

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科 生体高分子構造学講座 (箱嶋 敏雄)		
氏名	伊原 健太郎	提出	平成11年 1月 7日
題目	Crystal structure of human RhoA complexed with a GTP analogue (活性型ヒトRhoA-GTPアナログ複合体の結晶構造)		
要旨	<p>低分子量G蛋白質は分子量2万から3万のGTP結合蛋白質の総称であり、アミノ酸配列の類似性からRas, Rhoなどの数種類のファミリーに分類される。いずれもMg<sup>2+</sup>の存在下でGTPとGDPに強く結合し、GTP結合型とGDP結合型の間の大きなコンフォメーション変化を利用して異なった標的蛋白質を認識する。Rhoは主に細胞骨格や細胞接着に関わる。我々はRhoファミリーの構造的特徴を明らかにし、標的特異性の決定機構を解明するためにRhoAとGTPアナログであるGTPγSとの複合体の結晶構造解析を行った。初期位相の決定はH-Ras-GPPNPを用いた分子置換法によって行い、構造の精密化により最終的に分解能2.4 Å, R=19.5 %, R<sub>free</sub>=26.8 %の構造を得た。Rhoファミリーの蛋白質はRasファミリーと比較して13アミノ酸残基の挿入があるが、この部位が1つのαヘリックスを形成することが明らかとなった。H-Ras-GTPの構造との比較により、Switch IとSwitch II, 及びその中間の逆平行βシートの3箇所に大きな構造の違いが見られ、これらの領域がRhoファミリーとRasファミリーの標的特異性を決定することが示された。また、RhoA-GDPとの構造比較によって、RhoAのSwitch IはAsp28からAla44, Switch IIはGly62からLeu69であることが判明し、スイッチ領域以外にはほとんど構造の変化が見られなかった。RhoAとRac1はそれぞれRhoサブファミリーとRacサブファミリーに属し、アミノ酸の同一性が56%である。Rac1-GPPNPとの構造の比較の結果、Switch I付近(Val33-Ile46)と13アミノ酸残基の挿入領域付近(Asn123-Gln136)に比較的大きな主鎖の動きが集中していた。これらの領域はRac1の標的蛋白質であるp67phoxの認識領域とも一致することから、標的特異性への関与が考えられる。GTPの認識はH-Rasと類似していたが、糖と塩基の2つの水分子を介した認識に違いが認められた。このような認識様式はRac1においても観測されており、Rhoファミリーに一般的な特徴であると考えられる。RhoAはボツリヌス菌のC3毒素によってAsn41がADPリボシル化されるが、Asn41がAsn39として保存されるRac1では行われない。Asn41の周辺を見ると、RhoA-GTPγSのPhe39は溶媒領域に突き出していたのに対し、Rac1-GPPNPの対応するPhe37は分子の内側に埋もれているという大きな違いが見られた。今回の構造解析により、GDP型、そしてGAPとの複合体である遷移状態型と合わせ、全てのヌクレオチド結合型の構造解析が行われたことになる。また、RhoAはRasファミリー以外で唯一スイッチ領域が決定された低分子量G蛋白質でもあり、今後のスイッチングに関する研究の指標になるものと思われる。</p>		

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 伊原 健太郎

平成11年1月7日に提出された論文は、X線結晶解析の方法を用いた活性型ヒト低分子量G蛋白質RhoA<sub>V14</sub>とヌクレオチドGTP $\gamma$ S及びマグネシウムイオンの複合体の三次元構造決定とその構造に基づいた分子機能のメカニズムの解明からなる。

三次元構造決定では、試料の十分な精製、良質な結晶の調製、高分解能の観測強度データの収集、分子置換法による位相決定、精度の高い三次元構造の精密化がなされており、技術的信頼性は高い。特に、分子置換法による位相決定では、構造相同性の高い既知構造を必要とし、通常、40%以上のアミノ酸配列の相同性がないと解析は困難であると考えられていたが、今回、アミノ酸配列の相同性が低い(27%) H-Rasの構造を用いて位相の決定に成功したことは、高度の解析技術を示している。蛋白質のX線による原子レベルの三次元構造決定とは、蛋白質の発現や精製などの生化学実験から、X線強度データ収集などの物理実験、そして位相決定や構造解析における数値計算を含んでいるが、それらの全ての方法について十分な実力を有するものと判断した。

分子機能とそのメカニズムについては、その精度の高い三次元構造に基づいて詳細な構造学的な議論と、多くの関連した生化学的データを引用した機能についての慎重な考察の結果として結論されており、十分な妥当性が認められる。これらは、スイッチ領域の同定とともに、H-Rasならびに、Rhoファミリーの他のG蛋白質であるRac1やCdc42との詳細な構造比較によって、Rhoファミリーに特徴的なグアニンヌクレオチドの認識様式、スイッチ領域の構造上の差異、Rhoファミリーに特徴的な挿入残基部位の構造特性とスイッチ機能の可能性を明らかにしており、また、Rhoを特異的にADPリボシル化するボツリヌス菌のC3毒素の選択性を構造の立場から説明したことである。また、論文全般におりて、記述の明解さも水準に達していると判断された。

以上のように、本論文は低分子量G蛋白質の構造生物学に貴重な基礎データを提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。