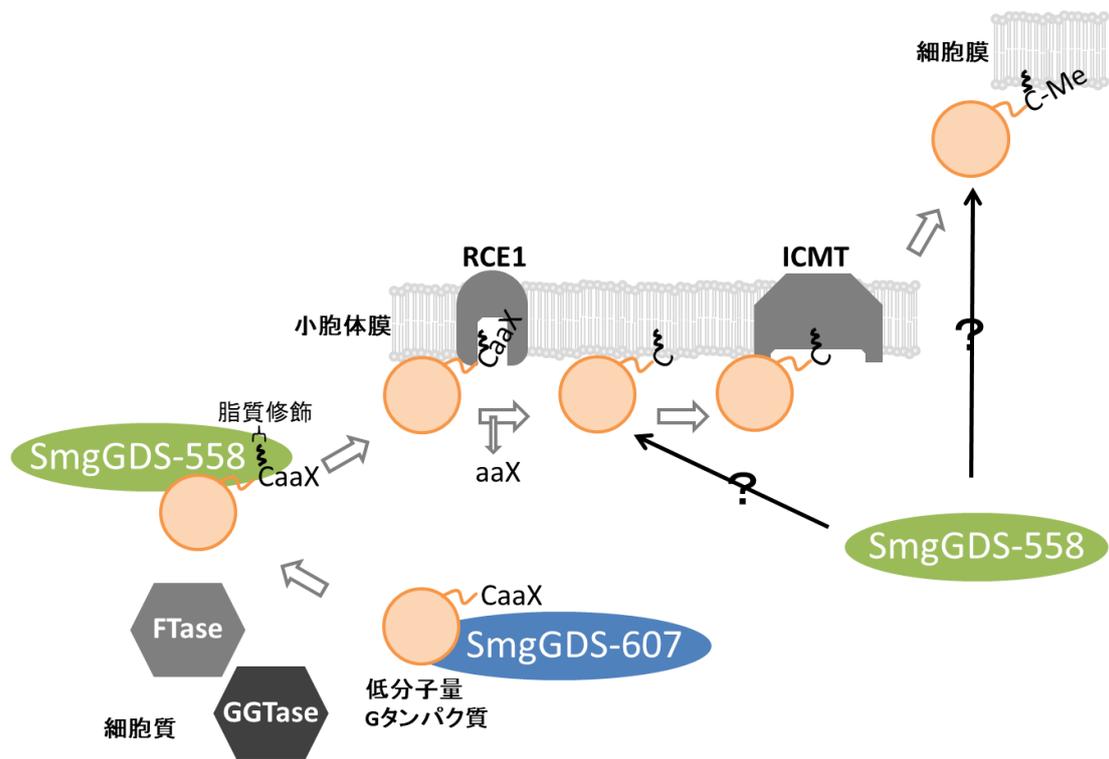


図 49 SmgGDS による低分子量 G タンパク質の翻訳後修飾制御モデル

低分子量 G タンパク質の三段階の翻訳後修飾とそれに対する SmgGDS の作用を図示した。SmgGDS-607 は新しく合成された未修飾低分子量 G タンパク質と複合体を形成し低分子量 G タンパク質を貯蓄する役割を持つと提唱されている。また、SmgGDS-558 は脂質修飾された低分子量 G タンパク質を認識し、小胞体膜上でのさらなるプロセッシングと細胞膜への局在をリクルートするかもしれない。

5. 付録

5.1. 昆虫細胞発現系によるイソプレニル化 RhoA の調製・結晶化の検討

5.1.1. 方法

本編では大腸菌で発現させた RhoA に対して *in vitro* にてファルネシル化を施した。それとは別の試みとして、昆虫細胞で RhoA とイソプレニル基転移酵素を発現（共感染）させる方法を検討した。本手法は昆虫細胞においてイソプレニル化 K-Ras4B を調製した先行研究を参考にして行った⁶⁹。

昆虫細胞発現用のベクターである pFastBacDual の PH プロモーター側の multi cloning site (MCS) に図 50 に表したようにプレジジョンプロテアーゼ認識配列を挟み His6 タグと MBP タグを N 末端側に付加した RhoA 全長遺伝子を組み込んだ。RhoA はファルネシル化には L193A 変異体をゲラニルゲラニル化には野生型を用いた。

また、イソプレニル基転移酵素については FTase とゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ (GGTase) の両者を検討した。GGTase は FTase と同じく 2 つの subunit で構成されており、 α -subunit は FTase と同じであり、 β -subunit は異なる（遺伝子名：GGTB）。RhoA の発現系と同じく pFastBacDual ベクターを用い、図 50 に示したように N 末端側に FLAG タグを付加した各サブユニットを組み込んだ。

各発現ベクターを用い、大腸菌 DH10Bac をそれぞれ形質転換した。Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems (Invitrogen) のマニュアルに従ってバックミドを調製し、Sf-9 細胞へ遺伝子導入した。P1-3 ウイルス液を作成した。

イソプレニル基転移酵素については発現確認のためウエスタンブロッティングを行った。P1, P2 ウイルス作成時の細胞を破碎用緩衝液（20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl）に懸濁し超音波破碎した。破碎液を SDS-PAGE し、ゲルを Nitrocellulose Membranes, 0.2 M N (BIO-RAD) に、15 V で 30 分間転写した。ブロッティング用緩衝液には、(50 mM Tris, 40 mM Glycine, 20% methanol) を使用した。転写後、Blocking One（ナカライテスク）を

5%含む洗浄用緩衝液(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 135 mM NaCl, 0.1% Tween-20) 中で1時間室温にて振盪しブロッキングした。染色は洗浄用緩衝液を用いて3000倍に希釈した rabbit anti FLAG antibody (Sigma-Aldrich)を一次抗体に、同じ緩衝液で3000倍に希釈した anti rabbit IgG goat IgG, HRP (Santa Cruz Biotechnology) を二次抗体に用い、転写したメンブレンをそれぞれ室温で1時間インキュベートした。検出は、Chemi-Lumi One (ナカライテスク) を用い、暗室中で発光を測定した。

大量培養では終濃度1%ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液(ナカライテスク)を添加した Sf-900 II SFM (Thermo Fisher Scientific)を用い、 $2 \cdot 3 \cdot 10^6$ 個/mLの細胞に RhoA およびイソプレニル基転移酵素 P3 ウイルス液をそれぞれ10 mL(ウイルス液)/1 L(培養液)の割合で添加し共感染させた。27合で72時間、振盪培養し、目的タンパク質を発現させた。

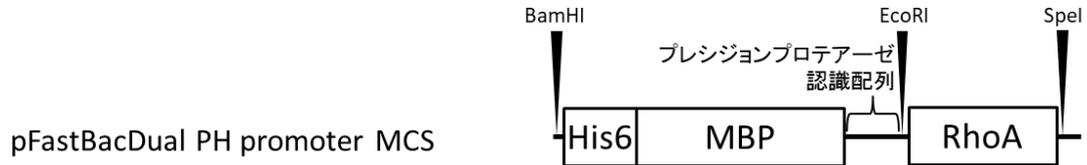
菌体を遠沈し破碎用緩衝液(20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10% (w/v) glycerol) に懸濁したのち超音波破碎した。破碎液を4 °C, 20000 rpm, 20 min 遠心しその上清を cOmplete His-Tag Purification Resin (Merck) へ吸着させた。洗浄用緩衝液(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% Glycerol, 20-35 mM Imidazole) を用いて10 CV以上洗浄した後、溶出用緩衝液(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20% (w/v) glycerol, 300 mM Imidazole) で溶出させた。溶出液を透析用緩衝液(20 mM MES pH 6.0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% (w/v) glycerol)を用いて4°Cで一晩透析した。希釈用緩衝液(20 mM MES pH 6.0, 5 mM MgCl₂, 10% (w/v) glycerol) で倍に希釈したのち、A緩衝液(20 mM MES pH 6.0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% (w/v) glycerol) で平衡化した1 mL RESOURCE S (GE Healthcare) へ吸着させた。また、この際素通り画分を回収した。B緩衝液(20 mM MES pH 6.0, 1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% (w/v) glycerol) を40 CVの範囲で0%-100% B緩衝液となるように勾配をかけ RhoA を溶出し溶出画分とし

た。試料をアミコンウルトラ (Merck) で濃縮後、GST を融合させたプレジジョンプロテアーゼを 1/100 (w/w) 量添加し、4°Cで一晩タグを切断させた。cOmplete His-Tag Purification Resin (Merck) を素通りさせ切断したタグを除去した。試料をアミコンウルトラ (Merck) で濃縮後、透析用緩衝液(20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) で透析した。RESOURCE S 素通り画分については状況に応じて Superdex 75 pg (GE Healthcare) を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行い、溶出画分を濃縮して最終標品とした。ゲル濾過の緩衝液には Tris 緩衝液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) を用いた。RESOURCE S 溶出画分はゲル濾過カラムに吸着しやすいため、ゲル濾過カラムによる精製は避けた。

精製試料を用いて SmgGDS-558 (77-558)との複合体結晶化スクリーニングを実施した。SmgGDS-558 (77-558) と RhoA をモル比 1 : 1 で混合し、PEG/Ion2, MembFac (Hampton Research) 、Protein Complex suite (QIAGEN) のスクリーニングキットを用いた。また、2.3.2 項で最適化した結晶化条件でも結晶化を試みた。

得られた結晶を用いて 2.3.3 項と同様に大型放射光施設にて X線回折データの収集及び解析を行った。

RhoA発現コンストラクト



FTase, GGTase発現コンストラクト

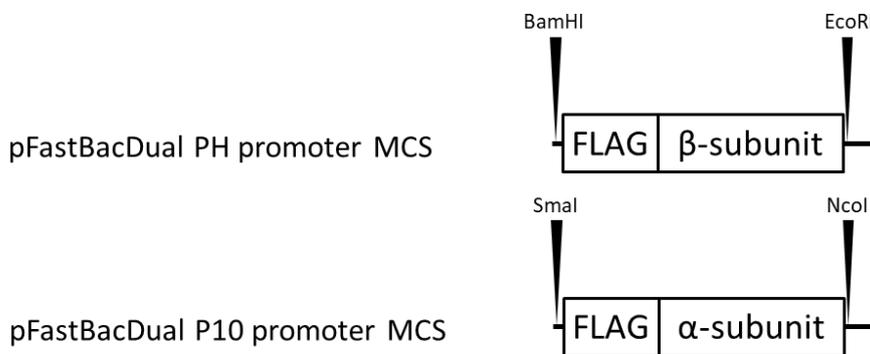


図 50 昆虫細胞用各タンパク質発現コンストラクト

FTase を発現させたコンストラクトの模式図を示した。

5.1.2. 結果

イソプレニル基転移酵素の発現確認では FTase, GGTase のどちらも発現を確認できた (図 51)。昆虫細胞でイソプレニル基転移酵素と共感染させ、発現させた RhoA は RESOURCE S に吸着するものとしなないものが存在した。RESOURCE S に吸着した画分はより沈殿が生じやすく、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーでは樹脂に吸着してしまう傾向にあった。FTase と共発現させた RhoA では RESOURCE S 素通り画分は 1-2 mg/1 L 培養液の収量であるのに対して、吸着画分は 0.5 mg/1 L 培養液であった。GGTase と共発現させた RhoA では RESOURCE S 素通り画分は 0.1 mg/1 L 培養液の収量であるのに対して、吸着画分は殆ど取れなかった。各精製ステップにおける結果を図 52 に示した。

得られた試料を用いて結晶化を行ったところ、FTase と共発現させた RhoA の RESOURCE S 素通り画分でのみ結晶が得られた (図 53)。結晶が得られた条件は 2.3 節と同じであった。放射光施設にて X 線回折実験を実施したところ、2.3 節と同程度の回折能をもっていた。しかしながら、複合体結晶の分解能の改善には至らず、本篇における構造解析に用いたデータには含めなかった。

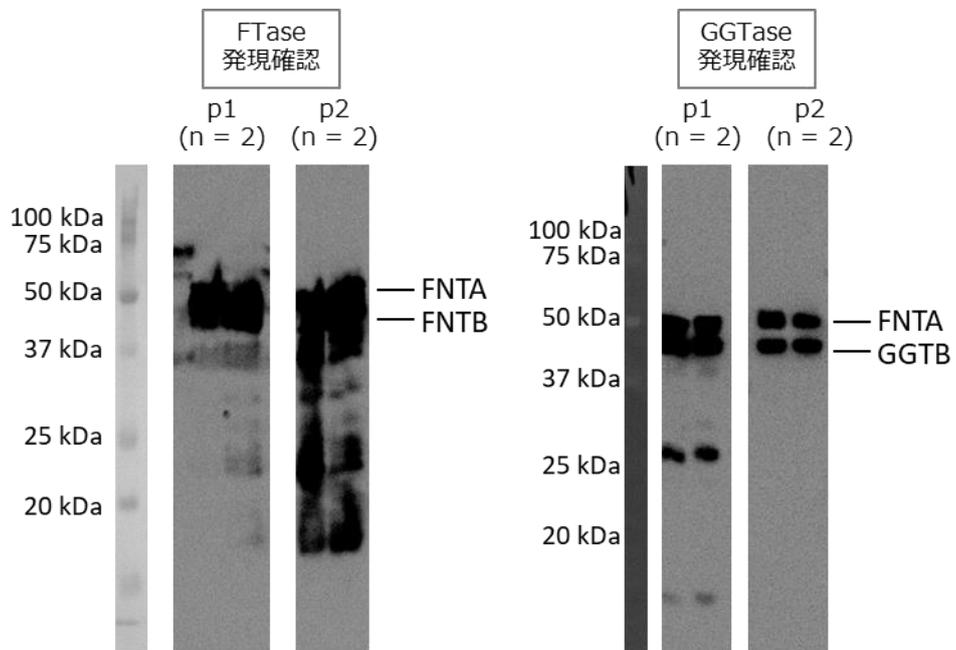


図 51 昆虫細胞におけるイソプレニル基転移酵素の発現確認

FLAG タグに対するウエスタンブロッティングによりイソプレニル基転移酵素の発現を確認した。どちらの酵素も発現を確認できた。

ファルネシル化RhoAの精製

ゲラニルゲラニル化RhoAの精製

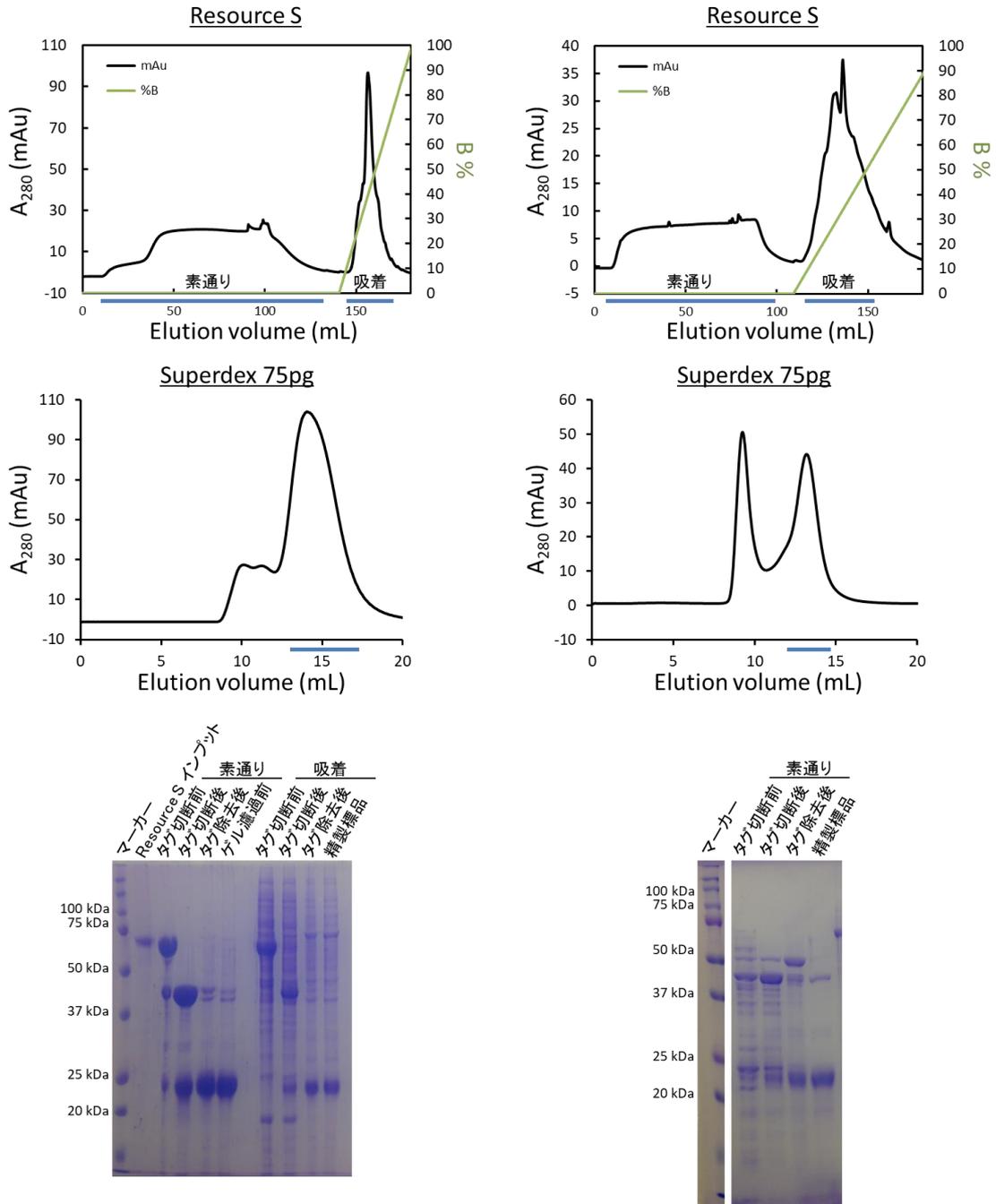


図 52 昆虫細胞発現系におけるイソプレニル化 RhoA の精製過程

精製過程のうち Resource S (上) と Superdex 75pg (中) のプロファイルと各精製ステップにおける SDS-PAGE (下) を示した。各プロファイルにおける青色線は回収した領域を表す。

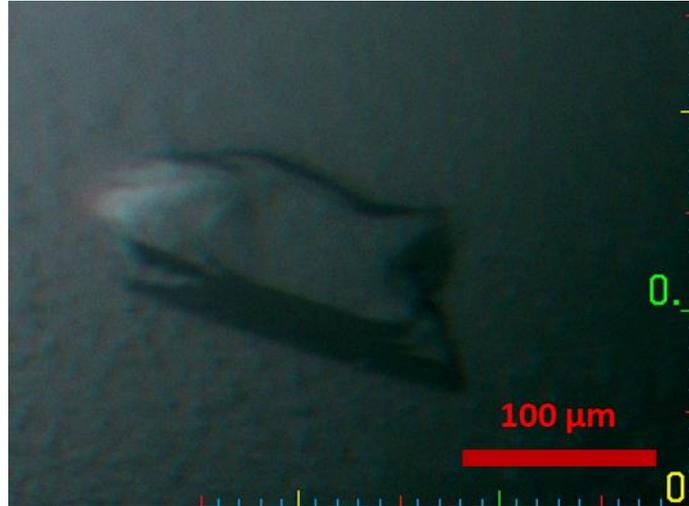


図 53 SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体結晶

昆虫細胞発現系から調製したファルネシル化 RhoA を用いて析出した SmgGDS-558 (77-558) /ファルネシル化 RhoA 複合体結晶の例。

6. 参考文献

- 1 Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews* **81**, 153-208 (2001).
- 2 Goitre, L., Trapani, E., Trabalzini, L. & Retta, S. F. in *Ras Signaling* 1-18 (Springer, 2014).
- 3 Colicelli, J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci. STKE* **2004**, re13-re13 (2004).
- 4 Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution* **33**, 1870-1874 (2016).
- 5 Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. & Sander, C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**, 4637-4648 (1991).
- 6 Wright, L. P. & Philips, M. R. Thematic review series: lipid posttranslational modifications CAAX modification and membrane targeting of Ras. *Journal of lipid research* **47**, 883-891 (2006).
- 7 Rossman, K. L., Der, C. J. & Sondek, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**, 167-180 (2005).
- 8 Yang, J., Zhang, Z., Roe, S. M., Marshall, C. J. & Barford, D. Activation of Rho GTPases by DOCK exchange factors is mediated by a nucleotide sensor. *Science* **325**, 1398-1402 (2009).
- 9 Kulkarni, K., Yang, J., Zhang, Z. & Barford, D. Multiple factors confer specific Cdc42 and Rac protein activation by dedicator of cytokinesis (DOCK) nucleotide exchange factors. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 25341-25351 (2011).
- 10 Mizuno, T. *et al.* A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 6442-6446 (1991).
- 11 Yamamoto, T. *et al.* Purification and characterization from bovine brain cytosol of proteins that regulate the GDP/GTP exchange reaction of smg p21s, ras p21-like GTP-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 16626-16634 (1990).
- 12 Williams, C. L. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cellular signalling* **15**, 1071-1080

- (2003).
- 13 Bergom, C. *et al.* The Tumor-suppressive Small GTPase DiRas1 Binds the Noncanonical Guanine Nucleotide Exchange Factor SmgGDS and Antagonizes SmgGDS Interactions with Oncogenic Small GTPases. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 6534-6545 (2016).
 - 14 Ogita, Y. *et al.* Di-Ras2 Protein Forms a Complex with SmgGDS Protein in Brain Cytosol in Order to Be in a Low Affinity State for Guanine Nucleotides. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 20245-20256 (2015).
 - 15 Hamel, B. *et al.* SmgGDS is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates RhoA and RhoC. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 12141-12148 (2011).
 - 16 Schuld, N. J. *et al.* The chaperone protein SmgGDS interacts with small GTPases entering the prenylation pathway by recognizing the last amino acid in the CAAX motif. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 6862-6876 (2014).
 - 17 Berg, T. J. *et al.* Splice variants of SmgGDS control small GTPase prenylation and membrane localization. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 35255-35266 (2010).
 - 18 Williams, C. Vol. 12 2933-2934 (Cell Cycle., 2013).
 - 19 Tew, G. W. *et al.* SmgGDS regulates cell proliferation, migration, and NF- κ B transcriptional activity in non-small cell lung carcinoma. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 963-976 (2008).
 - 20 Zhi, H. *et al.* SmgGDS is up - regulated in prostate carcinoma and promotes tumour phenotypes in prostate cancer cells. *The Journal of pathology* **217**, 389-397 (2009).
 - 21 Hauser, A. D. *et al.* The SmgGDS splice variant SmgGDS-558 is a key promoter of tumor growth and RhoA signaling in breast cancer. *Molecular Cancer Research* **12**, 130-142 (2014).
 - 22 Schuld, N. *et al.* SmgGDS-558 regulates the cell cycle in pancreatic, non-small cell lung, and breast cancers. *Cell Cycle* **13**, 941-952 (2014).
 - 23 Tanaka, S.-i. *et al.* Statins Exert the Pleiotropic Effects Through Small GTP-Binding Protein Dissociation Stimulator Upregulation With a Resultant Rac1 Degradation Significance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **33**, 1591-1600 (2013).
 - 24 Kudo, S. *et al.* (Am Heart Assoc, 2015).
 - 25 Minami, T. *et al.* Statins up-regulate SmgGDS through β 1-integrin/Akt1

- pathway in endothelial cells. *Cardiovascular research* **109**, 151-161 (2016).
- 26 Nogi, M. *et al.* SmgGDS Prevents Thoracic Aortic Aneurysm Formation and Rupture by Phenotypic Preservation of Aortic Smooth Muscle Cells. *Circulation*, CIRCULATIONAHA. 118.035648 (2018).
- 27 Shimizu, H. *et al.* Structure-based analysis of the guanine nucleotide exchange factor SmgGDS reveals armadillo-repeat motifs and key regions for activity and GTPase binding. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 13441-13448 (2017).
- 28 Shimizu, H., Toma-Fukai, S., Kontani, K., Katada, T. & Shimizu, T. GEF mechanism revealed by the structure of SmgGDS-558 and farnesylated RhoA complex and its implication for a chaperone mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 9563-9568 (2018).
- 29 Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in enzymology* **276**, 307-326 (1997).
- 30 Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 125-132 (2010).
- 31 Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. & Bricogne, G. Automated structure solution with autoSHARP. *Macromolecular Crystallography Protocols: Volume 2: Structure Determination*, 215-230 (2007).
- 32 Cowtan, K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **62**, 1002-1011 (2006).
- 33 Cowtan, K. Fitting molecular fragments into electron density. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **64**, 83-89 (2008).
- 34 Vagin, A. & Teplyakov, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of applied crystallography* **30**, 1022-1025 (1997).
- 35 Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **53**, 240-255 (1997).
- 36 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **60**, 2126-2132 (2004).
- 37 Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography* **26**, 283-291 (1993).
- 38 Fiser, A. & Do, R. K. G. Modeling of loops in protein structures. *Protein*

- science* **9**, 1753-1773 (2000).
- 39 Martí-Renom, M. A. *et al.* Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **29**, 291-325 (2000).
- 40 Šali, A. & Blundell, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of molecular biology* **234**, 779-815 (1993).
- 41 Webb, B. & Sali, A. Protein structure modeling with MODELLER. *Protein Structure Prediction*, 1-15 (2014).
- 42 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**, 403-410 (1990).
- 43 Blaszczyk, M. *et al.* Modeling of protein-peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking. *Methods* **93**, 72-83 (2016).
- 44 Kurcinski, M., Jamroz, M., Blaszczyk, M., Kolinski, A. & Kmiecik, S. CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Nucleic acids research* **43**, W419-W424 (2015).
- 45 Omer, C. A., Diehl, R. E. & Kral, A. M. in *Methods in enzymology* Vol. 250 3-12 (Elsevier, 1995).
- 46 Kuhlmann, N. *et al.* Structural and mechanistic insights into the regulation of the fundamental Rho regulator RhoGDI α by lysine acetylation. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 5484-5499 (2016).
- 47 Shimizu, N. *et al.* in *AIP Conference Proceedings*. 050017 (AIP Publishing).
- 48 Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. & Svergun, D. I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of applied crystallography* **36**, 1277-1282 (2003).
- 49 Svergun, D. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of applied crystallography* **25**, 495-503 (1992).
- 50 Svergun, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical journal* **76**, 2879-2886 (1999).
- 51 Volkov, V. V. & Svergun, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of applied crystallography* **36**, 860-864 (2003).
- 52 Yamashita, K., Hirata, K. & Yamamoto, M. KAMO: towards automated data

- processing for microcrystals. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* **74**, 441-449 (2018).
- 53 Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 213-221 (2010).
- 54 Laskowski, R. A. & Swindells, M. B. (ACS Publications, 2011).
- 55 Morris, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry* **19**, 1639-1662 (1998).
- 56 Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry* **30**, 2785-2791 (2009).
- 57 Wilson, J. M., Prokop, J. W., Lorimer, E., Ntantie, E. & Williams, C. L. Differences in the Phosphorylation-Dependent Regulation of Prenylation of Rap1A and Rap1B. *Journal of Molecular Biology* **428**, 4929-4945 (2016).
- 58 Krissinel, E. & Henrick, K. Protein interfaces, surfaces and assemblies service PISA at European Bioinformatics Institute. *J Mol Biol* **372**, 774-797 (2007).
- 59 Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-877 (2007).
- 60 Hoffman, G. R., Nassar, N. & Cerione, R. A. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* **100**, 345-356 (2000).
- 61 Dharmiah, S. *et al.* Structural basis of recognition of farnesylated and methylated KRAS4b by PDE δ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E6766-E6775 (2016).
- 62 Garcia-Mata, R., Boulter, E. & Burridge, K. The invisible hand: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 493 (2011).
- 63 Gasper, R., Sot, B. & Wittinghofer, A. GTPase activity of Di-Ras proteins is stimulated by Rap1GAP proteins. *Small GTPases* **1**, 133-141 (2010).
- 64 Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high - quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* **7**, 539 (2011).
- 65 Holm, L. & Sander, C. Dali: a network tool for protein structure comparison. *Trends in biochemical sciences* **20**, 478-480 (1995).

- 66 Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K. A. & Coates, J. C. Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends in cell biology* **20**, 470-481 (2010).
- 67 Noren, N. K., Liu, B. P., Burridge, K. & Kreft, B. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *The Journal of cell biology* **150**, 567-580 (2000).
- 68 Kabsch, W. A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallographica Section A: Crystal Physics, Diffraction, Theoretical and General Crystallography* **32**, 922-923 (1976).
- 69 Gillette, W. K. *et al.* Farnesylated and methylated KRAS4b: high yield production of protein suitable for biophysical studies of prenylated protein-lipid interactions. *Scientific reports* **5**, 15916 (2015).

7. 謝辞

研究室の代表であり、長年の研究経験から卓越したご指導を賜りました 東京大学 大学院薬学系研究科 蛋白構造生物学教室 清水 敏之 教授に心から御礼申し上げます。

本研究を開始以来、一から実験のご指導、ご助言を賜りました 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 藤間 祥子 准教授に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として SmgGDS および低分子量 G タンパク質との出会いを提供してくださった 武蔵野大学 薬学部 堅田 利明 教授に心から御礼申し上げます。

本研究の共同研究者として何度も活発な議論をさせていただいた 明治薬科大学 紺谷 圏二 教授に心から御礼申し上げます。

X 線回折実験において大変なご助力を賜りました 高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory ビームラインスタッフの皆様に心から御礼申し上げます。

X 線回折実験において大変なご助力を賜りました SPring-8 ビームラインスタッフの皆様に心から御礼申し上げます。

X 線小角散乱実験において大変なご助力を賜りました 高エネルギー加速器研究機構 清水 伸隆 博士 および 西條 慎也 博士、ビームラインスタッフの皆様に心から御礼申し上げます。

KAMO ソフトウェアの使用にあたって大変なご助力を賜りました 東京大学 大学院理学系研究科 山下 恵太郎 博士 および SPring-8 長谷川 和也 博士に心から御礼申し上げます。

本研究を進めるに当たり、多くのご助言を賜りました東京大学 大学院薬学系研究科蛋白質構造生物学教室 大戸 梅治 准教授に心から御礼申し上げます。

東京大学 大学院薬学系研究科 蛋白質構造生物学教室の皆様には、日ごろから大変お世話になりました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。