

## ADP リボシル化毒素と基質タンパク質の複合体の構造生物学

津下英明、鶴村俊治、吉田徹

我々の研究室は、細菌の分泌する ADP リボシル化毒素を研究の主題として研究を行っている。イオタ毒素(Ia)-アクチン複合体結晶構造は、このタイプの毒素では初めてのヒト基質タンパク質複合体である。2015年、C3 exoenzyme とその基質 RhoA 複合体の結晶構造解析に成功した。細菌由来のモノ ADP リボシル化毒素はその基質の違いから、幾つかの種類に分類できる。この中でウェルシュ菌由来のモノ ADP リボシル化毒素である Ia は、アクチンの Arg177 を特異的に ADP リボシル化しアクチンを脱重合する。一方、ボツリヌス菌やセレウス菌が持つモノ ADP リボシル化毒素 C3 は、RhoA の Asn41 を ADP リボシル化することで間接的にアクチン細胞骨格に影響を与える。この2つの毒素はどちらも ARTC グループに属して、その構造は良く似ているが、修飾する基質タンパク質も修飾するアミノ酸も異なる。2つの毒素の構造と機能は単体でそれぞれ研究されてきたが、その複合体の構造がわからないために基質認識機構と反応機構はまだよくわかっていなかった。我々のグループでは、これらの毒素と基質タンパク質複合体結晶構造解析を目的に長らく研究を行ってきた。2008年に Ia-アクチンの複合体構造を明らかにし（文献1）、2013年には NAD<sup>+</sup>結合型 Ia-アクチンと Ia-ADP リボシル化アクチンの複合体結晶を作り分けることに成功し、反応の前と後での高分解能の構造を明らかにした。これから ADP リボシル化の反応機構として” strain-alleviation (緊張と緩和) モデル” を提唱した（文献2, 3, 4）。更に2015年、長らくその複合体の構造解析が期待されてきた C3-RhoA の初めての複合体構造解析に成功した（文献5, 6）。これらの複合体解析から得られた、モノ ADP リボシル化毒素の基質認識と ADP リボシル化の反応機構についてまとめる。

### C3-RhoA複合体の結晶構造解析

RhoA特異的ADPリボシル化酵素C3 exoenzymeはRhoAのAsn41を特異的にADPリボシル化する毒素であり、1989年に見出された。代表的なRhoファミリー分子にはRhoA, Rac1, Cdc42があるが、C3はRhoAのみをADPリボシル化する。この特異性を利用して、Alan Hall (メモリアルスローンケタリングがんセンター)らは、RhoAがストレスファイバーと接着斑を、Rac1が葉状仮足を、Cdc42が糸状仮足を、それぞれ誘導することを見出した。このような生物学的に重要な知見をもたらしたC3のRhoAに対する特異性に、RhoAの研究者を含む多くの研究グループが興味を抱いてきたが、その相互作用とADPリボシル化の機構はよくわかっていなかった。

最初に見つかったボツリヌス菌のC3 exoenzymeに続いて、現在7つの異なる種類のC3が見出されている。ボツリヌス菌由来のC3bot1, C3bot2, *C. limosum*由来のC3lim, 黄色ブドウ球菌由来のC3stau1, C3stau2, C3stau3およびセレウス菌由来のC3cerがある。それぞれのC3でRho GTPaseに対する特異性は少しずつ異なるが、C3cerはRhoAのみを修飾する。RhoAとよく似たsmall GTPaseであるRac1, Cdc42はRhoAでADPリボシル化されるAsn41と同じ位置にAsnを持っているにもかかわらずC3の基質とならない。我々はセレウス菌由来のC3を用いて、GTPが結合したRhoA (RhoA(GTP)) とC3の複合体および、GDPが結合したRhoA (RhoA(GDP)) とC3の複合体の結晶化に初めて成功し、その立体構造 (apo-C3-RhoA(GTP)) を決定した。さらに、これらの結晶をNADHを含む溶液にソーキン

グした後X線回折データを収集することで、NADH、RhoA、C3の3者複合体の結晶構造 (NADH-C3-RhoA(GTP)とNADH-C3-RhoA(GDP)) を明らかにした (図 1 ABC)。

### RhoA(GDP)とRhoA(GTP)のC3による認識構造

RhoA のシグナル伝達スイッチとして機能する可変領域 (switch I と switch II) は RhoA(GDP)と RhoA(GTP)で大きく構造が異なることが知られていた。しかしながら、C3が結合した複合体構造では C3-RhoA(GDP)および C3-RhoA(GTP)はどちらも同じ可変領域の構造をとる (switch I は単体の RhoA(GDP)と同じ、switch II は単体の RhoA(GTP)と同じ) (図 1 D)。すなわち、C3 の結合によりこの部分の構造変化をおこし、その結果、RhoA(GDP)と RhoA(GTP)はどちらの状態でも ADP リボシル化される。

### C3-RhoAの相互作用

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

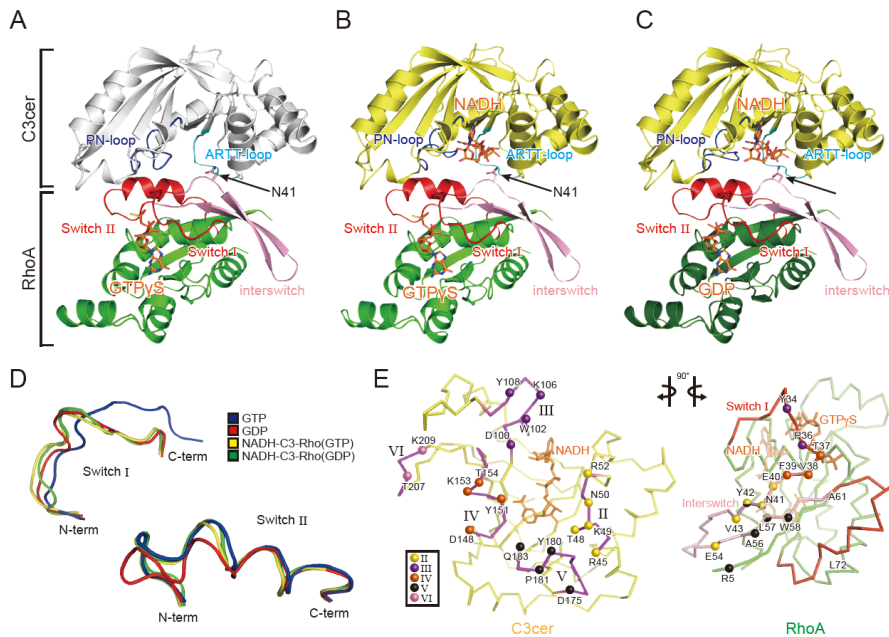


図 1 C3-RhoA 複合体の結晶構造とそれに基づく switch 領域の構造変化および結合面における相互作用領域 (A) apo-C3-RhoA(GTP), (B) NADH-C3-RhoA(GTP), (C) NADH-C3-RhoA(GDP), (D) 単体および複合体における RhoA の switch 領域のループ構造の比較, (E) C3-RhoA 結合面の見開図と相互作用領域

### C3はなぜRhoAに対して特異的か

図 2A に small GTPase のアライメントとその結合領域を示す。switch II (61-78) 領域は、RhoA, Rac1, Cdc42 3 つで保存されており、その RhoA 特異性に関与していないと考えら

れた。switch I と inter switch で幾つかの保存されていないアミノ酸が特異性に関わっていると考え、RhoA でこれらのアミノ酸を変異させると大きく活性が下がった (図 2B)。一方基質とならない Cdc42 にこれらの 4 重変異を加えることにより、良い基質とすることに成功した。重要な 4 つのアミノ酸は Trp58, Glu54, Glu40, Val143 であった (図 2C)。

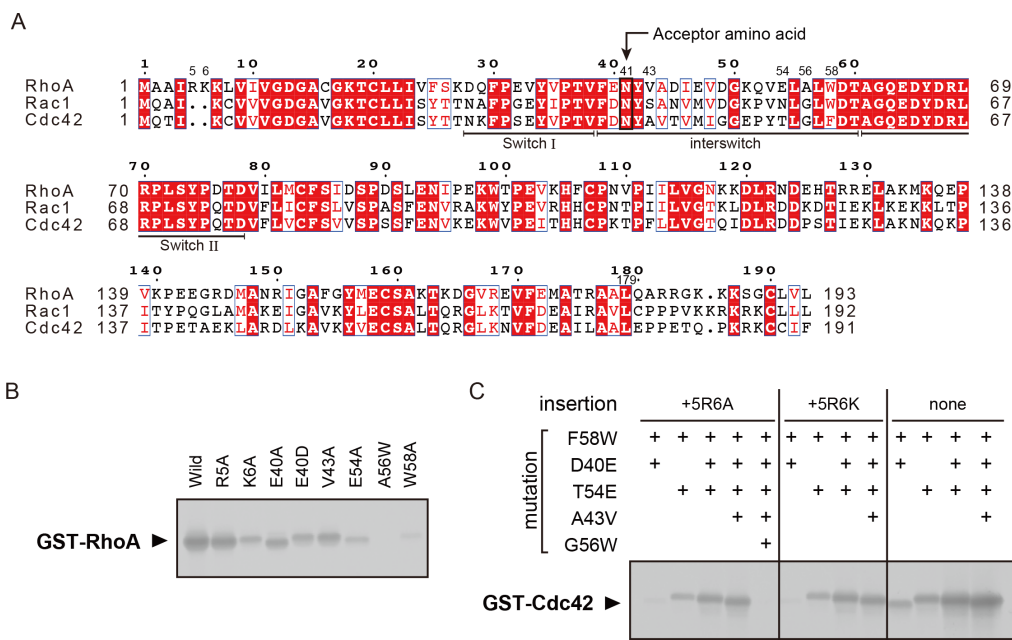


図 2 C3 の RhoA に対する特異性 (A) Rho GTPase のアミノ酸配列の比較, (B) C3 の RhoA 変異体に対する ADP リボシル化活性, (C) C3 の Cdc42 に対する ADP リボシル化活性

### ARTT ループが ADP リボシル化される基質アミノ酸の特異性を決める

Ia と C3 はどちらも似た構造を持つ ADP リボシル化毒素であるが、その基質はアクチンの Arg177 と RhoA の Asn41 である。毒素には共通した ADP-Ribosylation Turn Turn loop (ARTT loop) があり、最初のターンに存在する疎水性側鎖が基質 RhoA の認識をし、次のターンに存在する QXE のグルタミンが修飾される RhoA Asn41 の認識に関わると予測されていた。一方 Ia では EXE であり、最初のグルタミン酸が修飾されるアクチンの Arg177 の認識に関わる、すなわち、修飾アミノ酸に選別は、このように行われていると予測されていたが、その実験的な証明はされていなかった。C3-RhoA の複合体構造は、Gln(QXE) が RhoA Asn41 と水素結合を形成して、特異的な認識をし、さらに、この近傍に NADH の NC1 が存在していることを明らかにした (図 3)。また最初のターンに存在する疎水性側鎖 Tyr180 が RhoA の疎水性領域に結合している様子も

	170	180	183	185	190	
C3cer	169	GA <sup>170</sup> Y <sup>175</sup> M <sup>180</sup> N <sup>185</sup> S <sup>190</sup> D <sup>195</sup> D <sup>200</sup> L <sup>205</sup> T <sup>210</sup> A <sup>215</sup> Y <sup>220</sup> P <sup>225</sup> G <sup>230</sup> O <sup>235</sup> Y <sup>240</sup> E <sup>245</sup> V <sup>250</sup> LL <sup>255</sup> LP <sup>260</sup> R <sup>265</sup>				
C3bot1	160	AG <sup>170</sup> Y <sup>175</sup> ID <sup>180</sup> ...P <sup>185</sup> IS <sup>190</sup> AF <sup>195</sup> A <sup>200</sup> GO <sup>205</sup> LE <sup>210</sup> V <sup>215</sup> LL <sup>220</sup> LP <sup>225</sup> R <sup>230</sup>				
C3stau1	164	AA <sup>170</sup> Y <sup>175</sup> IL <sup>180</sup> NS <sup>185</sup> K <sup>190</sup> D <sup>195</sup> L <sup>200</sup> T <sup>205</sup> A <sup>210</sup> Y <sup>215</sup> G <sup>220</sup> O <sup>225</sup> Q <sup>230</sup> E <sup>235</sup> V <sup>240</sup> LL <sup>245</sup> LP <sup>250</sup> R <sup>255</sup>				
C3stau2	164	AA <sup>170</sup> Y <sup>175</sup> IL <sup>180</sup> NS <sup>185</sup> K <sup>190</sup> D <sup>195</sup> L <sup>200</sup> T <sup>205</sup> A <sup>210</sup> Y <sup>215</sup> G <sup>220</sup> O <sup>225</sup> Q <sup>230</sup> E <sup>235</sup> V <sup>240</sup> LL <sup>245</sup> LP <sup>250</sup> R <sup>255</sup>				
C3lim	172	AG <sup>170</sup> Y <sup>175</sup> IE <sup>180</sup> ...P <sup>185</sup> IS <sup>190</sup> TF <sup>195</sup> FK <sup>200</sup> GO <sup>205</sup> LE <sup>210</sup> V <sup>215</sup> LL <sup>220</sup> LP <sup>225</sup> R <sup>230</sup>				
IaΔN	374	GA <sup>374</sup> Y <sup>379</sup> LS <sup>384</sup> ...A <sup>389</sup> LP <sup>394</sup> G <sup>399</sup> V <sup>404</sup> E <sup>409</sup> V <sup>414</sup> LL <sup>419</sup> LN <sup>424</sup>				

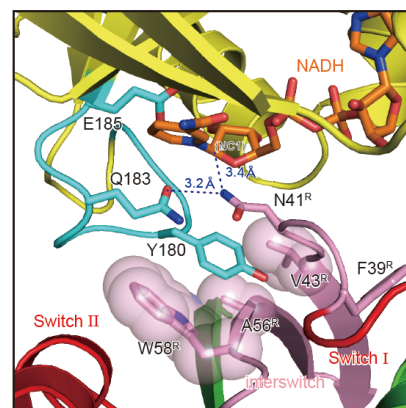


図 3 ARTT ループとその周辺環境および相互作用

初めて明らかにした。この関係はADP リボシル化にとって理想的な関係であると考えられる(3) RhoA のC3 による認識領域がわかったことで、この点変異体を作り、活性消失を確認した。また、基質とはならない Cdc42(RhoA と似た small GTPase) の点変異体を作り、4重変異体によりADP リボシル化の良い基質することに成功した。

#### 今後の研究で明らかにするべき点

既に解析に成功した、Ia-アクチンでは、ADP リボシル化反応の前と後での複合体結晶構造を明らかにした。今後明らかにした複合体構造を Ia-アクチンと C3-RhoA で詳細に比べることにより、さらなるADP リボシル化毒素の基質認識と反応機構の共通の知見がわかってくると考えている(図4)。Ia-アクチンでは、提唱されている「ARTT ループがADP リボシル化される基質アミノ酸の特異性を決める」すなわち EXE の前者のグルタミン酸がアクチンの Arg177 を認識する構造は得られていない。また、Arg177 がのるアクチンのβシート部分は構造が固く、この Arg が動くことは考えにくい。考えられるのは Ia の EXE が反応の過程で動き、この認識に働いているのかもしれない。今後、時分割での結晶構造解析を更に進めることで、そのような過渡的状态でのスナップショットが得られるかもしれないと考えている。

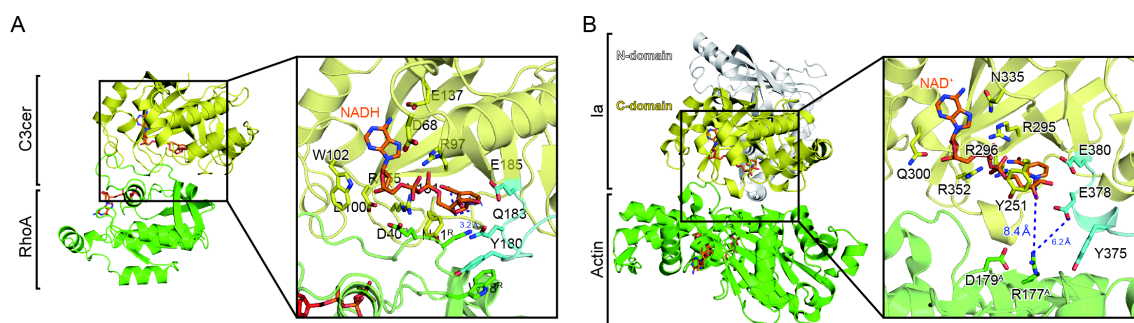


図4 C3-RhoA(A)と Ia-actin(B)複合体構造の比較、拡大図はそれぞれのNAD(H)および標的アミノ酸周辺を示す

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、細菌毒素研究の共同研究を続けている、徳島文理大学 薬学部 永浜政博教授、櫻井純教授 および 新潟大学 歯学部 小田真隆准教授に感謝の意を表す。

本研究は私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」および新学術領域研究「細胞シグナリング複合体によるシグナル検知・伝達・応答の構造的基礎」(研究課題番号：23121529、25121733) およびの助成を受けた。

また C3-RhoA 複合体結晶の X 線回折データ測定は私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」で整備した、単結晶 X 線回折装置(RIGAKU R-AXIS4 (MICRO7HFM))が使用された。

## 参考文献

(1) Tsuge H., Nagahama M., Oda M., Iwamoto S., Utsunomiya H., Marquez VE., Katunuma N., Nishizawa M. and Sakurai J.

Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by *Clostridium perfringens* iota toxin.

***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 105(21):7399-404.(2008)

(2) Tsurumura T., Qiu H., Tsumori Y., Oda M., Nagahama M., Sakurai J. and Tsuge H.

Arginine ADP-ribosylation mechanism based on structural snapshots of iota-toxin and actin complex.

***Proc Natl Acad Sci U.S.A.*** 110(11):4267-4272. (2013)

(3) Tsuge H. and Tsurumura T.

Reaction Mechanism of Mono-ADP-Ribosyltransferase Based on Structures of the Complex of Enzyme and Substrate Protein.

***Curr Top Microbiol Immunol.*** 384:69-87. (2015)

(4) 鶴村俊治、津下英明

修飾酵素と基質タンパク質の反応前後における複合体結晶の作製と構造に基づく反応機構—ウェルシュ菌イオタ毒素 Ia によるアクチンの修飾機構—

***日本放射光学会誌*** Vo. 27, No. 5, p233-240. (2014)

(5) Toda A., Tsurumura T., Yoshida T., Tsumori Y. and Tsuge H.

Rho GTPase Recognition by C3 Exoenzyme Based on C3-RhoA Complex Structure.

***J Biol Chem.*** 7:290(32):19423-32. (2015)

(6) Tsuge H., Yoshida T. and Tsurumura T.

Conformational plasticity is crucial for C3-RhoA complex formation by ARTT-loop.

***Pathog Dis.*** 73(9)(2015)