

氏 名	井上 道雄
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第 847 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 24 日
学位授与の要件	高エネルギー加速器科学研究科 物質構造科学専攻 学位規則第 6 条第 1 項該当
学位論文題目	Structural and functional analysis of intra-cellular transport between Golgi apparatus and endosome/ lysosome system using synchrotron radiation
論文審査員	主 査 助教授 小林 克己 教授 松下 正 教授 古坂 道弘 教授 若槻 壮市 助教授 加藤 龍一 教授 中山 和久（京都大学）

論文内容の要旨

Living organisms are composed of many kinds of protein and metabolize these proteins to maintain their bodies. All eucaryotic cells have membrane-bound organelles, such as nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, endosomes and lysosomes. Proteins and lipids are mainly transported by membrane traffic between these organelles. The intracellular protein transport is important for cellular function and mistransported cargo proteins can cause serious nervous diseases. In order to elucidate the intracellular transport, I pursued crystallographic study of GGA (Golgi-associated, γ -ear-containing, ARF-binding) protein in the clathrin-mediated membrane traffic

Clathrin-mediated membrane traffic is responsible for protein transport from the plasma membrane or the *trans*-Golgi network (TGN) to the endosomal/lysosomal system. The recruitment of clathrin is mediated by GGA proteins and adaptor protein (AP) complexes. GGA and AP-1 complex are thought to cooperatively regulate the packaging of cargo receptors such as mannose 6-phosphate receptors (MPR) to transport vesicle at the TGN. GGAs are composed of three domains and one flexible region: the N-terminal VHS (Vps27p/Hrs/STAM) domain which recognizes C-terminal tail of cargo receptors such as MPR, the GAT (GGA and Tom1) domain which interacts with the GTP form of ARF on the TGN membranes, the proline-rich hinge region which interacts with clathrin, and the C-terminal GAE (γ -adaptin ear) domain which interacts with a number of accessory proteins that regulate membrane transport. Accessory proteins localize on TGN membrane, clathrin-coated vesicles, endosomal membrane and so on. Thus, GAE domain may regulate the formation, maintenance and disassembly of clathrin-coated vesicles through the interaction with various accessory proteins.

First, I determined the crystal structure of GAE domain of GGA1. GGA1-GAE forms an immunoglobulin-like β -sandwich fold composed of two β -sheets (strands β 1- β 2- β 3- β 5- β 6 and β 4- β 7- β 8) and one α -helix. This structure is similar to the γ 1-ear structure but GGA1-GAE forms a dimer in the crystal. The dimerization of GAE domain in crystal was the first observation. To elucidate the dimer formation of GGA1-GAE in solution, small angle X-ray scattering (SAXS) of GGA1-GAE was measured. I compared the Kratky plots of SAXS data with the crystal structure. The data shows GGA1-GAE also forms dimer in solution.

To elucidate the interaction mechanism between GGA1-GAE and accessory proteins, I measured the binding affinities of GGA1-GAE to accessory proteins and

determined the complex structure of GGA1-GAE with the accessory protein peptide. GGA1-GAE bound to accessory proteins mainly through hydrophobic interaction.

Recently, γ -ear domain of AP-1 which is homologous to GAE domain was shown to interact with the "WNSF" motif in the GGA1 hinge region. I found that GGA1-GAE interacts with GGA1 hinge region. I measured the binding affinity of GGA1-GAE to GGA1 hinge *in vitro* and determined the complex structure of GGA1-GAE with the GGA1 hinge peptide. The complex structure revealed that the accessory proteins and GGA1 hinge interacted with GGA1-GAE at the same binding site. I confirmed that the GGA-GAE and GGA1 hinge interaction competes with accessory protein using fluorescence spectroscopy. These suggest that the autoinhibition of GGA1-GAE by GGA1 hinge controls the clathrin mediated traffic pathway.

In summary, I researched GGA1 to understand clathrin-mediated transport. I analyzed structurally and functionally about the GAE domain of GGA1. I propose that the autoinhibition of GGA1-GAE by GGA1 hinge may regulate the clathrin-mediated transport.

論文の審査結果の要旨

細胞内の物質のやり取りを主に行っている細胞内膜輸送を理解するために、ゴルジ体からエンドソームへの輸送に関わるタンパク質 GGA1 について、放射光を用いた構造解析および機能解析を行った。GGA1 タンパク質の 4 つの機能領域の一つである GAE ドメインの立体構造を、放射光 X 線結晶構造解析の手法を用いて決定した。GAE ドメインの結晶構造は 8 つの β ストランドから主になっており、二つの β シートが重なった β サンドイッチ構造をしている事を明らかにした。また GAE ドメインが結晶中で二量体として存在しているばかりではなく、溶液中においても二量体として存在していることを放射光 X 線小角散乱の実験を行う事により示した。

GAE ドメインにはクラスリン小胞の形成・制御にかかわる AP-1 の γ 1-ear と相同な部分が存在しており、GAE ドメインと γ 1-ear ドメインは共通したアクセサリータンパク質と結合することが知られている。また γ 1-ear ドメインは結晶構造がすでに明らかになっており、アクセサリータンパク質との機能解析の研究も行われている。明らかにした GAE ドメインの立体構造と γ 1-ear ドメインの立体構造の比較を行った結果、両者はアミノ酸一次配列だけでなく立体構造においても類似していることが分かった。そして、GAE ドメインのアクセサリータンパク質の結合部位を推定することができた。

また GAE ドメインと相互作用するアクセサリータンパク質との機能解析を行った結果、GAE ドメインは認識する各アクセサリータンパク質ペプチドと解離定数 70-130 μ M で結合することを示したが、ペプチド溶液を用いたソーキング実験では構造解析に耐える複合体結晶を得ることが出来なかった。そこで、GAE ドメインとアクセサリータンパク質ペプチドとの共結晶構造解析を行ったところ、アクセサリータンパク質ペプチドは推定した結合部位に結合していたが、その相互作用様式は今まで予想されていた電荷による相互作用ではなく疎水的な相互作用であることを明らかにした。

さらに、 γ 1-ear ドメインが GGA1 内の hinge と呼ばれる領域に結合することが報告されていることから GAE ドメインも hinge 領域に結合することを考え、GAE ドメインと hinge ペプチドとの機能解析を行った。その結果、GAE ドメインは 180 μ M の解離定数で結合していることを新たに見いだした。GAE ドメインと hinge ペプチドとの共結晶構造解析を行ったところ、hinge ペプチドはアクセサリータンパク質と同じ結合部位に同様の疎水的な相互作用で結合していることを新たに見いだした。

また hinge ペプチドとアクセサリータンパク質の GAE ドメインへの結合が競合的であることをタンパク質の自家蛍光を用いた機能解析実験より明らかにした。

これらの結果から、GGA1タンパク質のGAEドメインが自分自身および他の分子と相互作用するという、これまでは知られていなかったGGAタンパク質の分子機構を明らかにし、それが細胞内輸送の制御にかかわる新たな可能性を示し、細胞内タンパク質輸送の研究に大きく貢献した。