

### 【背景】

Ras や Rho をはじめとする低分子量 G 蛋白質は 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。低分子量 G 蛋白質はコアドメインである G ドメインと C 末端の Hypervariable region (HVR) からなる (図 1A)。さらに HVR の末端 4 残基は CaaX モチーフと呼ばれ Cys 残基が翻訳後にファルネシル化あるいはゲラニルゲラニル化といった脂質修飾を受ける。低分子量 G 蛋白質の活性は GTP の加水分解を促進する GTPase 活性化蛋白質 (GAP: GTPase activating protein) と GDP/GTP の交換を促進するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF: guanine nucleotide exchange factor) によって厳密に制御されている。

本研究で対象とした SmgGDS は RhoGEF の一つである。RhoGEF はこれまでに Dbl ファミリー、Dock ファミリー、SmgGDS の 3 タイプが報告されている。前者 2 つの GEF 活性ドメインの結晶構造はすでに明らかにされている一方で SmgGDS の構造についてはこれまで報告例はなかった。SmgGDS は分子全体を通して armadillo-repeat motif (ARM) からなり既知の GEF 活性ドメインとは異なる。さらに Rho 以外にも HVR に正電荷を帯びた poly basic region (PBR) をもつ多様な低分子量 G 蛋白質と結合できる。SmgGDS には ARM 数の 1 つ異なる 2 つのアイソフォーム (SmgGDS-558, SmgGDS-607) が存在し (図 1B)、低分子量 G 蛋白質の脂質修飾の有無を別々に認識することが示唆されてきた。これらのことから SmgGDS は Dbl, Dock 両ファミリーとは異なる GEF 作用機序および HVR 認識機構を持つことが期待される。

本研究では SmgGDS の構造解析を通じ SmgGDS の GEF 作用機序および機能を解明することを目的とした。

### 【方法】

ヒト SmgGDS の両アイソフォームの N 末端に GST を付加したものとヒト RhoA の N 末端に His タグを付加したものを大腸菌で発現させた。酵素によるタグの切断を行い、高純度試料を調製した。RhoA に対しては *in vitro* にてファルネシル基転移酵素と基質である FPP を混合することでファルネシル化 RhoA を調製した。得られた試料をもとに結晶化スクリーニングを実施し、大型放射光施設にて X 線回折データを収集した。SmgGDS-558 単体構造はセレノメチオニン置換体を用いた単波長異常散乱法で、SmgGDS-558/ファルネシル化 RhoA 複合体構造は

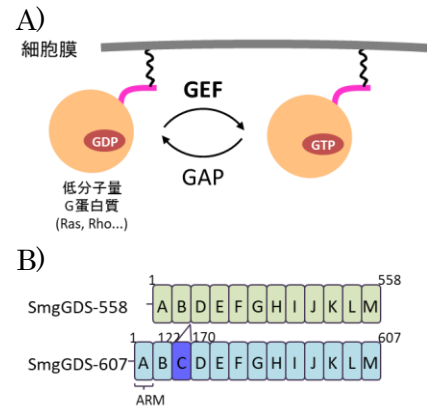


図 1 A) 低分子量 G タンパク質の概略。B) SmgGDS のドメイン構成。

SmgGDS-558 と RhoA の単体構造をモデルとした分子置換法で結晶構造を決定した。X 線小角散乱により SmgGDS と RhoA の溶液構造を決定した。また、プルダウン試験や表面プラズモン共鳴 (SPR: surface plasmon resonance) 法により SmgGDS と RhoA との結合能を評価した。さらに、蛍光標識 GDP を利用し RhoA からの GDP の解離を検出することで SmgGDS の RhoA に対する GEF 活性を評価した。

## 【結果】

### 1. SmgGDS-558 単体の構造解析

SmgGDS-558 の N 末端を 60 残基欠損させた変異体で結晶を得ることができ、2.1Å の分解能で構造を決定した[1]。SmgGDS-558 の結晶構造は全体を通じ ARM で構成された超螺旋型の構造だった。SmgGDS-558 の表面には側面の負に帯電した領域 (負電荷領域) と凹面の正に帯電した領域 (正電荷領域) が存在していた (図 2)。また、X 線小角散乱による SmgGDS-558 と RhoA の複合体溶液構造から SmgGDS-558 の凹面に RhoA がはまり込むことが示唆された (図 2)。

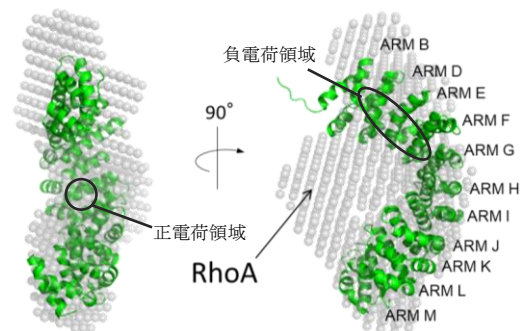


図 2 SmgGDS-558 単体結晶構造 (リボン図) と SmgGDS-558/RhoA 複合体溶液構造 (ダミー原子表示) の重ね合わせ

### 2. SmgGDS 両アイソフォームの RhoA に対する相互作用・機能解析

SmgGDS の機能をより深く理解するため、RhoA に対する結合能と GEF 活性を評価した。SPR 法による相互作用解析の結果、SmgGDS-558 はファルネシル化 RhoA に対して強く結合 ( $K_D = 2.3$  nM) する一方で、SmgGDS-607 は未修飾の RhoA に対してより強い結合 ( $K_D = 0.8$  nM) を示した。また、蛍光標識 GDP を利用した GEF 活性試験において SmgGDS-558 はファルネシル化 RhoA にのみ GEF 活性を示す一方で、SmgGDS-607 は未修飾 RhoA に対してより強い GEF 活性を示し、SPR の結果と一貫するものだった (図 3)。SmgGDS の凹面の正領域に変異を入れたところ GEF 活性が低下したことから、SmgGDS の凹面が GEF 活性に重要であることが示唆された (図 3)。

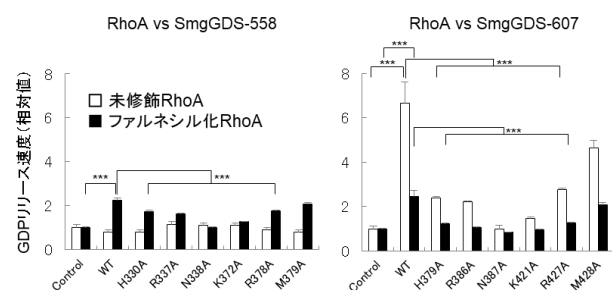


図 3 GEF 活性測定試験 (GDP リリース試験) 結果。RhoA のみでのリリース速度 (Control) を 1 とした時の相対速度を縦軸に表した\*\*\*は  $p < 0.001$  を表す。

### 3. SmgGDS-558/ファルネシル化 RhoA 複合体の構造解析

N 末端欠損 SmgGDS-558 とファルネシル化 RhoA をモル比 1 : 1 で混合し結晶化スクリーニングを行ったところ複合体の結晶を得ることができ、3.5Å の分解能で構造を決定した[2]。結晶構造において SmgGDS-558 は主として RhoA の 2 か所を認識していた。1 つは G ドメインにある Switch II 領域であり、もう 1 つは CaaX モチーフのファルネシル化 Cys 残基であった (図 4A)。複合体結晶中の RhoA は大きくディスオーダーした領域を有し、P-loop と Switch I のすべて、および Switch II の一部の電子密度は確認されなかった。既知の RhoA 単体構造と複合体中での RhoA 構造を比

較すると、Switch II が外側に動かされ、G-domain が大きく露出した構造が観測された (図 4B)。グアニンヌクレオチドと Mg イオンも観察されなかったことから、本構造は SmgGDS-558 により RhoA の G-domain が露出され、グアニンヌクレオチドと Mg イオンを放出した直後の状態を捉えたものと考えられる。Switch II は SmgGDS-558 の凹面にあたる ARM と広く相互作用しており、この部分に対する変異体は SmgGDS の結合能および GEF 活性を低下させた。

興味深いことに RhoA の CaaX モチーフ上の脂質修飾された Cys 残基(ファルネシル化 Cys)は SmgGDS-558 のポケット(cryptic pocket)に挿入されていた (図 5A-C)。このポケットは我々が以前に決定した SmgGDS-558 の単体構造では存在しておらず (図 5D)、脂質修飾された RhoA を結合することにより ARM B と D の間に新たに形成されることがわかった (図 5A, B)。SmgGDS-558 のポケットは主として疎水性残基で構成され、炭素数 15 のファルネシル基を収容していた (図 5C)。得られた結晶構造にプログラム AUTODOCK を用いて炭素数 20 のゲラニルゲラニル化 Cys をドッキングしたところ、これを収容するのに十分な大きさと深さを持っていたため、SmgGDS-558 はファルネシル化とゲラニルゲラニル化のどちら

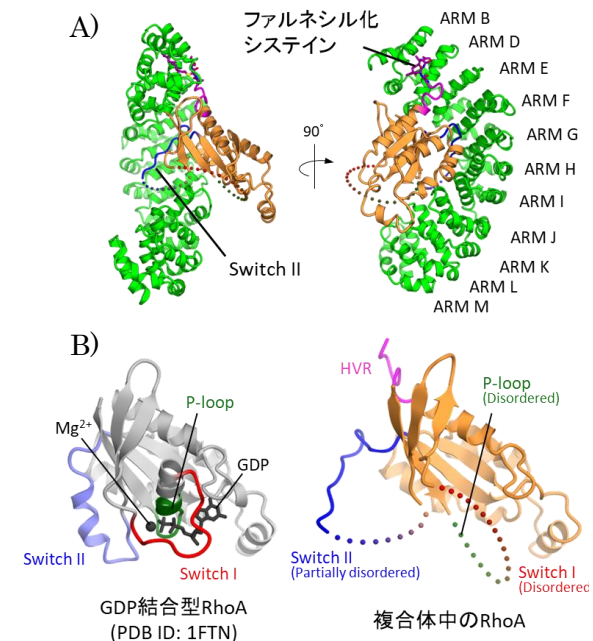


図 4 A) 複合体結晶構造。B) 単体時 (左) と SmgGDS-558 との結合時 (右) の RhoA の構造比較。ディスオーダーしていた領域は破線で示した。

か、SmgGDS-558 のポケットは主として疎水性残基で構成され、炭素数 15 のファルネシル基を収容していた (図 5C)。得られた結晶構造にプログラム AUTODOCK を用いて炭素数 20 のゲラニルゲラニル化 Cys をドッキングしたところ、これを収容するのに十分な大きさと深さを持っていたため、SmgGDS-558 はファルネシル化とゲラニルゲラニル化のどちら

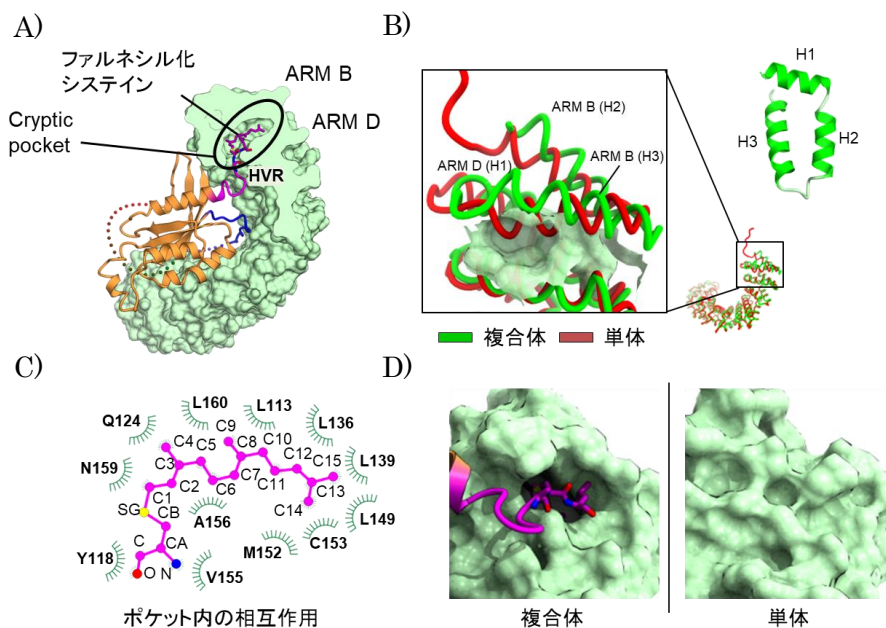


図 5 A) cryptic pocket の断面図。B) SmgGDS-558 単体と RhoA との複合体の構造比較。H1-3 は 1 つの ARM を構成する 3 つの  $\alpha$ ヘリックスを表す。C) ポケット内の相互作用図。D) SmgGDS-558 単体 (右) と RhoA との複合体 (左) のポケット入り口付近。単体ではポケットは形成されていない。

の脂質修飾も認識できることを示唆した。

また、SmgGDS-607 のホモロジーモデルを作成し、両アイソフォームを比較したところ SmgGDS-607 では ARM C が挿入されるため、SmgGDS-558 にみられた cryptic pocket は形成できないと考えられた (図 6)。ARM C の表面残基と予想された領域に変異を入れると RhoA の HVR ペプチドとの親和性が低下した。このことから SmgGDS-607 は ARM C の存在によって SmgGDS-558 とは異なる分子表面を形成し、脂質未修飾の RhoA の HVR を結合すると考えられる。

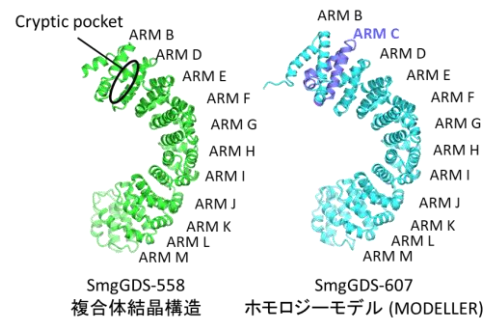


図 6 RhoA との複合体中の SmgGDS-558 (左) と SmgGDS-607 ホモロジーモデル (右) の比較。

### 【結論】

本研究では SmgGDS-558 の単体と脂質修飾された RhoA 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 (図 7)。SmgGDS-558 は SmgGDS-607 の持たない cryptic pocket を形成することで脂質修飾をもつ RhoA も受容できると考えられる。SmgGDS-607 では付加的な ARM の挿入により、未修飾 RhoA の認識に優位な分子表面を形成できるのであろう。本研究により SmgGDS がこれまで報告されてきた RhoGEF とは全く異なる方法で RhoA を認識するということが構造生物学的に初めて示された。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重要なものである。

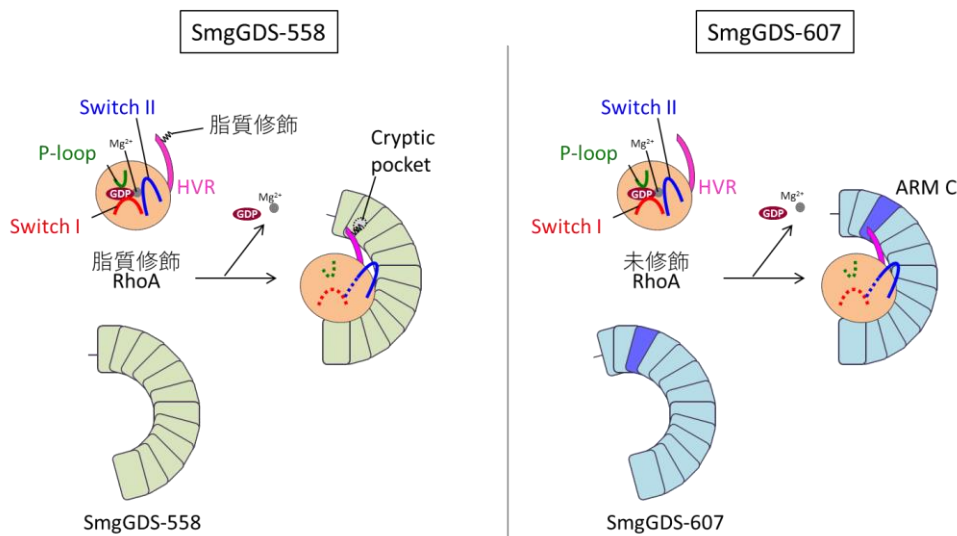


図 7 SmgGDS による RhoA 認識機構モデル

### 【参考文献】

1. Shimizu, H. *et al.* (2017). Structure-based analysis of the guanine nucleotide exchange factor SmgGDS reveals armadillo-repeat motifs and key regions for activity and GTPase binding. *J Biol Chem.*, **292**(32), 13441-13448.
2. Shimizu, H. *et al.* (2018). GEF mechanism revealed by the structure of SmgGDS-558 and farnesylated RhoA complex and its implication for a chaperone mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **115**(38), 9563-9568.