

Rab のグアニンヌクレオチド交換因子 Sec2p の機能構造解析

佐藤裕介¹, 白川龍太郎², 堀内久徳², 堂前直³, 深井周也^{1,4}, 濡木理¹
(¹東工大・生命理工, ²京大・医, ³理研, ⁴東工大・バイオセンター)

生理活性物質の分泌, 受容体や輸送体などの細胞表面への提示, さらに細胞の形態変化に応じた膜の供給などの様々なプロセスは, 開口放出によって行われている。開口放出は分泌小胞が細胞膜と融合することによって起こり, その膜融合は, 主に低分子量 GTPase である Rab と, そのエフェクターとの相互作用により GTP 依存的に制御されている。Rab は活性化状態である GTP 結合型と, 不活性化状態である GDP 結合型の 2 つの状態を転移することで, 開口放出を制御する分子スイッチとして働く。

出芽酵母の開口放出は Sec4p という Rab によって制御されている。Rab の活性型への変換はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によって行われているが, Sec4p の GEF として Sec2p が同定されている。Sec2p は Sec4p に結合した GDP を解離させ, Sec4p を GTP 結合型へと変えることで Sec4p を活性化させる。Sec2p はこれまでに構造決定されたいかなる GEF とも配列の相同性が無く, Sec4p 活性化機構は未知であった。

今回我々は, Sec2p による Sec4p 活性化の機構を明らかにするため, Sec2p の単体(1), および Sec2p・Sec4p 複合体について, X 線結晶構造解析および立体構造に基づく変異体解析を行った。

我々は, Sec2p が 31-160 残基の領域のみで GEF 活性を持つことを明らかにし, 活性をもつこの領域 (GEF ドメイン) について大腸菌を用いた大量発現系の構築, 精製・結晶化, SeMet 標識体を用いた SAD 法による位相決定を行い, 3.0 Å の分解能での構造決定に成功した。驚くべきことに, Sec2p の GEF ドメインの構造は, これまで報告されていたあらゆる GEF の構造と全く異なっており, 二量体化して 180 Å におよぶ長く平行なコイルドコイルを形成していた。さらに, Sec2p 欠失変異体, および点変異体も構築し, Sec2p の 68-142 アミノ酸残基の内部の領域が Sec4p の認識に関わっていることを明らかとした。

続いて, Sec2p 単体の構造解析の結果から, より安定に Sec4p との複合体を形成すると予想される Sec2p の発現系を構築し Sec4p との共結晶化を行った。SeMet 標識体を用いた MAD 法による位相決定を行い, 2.7 Å の分解能で, Sec4p・Sec2p 複合体の構造決定に成功した。Sec4p・Sec2p 複合体と Sec4p・GDP, Sec2p 単体の構造の比較の結果, 複合体の形成によって Sec2p, Sec4p とともに大きな構造変化をしていた。特に, Sec4p のスイッチ領域 (GDP, GTP の結合に関わる領域) は非常に大きく移動しており, このスイッチ領域の構造変化が GDP 解離の促進を行っていることを明らかとした。

(1) Sato, Y., Shirakawa, R., Horiuchi, H., Dohmae, N., Fukai, S. & Nureki, O. (2007) Structure 15, 245-252.