

GGA1 のヒンジ領域と GAE ドメインの相互作用における自己抑制機構

○井上道雄¹、志波智夫^{1*}、川崎政人¹、山田悠介¹、上久保裕生²、片岡幹雄²、
加藤龍一¹、中山和久³、若槻壮市¹

¹高エネ研・物構研・構造生物、²奈良先端・物質創生、³京大・薬、(*現:東大・総合文化)

細胞の中では物質の輸送が正確に行われることで正常な生命活動が維持されている。その働きを主に担っているタンパク質は細胞内の小器官へ膜を介した輸送によって運ばれて、それぞれの場所でその機能を発揮している。GGA (Golgi-localizing, γ adaptin ear homology domain, ARF-binding proteins) タンパク質及び AP-1 アダプタータンパク質複合体は、クラスリンを介したトランスゴルジネットワーク(TGN)とエンドソーム・リソソーム間の膜輸送に関与している。GGA タンパク質は VHS (Vps27p/Hrs/STAM)、GAT (GGA and Tom1)、GAE (γ adaptin ear) の 3 つのドメインとヒンジ領域の 4 つの機能部位を持っている。GAE ドメインは γ -synergin や Rabaptin-5 などの膜輸送調節タンパク質 (アクセサリタンパク質) と結合することが明らかとなっており、更に GAE ドメインのホモログである AP-1 の γ 1-ear ドメインは GGA のヒンジ領域に結合することから、膜輸送において積荷タンパク質 MPR (mannose 6-phosphate receptors) のパッキングを GGA タンパク質と AP-1 タンパク質複合体が共同して行うことが示唆されている。

GGA タンパク質の三つのドメインのうち、VHS、GAT ドメインについては既に我々のグループがその立体構造を明らかにしており、今回、構造が未知であった GAE ドメインの結晶構造を決定した。結晶中で GAE ドメインは β サンドイッチ構造を取っており、また二量体を形成していた。SAXS (X 線小角散乱) を用いて溶液中での GAE ドメインの会合状態を調べたところ、溶液中においても GAE ドメインは二量体で存在していることが示された。次に GAE ドメインとアクセサリタンパク質の共通配列ペプチドの結合について SPR (表面プラズモン共鳴) を用いて調べた。その結果、GAE ドメインは共通配列ペプチドと相互作用するだけでなく GGA1 タンパク質のヒンジ領域内に見出された相同なアミノ酸配列を持つペプチドとも結合することが示された。そこで GGA1 タンパク質の GAE ドメインとヒンジペプチドとの複合体の結晶構造を決定したところ、ヒンジ領域内の WNSF 配列が GAE ドメインの疎水的な溝にはまり込んで結合していることが明らかとなった。

GAE ドメインに対するアクセサリタンパク質とヒンジ領域の結合が競合的なものかどうかを調べるために、ヒンジ領域と GAE ドメインを含む部分タンパク質と Rabaptin-5 ペプチドを用いて蛍光消光実験を行った。ペプチドを加えることでヒンジ領域のトリプトファン蛍光が消光したことから、両者は競合して GAE ドメインと結合することが分かった。またタンパク質濃度に非依存的に解離定数は一定であったことから、GAE ドメインはヒンジ領域と分子内相互作用しており、アクセサリタンパク質との結合によって分子内相互作用を解消する機構をもっていることが考えられた。