

## ARA6/VPS9a の各種結晶構造

伊原健太郎<sup>1</sup>、上島珠美<sup>1</sup>、上田貴志<sup>2</sup>、中野明彦<sup>2,3</sup>、若槻壮市<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放射光科学第二研究系

<sup>2</sup>東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

<sup>3</sup>理化学研究所基幹研究所中野生体膜研究室

低分子量GTPaseは、一般的にGTP結合型で標的タンパク質(エフェクター)と相互作用し、自らのGTPase活性によりGTPがGDPに加水分解されると、エフェクターと相互作用しないGDP結合型へ変換される。低分子量GTPase自らのGTPase活性は比較的弱く、GTP加水分解速度は早くても毎秒  $10^{-3}$  回程度である。このGTP加水分解速度はGTPase活性化タンパク質(GAP)により大幅に加速される。一方、GDP結合型からGTP結合型という逆の変換には、GTPase活性に必須なマグネシウムイオン( $Mg^{2+}$ )と共に低分子量GTPaseに結合したGDPが一旦外れ、そこに外部から新たに $Mg^{2+}$ とGTPが導入される必要がある。GDPが自然に外部のGTPと交換する速度はGTPase活性と同様に遅く、やはり毎秒  $10^{-3}$  回前後と報告される例が多い。このように低分子量GTPaseに強固に結合した $Mg^{2+}$ とGDPを強制的に排除するのがグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)である。GEFはヌクレオチドフリー型の低分子量GTPaseと強い親和性を有し、 $Mg^{2+}$ /GDPとの競合の性質を利用して低分子量GTPase から $Mg^{2+}$ /GDPを解離させ、細胞質内により高濃度で存在する $Mg^{2+}$ /GTPの導入を助けると考えられているが、その詳細は各種GTPase/GEFの結晶構造解析や生化学的アッセイにも関わらず不明な点が多い。GEFの結晶構造解析は、ヌクレオチドフリー型低分子量GTPaseとの複合体として行われることが多いが、GEFと競合関係にあるために安定に導入することが難しいと考えられていた、各種ヌクレオチド結合型のGTPase/GEF複合体結晶構造を我々は得ている。シロイヌナズナでは低分子量GTPaseの一つであるRab5 様の分子として、ARA6、ARA7、RHA1 の 3 つ、及びこれらの選択的GEFであるVPS9aが知られている。このうちARA6 とARA7 に関して、ヌクレオチドフリー型、及びGDP、GDPNH<sub>2</sub>、又はGDPβSが含まれた状態で、VPS9aとの複合体結晶構造が得られている。これらの間には、ARA6 又はARA7 のリン酸結合部位に興味深い構造の差が見られる一方、全ての構造に $Mg^{2+}$ の結合が見られない共通点がある。更にヌクレオチド結合型構造間には、排除すべきGDP又はGDPアナログに対するVPS9aによる共通の認識が認められる。GEFと $Mg^{2+}$ /GDPは競合関係にあると考えられてきたが、Rab5/Vps9 系においては、共存中間体がある程度安定に存在するようである。前回までARA7/VPS9aの話を中心にしたため、今回はARA6/VPS9aの各種結晶構造をもとに、VPS9aによる $Mg^{2+}$ /GDP除去のメカニズムを議論したい。