

氏 名 上島 珠美

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大乙第 219 号

学位授与の日付 平成24年9月28日

学位授与の要件 学位規則第6条第2項該当

学位論文題目 GDP-, GDP-Ca<sup>2+</sup>-bound and nucleotide-free intermediates of the guanine nucleotide exchange reaction in the Rab5/VPS9a cycle.

論文審査委員 主 査 教授 若槻 壮市  
准教授 川崎 政人  
教授 足立 伸一  
准教授 五十嵐 教之  
准教授 加藤 龍一  
教授 中野 明彦 東京大学

More than 100 small GTPases are reported in eukaryote and Rab proteins, which are ones of GTPases, play important roles in the vesicle transport. Specially, Rab5 was reported to work in the early endosome. All small GTPases have two nucleotide-bound forms, GTP-bound, active form and GDP-bound, inactive form. These active- and inactive- forms of small GTPase are called “molecular switch” and its states of small GTPase are regulated by guanine nucleotide exchange factor (GEF). To clarify the formation of the complex of small GTPase/GEF and to investigate the mechanism of the nucleotide exchange by GEF, we proposed that on the way to the nucleotide-free complex, a series of GDP-bound intermediates arise within the complex between *Arabidopsis thaliana* Rab5 and its GEF VPS9a. In these structures, VPS9a recognizes GDP b-phosphate directly via its aspartate finger and assists the P-loop lysine of Rab5 to stimulate release of GDP. However, it is unclear how VPS9a removes  $Mg^{2+}$  from GDP while keeping the GDP-bound in the small GTPase prior to formation of the nucleotide-free binary complex. Here, we report the structure of a metal-bound complex of Rab5-GDP/VPS9a in which the Asp finger of VPS9a also coordinates directly to the divalent metal ion. We propose that this structure corresponds to an earlier step, further upstream of the metal-free GDP-bound complex. We discuss the significance of the metal ion in the Rab5/GEF complex in the production of the final GTP-bound state. Moreover, we solved the domain swapped dimer of ARA7 and discuss its bi-function, GTPase activity and GDI-like activity based on the biological data for ARA7.

## 博士論文の審査結果の要旨

博士論文は、第1章の要旨、第2章の導入に続いて、第3章から第5章に分けて大きく3つの研究結果が報告されている。

第3章では植物の細胞内輸送に関与するRab5低分子量GTPaseであるARA7と、そのグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）であるVPS9aの複合体について、様々なGDPとそのアナログとの共結晶化とX線結晶構造解析について報告している。それにより、ARA7に結合したGDPが、VPS9aによってGTPと交換されるGEF反応の中間状態の各過程を詳細に追跡することが可能になった。

第4章では、GDPとカルシウムイオンが結合したARA7/VPS9a複合体の構造解析が述べられている。GTPaseとGEFの複合体にヌクレオチドや金属が入った状態での構造解析は例が少なく、特にRabファミリーGTPaseとGEFの複合体については世界で初めての報告である。

第5章では、GDP結合型ARA7について、一部の構造がunfoldしてスワップしたダイマーの結晶構造が得られており、X線小角散乱による解析から溶液中でも一部構造がunfoldする可能性を明らかにした。

以上、第3章から第5章の研究結果において、X線結晶構造解析については同センターの共同研究者の貢献が大きいものの、タンパク質の発現、精製、結晶化、タンパク質間相互作用に関する生化学実験などは上島氏が独力で行い、立体構造に基づいたGEF反応機構のモデルが検証されている。

上島珠美氏は高エネルギー加速器研究機構・構造生物学研究センターで9年間行ってきた研究成果に基づき、博士論文の発表を行った。発表は予備審査の指摘事項を踏まえて改善されており、博士論文の内容が順序立てて要領よく提示され、研究の意義、結果、考察が明確に示された。ヌクレオチド交換反応におけるカルシウムイオンの意味、ダイマー形成の意味など興味深い質問に対して、自分自身の理解に基づいて的確な回答が述べられた。このことから、本研究に関する十分な理解と広範な知識があることが示された。

以上の理由により、論文審査委員会では全員が合格と判断した。