

タンパク質の細胞内輸送を司る GGA1 タンパク質の VHS ドメインの立体構造 (GGA1 によるマンノース-6-リン酸レセプターの認識の構造的基盤)

志波 智生^{1,2}, 高津 宏之³, 禾 晃和¹, 川崎 政人¹, 松垣 直宏¹, 五十嵐 教之¹, 鈴木 守¹,
加藤 龍一¹, Thomas Earnest⁴, 中山 和久⁵, 若槻 壮市¹

¹高エネ研・物構研・構造生物グループ, ²国際科学振興財団, ³筑波大・生物系 (現 理研・免疫アレルギー研),
⁴Advanced Light Source (ALS), Berkeley USA, ⁵筑波大・生物系 (現 金沢大・薬)

Structural basis for recognition of mannose-6-phosphate receptor by GGA1 protein

Tomoo SHIBA^{1,2}, Hiroyuki TAKATSU³, Terukazu NOGI¹, Masato KAWASAKI¹,
Naohiro MATSUGAKI¹, Noriyuki IGARASHI¹, Mamoru SUZUKI¹, Ryuichi KATO¹,
Thomas EARNEST⁴, Kazuhisa NAKAYAMA⁵, Soichi WAKATSUKI¹

¹Photon Factory (PF), Institute of Materials Structure Science, KEK, ²Foundation for Advancement of International
Science (FAIS), ³Institute of Biological Sciences and Gene Research Center, University of Tsukuba (Present:
Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN), ⁴Advanced Light Source (ALS), Berkeley USA, ⁵Institute of
Biological Sciences and Gene Research Center, University of Tsukuba (Present: Faculty of Pharmaceutical Science,
Kanazawa University)

1. はじめに

真核生物の細胞内には細胞の基本的活動を受け持つ小さな器官がいくつも存在し、生命活動を担っている。それらの一例として、遺伝子の情報を管理している核、細胞内で使えるエネルギーを生み出すミトコンドリア、合成されたタンパク質が運び出されてくるゴルジ体などがある。こうした小器官の活動は、それに必要な物質が間違いなく運ばなければ正常に保つことは不可能である。つまり、細胞内での物質の輸送は細胞活動を支える原点であり、細胞内の物質輸送を支配しているタンパク質の役割を明らかにすることは細胞の活動を知る上で非常に重要である。

細胞内物質輸送系は複数が知られているが、その代表例がクラスリン被覆小胞を介した輸送機構である。ゴルジ体内腔にある積荷タンパク質は輸送タンパク質受容体と制御タンパク質を介して、クラスリンタンパク質によって覆われた輸送小胞内に集積され、目的地へと運ばれる (Fig. 1)。これらの細胞内輸送に関わるタンパク質に変異が起こり、誤った場所にタンパク質が輸送されることによって引き起こされる病気も多数存在しており、これらのタンパク質群の構造と機能を理解することは基礎生物学と医学の両面から最重要視されている。

最近見いだされた細胞内輸送の制御タンパク質 GGA ファミリーは、その新規性などから非常に注

目を集め、世界中からその立体構造に基づいた制御機構の解明が待望されていた。我々のグループと、米国 NIH のグループは独立に GGA タンパク質の立体構造を決定することにほぼ同時に成功し、それらの成果は *Nature* 誌の同じ号に前後して掲載された [1,2]。本稿では、我々の研究結果とそれによって得られた知見について簡単に紹介する。

2. GGA1 タンパク質

クラスリン被覆小胞の制御を行うアダプタータンパク質として AP 複合体が知られていたが、ごく最近それに加えて GGA タンパク質が見いだされた [3,4]。GGA1 タンパク質は、Fig. 1 に示すように 3 つのドメインと 1 つの領域からなり、N 末端ドメイン (VHS ドメイン) は細胞内輸送タンパク質である Vps27、Hrs、STAM と相同性があり、中央ドメイン (GAT ドメイン) は GGA タンパク質ファミリーで保存されている領域で、C 末端ドメイン (GAE ドメイン) は同じアダプタータンパク質である AP-1 複合体 γ -ear ドメインと相同性がある。これらの 4 つの領域について、中央ドメインは輸送小胞の形成開始シグナルとして働く ARF-GTP と相互作用し [5-9]、GAT ドメインと GAE ドメインをつなぐヒンジ (プロリン・リッチ) 領域は輸送小胞の被覆タンパク質であるクラスリンと相互作用する [9,10]。また、GAE ドメインは他のアクセサリタンパク

質と相互作用する。N末端領域に存在するVHSドメインは、トランスゴルジネットワーク(TGN)を貫通する輸送タンパク質受容体の細胞質領域(Fig. 1では上側)と結合することが最近報告されている[4,11-14]。我々はGGA1タンパク質のVHSドメインと輸送タンパク質受容体の相互作用に関する知見を得るため、ヒトGGA1タンパク質のVHSドメイン単体および、輸送タンパク質受容体のマンノース-6-リン酸レセプター(MPR)の結合領域との複合体のX線結晶構造を明らかにした[1]。

3. 実験

3.1 タンパク質の発現・精製と結晶化

ヒトGGA1タンパク質のVHSドメインのみをコードするDNA断片をPCRを用いて増幅し、グルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として、大腸菌内で発現させ精製した。プロテアーゼでグルタチオン-S-トランスフェラーゼ部を切断除去し、VHSドメインのみを結晶化に用いた。

GGA1タンパク質のVHSドメイン単体の結晶は、17% ポリエチレングリコール3350, 0.2 M KH_2PO_4 を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法で作成した(Fig. 2a)。また、VHSドメインとMPRのC末端(ACLL)ペプチドとの複合体の結晶は、モル比が1:5となるサンプルを作成し、14% ポリエチレングリコール3350, 0.2 M NH_4I を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法で作成した(Fig. 2b)。

3.2 X線回折強度データの測定と構造決定・精密化

GGA1タンパク質のVHSドメイン単体の結晶のX線回折強度データは、KEK, PFのビームライン6B ($\lambda=1.0 \text{ \AA}$) の放射光を用いて、 2.1 \AA 分解能のデータを $R_{\text{merge}}=0.044$ の精度で測定した。また、VHSドメインとMPRのC末端ペプチドとの複合体の結晶のX線回折強度データは、ALSのビームライン5.0.2 ($\lambda=1.0 \text{ \AA}$) の放射光を用いて、 2.0 \AA 分解能のデータを $R_{\text{merge}}=0.067$ の精度で測定した。その他の測定結果の統計値をTable S1 (Appendix) に示した。

GGA1タンパク質のVHSドメイン単体の結晶構造は、TOM1タンパク質のVHSドメイン(PDBコード: 1ELK)をサーチモデルとする分子置換法で決定した。また、VHSドメインとMPRのC末端ペプチドとの複合体の結晶構造は、GGA1のVHSドメイン単体の構造をサーチモデルとする分子置換法で決定した。その後、構造精密化を行ったところ、単体及

び複合体の結晶学的R値はそれぞれ22.3, 22.8%となった。その他の精密化の統計値をTable S1 (Appendix) に示した。

3.3 変異体の作成と酵母2-hybrid解析

GGA1タンパク質のVHSドメインとMPRのC末端ペプチドとの複合体の結晶構造から導かれた相互作用部位を生体内で検証するため、VHSドメインの特定のアミノ酸に変異を導入した変異タンパク質とMPRやSortillinなどの輸送タンパク質受容体との相互作用について、酵母2-hybrid systemを用いて実験を行った。

4. 結果と考察

4.1 GGA1タンパク質のVHSドメインの構造

構造解析の結果、GGA1のVHSドメインは8本の α -ヘリックスから構成されており、MPRのC末端(ACLL)ペプチドは、helix6とhelix8の間のクレフト(溝)に沿うように結合していることが明らかになった。GGA1のVHSドメインとMPRのC末端ペプチドとの複合体の全体構造を、Fig. 3に示す。Fig. 3bは、Fig. 3aを 90° 回転してhelix5を上から見た図である。また、結合しているMPRのC末端ペプチドは、ball-and-stickモデルで示してある。Fig. 4には、MPRのC末端ペプチドの(Fo-Fc)を係数とするomit電子密度図(3.0σ)を示した。helix6とhelix8の間のクレフトにMPRのC末端ペプチドの明瞭な電子密度を確認することができた。

4.2 VHSドメイン分子のMPRのC末端ペプチドとの結合表面

得られた複合体結晶構造に基づいてVHSドメインとMPRとの相互作用を理解するため、その結合表面の荷電状態および疎水性の可視化を行った(Fig. 5)。Fig. 5aはVHSドメイン単体の、Fig. 5bはペプチドとの複合体の静電ポテンシャルを示したもので、緑の線がペプチドの輪郭に相当する(赤色: 負に荷電した領域、青色: 正に荷電した領域)。ペプチドが結合していないVHSドメイン分子表面がペプチドが結合することによって、正電荷(青色)から負電荷(赤色)に変化することがわかった。Fig. 5c-fは、複合体におけるMPRのC末端ペプチドとVHSドメインとの結合部分を拡大して表示したもので、それぞれ静電ポテンシャル(Fig. 5c, d)と疎水性領域(Fig. 5e, f)を示したものである。Fig. 5cに示したようにVHSドメイン側は正電荷(青色)を帯びてお

GGA1タンパク質のドメイン構造

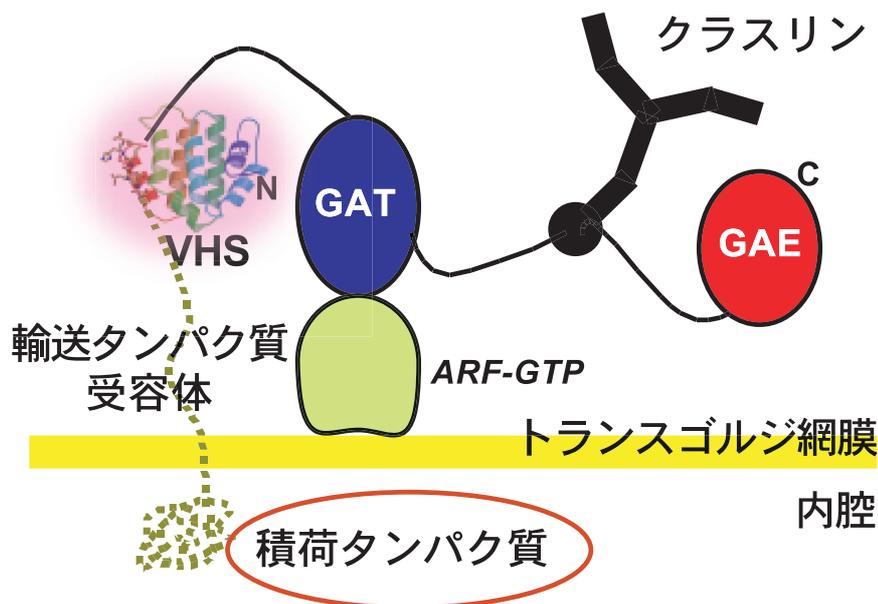


Figure 1

Schematic representation of domain organization of GGA1 protein (upper panel) and interaction between GGA1 and other proteins (lower panel). GGA1 protein consists of three domains, VHS, GAT and GAE. GGA1 interacts with at least three other proteins, clathrin, ARF and MPR. Clathrin is a coat protein of transport vesicles and it interacts with proline-rich region between GAT and GAE domains of GGA1 protein. GAT domain interacts with GTP bound-ARF which is a small G-protein. VHS domain interacts with C-terminal ACLL sequence of MPR protein which is a cargo receptor protein.

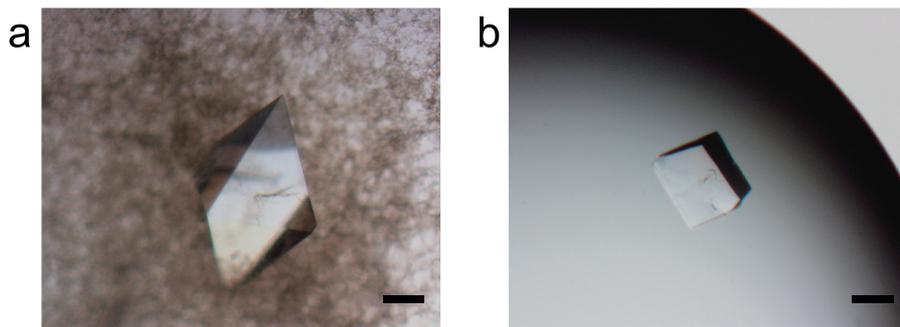


Figure 2

Crystal of the human GGA1 VHS domain (a) and that of the human GGA1 VHS domain complexed with C-terminal ation-independent MPR peptide (b). Bar shows 0.1 mm.

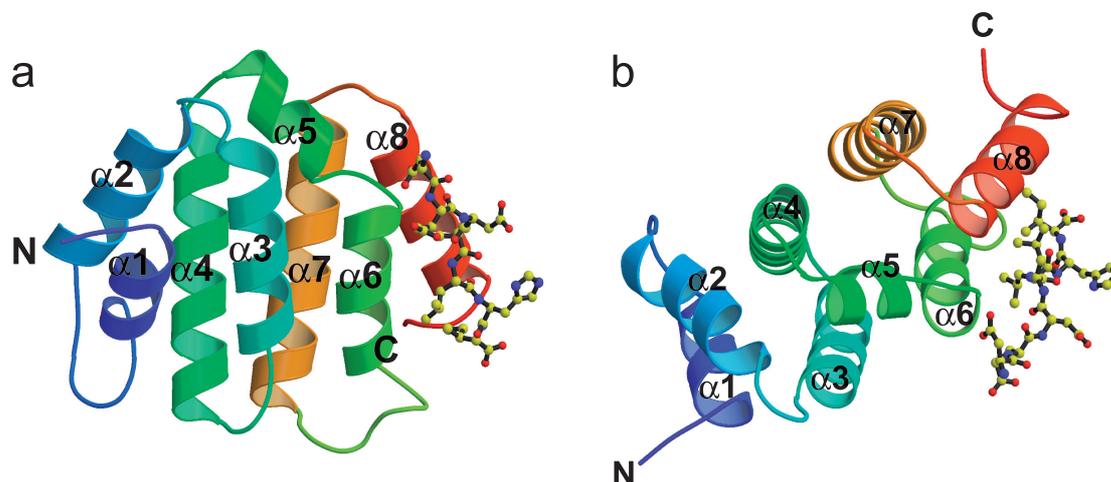


Figure 3

Ribbon diagram of human GGA1 VHS domain complexed with MPR peptide. The MPR (ACLL) peptide molecule is shown as a ball-and-stick model. (a) is shown from side-view, and (b) is shown from top-view.

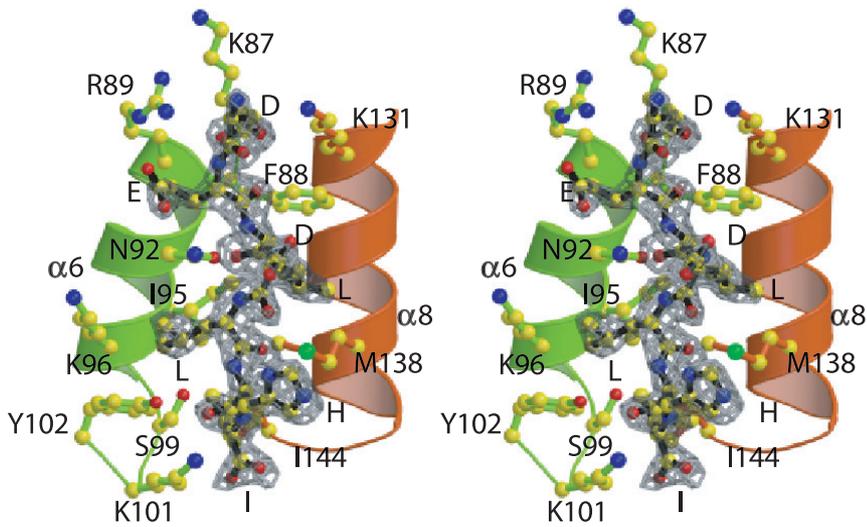


Figure 4

Stereo view of the omit Fo-Fc electron density map of the ACLL peptide (chain C), contoured at 3.0σ , superimposed with a ball-and-stick model of the peptide in the center (bonds colored in black and residues labeled with single letters). It also shows a ribbon diagram of the helices $\alpha 6$ and $\alpha 8$ with ball-and-stick models of the residues involved in the interaction with the peptide.

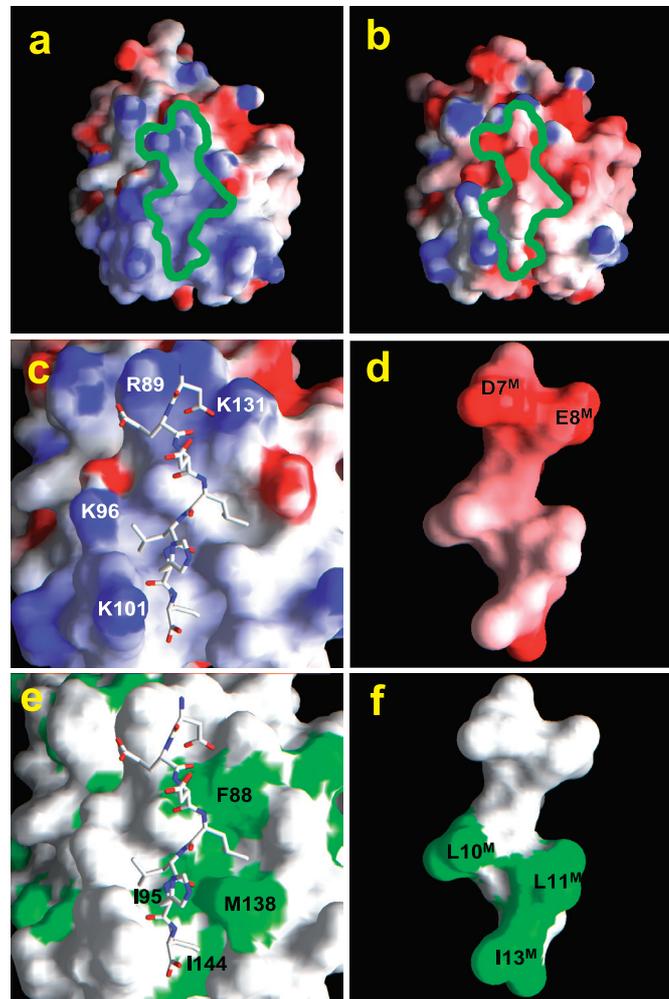


Figure 5

Surface representation of the VHS domain interacting with the cation-independent MPR ACLL peptide. The surfaces are colored according to the electrostatic surface potential in **a-d** (blue, positive; red, negative) and hydrophobicity in **e** and **f** (green). **a**, The VHS domain (in complex form) without the peptide. Green line shows outline of the peptide. **b**, With the peptide in the same view as in **a**. Green line shows outline of the peptide. **c**, The Peptide bound to the VHS domain. The peptide is shown as sticks and the basic residues interacting with the peptide are labeled. **d**, The other side of the peptide. **e**, The peptide bound to the VHS domain (the same view as in **c**). **f**, Hydrophobicity of the other side of the peptide (the same view as in **d**). **c-d** and **e-f** are shown as open-book pairs.

り、Fig. 5dに示したペプチドの負電荷部分（赤色）と静電的に引き合っている様子がわかった。また、Fig. 5e,fに示したようにVHSドメイン側もMPRのC末端ペプチドも、それらの相互作用する領域は共に疎水性（緑色）の分布を示しており、疎水性相互作用も分子間相互作用に寄与していると考えられた。

4.3 VHSドメインのMPRのC末端ペプチドの分子認識の原子レベルでの機構

VHSドメインとMPRのC末端ペプチドの複合体のX線結晶構造を決定したことにより、GGA1タンパク質のVHSドメインが輸送タンパク質受容体のMPRをどのようにして認識しているかが、原子レベルで明らかにされた。Fig. 6は、その相互作用を模式的に示したものである。この図に示したように、相互作用に関わるVHSドメイン側のアミノ酸残基は、helix6とhelix8に局在している。また、MPRのC末端ペプチドのジロイシン残基（Leu10^M-Leu11^M）の認識は主にPhe88, Ile95, Met138などの疎水性残基やAsn92, Lys96, Tyr102の疎水性の炭化水素鎖部分により行われており、酸性残基（Asp7^M）の認識は主にLys131の塩基性側鎖との静電的相互作用により行われていることがわかる。

分子認識に関わるこれらのアミノ酸残基の必要性は、酵母の2-hybrid systemを用いた実験によっても明らかであった。Table 1に示したように、Phe88, Asn92, Ile95, Lys131などに変異が導入されたGGA1タンパク質は、輸送タンパク質受容体であるMPRやSortilinとの結合能が失われていることが細胞内で確認された。

Table 1 Yeast two-hybrid analysis

Bait	Prey	
	CI-MPR	Sortilin
WT	+++	+++
F88Q	-	-
N92E	-	-
E93S	+++	+++
I95D	-	-
K131N	+/-	-
Y136stop	-	-

+++、+/- and - indicate yeast cells that developed blue color in 1-h incubation with X-gal, developed pale blue color in 18-h incubation, and did not develop blue color within 18 h, respectively, in a filter assay for β -galactosidase.

4.4 分子認識の特異性がどのようにして達成されているか

細胞内輸送において特定のタンパク質を目的の場所に輸送するためには、輸送するものとされるものが厳密にお互いを認識することが必要である。本研究では、クラスリン被覆小胞のアクセサリタンパク質GGA1のVHSドメインとMPRの相互作用に着目して実験を行ったが、このVHSドメインとアミノ酸配列上も立体構造上も似ているTom1, Hrsなどのタンパク質も、やはり細胞内輸送に関わることが知られている。GGA1と他のタンパク質のVHSドメインのアミノ酸配列を比較したものがFig. 7である。青色で示されているアミノ酸残基はGGAタンパク質のみで保存されているもので、赤色で示されている残基は他でも保存されているものを表している。全体にわたって配列は保存されているが、helix6とhelix8に相当する領域では、GGAタンパク質のみで保存されている残基（青色）が特徴的に見いだされている。一方、今回のX線結晶構造解析によって明らかになった、MPRと相互作用しているアミノ酸残基を図中、黒色の矢印で示した。実際にMPRとの分子認識を行うアミノ酸残基はGGAタンパク質のみで保存されており、他のタンパク質ではそれらは保存されていない。

以上から本研究により、(1) GGAタンパク質がターゲットのMPRを認識する原子レベルでの機構を明らかにしたと共に、(2) この相互作用は細胞内輸送における特異性を直接説明しただけでなく、さらに(3) 他のVHSドメインでは異なる分子認識機構が存在するであろう事を導き出した。

5. まとめ

我々は、GGA1のVHSドメイン単体および、MPRのC末端ペプチドとの複合体のX線結晶構造を決定した。その結果、MPRのC末端ペプチドは、VHSドメインのhelix6とhelix8のクレフトに静電相互作用及び疎水性相互作用で結合していることを明らかにした。また、MPRの認識に関与するアミノ酸残基はGGAタンパク質で特徴的であり、分子認識の特異性をよく説明することができた。

クラスリン被覆小胞の制御タンパク質としては、近年になって見いだされたGGAタンパク質の他に以前から研究されていたAP複合体が知られている。AP複合体はその名の通り、4つのサブユニットからなる巨大分子であるのに対し、GGAタンパク質はそれ単体でクラスリン・ARF・輸送タンパク質と

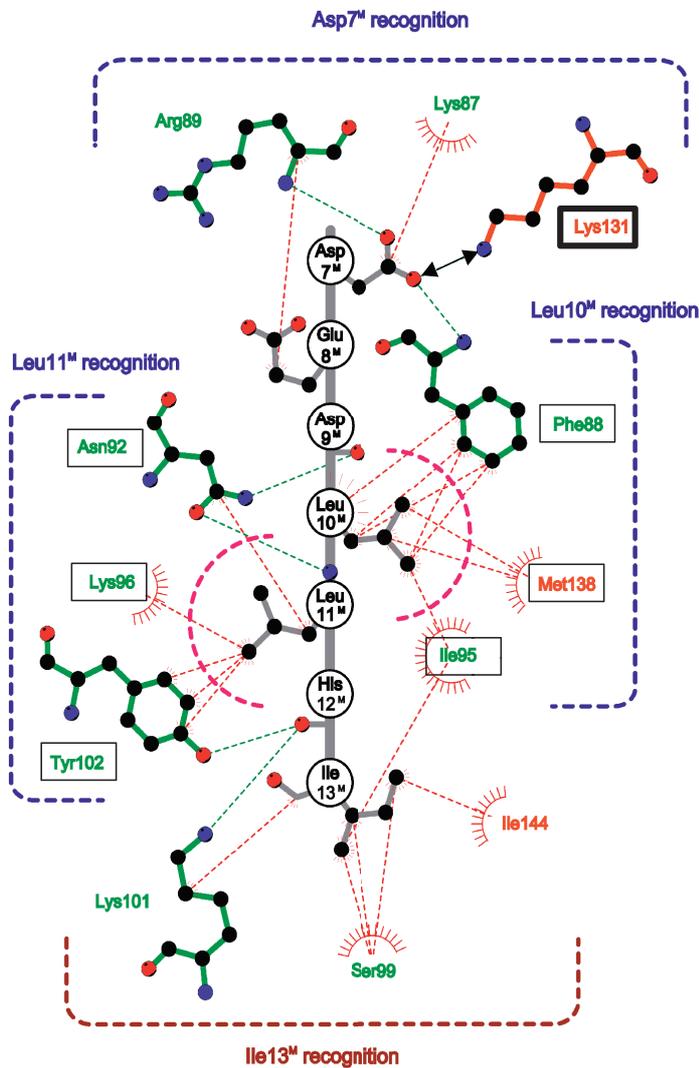


Figure 6

Peptide binding diagram. The main chain and the side chains of the MPR ACLL peptide are shown in gray and side chains involved in the specific interactions are shown by ball-and-stick models. VHS domain residues in the helices $\alpha 6$ and $\alpha 8$ are shown in green and orange, respectively, where residues involved in the hydrogen bond or the charged interaction are shown by ball-and-stick models and those in the hydrophobic interaction are indicated only by text. In the ball-and-stick models, each atom is colored as follows: carbon, gray; nitrogen, blue; oxygen, red. Hydrogen bonds or charged interactions are indicated by green dotted lines, and hydrophobic interactions by red dotted lines with a starburst around each atom or residue. The arrow between Lys131 and Asp7M shows an electrostatic interaction.

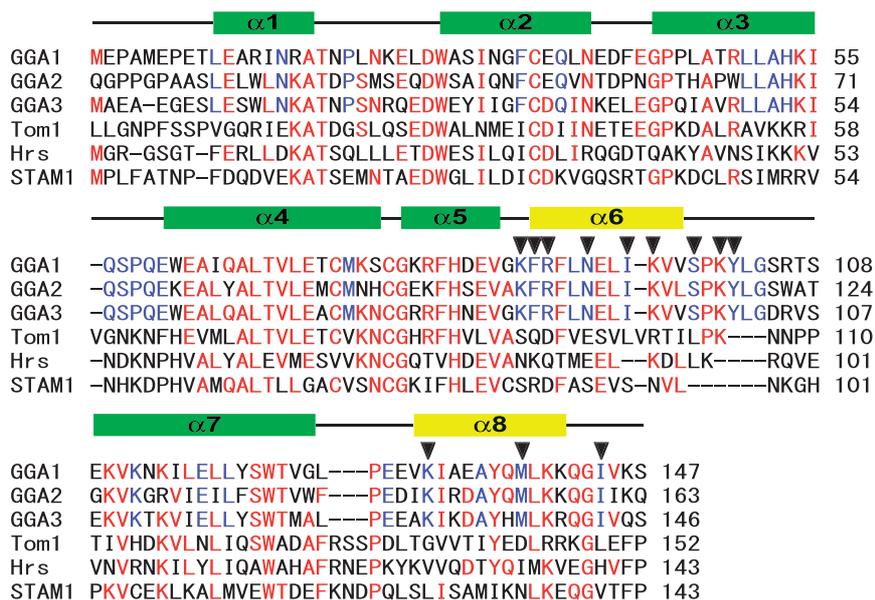


Figure 7

Alignment of amino acid sequences of VHS domains from GGAs, Tom1, Hrs and STAM1. Arrowheads indicate GGA1 residues involved in the interaction with the MPR ACLL peptide.

の結合を行い、細胞内輸送を制御する (Fig. 1)。実験系としては、単一分子種であるGGAタンパク質は非常に有利であり、一部ではあるがその構造を決定し機能との関連を明らかにできた意義は大きい。我々は既に他のドメインの構造解析にも着手しており、着々と成果を上げつつある。最終的には、ドメインごとの構造機能解析に加えて、全ドメインを含む構造決定や相互作用によるドメイン間での構造変化の有無や意義を明らかにし、細胞内輸送の制御機構を原子レベルで理解することを目指している。

謝辞

高エネ研・物構研・構造生物グループが本格的に研究を開始して1年足らずでこのような研究成果をあげられたことについて、当グループを支援して下さいている多くの方に感謝します。また、本研究でKEK, PFのBL-6BおよびALSのBL-5.0.2でX線回折強度データを収集する際に協力して下さい下さった方々に特に感謝します。

引用文献

- [1] Shiba, T., Takatsu, T., Nogi, T., Matsugaki, N., Kawasaki, M., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Earnest, T., Nakayama, K. and Wakatsuki, S., *Nature*, **415**, 937-941 (2002).
- [2] Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino, J. S. and Hurley, J. H., *Nature*, **415**, 933-937 (2002).
- [3] Black, M. W. and Pelham, H. R. B., *Curr. Biol.* **11**, R460-R462 (2001).
- [4] Robinson, M. S. and Bonifacino, J. S., *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 444-453 (2001).
- [5] Boman, A. L., Zhang, C.-J., Zhu, X. and Kahn, R. A., *Mol. Biol. Cell* **11**, 1241-1255 (2000).
- [6] Dell'Angelica, E.C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, M. and Bonifacino, J. S., *J. Cell Biol.* **149**, 81-83 (2000).
- [7] Hirst, J., Lui, W. W., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N. and Robinson, M. S., *J. Cell Biol.* **149**, 67-79 (2000).
- [8] Zhdankina, O., Strand, N. L., Redmond, J. M. and Boman, A. L., *Yeast* **18**, 1-18 (2001).
- [9] Puertollano, R., Randazzo, P. A., Presley, J. F., Hartnell, L. M. and Bonifacino, J. S., *Cell* **105**, 93-102 (2001).
- [10] Costaguta, G., Stefan, C. J., Bensen, E. S., Emr, S.

D. and Payne, G. S., *Mol. Biol. Cell* **12**, 1885-1896 (2001).

- [11] Nielsen, M. S., Madsen, P., Christensen, E. I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R. and Petersen, C. M., *EMBO J.* **20**, 2180-2190 (2001).
- [12] Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J. and Bonifacino, J., *Science* **292**, 1712-1716 (2001).
- [13] Takatsu, H., Katoh, Y., Shiba, Y. and Nakayama, K., *J. Biol. Chem.* **276**, 28541-28545 (2001).
- [14] Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V. P. and Kornfeld, S., *Science* **292**, 1716-1718 (2001).

著者紹介

志波智生 (Tomoo SHIBA)

国際科学振興財団研究員・高エネルギー加速器研究機構協力研究員

茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 0298-79-6176 FAX: 0298-79-6179

e-mail: shiba@pfweis.kek.jp

略歴：2000年東京大学大学院薬学系研究科博士後期課程修了、2000年東京大学薬学部研究員、2001年国際科学振興財団研究員・高エネルギー加速器研究機構協力研究員、現在に至る。薬学博士。

高津 宏之 (Hiroyuki TAKATSU)

理研・免疫アレルギー研・研究員、理学博士。

禾 晃和 (Terukazu NOGI)

高エネ研・物構研・研究機関研究員、理学博士。

川崎 政人 (Masato KAWASAKI)

高エネ研・物構研・助手、理学博士。

松垣 直宏 (Naohiro MATSUGAKI)

高エネ研・物構研・助手、理学博士。

五十嵐 教之 (Noriyuki IGARASHI)

高エネ研・物構研・助手、理学博士。

鈴木 守 (Mamoru SUZUKI)

高エネ研・物構研・助手、理学博士。

加藤 龍一 (Ryuichi KATO)

高エネ研・物構研・助教授、理学博士。

Thomas EARNEST
Center Head of Berkeley Center for Structural Biology,
Physical Biosciences Division, Lawrence Berkeley
National Laboratory (USA), Ph.D.

中山 和久 (Kazuhisa NAKAYAMA)
金沢大・薬学部・教授、医学博士。

若槻 壮市 (Soichi WAKATSUKI)
高工ネ研・物構研・教授、Ph.D.

(Appendix)

Table S1 Data processing, refinement and models

Crystals		
	Native	Complex
Space group	$P4_32_12$	$P2_12_12_1$
Cell dimensions (Å)	$a = 55.1, c = 105.5$	$a = 55.2, b = 65.9, c = 101.6$
Solvent content (%)	48.4	52.1
Data processing statistics		
	Native	Complex
Wavelength (Å)	1.0 (PF-BL-6B)	1.0 (ALS 5.0.2)
Temperature (K)	293	100
Resolution (Å)	15 - 2.1 (2.17 - 2.1)	30 - 2.0 (2.11 - 2.0)
Number of total reflections	39,125	167,862
Number of unique reflections	9,580	25,975
Completeness (%)	95.6 (89.4)	99.6 (99.3)
R_{merge} (%)	4.4 (28.8)	6.7 (35.9)
I / σ	25.8 (4.7)	7.1 (1.9)
Models		
	Native	Complex
protein atoms	1,117	2,252
Number of peptide atoms	-	103
Number of water molecules	34	198
Number of iodide ions	-	6
Average B -factors (Å ²)	34.4	39.1
		protein chain A 32.4
		peptide chain C 35.3
		protein chain B 44.0
		peptide chain D 50.3
Refinement statistics		
	Native	Complex
Resolution range (Å)	15.0 - 2.1	30 - 2.0
Reflections in working/free set	9,057/456	23,340/1292
R -factor / R_{free} (%)	22.3/26.1	22.8/26.1
R.m.s. deviation from ideal values		
Bond length (Å)	0.013	0.011
Bond angle (°)	1.56	1.29
Ramachandran plot		
Most favoured region (%)	91.9	95.3
Additionally allowed region (%)	8.1	4.7
Generously allowed region (%)	0	0
Disallowed region (%)	0	0

Values in parentheses are for the highest resolution shell. $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_i \sum_j |<I_i> - I_{ij}|}{\sum_i \sum_j I_{ij}}$, where $<I_i>$ is the mean intensity i th unique reflection, and I_{ij} is the intensity of its j th observation. R -factor = $\frac{\sum_h ||F(h)_{\text{obs}}| - k|F(h)_{\text{calc}}||}{\sum_h |F(h)_{\text{obs}}|}$. R_{free} is the R -factor calculated for a test set reflections, comprising a randomly selected 5 % of the data, not used during refinement.