

## 論文の内容の要旨

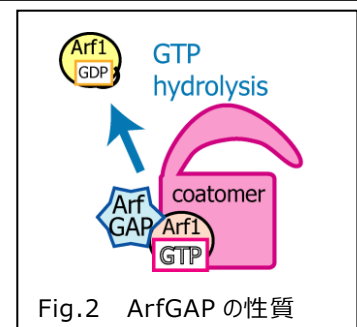
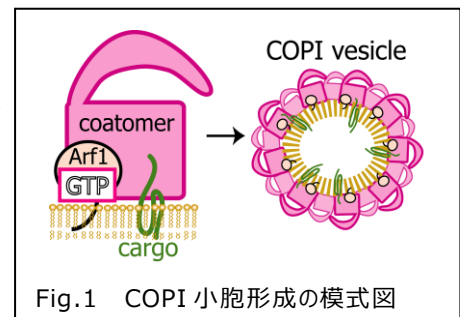
### 論文題目 COPI タンパク質の小胞形成制御機構の解明

氏 名 富永 紗衣

#### 【序】

ゴルジ体から小胞体への逆行性輸送は、coat protein complexes I (COPI) 小胞により行われる。COPI 小胞形成は、低分子量 GTPase である Arf1 と、7つのサブユニットから構成される巨大タンパク質複合体である coatomer、および積荷タンパク質 (cargo) が脂質膜上に大量に集積することにより行われる (Fig.1)。小胞形成の際、coatomer には、GTP 結合型の Arf1 と cargo の両方が結合する。

また、ゴルジ体選択的に COPI 小胞を形成させるためには、Arf-GTPase activating protein (ArfGAP) が必要であることが示されている。ArfGAP は、coatomer と複合体を形成した Arf1 の GTP 加水分解を促進する性質を持つ (Fig.2)。しかし ArfGAP がどのように小胞形成制御に関与しているかは不明である。これを解明するためには、ArfGAP と Arf1 および Arf1/coatomer 複合体との結合様式を明らかにする必要がある。



現在までに、Arf1 と coatomer の複合体の結晶構造が解かれており、coatomer が Arf1 の switch 領域と呼ばれる部位に結合することが明らかとなっている。また、ArfGAP の単独の結晶構造も解かれている。しかし、ArfGAP と Arf1、もしくは Arf1/coatomer 複合体との構造はいずれも解かれておらず、結合様式は不明である。

そこで本研究では、ArfGAP の、Arf1 および Arf1/coatomer 複合体との結合様式を明らかにして、ArfGAP が COPI 小胞形成を制御する機構を解明することを目的とした。

## 【方法】

GTP 結合型において脂質膜と結合する、N 末 17 残基を欠失させた Arf1 (以降単に Arf1 とする) を大腸菌により大量発現させ、陰イオン交換カラムおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。Arf1 を NMR 解析する際には、GDP/GTP 交換因子を用いて、GTP の非加水分解アナログである GTP $\gamma$ S 結合型に均一化した。

ArfGAP に関しては、非構造形成領域である C 末 279 残基を欠失させた [1-136] ArfGAP1 (以降単に ArfGAP とする) を大腸菌により大量発現させ、グアニジン可溶化、Ni アフィニティーカラムの後に変性巻き戻し、陰イオン交換カラム、サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。GTP 結合型の Arf1 に ArfGAP を添加して、Arf1 上の GTP の加水分解に伴う 340 nm の蛍光強度の減少を観測することにより、調製した ArfGAP が Arf1 の GTP 加水分解を促進する活性を確認した。

coatomer に関しては、coatomer 全体と同様に、Arf1 との結合、および ArfGAP 存在下における Arf1 の GTP 加水分解の促進を行うことが報告されている、 $\gamma$ サブユニットと $\zeta$ サブユニットの複合体 ([1-355] $\gamma$ -COP/[1-153] $\zeta$ -COP 複合体、以降単に coatomer とする) を昆虫細胞により大量発現させ、Ni アフィニティーカラムおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

Arf1、ArfGAP の主鎖アミド基に由来する NMR シグナルの帰属に関しては、均一  $^2\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  標識体を調製し、各種三重共鳴スペクトル (HNCACB, HNcoCACB, HNCA 他) を測定した上で、連鎖帰属法により行った。さらに Arf1 については Ile, Leu, Val の側鎖メチル基のみを  $^1\text{H}^{13}\text{C}$  標識した均一  $^2\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  標識体を調製して、各種三重共鳴スペクトル (HMCMcbcaNH 他) を測定した上で、主鎖アミド基の帰属に基づいて Ile, Leu, Val の側鎖メチル基に由来する NMR シグナルを帰属した。

## 【結果】

### 1. Arf1, ArfGAP, coatomer の調製

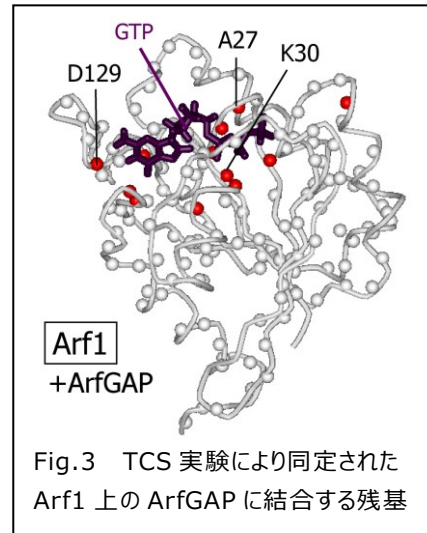
95 %以上の純度の Arf1 を、培地 1 L あたり約 36 mg の収量で得た。GTP $\gamma$ S 結合型の Arf1 (以降 Arf1-GTP $\gamma$ S とする) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルから、95 %以上の Arf1 に GTP $\gamma$ S が結合していることが示された。調製した Arf1-GTP $\gamma$ S について、連鎖帰属法により、観測可能な 160 残基中 159 残基の主鎖アミドシグナルを帰属した。また、Ile, Leu, Val の側鎖メチル基に関して、観測可能なシグナル 72 個中 69 個を帰属した。

また、95 %以上の純度の ArfGAP を、培地 1 L あたり 32 mg の収量で得た。蛍光変化実験により調製した ArfGAP の活性を確認した。連鎖帰属法により、131 残基中 122 残基の主鎖アミドシグナルを帰属した。

さらに、約 90 %の純度の coatomer を 600 mL culture あたり複合体として 24 mg ( $\gamma$ -COP:16 mg,  $\zeta$ -COP:8 mg)の収量で得た。調製した coatomer を Arf1 に添加して NMR スペクトルを取得した結果、Arf1 の switch 領域に由来する NMR シグナルに、シグナル強度減少および化学シフト変化が確認された。したがって、調製した coatomer が Arf1 結合活性を持つことが示された。

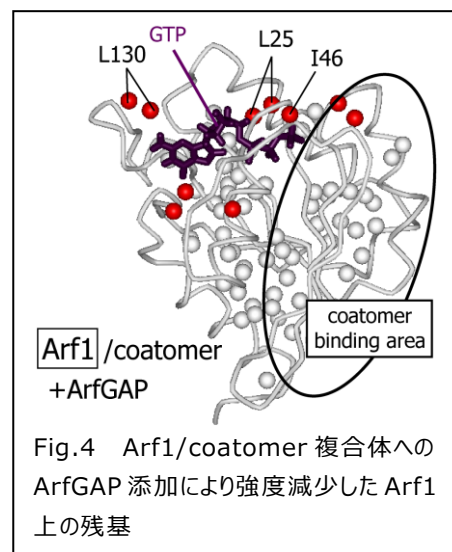
## 2. Arf1 と ArfGAP の結合様式の解明

均一  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識 Arf1-GTP $\gamma\text{S}$  に 1.5 等量の非標識 ArfGAP を添加して、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定した。その結果、Arf1 のシグナル強度が約 20 %減少したが、複合体のシグナルは観測されなかった。したがって、両者は解離定数 1 mM 以上の弱い親和性で結合することが示された。また、TCS 実験を行った結果、Arf1 の GTP 結合部位近傍に位置する A27, K30, D129 等のシグナル強度が、ラジオ波照射に伴い減少した。したがって、これらの残基が ArfGAP との結合界面に位置することが示された (Fig.3)。

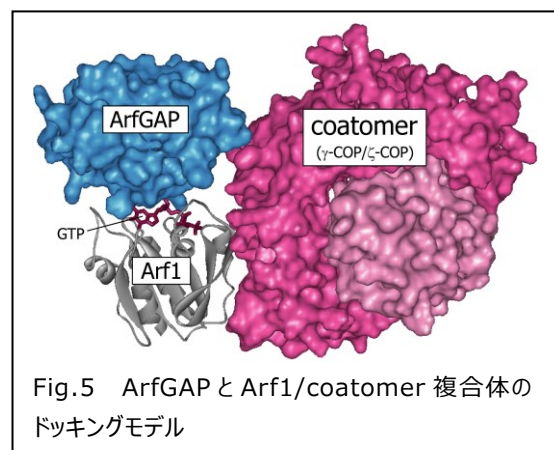


## 3. Arf1/coatomer 複合体と ArfGAP の結合様式の解明

次に、Ile, Leu, Val の側鎖メチル基のみを  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  標識した均一  $^2\text{H}$  標識 Arf1-GTP $\gamma\text{S}$  と非標識 coatomer の複合体に、ArfGAP を段階的に添加して、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC スペクトルを測定した。その結果、Arf1 のいくつかのシグナルに 50 Hz 程度の化学シフト変化が生じた。各シグナルは同等もしくは遅いタイムスケールの変化を示し、Arf1/coatomer 複合体に対して 4.0 等量の ArfGAP を添加した時点で、ほぼ全ての Arf1 が三者複合体を形成したことが示された。この結果から、ArfGAP と Arf1/coatomer 複合体の解離定数は 16  $\mu\text{M}$  以下であり、Arf1 単独とよりも強く結合することが示唆された。また、化学シフト変化が観測された残基は、Arf1 の GTP 結合部位近傍に位置する、L25, I46, L130 等であった。したがって、三者複合体においても、ArfGAP は Arf1 の GTP 結合部位近傍に結合することが示された (Fig.4)。



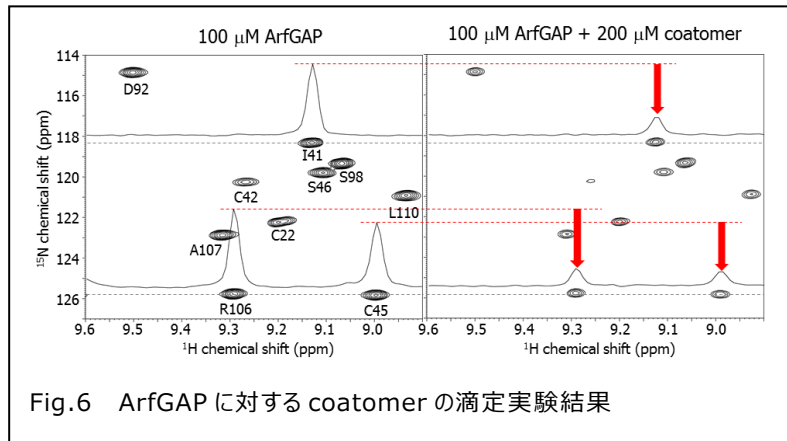
以上の実験により得られた、Arf1 上の ArfGAP 結合界面に関する情報に基づいて、ArfGAP と Arf1/coatomer 複合体の各結晶構造をドッキングさせて、三者複合体モデルを構築した (Fig.5)。その結果、得られたモデルでは、ArfGAP と coatomer が近接していた。また、Arf1/coatomer 複合体が Arf1 単独より強く ArfGAP と結合することが前述の実験により示された一方で、Arf1 単独の



結晶構造と、Arf1/coatomer 複合体の結晶構造では、Arf1 の GTP 結合界面近傍の構造はほぼ同等であることから、Arf1 と ArfGAP の結合様式における coatomer の影響は小さいことが示唆された。以上より、ArfGAP と coatomer が相互作用することが強く示唆された。

#### 4. ArfGAP と coatomer の相互作用の確認

ArfGAP と coatomer の相互作用を調べるために、均一  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識 ArfGAP に非標識 coatomer を添加して、スペクトルを取得した。その結果、coatomer 添加に伴い、ArfGAP の NMR シグナル強度が減少した (Fig.6)。したがって、ArfGAP と coatomer が相互作用することが示された。



#### 【考察】

本研究では、coatomer が Arf1 だけでなく ArfGAP とも結合することにより、Arf1 の活性部位が ArfGAP と接近した、GTP 加水分解反応の上で有利であると考えられる三者複合体を形成することを初めて示した。

coatomer が、Arf1 と ArfGAP の両方と結合することから、coatomer の濃度が高い条件では、Arf1 と ArfGAP が両方同時に結合した coatomer の割合が減少し、その結果 GTP 加水分解反応が進行しにくくなることが示唆された (Fig.7)。一方、coatomer はゴルジ体へ集積していることが知られている。したがって、ArfGAP は、coatomer が集積していないゴルジ体以外の部位で Arf1 の GTP を加水分解することにより、coatomer が集積したゴルジ体で選択的に COPI 小胞形成が進行するように制御している、と考えた。

