

## リソソームタンパク質の輸送における ARF による GGA タンパク質の膜へのリクルートの分子機構

志波 智生<sup>1,2</sup>, 川崎 政人<sup>1</sup>, 高津 宏之<sup>3,4</sup>, 禾 晃和<sup>1,5</sup>, 松垣 直宏<sup>1</sup>,  
五十嵐 教之<sup>1</sup>, 鈴木 守<sup>1</sup>, 加藤 龍一<sup>1</sup>, 中山 和久<sup>3,6</sup>, 若槻 壮市<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 高エネ研・物構研・構造生物学研究センター, <sup>2</sup> 国際科学振興財団, <sup>3</sup> 筑波大・生物系,  
<sup>4(現)</sup> 理研・免疫アレルギー研, <sup>5(現)</sup> マックスプランク生物物理学研究所, <sup>6(現)</sup> 京都大院・薬

### Molecular mechanism of membrane recruitment of GGA by ARF in lysosomal protein transport

Tomoo Shiba<sup>1,2</sup>, Masato Kawasaki<sup>1</sup>, Hiroyuki Takatsu<sup>3,4</sup>, Terukazu Nogi<sup>1,5</sup>, Naohiro Matsugaki<sup>1</sup>,  
Noriyuki Igarashi<sup>1</sup>, Mamoru Suzuki<sup>1</sup>, Ryuichi Kato<sup>1</sup>, Kazuhisa Nakayama<sup>3,6</sup>, Soichi Wakatsuki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Structural Biology Research Center, Photon Factory (PF), Institute of Materials Structure Science, KEK,

<sup>2</sup>Foundation for Advancement of International Science (FAIS),

<sup>3</sup>Institute of Biological Sciences and Gene Research Center, University of Tsukuba,

<sup>4</sup>Present address: Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN,

<sup>5</sup>Present address: Max-Planck-Institut fuer Biophysik,

<sup>6</sup>Present address: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

#### 1. はじめに

ヒトを初めとする真核生物の細胞には、膜で仕切られた細胞内小器官が多数存在し、それぞれが固有の役割を持っている。例えば、核は遺伝情報の担い手である DNA を管理し、ミトコンドリアはエネルギーの生産を行い、ゴルジ体は新しく合成された分泌タンパク質の修飾や選別を行っている。それぞれの細胞内小器官への物質の輸送は、膜がくびれて形成される輸送小胞により行なわれる。クラスリン被覆小胞を介した小胞輸送はその代表例であり、エンドサイトーシスと呼ばれる細胞内への物質の取り込みや分泌タンパク質の細胞内輸送などに関与している。ゴルジ体から目的地へと出発する積荷タンパク質は、トランス・ゴルジ・ネットワーク (TGN) 膜に局在する積荷タンパク質受容体によって集められ、アダプタータンパク質の助けを借りてクラスリン被覆小胞の中に取り込まれ、目的地へと運ばれる。クラスリン被覆小胞を介した小胞輸送は神経における情報伝達などにも関わっており、この輸送系に異常が起きると神経の麻痺など様々な疾患が引き起こされる。従って、小胞輸送現象を理解することは、生物学的に興味深いだけでなく医学的な見地からも重要である。

クラスリン被覆小胞形成のアダプタータンパク質としては AP 複合体が以前から知られていたが、最近それに加えて GGA タンパク質が発見された [1]。GGA タンパク質は、トランス・ゴルジ・ネットワーク (TGN) 膜からの輸送小胞形成に関与する。GGA タンパク質は 3 つのドメインからなる (Fig. 1)。N 末端の VHS ドメインはマンノース 6 リン酸受容体などの輸送タンパク質受容体の細胞質領域と結合する。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、輸送小胞の形成開始シグナル

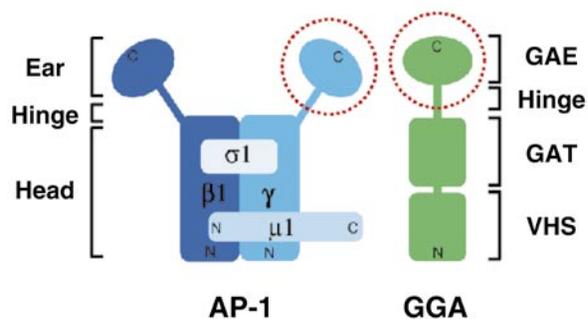
として働く ARF (GTP 結合型) と相互作用する。C 末端の GAE ドメインは同じアダプタータンパク質である AP-1 複合体の  $\gamma$ -ear ドメインと相同性がある (Fig. 1)。GAT ドメインと GAE ドメインの間のヒンジ領域は輸送小胞の被覆タンパク質であるクラスリンと相互作用する。

GGA ファミリーは、その重要性と新規性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についての論文がすでに幾つか報告されている [2-7]。これまで、我々のグループは、GGA1 の VHS ドメインとマンノース 6 リン酸受容体の C 末端領域のペプチドとの複合体の構造 [2] や、GAE ドメインのホモログである AP1 複合体の  $\gamma$ -ear ドメインの結晶構造を明らかにした [6]。最後に残った GAT ドメインの構造決定は国際的に熾烈な競争となり、我々のグループと、英国ケンブリッジ大学、米国 NIH 及び米国オクラホマ大学の計 4 つのグループがほぼ同時に構造決定に成功した [8-11]。TGN 膜に結合した ARF に GAT ドメインが結合することによって、GGA は TGN 膜にドッキングし、輸送小胞の形成を開始することが出来る。我々のグループは GAT ドメイン単体だけでなく、その N 末端領域 (N-GAT) と ARF1 (GTP 結合型) との複合体の X 線結晶構造も明らかにした [8]。これにより GGA タンパク質が ARF により、TGN 膜にリクルートされるメカニズムが明らかになった。

#### 2. 実験

##### 2.1 タンパク質の発現・精製と結晶化

ヒト GGA1 タンパク質の GAT ドメイン (166-305 残基) 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 (GST) との融合タンパク



**Figure 1**  
Schematic diagrams of AP-1 complex and GGA.

質として、大腸菌内で発現させ精製した。プロテアーゼで GST 部を切断除去し、GAT ドメインのみを結晶化に用いた。また、同様に ARF1 (Q71L 変異により GTP から GDP への加水分解が起こらず、GTP 結合型に固定された変異体) と N-GAT ドメイン(166-210 残基)をそれぞれ発現・精製し、両者を混合して複合体を形成し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて複合体を精製し結晶化に用いた。

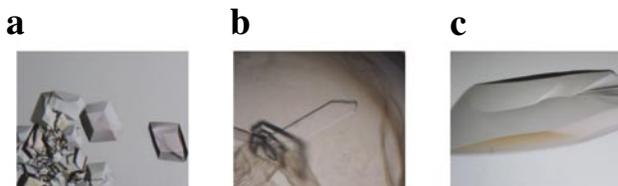
GGA1 タンパク質の GAT ドメイン単体の結晶は、35 % MPD, 2 % PEG6000, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法で作製した (Fig. 2a)。また、ARF1(GTP-form) の結晶は、24 % PEG3350, 0.2 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法で作成した (Fig. 2b)。また、ARF1 と N-GAT ドメインの複合体結晶は、10 % PEG 3350, 0.2 M KI を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散法で作製した (Fig. 2c)。

**2.2 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 GAT ドメインの結晶の X 線回折強度データは、KEK PF のビームライン BL-18B ( $\lambda=1.0 \text{ \AA}$ ) の放射光を用いて、2.1  $\text{\AA}$  分解能のデータを  $R_{\text{merge}}=0.045$  の精度で測定した。また、位相情報を得るためにセレノメチオニン化した GAT ドメインの結晶の X 線回折強度データも 3 種類の異なる波長 ( $\lambda=0.9500, 0.9806, 0.9808 \text{ \AA}$ ) で、KEK PF のビームライン BL-18B の放射光を用いて測定した。

ARF1(GTP-form) の結晶の X 線回折強度データは、KEK PF のビームライン BL-6A ( $\lambda=0.977 \text{ \AA}$ ) の放射光を用いて、1.5  $\text{\AA}$  分解能のデータを  $R_{\text{merge}}=0.043$  の精度で測定した。

また、ARF1 と N-GAT ドメインの複合体結晶の X 線回



**Figure 2**  
(a) Crystal of the GGA1 GAT domain, (b) Crystal of the ARF1 (GTP-form), (c) Crystal of the GGA1 N-terminal GAT domain in complex with ARF1 (GTP-form). Bars indicate 0.1 mm in length.

折強度データは、KEK PF のビームライン BL-18B ( $\lambda=1.0 \text{ \AA}$ ) の放射光を用いて、1.6  $\text{\AA}$  分解能のデータを  $R_{\text{merge}}=0.048$  の精度で測定した。その他の測定結果の統計値を Table 1 (Appendix) に示した。

GGA1 タンパク質の GAT ドメイン単体の結晶構造は、セレノメチオニン化したタンパク質の結晶を用いた多波長異常分散法 (MAD) で決定した。ARF1(GTP-form) の結晶構造は、ARF6 の GTP-form をモデル分子として用いた分子置換法で決定した。また、ARF1 と N-GAT ドメインの複合体の結晶構造は、ARF1 (GTP-form) 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、GAT ドメイン単体、ARF1 (GTP-form)、ARF1 と N-GAT ドメインの複合体の結晶学的 R 値はそれぞれ 24.7, 19.0, 19.8 % となった。その他の精密化の統計値を Table 1 に示した。

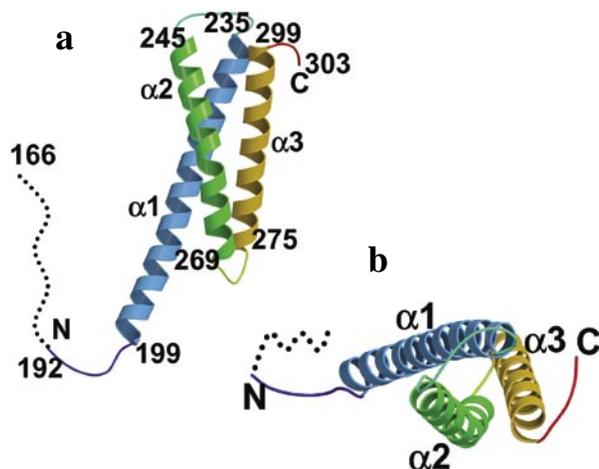
**3. 結果と考察**

**3.1 GGA1 タンパク質の GAT ドメインの構造**

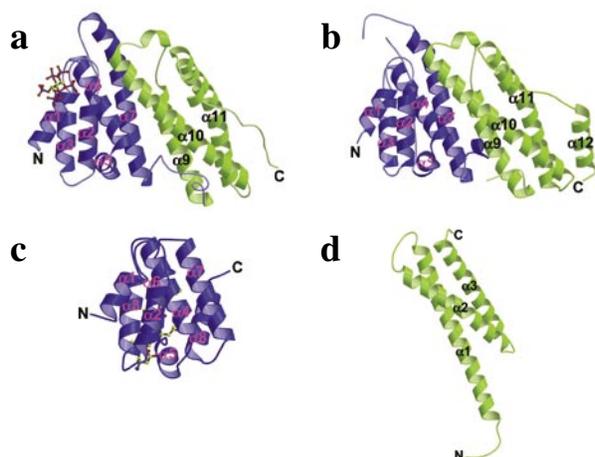
構造解析の結果、GGA1 の GAT ドメインは、3 本の  $\alpha$ -ヘリックスから構成されていることが明らかになった (Fig. 3)。Fig. 3b は、Fig. 3a を 90° 回転して 3 本のヘリックスを上から見た図である。N 末端のヘリックスは、他の 2 本のヘリックスのおよそ 2 倍の長さを持つ。また、N 末端の 26 残基は、電子密度が明瞭ではなく、結晶中でフレキシブルな構造をとっているものと考えられる。

**3.2 GAT ドメインと類似の構造を持つタンパク質**

GGA1 の GAT ドメインに良く似た立体構造のタンパク質を検索したところ、CALM[12] と LAP[13] タンパク質の一部が GAT ドメインと似ていることが分かった。これらのタンパク質は、ともに API80 のホモログであり、クラスリン被覆小胞形成に関与するタンパク質である。Fig.



**Figure 3**  
Ribbon diagram of human GGA1 GAT domain. The GAT domain forms three  $\alpha$ -helices connected by loops of varying length. The final model is complete except for the N-terminal 26 residues (166-191: dotted line) and the C-terminal 2 residues (304-305) whose electron density is very weak. (a) side-view, and (b) top-view.

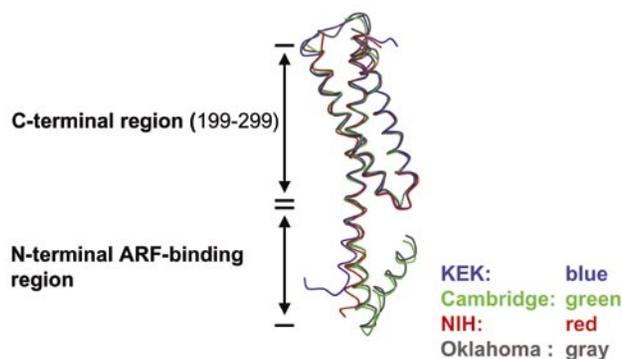


**Figure 4**  
Comparison of the GGA1 VHS-GAT domain with AP180 homologues. (a) Ribbon diagram of the N-terminal domain of CALM (PDB 1HG5, Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukaemia Protein). The  $\alpha 1$  to  $\alpha 7$  are shown in blue and  $\alpha 9$  to  $\alpha 11$  in green. Inositol hexakisphosphate molecule is shown in a ball-and-stick model. (b) Ribbon diagram of the N-terminal domain of *Drosophila* clathrin adaptor protein LAP (PDB 1HX8).  $\alpha 1$  to  $\alpha 7$  are shown in blue and  $\alpha 9$  to  $\alpha 12$  in green. (c) Ribbon diagram of the VHS domain of GGA1 complexed with the C-terminal cation independent-M6PR (CI-M6PR) peptide (PDB 1JWG) in the same orientation as in (a). CI-M6PR peptide is shown in a ball-and-stick model. (d) Ribbon diagram of the GGA1-GAT domain in the same orientation as in (a).

4a は CALM の立体構造、Fig. 4b は LAP の立体構造であり、緑色で示してある部分が GGA1 の GAT ドメイン (Fig. 4d) の立体構造と類似している。興味深いことに、N 末端側の青色で示してある部分は、GGA1 の VHS ドメイン (Fig. 4c) と良く類似した立体構造を有している。両者の構造を比較すると、緑色で示してある GAT ドメインの領域では、GGA1 の GAT ドメインの N 末のヘリックスが CALM や LAP と比較して少し長いということ以外では良く類似している。また、青色で示してある VHS の領域では、CALM と LAP では、GGA1 の VHS ドメインと比較すると、 $\alpha 6$  と  $\alpha 8$  が欠損していることと、 $\alpha 7$  が VHS と比較して少し長いということ以外、良く類似している。ただし、CALM は、ホスファチジルイノシトール -4,5- ニリン酸などのリン脂質を介して、膜に結合している。それに対して、GGA タンパク質は、GAT ドメインを介して、膜上に存在している GTP 結合型 ARF と相互作用し、膜にリクルートされる。これらの点で、GGA タンパク質と AP180 のホモログは、立体構造は類似しているが、膜への結合の観点から見ると大きく異なっている。

### 3.3 4つのグループが構造解析した GGA1 タンパク質の GAT ドメインの構造比較

我々のグループとほぼ同時に、英国ケンブリッジ大学のグループ、米国の NIH のグループ及び米国オクラホマ大学のグループは独立に GGA1 の GAT ドメインの立体構造を決定した [8-11]。4つのグループが決定した GAT ドメインの C 末端側の 3本のヘリックス構造は非常に良く一致しているが、N 末端側は大きく異なっている。C 末端側



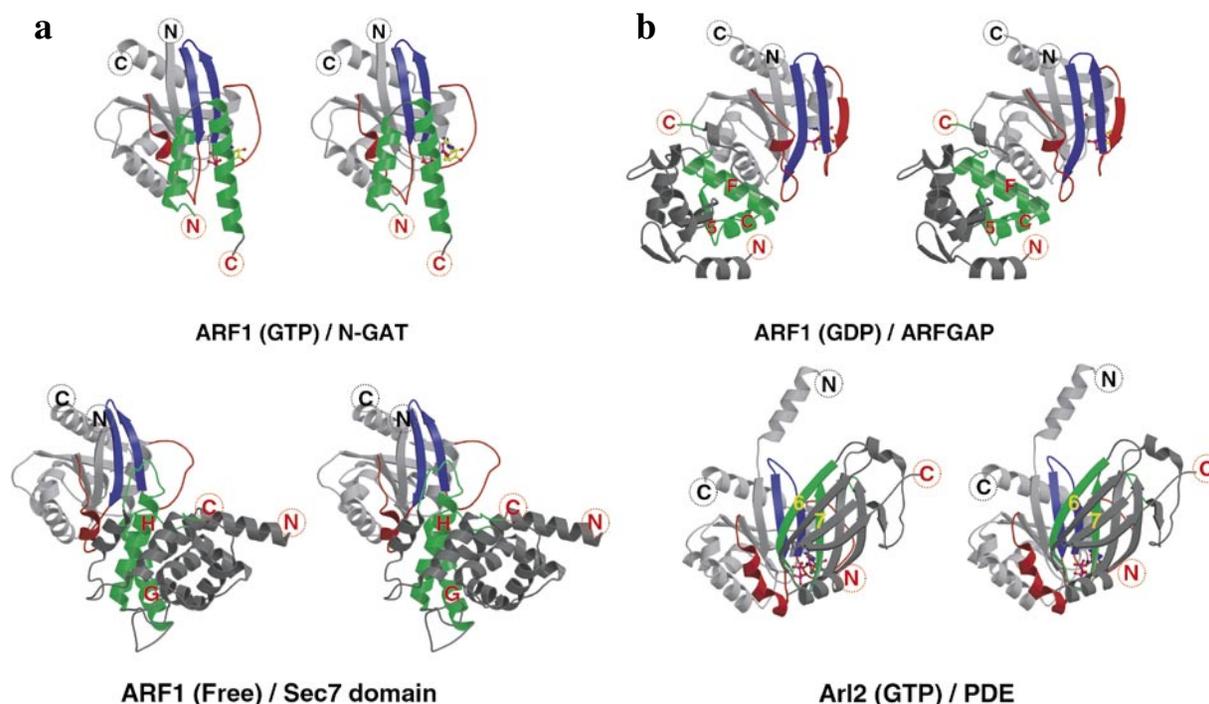
**Figure 5**  
Comparison of the crystal structures of GGA1 GAT domains determined by the four groups. The diagram was made by the least-square minimization of the overlap of C-terminal GGA1 GAT domains (199-299) from the four groups.

の 3本のヘリックスを重ね合わせた図を Fig. 5 に示す。ケンブリッジ大学のグループ [9] とオクラホマ大学のグループ [11] の晶系は hexagonal で空間群が  $P6_3$  であり、4つのヘリックスから構成されているが、我々のグループ [8] と NIH のグループ [10] の晶系は Rhombohedral で空間群が  $R3$  であり、3本のヘリックスから構成されていて N 末の領域は disorder している。我々が GAT ドメインの N 末端領域の円二色性 (CD) スペクトルを測定したところ、完全にはフォールドしていないことが分かった。したがって溶液中の GAT ドメインは、4本のヘリックスにフォールドした構造と、N 末端領域がアンフォールドした構造との平衡状態にあると考えられる。

### 3.4 N-GAT ドメインと ARF1 との複合体の構造

ARF と相互作用するのは GAT のフレキシブルな N 末端領域である。GAT ドメインと ARF は溶液中で安定な複合体を形成するが (平衡解離定数は約  $1 \mu\text{M}$ )、我々が試みた多数の結晶化条件下ではどうしても複合体の結晶は得られなかった。そこで ARF と相互作用する GAT の N 末端領域 (N-GAT) だけを発現・精製し、ARF と複合体を形成させて結晶化したところ、初めて複合体の結晶を作ることが出来た (Fig. 2c)。N-GAT と ARF1 の複合体の全体構造を、Fig. 6 に示す。Fig. 6b は、Fig. 6a を  $90^\circ$  回転して N-GAT の 2本のヘリックスを横から見た図である。また、ARF1 に結合している GTP と  $\text{Mg}^{2+}$  は、ball-and-stick モデルで示してある。Fig. 6c には、N-GAT の ( $F_o - F_c$ ) を係数とする omit 電子密度図 ( $1.5 \sigma$ ) を示した。このように、N-GAT の明瞭な電子密度を確認することができた。GAT ドメイン単体では、そのフレキシブルさのために構造を決定することはできなかった N 末端領域 (N-GAT) であるが、ARF1 と複合体を形成するとヘリックス-ループ-ヘリックスの構造を形成し、次に述べる様に ARF1 のスイッチ 1 領域とスイッチ 2 領域と相互作用していることが明らかになった。





**Figure 8**

Comparison of the ARF1/N-GAT complex with other complex structures of ARF and ARF-interacting proteins shown in stereo diagrams. In panels (a)-(d), regions which interact with ARF are highlighted in green and the rest in dark gray. The switches 1 and 2, and the interswitch region of ARF are shown in red and blue respectively and the rest is in light gray. Encircled "N" and "C" stand for the N- and C-termini. (a) ARF1/N-GAT complex (this work). (b) ARF1/ARFGAP complex [16]. (c) ARF1/Sec7 domain complex [17]. (d) Arl2/PDE $\delta$  complex [18].

競合し合うという生化学データ [15] も、GGA と ARFGAP がともに ARF のスイッチ 2 領域に結合するという立体構造から説明できる。

### 3.7 GAT ドメイン全体と ARF の結合モデル

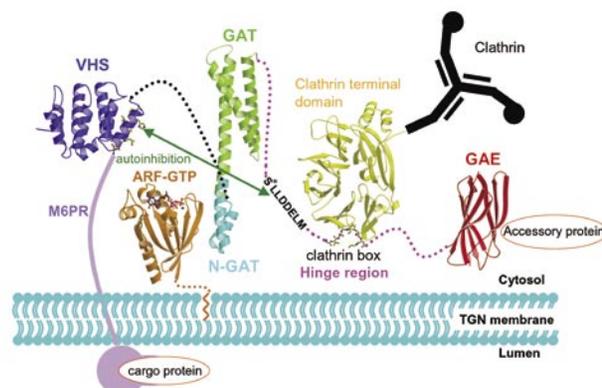
GAT ドメイン単体の構造と N-GAT/ARF 複合体中の N-GAT とで共通する 199-205 残基の部分を重ね合わせたモデルと、今までに得られた知見をまとめたものが Fig. 9 である。重ね合わせモデルでは、ARF と結合した GAT ドメインは 4 本のヘリックスからなる。これはケンブリッジ大学のグループ [9] とオクラホマ大学のグループ [11] の GAT ドメインの構造と類似する。フレキシブルな GAT の N 末端領域は、ARF と結合することによってヘリックス-ループ-ヘリックス構造として安定化されると考えられる。

## 4. まとめ

我々は、GGA1 の GAT ドメイン単体および、GAT ドメインの N 末端領域 (N-GAT) と ARF との複合体の X 線結晶構造を決定した。その結果、GAT ドメインの C 末端側は 3 本の  $\alpha$ -ヘリックスの束から成っていた。一方 N-GAT はフレキシブルな構造で、ARF と結合することによってヘリックス-ループ-ヘリックス構造として安定化されることが分かった。N-GAT は、ARF のスイッチ 1 および 2 領域と疎水性相互作用で結合していた。

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・輸送タンパク質との結合を行い、細胞内輸送を制御する (Fig. 9)。我々はこれまでで GGA のドメインごとの構造機能解析をほぼ終了した。GGA のドメインの間は長



**Figure 9**

Domain organization of GGA and a proposed model of the interactions with its partners during the vesicle formation. The N-terminal VHS domain recognizes the sorting signals such as M6PR (PDB 1JWG). The GAT domain interacts with a membrane-bound ARF (in this study). The subsequent hinge region interacts with clathrin (clathrin terminal domain complexed with clathrin-box peptide from  $\beta$ 3-hinge of AP-3, PDB 1C9I). The sequence S\*LLDDEL interact with VHS domain (autoinhibition) when S\* is phosphorylated [19]. Finally, the C-terminal GGA1 GAE domain is modeled from the structure of the ear domain of  $\gamma$ -adaptin (PDB: 1IU1) based on their similarity both in sequence and function.

いリンカーでつながっており、全ドメインを含む結晶構造解析は困難である。今後は GGA 全体の構造変化を X 線小角散乱などの手法で明らかにし、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。

## 引用文献

- [1] Robinson, M. S. and Bonifacino, J. S., *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 444-453 (2001).
- [2] 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).
- [3] Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino, J. S. and Hurley, J. H., *Nature*, **415**, 933-937 (2002).
- [4] Kato, Y., Misra, S., Puertollano, R., Hurley, J. H. and Bonifacino, J. S. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 532-536 (2002).
- [5] Zhu, G., He, X., Zhai, P., Terzyan, S., Tang, J. and Zhang, X. C. *FEBS Lett.* **537**, 171-176 (2003).
- [6] Nogi, T., Shiba, Y., Kawasaki, M., Shiba, T., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Takatsu, H., Nakayama, K. and Wakatsuki, S. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 527-531 (2002).
- [7] Kent, H. M., McMahon, H. T., Evans, P. R., Benmerah, A. and Owen, D. J. *Structure* **10**, 1139-1148 (2002).
- [8] Shiba, T., Kawasaki, M., Takatsu, H., Nogi, T., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Nakayama, K. and Wakatsuki, S. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 386-393 (2003).
- [9] Collins, B. M., Watson, P.J. and Owen, D. J. *Dev. Cell* **4**, 321-332 (2003).
- [10] Suer, S., Misra, S., Saidi, L. F. and Hurley, J. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4451-4456 (2003).
- [11] Zhu, G., Zhai, P., He, X., Terzyan, S., Zhang, R., Joachimiak, A., Tang, J., and Zhang, X. C. *Biochemistry* **42**, 6392-6399 (2003).
- [12] Ford, M. G. et al. *Science* **291**, 1051-1055. (2001).
- [13] Mao, Y., Chen, J., Maynard, J. A., Zhang, B. and Quiocho, F. *Cell* **104**, 433-440 (2001).
- [14] Puertollano, R., Randazzo, P. A., Presley, J. F., Hartnell, L. M. and Bonifacino, J. S. *Cell* **105**, 93-102 (2001).
- [15] Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K. and Nakayama, K. *Biochem J.* **365**, 369-378 (2002).
- [16] Goldberg, J. *Cell* **96**, 893-902 (1999).
- [17] Goldberg, J. *Cell* **95**, 237-248 (1998).
- [18] Hanzal-Bayer, M., Renault, L., Roversi, P., Wittinghofer, A. & Hillig, R. C. *EMBO J.* **21**, 2095-2106, (2002).
- [19] Doray, B., Bruns, K., Ghosh, P. and Kornfeld, S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 8072-8077 (2002).

## 著者紹介

志波 智生 (Tomoo SHIBA)

高エネルギー加速器研究機構・ポスドク研究員

〒305-801 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、2002年より現職。薬学博士。

川崎 政人 (Masato KAWASAKI)

高エネ研・物構研・助手、理学博士。

高津 宏之 (Hiroyuki TAKATSU)

理研・免疫アレルギー科学総合研究センター・ポスドク研究員、理学博士。

禾 晃和 (Terukazu NOGI)

マックスプランク生物物理学研究所・ポスドクドクトラルリサーチフェロー、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。

中山 和久 (Kazuhisa NAKAYAMA)

京都大院・薬学研究科・教授、医学博士。

若槻 壮市 (Soichi WAKATSUKI)

高エネ研・物構研・教授、Ph.D.

(2003年7月1日原稿受付)

## (Appendix)

**Table1 Data processing and refinement statistics****Crystallographic data**

	GGA1 GAT domain	ARF1 (Q71L)	N-GAT / ARF1
Space group	<i>R</i> 3	<i>C</i> 2	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Cell dimensions (Å)	<i>a</i> = 85.1, <i>c</i> = 59.1	<i>a</i> = 127.6, <i>b</i> = 50.8, <i>c</i> = 52.1	<i>a</i> = 49.4, <i>b</i> = 76.9, <i>c</i> = 61.9
(°)	$\alpha$ = 90, $\gamma$ = 120	$\beta$ = 113.4	
Solvent content (%)	51.9	41.2	47.8

**Data processing statistics**

	GGA1 GAT domain	ARF1 (Q71L)	N-GAT / ARF1
Wavelength (Å)	1.0 (PF-BL18B)	0.977 (PF-BL6A)	1.0 (PF-BL18B)
Temperature (K)	100	100	100
Resolution (Å)	30 - 2.1 (2.21 - 2.1)	30 - 1.5 (1.58 - 1.5)	30 - 1.6 (1.69 - 1.6)
Total reflections	64,602	155,298	194,166
Unique reflections	9,302	44,086	30,626
Completeness (%)	100.0 (99.6)	89.8 (62.8)	96.4 (83.1)
$R_{\text{merge}}$ (%)	4.5 (26.7)	4.3 (20.1)	4.8 (24.5)
<i>I</i> / $\sigma$	9.2 (2.8)	12.9 (3.1)	11.0 (3.0)

**Models**

	GGA1 GAT domain	ARF1 (Q71L)	N-GAT / ARF1
Number of protein atoms	887	2,664	1,663
Number of water molecules	108	313	278
Number of GTP atoms	-	64	32
Number of Ions molecules	-	Mg <sup>2+</sup> : 2	Mg <sup>2+</sup> : 1, $\Gamma$ : 2
Average <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )	46.5	13.2	16.8

**Refinement statistics**

	GGA1 GAT domain	ARF1 (Q71L)	N-GAT / ARF1
Resolution range (Å)	30 - 2.1	20 - 1.5	30 - 1.6
Reflections in working / free set	8,858 / 443	41,851 / 2,221	29,080 / 1,545
<i>R</i> -factor / $R_{\text{free}}$ (%)	24.7 / 29.4	19.0 / 21.1	19.8 / 22.7
R.m.s. deviation from ideal values			
Bond length (Å)	0.018	0.008	0.012
Bond angle (°)	1.74	1.23	1.56
Ramachandran plot			
Most favoured (%)	85.7	94.3	94.1
Additionally allowed (%)	13.3	5.7	5.9
Generously allowed (%)	1.0	0	0
Disallowed (%)	0	0	0

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

$R_{\text{merge}} = \sum_i \sum_j |<I_i> - I_{ij}| / \sum_i \sum_j I_{ij}$ , where  $<I_i>$  is the mean intensity *i*th unique reflection, and *I<sub>ij</sub>* is the intensity of its *j*th observation.