

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770078

研究課題名（和文） Rab GTPase 活性化機構の構造的基盤

研究課題名（英文） Structural basis for the activation of Rab GTPases

研究代表者

深井 周也（FUKAI SHUYA）

東京大学・放射光連携研究機構・准教授

研究者番号：10361792

研究成果の概要：

真核細胞は、脂質膜で囲まれた様々な細胞内小器官から構成されており、その間を多種多様な生体高分子が、小胞と呼ばれる小さな袋を介して行き来している。この小胞による輸送の制御には、分子スイッチとして機能する Rab タンパク質が必要である。本研究では、Rab タンパク質のスイッチを ON にする（活性化する）メカニズムを原子レベルで解明することを目的として、Rab タンパク質とその活性化タンパク質との複合体の立体構造を決定した。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 450,000 | 3,750,000 |

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析・低分子量 GTPase・分子間相互作用・膜タンパク質・小胞輸送・膜融合

1. 研究開始当初の背景

真核細胞は、さまざまなオルガネラから構成されており、それぞれのオルガネラを經由する物質輸送は主に膜小胞を介して行われる。目的のオルガネラに到達した膜小胞は、オルガネラと脂質二重膜を融合させることによって積荷を受け渡す。膜融合は、Rab ファミリーを代表とする特定の低分子量 GTPase とそのエフェクターとの相互作用によって GTP 依存的に制御されている。Rab は、GTP・GDP の結合により活性・不活性型の変換を行うが、GTP 型から GDP 型への変換は

GTPase 活性化タンパク質（GAP）そして GDP 型から GTP 型への変換はグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）の助けを借りて行われる。また、活性型の Rab はオルガネラあるいは細胞膜上の特定の領域に固定されることが必要である。そのため Rab は C 末端付近のシステイン残基に脂質修飾を受ける。脂質修飾を受けた領域は、グアニンヌクレオチド解離阻害因子（GDI）と呼ばれるタンパク質ファミリーによって保護されるため、低分子量 GTPase は細胞質中に可溶化した状態で存在することができる。GDI は GDP 結合型の Rab

に結合して、GDP から GTP への交換を阻害することでも Rab を不活性型に維持する。GDI とは逆に、低分子量 GTPase を GDI から解離させ、膜にアンカーさせる活性を担う分子は GDI 置換因子 (GDF) と呼ばれ、ゴルジ体やエンドソームのマーカータンパク質として知られる Yip タンパク質ファミリーが Rab に対する GDF と考えられている。ほ乳類では、エンドソームやゴルジ体に局在する Rab に対して Yip3 が GDF として機能することが報告されている。

以上のように、Rab の活性化には GEF と GDF の 2 種類の因子が必要であるが、研究開始当初、GEF の一つである Vps9 ファミリーと Mss4 ファミリーによる Rab の活性化機構のみが複合体の立体構造に基づいて解明されていた。

2. 研究の目的

本研究では、上述の背景を踏まえて、(1) RabGDF である Yip ファミリーによる GDI の解離、および、(2) RabGEF である Sec2 ファミリーによるグアニンヌクレオチド交換によって行われる低分子量 GTPase Rab の活性化のメカニズムを原子分解能レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究開始時点において、我々はすでに酵母の Rab GTPase Sec4p の GEF である Sec2p の GEF 活性ドメインの結晶構造を 3.0 Å 分解能で決定し、Sec2p によるヌクレオチド交換反応が単純なコイルドコイル構造によって担われていることを明らかにしていた。また、欠失変異体および点変異体を用いた結合解析および GEF 活性測定により、Sec4p 結合領域と GEF 活性に必須なアミノ酸残基についても同定していた。そこで、これらの解析結果に基づいて Sec2p と Sec4p との複合体の結合様式を予測し、Sec2pGEF 領域の様々な発現コンストラクトを作成して、複合体の結晶化を行なうこととした。Sec2p の結晶構造解析は、研究代表者である深井の指導の下で大学院生の佐藤裕介が担当した。

並行して、Sec4p のほ乳類 ortholog である Rab8 および Rab3A とそれらの GEF である Rabin3 および GRAB の結晶化も行なうこととした。この解析により、Rab と RabGEF との相互作用特異性の獲得と単純なコイルドコイル構造によるヌクレオチド交換のメカニズムが明らかになることを期待した。我々が同定した Sec2p の Sec4p 結合領域は GRAB および Rabin3 に非常によく保存されており、アミノ酸配列アラインメントからは特異性を決定していると思われるアミノ酸残基を特定することは難しく、Rab と

RabGEF との複合体の結晶構造を決定する必要があった。

Sec2p のほ乳類ホモログである GRAB および Rabin3 については、ラット脳の cDNA から遺伝子をクローニングし、大腸菌での大量発現系を構築し、さらに精製・結晶化を試みた。ほ乳類の RabGEF の結晶構造解析は、深井の指導の下で大学院生の吉川梓が担当した。結晶化条件の初期スクリーニングには、ハンプトンリサーチ社やヤナバイオ社から市販されているスクリーニングキットを用いた。結晶化条件の最適化には、ハンプトンリサーチ社から市販されている添加剤のスクリーニングキットを用いた。結晶化には自動結晶化装置 Mosquito を用いた。自動結晶化装置を用いることにより、結晶化条件の数と結晶生成までの時間の二点に関して、効率的なスクリーニングを行った。

(2) GDF と考えられている Yip タンパク質は、四回貫通型の膜タンパク質であると予測されている。出芽酵母においては、Yip ファミリーとして 6 つのタンパク質 (Yip1p, Yip2p, Yip3p, Yip4p, Yip5p, Yif1p) が同定されている。真核生物由来の膜タンパク質の大量調製には、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を使った大量発現系が有利であることが経験的に知られており、本研究においてもこの発現系を用いることとした。出芽酵母と *P. pastoris* は近縁な生物種であり、GDF 活性を有する状態で出芽酵母由来の Yip タンパク質を大量に発現させることが可能であると考えた。Yip タンパク質は、ヘテロ二量体を形成して機能していることが示唆されており、それぞれの Yip タンパク質単独で安定に調製できない場合は、異なる Yip タンパク質との共発現を行なうことを計画した。

Yip タンパク質の遺伝子は、出芽酵母ゲノムから PCR によりクローニングした。*P. pastoris* での発現では、多コピーの形質転換体の方が発現効率がよいことが知られているので、形質転換効率を上げ、高濃度の薬剤 (Zeocin) に耐性をもつ多コピーの形質転換体を単離した。C 末には myc タグおよび 6×His タグを導入し、抗 Myc 抗体を用いたウェスタンブロットングおよび Ni キレートリングカラムを用いたアフィニティー精製により発現を確認することを当初計画したが、簡便に検出するために、最終的には、GFP タグと 6×His タグを C 末あるいは N 末に導入することとした。

酵母の破碎には、小スケールではガラスビーズによる破碎、大スケールではマイクロフルイダイザーを用いることとした。破碎後、超遠心によって膜画分を調製した後、ドデシルマルトシド、デシルマルトシド、ベータオ

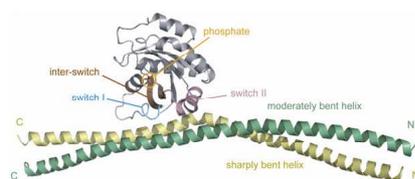
クチルグルコシドなどの結晶化で用いられる主要な界面活性剤で可溶化したタンパク質を Ni キレートカラムとゲルろ過カラムによる液体クロマトグラフィーで精製を行なうことを計画した。Yip タンパク質の調製は、研究代表者の深井と協力して、助教の三村が担当した。結晶化条件のスクリーニングは、上に述べた RabGEF タンパク質の場合と同様の方法で行うこととした。

(1)、(2)に関して、解析に適した結晶が得られた場合は、X線回折データセットの収集を大型放射光施設 SPring8 および PF で行った。回折データの処理にはプログラムパッケージ HKL2000 (DENZO および SCALEPACK) を用いた。異常分散法におけるセレン原子位置の同定にはプログラム SnB あるいは SHELX を用いた。また、位相決定にはプログラム SHARP を用いた。原子モデルの構築および修正にはプログラム O あるいは COOT を用いた。構築した原子モデルの精密化には、プログラム CNS あるいは REFMAC5 を用いた。結晶解析全体で、データの変換、溶媒平滑化や平均化による位相の改善、分子置換による位相決定などの処理にはプログラムパッケージ CCP4 を用いた。

4. 研究成果

(1) 酵母の Rab GTPase Sec4p とその活性化タンパク質であるグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) Sec2p について、*Structure* 誌に発表した Sec2p GEF ドメインの結晶構造と生化学的解析の結果に基づいて発現系を設計し、Sec2p GEF ドメインとヌクレオチド非結合型 Sec4p 複合体の結晶化に成功した。最終的に複合体の結晶構造を 2.7 Å 分解能で決定し、ヌクレオチドの解離を促進させる Sec4p のスイッチ領域の大きな構造変化が複合体形成によって引き起こされる仕組みを原子分解能レベルで明らかにした。具体的には、「複合体形成に伴って、Sec2p の二本のヘリックスが互いに近づき、Phe109 の側鎖が Leu104 と Leu108 に向かって反転する。これら 3 つのアミノ酸残基によって疎水性のプラットフォームが形成され、Sec4p のスイッチ領域 I 上の Phe49, Ile53, Ile55、インタースイッチ領域の Phe57, Trp74 の側鎖を引き付ける。その結果、スイッチ領域 I と II は大きく構造変化して、Sec2p の表面にフィットするような平らな疎水性のインターフェースを形成する。これらの大きな構造変化は、スイッチ領域 I と GDP との相互作用を失わせ、GDP の解離を促進させる。」というものであった。単純な coiled-coil 構造によるヌクレオチド交換のメカニズムとしては、世界で初めての例であった。同時期に Yale 大学のグループから 3.3 Å 分解能の複合体の構造が *Mol*

Cell 誌に発表されたが、彼女らの構造とは異なり、我々の構造は P ループにリン酸が結合し、ヌクレオチド交換反応の中間状態とみなすことができた。我々の結果は、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 誌に発表した。さらに、Sec2p GEF ファミリーの特異性獲得の機構を明らかにすべく、ほ乳類の Sec2p ホモログである Rabin3 および GRAB と Rab との複合体の結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。



Sec2p の GEF ドメインと Sec4p との複合体の結晶構造

(2) 出芽酵母由来の Yip タンパク質 (Yip1p, Yip2p, Yip3p, Yip4p, Yip5p, Yif1p) のうち、イントロンを含む Yip3p 以外について、出芽酵母ゲノムから遺伝子をクローニングした。Yip2p はデータベース上に発表されている配列と 5' 端の配列が異なっており、ORF が明確でなかったため発現の候補から除外し、最終的に Yip1p, Yip4p, Yip5p, Yif1p の 4 種類を *Pichia pastoris* の発現ベクターである pPICZ および pPICZα に組み込んだ。DTT と Li₂SO₄ で細胞を処理することにより形質転換効率を上げ、それぞれ 2 g/L の Zeocin 存在下で生育することが可能な形質転換体を得た。得られたいくつかの形質転換体に対してメタノール添加による発現誘導を行い、膜画分を調製して C 末端に付加した 6 × His タグに対する抗体をもちいたウエスタンブロットングによる発現の確認を行ったが、発現を確認することはできなかった。また、論文でヘテロ二量体を形成すると報告されている Yip4p と Yip5p、および、Yip1p と Yif1p のヘテロ二量体での共発現も試みたが、発現を確認できなかった。そこで、GFP 融合タンパク質をつかった発現を試みたところ、N 末端に GFP を付加したコンストラクトで膜画分への発現を GFP の蛍光により確認することができた。発現が確認されたことにより、今後の構造解析に向けた Yip タンパク質の大量調製への準備が一段階進んだと言えるが、より多くの試料を得るためにはさらなる工夫が必要であると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D. G., Ito, K., Nureki, O. "Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures" Nature 455 巻 988-991 頁 2008 年

Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., Fukai, S. "Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains" Nature 455 巻 358-362 頁 2008 年

Higashi, T., Ikeda, T., Shirakawa, R., Kondo, H., Kawato, M., Horiguchi, M., Okuda, T., Okawa, K., Fukai, S., Nureki, O., Kita, T., Horiuchi, H. "Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by diaphanous-related formins, mDial1 and Daam1, in platelets" The Journal of Biological Chemistry 283 巻 8746-8756 頁 2008 年

Kawato, M., Shirakawa, R., Kondo, H., Higashi, T., Ikeda, T., Okawa, K., Fukai, S., Kita, T., Horiuchi, H. "Regulation of platelet dense granule secretion by the Ral GTPase-Exocyst pathway" The Journal of Biological Chemistry 283 巻 166-174 頁 2008 年

Yamashita, M., Higashi, T., Suetsugu, S., Sato, Y., Ikeda, T., Shirakawa, R., Kita, T., Takenawa, T., Horiuchi, H., Fukai, S., Nureki, O. "Crystal structure of human DAAM1 formin homology 2 domain" Genes to Cells 12 巻 1255-1265 頁 2007 年

Sato, Y., Fukai, S., Ishitani, R., Nureki, O. "Crystal structure of the Sec2p-Sec4p complex in the intermediate state of the nucleotide exchange reaction" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 104 巻 8305-8310 頁 2007 年

Sato, Y., Fukai, S., Nureki, O. "Crystallization and crystallographic analysis of yeast Sec2p, a guanine nucleotide-exchange factor for the yeast Rab GTPase Sec4p" Acta Crystallographica F 63 巻 616-619 頁 2007 年

[学会発表](計 5 件)

深井 周也 "Structural basis of selective cleavage of Lys63-linked polyubiquitin chains by JAMM ubiquitin isopeptidase" FASEB Summer Research Conferences -Ubiquitin and Cellular Regulation- 2008 年 6 月 16 日 Saxton's River, Vermont, USA

佐藤裕介「AMSHファミリーによる K63 結合型ポリユビキチン鎖特異的な切断活性機構の構造的基盤」BMB2008 2008 年 12 月 12 日 神戸ポートアイランド

深井周也「開口放出を制御する RabGTPase Sec4p 活性化の構造的基盤」BMB2007 2007 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜

東智仁「Rho によって制御される細胞質中の Formin タンパク質によるアクチン重合」BMB2007 2007 年 12 月 12 日 パシフィコ横浜

白川龍太郎「RalGAP の同定」BMB2007 2007 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜

[図書](計 1 件)

深井周也、佐藤裕介、吉川梓 羊土社 実験医学 2 月号 4111-414 頁 2009 年

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

深井 周也 (FUKAI SHUYA)
東京大学・放射光連携研究機構・准教授
研究者番号：10361792

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者