

○上島珠美<sup>1</sup>、伊原健太郎<sup>1</sup>、郷達明<sup>4</sup>、上田貴志<sup>2</sup>、砂田麻里子<sup>2</sup>、伊藤 瑛海<sup>2</sup>、中野明彦<sup>2,3</sup>、若槻杜市<sup>1</sup>

<sup>1</sup>高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所構造生物学研究センター

<sup>2</sup>東京大学大学院理学系研究科生物学専攻

<sup>3</sup>理化学研究所中央研究所中野生体膜研究室

<sup>4</sup>神戸大学大学院理学研究科生物学専攻

## 概要

低分子量GTPaseは、GTP結合型とGDP結合型の構造の違いを利用する分子スイッチである。その制御には主に3つの因子が関わっている。不活性型であるGDP結合型から活性型であるGTP結合型への変換は、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)により行われる。活性型から不活性型への変換は、自らのGTPase活性と、GTPase活性促進蛋白質(GAP)により行われる。こうして生じた不活性型はGDP解離阻害因子(GDI)と複合体を形成することで、機能しない状態が保たれる。活性型の低分子量GTPaseは、エフェクターと呼ばれる標的蛋白質との相互作用を介して機能する。小胞輸送においては各種Rab低分子量GTPaseが関与し、特にエンドサイトーシスにはRab5が関わる。シロイヌナズナではARA6、ARA7、RHA1がRab5グルーブに属する。小胞輸送を理解する一環として、我々はシロイヌナズナ由来Rab5様低分子量GTPasesの選択的GEFであるVPS9aの機能解析、構造解析を行っている。近年、多くのGTPあるいはGDP結合型低分子量GTPaseの単体構造や、GEFとの複合体構造が明らかにされているが、未だGEF反応のメカニズムには不明点が多い。今回我々はARA6またはARA7、及びVPS9a、そして3種類のヌクレオチド(GDP、GDPNH<sub>2</sub>、GDP-βS)を含む複合体の結晶構造を明らかにした。Vps9ドメインに完全に保存されたアスパラギン酸の側鎖(Aspフィンガー)がGDPとの静電的反発を利用してヌクレオチド交換を行うと考えられていたが、今回の解析からは、静電的反発とは逆に、水素結合によるヌクレオチド認識が示された。一方、GTPaseのP-loopに完全に保存され、ヌクレオチドのβ位のリン酸を認識するリジンの側鎖がAspフィンガーと相互作用していることから、このリジンとAspフィンガー、そしてGDPの間に静電的競合が存在しうるのである。Vps9ドメインによるRab5のヌクレオチド交換のメカニズムに迫りたい。さらに、シロイヌナズナにおけるRab5の制御サイクルを再検証する。

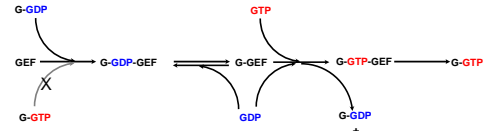


Figure. 1ヌクレオチド交換の反応機構。反応の始まりは不活性型GTPaseがGEFと結合することで始まる。GTP型の活性化型はこの反応には入れない。GTPase-GDP-GEFの複合体が形成された後に、GDPが複合体から解離し、nucleotide freeの複合体となる。その後GDP、GTPの両者がnucleotide free複合体に入ることが可能であるが、GTPが入った場合のみ反応は終了となる。仮にnucleotide freeの複合体にGDPが挿入された場合、この反応系に三者複合体(GTPase-GDP/GEF)として留まるのか、あるいは一度この反応系を外れて最初のステップに戻るのか、選択的にGTPを選んでいるのか、詳細は解明されていない。

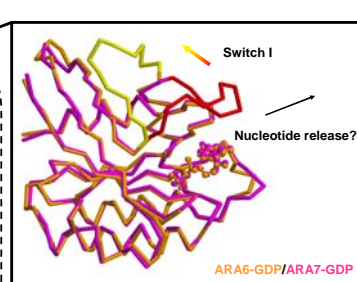
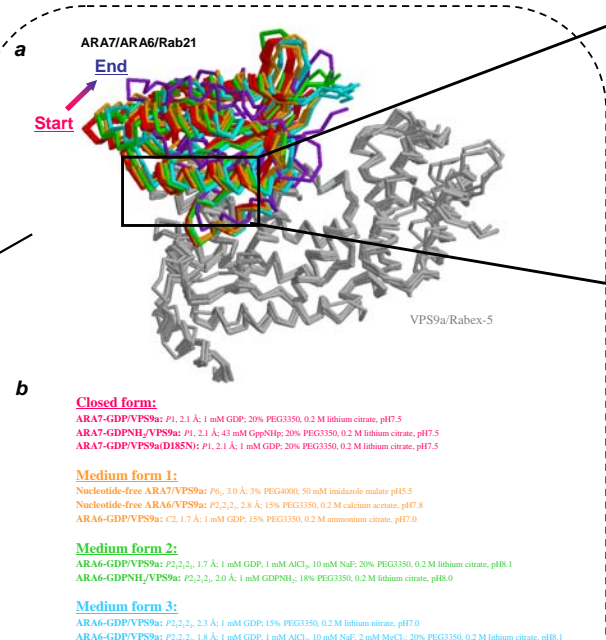
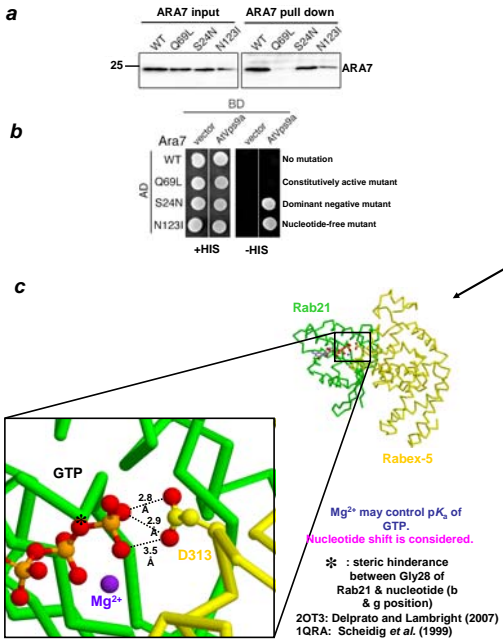


Figure.3 ARA6-GDP/VPS9aとARA7-GDP/VPS9aのswitch Iの違い。すべてのsmall GTPaseはswitch Iとswitch IIという構造変化に富んだ領域を持ち合わせている。この領域の構造変化が、GEFやeffectorと呼ばれる分子との結合に重要な役割を果たす。またヌクレオチドの交換が行われる際も、この領域の開閉がヌクレオチドの放出には必須である。Fig. 2で異なる位置に存在する二つのsmall GTPase, ARA6-GDPとARA7-GDPのswitch I領域を重ね合わせた。両者の比較から、small GTPaseのGEF上での動きに伴い、ヌクレオチド放出に必要なswitch I領域の開閉も行われることが示唆された。

Figure.4 GTPは複合体中に安定に存在するか？一般的にはGTPは安定にnucleotide freeの複合体中に存在しないと考えられている。a, b) vitroの結合実験では、GTP結合変異体はGEFに結合することが出来ない。この結合はGEF反応の最初の段階を見ているのであり、nucleotide freeの中間状態にGTPが安定に入りこめないことを示唆しているわけではない。c) Rab21-Rabex5 (fig.2で一番左端にフントしているRab)に、GTPを重ね合わせたモデルである。GTPを置いてみると、反応に重要なD313<sub>Rabex5</sub>と水素結合を形成するのに適切な距離が維持され、立体障害は観察されない。したがって、GTPはnucleotide freeの中間状態に入りうる。a. Pull down assay. b. Y2H. c. Rab21/Rabex-5 could accommodate GTP & Mg<sup>2+</sup>(2OT3: Delprato and Lambright (2007))

Figure.2 閉状態、開状態、その間にある3つの中間状態に分類されたRab5/Vps9結晶構造群。12の複合体結晶構造において、Vps9ドメインでGTPaseの重ね合わせを行った。GTPaseはVps9ドメインに対して、5通りに分類される。small GTPaseのGEF上での動きは何を意味するのだろうか？a) 構造解析を行ったARA7/VPS9a, ARA6/VPS9aの11の複合体と結晶構造が報告されているRab21/Rabex5(2OT3: Delprato and Lambright (2007))を重ね合わせた図。b) 結晶化条件、分解能と空間群。

Figure.5ヌクレオチド結合領域の拡大図。今回明らかにした構造の中で特に著しい変化が観察されたものに関して、ヌクレオチド結合領域周辺の比較を行った。ヌクレオチドの放出には、構造変化の大きかったK23<sub>ARA7</sub>(あるいはK32<sub>Rab21</sub>)とD185<sub>VPS9a</sub>(あるいはD185<sub>Rabex5</sub>)が重要であると考えられた。左図はあたかもsmall GTPaseのリジンとGEF側のAspフィンガーがヌクレオチドを誘導しているかのように見える。かつてはヌクレオチドの放出は、逆電化による反発のみで追い出されると信じられていたが、これらの大きな変化が観察されたK23<sub>ARA7</sub>とD185<sub>VPS9a</sub>によりヌクレオチドの交換が巧みにコントロールされている可能性が大いに示唆された。(a-d) The four complex structures of plant Rab5 and its GEF during the first phase of GDP/GTP exchange by the Rab5 GEF. e. GTP bound model in Rab21/ps9. (2OT3: Delprato and Lambright (2007))

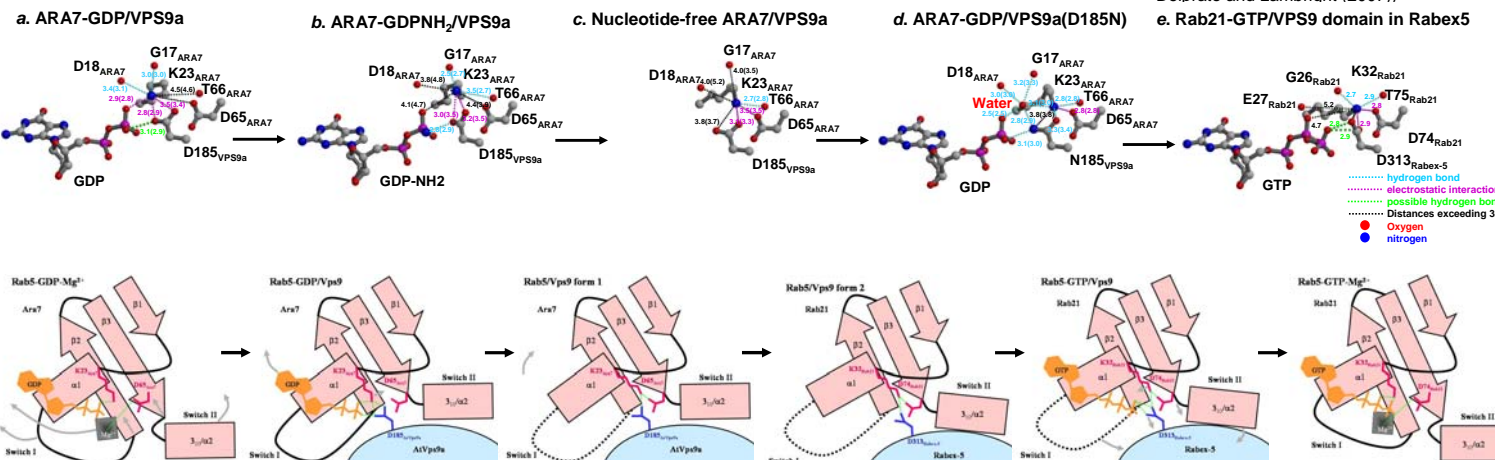


Figure.6 結論 Vps9ドメインによるRab5活性化モデルの提唱。今回我々はRab5/Rab5GEFのnucleotide free型、ヌクレオチド結合型の11の中間体の構造を明らかにした。これらの中間体はGDP/GTP交換のGTP導入以前に観測される、準安定な状態に対応すると考えられ、いくつかのコンフォメーションが存在しうることが明らかになった。そのコンフォメーション変化をふまえて、ヌクレオチド交換のモデルを提唱する。まず最初にRab5-GDP-Mg<sup>2+</sup>におけるMg<sup>2+</sup>の安定化は、small GTPase側のD65<sub>ARA7</sub>による。GEFと結合することで、GEF側のD185<sub>VPS9a</sub>の結合が断ち切られる。D185<sub>VPS9a</sub>はRab側のswitch IIに保存されたK23<sub>ARA7</sub>、GDPのβ-phosphateと結合を形成する。K23<sub>ARA7</sub>の周辺は酸性の環境が形成されるが、K23<sub>ARA7</sub>の側鎖(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)が存在することで、GDPは反発による力のみで押し出されているわけではない。D185<sub>VPS9a</sub>とD65<sub>ARA7</sub>によりK23<sub>ARA7</sub>の鎖が巧みに制御され、その結果GDPのβ位のphosphateとの間の結合が断ち切れ、GDPはより不安定化することで複合体から解離していく。Nucleotide freeの複合体は安定な構造をとるが、現段階までに解かれた多くのsmall GTPase/GEFはswitch Iの領域が観測されることが多く、switch Iの領域の構造が激しく動いている可能性が示唆された。この領域の開閉を行うことにより、GTPあるいはGDPが入りうる。我々はGDP結合型複合体(分解能2.0Å)のほうが、Nucleotide free複合体(分解能3Å)よりも安定な結晶が得られることより、GDPがNucleotide free複合体に挿入された場合は、三者複合体として安定にGEF反応の途中に留まることを予想している。今回解いた11の複合体の構造より、中間体といえどもさまざまなフォームが存在すること、静電的反発のみでヌクレオチドの交換が行われると考えられていたが、small GTPase、GEF両者の重要な残基によって巧みにヌクレオチドの交換が操作されていることが示唆された。