

審査の結果の要旨

氏名 清水 光

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 蛋白質の C 末端の Hypervariable region (HVR)には CaaX モチーフが存在し、その Cys 残基は翻訳後に脂質修飾を受ける。この修飾過程は低分子量 G 蛋白質が細胞膜へ局在するために重要である。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。

RhoGEF の一つである SmgGDS は分子全体を通して armadillo-repeat motif (ARM)からなる分子である。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 は既知の GEF 活性ドメインを持たずこれまで立体構造の報告例はなかった。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、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 CaaX モチーフ認識機構を持つことが期待される。

本論文は 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構造生物学的、生化学的な研究成果を述べたものである。

まず、SmgGDS 単体の構造解析と生化学的な物性解析の結果を記す。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、2.1 Å の分解能で構造を決定した。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)が存在した。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。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。SmgGDSの凹面の正電荷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。

次に、SmgGDS-558とファルネシル化 RhoA との複合体の構造解析結果について記す。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、3.5 Å の分解能で構造を決定した。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。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。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 残基は SmgGDS-558 のポケット (cryptic pocket) に挿入されていた。このポケットは SmgGDS-558 の単体構造では存在しておらず、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。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。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。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。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 を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り、博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。