

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790033

研究課題名（和文）

Pex19pによるペルオキシソーム膜タンパク質輸送メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Structural and functional implication of Pex19p protein

研究代表者

中野 博明 (NAKANO HIROAKI)

兵庫医療大学・薬学部・助手

研究者番号：10378789

研究成果の概要：

ペルオキシソーム膜に局在するタンパク質Pex3pは、ペルオキシソームの生成や膜タンパク質（PMP）の細胞内輸送に不可欠な因子である。Pex3pの細胞質側ドメインは、PMPの細胞内輸送キャリアであるPex19pと相互作用し、PMPをペルオキシソーム膜に誘導する。この相互作用に関連すると考えられるTrp104の変異体を調製し、Pex19pとの相互作用と細胞内でのペルオキシソーム形成能について詳しく評価した。幾つかの物理化学的な測定から、Pex3p細胞質側ドメインとPex19pは、1対1の安定な複合体を形成することが判明した。この情報に基づき、表面プラズモン共鳴を利用して両者の解離定数を求めた結果、3.4 nMという値が得られた。この結合力は、他の輸送キャリア：レセプター間の場合に匹敵する強さである。次に、Pex3pのW104AとW104Fの二種類の変異体について同様に解離定数を求めると、それぞれ1080 nM、66 nMという値が得られた。これは、Trp104の芳香環部分がPex19pとの結合に大きく寄与することを示す。さらに、pex3欠損CHO細胞でPex3p変異体を発現させ、ペルオキシソーム生成の有無を調べた。W104Fは野生型の場合と同様にペルオキシソームの回復が観察された。これに対し、W104Aでは回復が認められなかった。すなわち、Pex3pに依存したペルオキシソーム形成能とPex3p-Pex19p間の結合には、密接な関係があると示唆された。さらにPex3pとPex19pの複合体の単結晶が得られ、2.5 Å分解能のX線回折強度データが得られ、2.5 Å分解能での立体構造決定に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：Pex19p、Pex3p、ペルオキシソーム、相互作用、Biacore、沈降平衡法、X線結晶解析、CHO細胞

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは脂肪酸の代謝を担う生理的に重要なオルガネラである。脂肪酸のうち、極長鎖脂肪酸のペルオキシソームへの取り込みには、ALDPやPMP70などのペルオキシソーム膜挿入型タンパク質(PMP)と総称される膜タンパク質群が関わっており、ALDPの異常は、若年性の致死的疾患である副腎白質ジストロフィを引き起こす。PMPのペルオキシソーム膜への輸送や膜挿入に関わるのは、主としてPex19p、Pex3pという少なくとも2つのペルオキシシン(Pex)タンパク質である。Pexとは、その遺伝子欠損がペルオキシソームの形成異常をもたらすタンパク質の総称である。ペルオキシソームの形成異常は、Zellweger症候群という代謝性疾患の原因となっている。

リボソームで合成されたほとんどのPMPは、Pex19pと結合し細胞質中を輸送され、ペルオキシソーム膜上で膜透過装置であるPex3pに受け渡されると考えられている。しかし、PMPには遺伝子配列上の相同性は見られず、なぜ、多様なPMPがPex19pに特異的に認識されるのかは未だ不明である。従って、Pex19pが、PMPがもつとされるPMP輸送シグナル(mPTS)を認識する機構を解明することは、PMPの膜挿入メカニズムの理解を基盤とした医薬品開発に応用できるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PMPの輸送キャリアとされるPex19pとPMPとの間の相互作用解析を行うことにより、PMPがペルオキシソーム膜へ特異的に認識、輸送されるための機構を明らかにすることである。一般的に、膜タンパク質の翻訳後輸送は、翻訳されると同時に小胞体膜に挿入され、引き続いて目的のオルガネラあるいは細胞表面へと輸送される。一方、PMPは遊離型リボソームで合成される。翻訳が完了したPMPに存在するmPTSをPex19pが認識し、PMP-Pex19p複合体として細胞質中を移動しペルオキシソーム膜上の膜タンパク質であるPex3pへと受け渡されると考えられている。しかし、mPTSに特徴的な配列はみられずPMP輸送過程における分子間の認識メカニズムは未だ不明である。そこで、本研究課題では、Pex19pがどのようにしてmPTSを認識する

のかを明らかにすることを目的とする。そのために、さまざまなPMPを用いてPMPとPex19pとの間の相互作用解析を物理化学的測定により行う。これにより、PMPの膜輸送メカニズムの一端を解明することを目指す。

本研究においては、代表的なPMPとしてPMP22、PMP70及びALDPの3種類のタンパク質を用いる。それらのタンパク質から種々のフラグメントを切り出し、免疫沈降実験や表面プラズモン共鳴法を用いてPex19pとの結合領域の同定を行う。同定されたPex19pとの結合領域の残基を変異させた変異体を作成し、PMPがPex19pに結合するために必要な残基を予測する。得られた変異体に関してPex19pとの結合の有無を免疫沈降実験、表面プラズモン共鳴実験、NMRによる滴定実験などにより評価し、分子間相互作用に必要な残基を決定する。Pex19pに認識されるために必要な残基が明らかになれば、その残基を含む領域のPMPタンパク質フラグメントを用い、安定にPex19p-PMP複合体が存在する条件の検討を行う。これにより、安定にPex19p-PMP複合体が存在する条件が決定された後、X線結晶解析あるいはNMRによる三次元立体構造の決定を行う。以上のことから、PMPがPex19pにどのように認識、捕捉されるのか、ということを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PMP22、PMP70とPex19pの結合領域の同定
PMP22とPMP70についてPex19p結合領域の同定を行う。ALDPについては、Pex19pとの相互作用部位がYeast two hybrid法を用いた実験により同定されている(1)。二次構造予測を参考にしながらPMPのペプチド断片を多数設計し、膜貫通領域を含む断片についてはコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞合成系によりペプチドを調製する。膜貫通領域を含まない領域のものについては、無細胞合成系に加え大腸菌での発現も試みる。また特に短い断片については、ペプチド合成により調製する。それぞれの断片が精製したPex19pと結合するか否かを免疫沈降実験、表面プラズモン共鳴実験により評価し、結合が確認できた断片に関しては、限定加水分解によりPex19pとの結合に最低限必要な領域の絞り込みを行う。

(2) PMPとPex19pの相互作用解析

同定した結合領域について、新たにコムギ胚芽抽出液あるいは大腸菌を用いた発現精製系を再構築し、超遠心分析や表面プラズモン共鳴法などの手法を用いて結合解離に対する溶媒条件の検討を行い、安定に複合体が形成する条件を決定する。並行して、PMP 全長と Pex19p との結合についても相互作用様式を解析する。

この際、立体構造解析の対象とするタンパク質の物性が安定であることが明らかになった場合には X 線結晶解析を用いた立体構造決定を試みる。また、分子量その他の点で NMR による解析が適していると判断される場合には、並行して NMR による立体構造決定を目的とした実験を開始する。

(3) Pex19p-PMP の相互作用残基の特定

PMP の部分配列の相互作用解析の結果より、Pex19p との相互作用に関わると考えられる残基を、PMP 部分配列の二次構造予測などの方法により予測し、それらの点変異体を多数作製する。得られた変異体に関して Pex19p との結合の有無を評価、分子間相互作用に必須な残基を免疫沈降実験、表面プラズモン共鳴実験、NMR による titration 実験等の方法で決定する。

(4) 複合体の結晶化・結晶構造解析及び NMR による溶液中での構造解析

得られた複合体について、動的光散乱測定により物性の評価を行い、結晶化条件をスクリーニングする。結晶が得られたら、X 線結晶構造解析を行い、Pex19p が PMP を認識するために必要な構造要因を明らかにする。

(5) Pex19p による PMP 輸送メカニズムの解明

以上の結果をとりまとめ、PMP が Pex19p に捕捉され、ペルオキシソーム膜へと輸送される分子機構について明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、Pex3p-Pex19p の相互作用について検討を行った。そのためにまず、Pex3p の細胞質側領域のみを発現させた。Pex19p との結合実験をゲル濾過及び蛍光測定、分析超遠心沈降平衡法により行ったところ、Pex3p と Pex19p はストイキオメトリーが 1 : 1 で結合していることが明らかとなった。蛍光測定において Pex3p に Pex19p を加えていった場合に、特徴的なブルーシフトを起こしたことから、Pex3p の二つあるトリプトファンの中から (Trp104、Trp224) が Pex19p との相互作用に関与していると示唆された。そこで、これらを Ala に変えた変異体を作成し、Pex19p との相互作用を免疫沈降実験によって解析したところ、Trp104 のみが Pex3p との

結合に関与していることが明らかとなった。さらに Trp104 の周囲の残基を Ala に変異させてスクリーニングを行ったが、Pex19p との結合力を失った残基は存在しなかった。このことから、Pex3p の Trp104 は、直接 Pex19p との相互作用に関わっているということを明らかにした。さらに、Trp104 の変異体を調製し、Pex19p との相互作用と細胞内でのペルオキシソーム形成能について詳しく評価した。幾つかの物理化学的な測定から、Pex3p 細胞質側ドメインと Pex19p は、1 対 1 の安定な複合体を形成することが判明した。この情報に基づき、表面プラズモン共鳴を利用して両者の解離定数を求めた結果、3.4 nM という値が得られた。この結合力は、他の輸送キャリア：レセプター間の場合に匹敵する強さである。次に、Pex3p の W104A と W104F の二種類の変異体について同様に解離定数を求めると、それぞれ 1080 nM、66 nM という値が得られた。これは、Trp104 の芳香環部分が Pex19p との結合に大きく寄与することを示す。さらに、pex3 欠損 CHO 細胞で Pex3p 変異体を発現させ、ペルオキシソーム生成の有無を調べた。W104F は野生型の場合と同様にペルオキシソームの回復が観察された。これに対し、W104A では回復が認められなかった。すなわち、Pex3p に依存したペルオキシソーム形成能と Pex3p-Pex19p 間の結合には、密接な関係があると示唆された。さらに Pex3p と Pex19p の複合体の単結晶が得られ、2.5 Å 分解能の X 線回折強度データが得られ、2.5 Å 分解能での立体構造決定に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Sato Y, Shibata H, Nakano H, Matsuzono Y, Kashiwayama Y, Kobayashi Y, Fujiki Y, Imanaka T, Kato H.: Characterization of the interaction between recombinant human peroxin Pex3p and Pex19p: identification of TRP-104 IN Pex3p as a critical residue for the interaction. J. Biol. Chem. 283, 6136-6144. (2008)

[学会発表] (計 1 件)

佐藤康彦、柴田洋之、中野博明、松園裕嗣、柏山恭範、小林裕次、藤木幸夫、今中常雄、加藤博章：ペルオキシソーム膜タンパク質輸送に関与する Pex3p と Pex19p の相互作用様式、第 8 回蛋白質科学会大会、東京、平成 20 年 6 月 12 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 博明 (NAKANO HIROAKI)

兵庫医療大学・薬学部・助手

研究者番号：10378789