

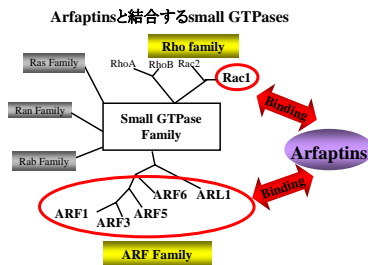
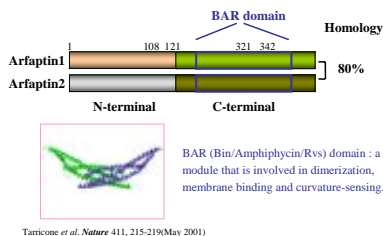
課題A基本的生命

小胞輸送を制御するタンパク質複合体の構造機能解析

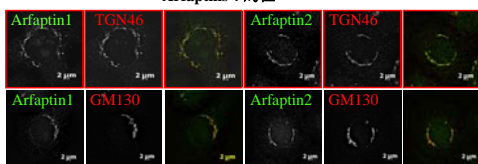
若槻壮市¹、中山和久²、加藤龍一¹、川崎政人¹、謝 勇¹、申 惠媛²、満 智秋²、武井朋美²、高橋千絵²
 (1高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所、2京都大学・薬学研究科)

細胞機能の調節における小胞輸送の役割

(1) ARFファミリーの低分子量GTPaseとそのエフェクターArfaptin/PORの相互作用の解析、および細胞内局在の解析を行った。これまではARFのエフェクターと考えられていた Arfaptin-1とArfaptin-2が、ARFよりもARL1と強い相互作用をすること、およびARL1依存的にTGNに局在することを見出した。

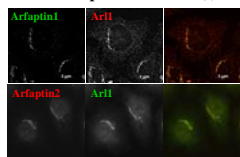


Arfaptinsの局在

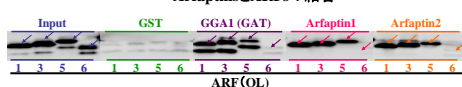


Arfaptin1もArfaptin2も主にゴルジ体特にtrans-Golgiに局在する

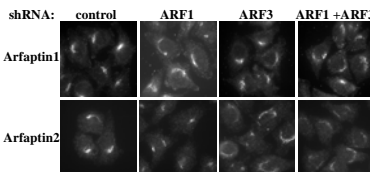
ArfaptinsとARL1共局在



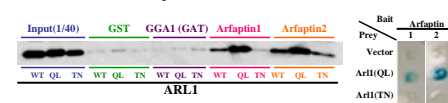
ArfaptinsとARFsの結合



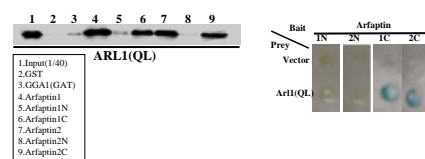
ARF1とARF3をノックダウンされた時Arfaptinsのゴルジ局在に影響なし



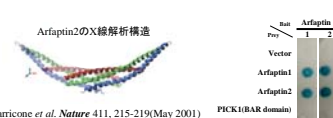
ArfaptinsはARL1-GTPと結合する



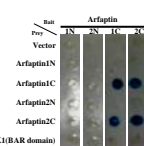
ArfaptinsがARL1-GTPと結合する部位はArfaptinsのC末端(BAR domain)である



Arfaptins同士はhomodimerを作るのみならず、heterodimerも作る

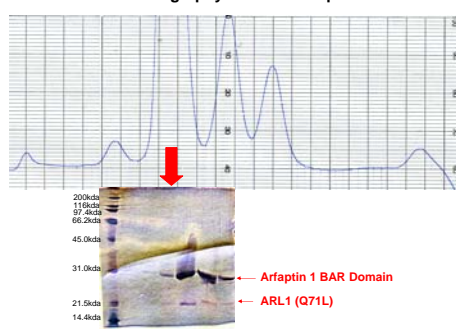


dimerの形成部位はC末端(BAR domain)である

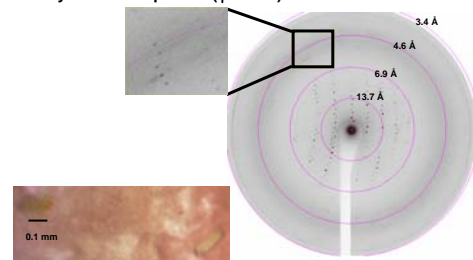


(2) Arfaptin1について、得られた精製タンパク質をARF1やARL1と混合後ゲル濾過クロマトグラフィーをすることによって、複合体を得ることに成功した。Arfaptin1のBARドメインとARL1の複合体については、8Å分解能の結晶を得ることに成功しており、現在結晶化条件を改善中である。また、精製後時間が経つとタンパク質が分解するケースが見出されたので、それらについては分解しない条件を検索すると共に、分解産物に相当するコンストラクトをデザインして大量発現実験を行っている。

Gel filtration chromatography of ARL1-Arfaptin 1 BAR Domain



X-ray diffraction pattern (φ: 0 - 1°)

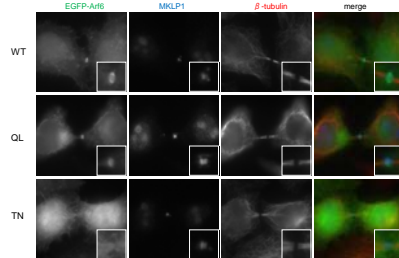
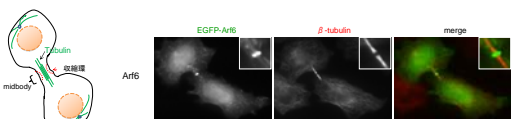


Cell parameters

	Arfaptin 1 BAR Domain-ARL1	Yeast ARL1 (1MOZ)	Arfaptin2 BAR Domain (1I49)
Space group	P4 et al.	P3 ₁	P3 ₂ 2 1
Cell parameters (Å)	a = b = 113.12, c = 65.10	a = b = 104.25, c = 45.19	a = b = 146.33, c = 82.73

細胞質分裂の制御

(3) ARF6がそのエフェクターであるキネシン様タンパク質MKLP1とともに、細胞質分裂時にミッドボディーのマトリックスに局在することを見出した。



Arf6 Q87L (GTP結合型: 活性型) はmidbodyに局在しMKLP1と共局在する
 Arf6 T27N (GDP結合型: 不活性型) はmidbodyに局在しない

Arf6とMKLP1とのInteraction

