

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15747

研究課題名(和文)ペルオキシソームタンパク質取込機構におけるAAA-ATPase複合体の機能と構造

研究課題名(英文)Biochemical study of the AAA-ATPase complex in peroxisome protein import

研究代表者

潘 東青 (Pan, Dongqing)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：50710787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物において、細胞小器官ペルオキシソームの生合成は、正常な細胞機能に必要な不可欠であり、ペルオキシシンと呼ばれる一群のタンパク質によって、緻密なコントロールのもとで実行される。本研究では、細胞質で作られたペルオキシソームタンパク質をペルオキシソーム内腔に取り込む際に、レセプターリサイクル複合体として機能するAAA-ATPaseのPex1:Pex6複合体の分子機能を理解するために、出芽酵母のPex1p:Pex6p複合体の精製と構造解析を行い、Pex1p:Pex6p複合体とPex15pの相互作用について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルオキシソームの生合成を行うペルオキシシンタンパク質に突然変異が生じて機能欠損になると、致死性神経疾患Zellweger症候群が引き起こされることが知られている。ペルオキシシンの中でもPex1とPex6の遺伝子は大きく、Zellweger症候群のもっとも一般的な原因遺伝子として知られている。本研究では、Pex1:Pex6複合体の分子機能の理解を目指して、その分子構造の解明を行った。得られた分子構造から複合体の形成の仕方や複合体の動きを推測することができるようになり、Pex1とPex6の機能欠損によって引き起こされる疾患の病因の理解に大いに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The biogenesis of peroxisome is an essential cell function in eukaryotic cells and is carried out by a group of proteins, called peroxins, in a tightly regulated manner. In the process of peroxisome protein import, the AAA-ATPase Pex1:Pex6 complex functions as a receptor recycle machinery to relocate the receptor proteins from the peroxisome membrane to cytosol. In this study, we purified a yeast Pex1p:Pex6p complex and studied its function using structural biology techniques. We also studied the interaction between Pex1p:Pex6p complex and its recruiter, Pex15p.

研究分野：構造生物学

キーワード：ペルオキシソーム タンパク質輸送 AAA-ATPase

1. 研究開始当初の背景

真核細胞において、新生タンパク質が細胞小器官へ正確に局在化することは細胞機能の発現に必要不可欠であり、それを達成するために細胞小器官ごとに独特な輸送・取込機構が備わっている。ペルオキシソームには、タンパク質の高次構造を維持したまま、内腔タンパク質を膜通過させる特殊なタンパク質取込機構があり、真核生物でよく保存されたペルオキシシン (Pex) と呼ばれる一群のタンパク質のうち、約 15 種のがその取込機構を構成している。ヒトのペルオキシシンホモログの機能欠損は重篤な先天性ペルオキシソーム欠損症の原因となることが知られている。

ペルオキシソーム内腔タンパク質取込機構は、内腔タンパク質のシグナル配列を認識するレセプタータンパク質、膜上のチャネル形成複合体、レセプタータンパク質をユビキチン付加する複合体、そして、ユビキチン化したレセプタータンパク質を膜から引き抜くリサイクル複合体から構成される。この中で AAA-ATPase であるリサイクル複合体は ATP の結合と加水分解によって、内腔タンパク質が効率的に取り込まれるように取込サイクルを駆動する重要な複合体である。ペルオキシシンによる内腔タンパク質取込機構の機能メカニズムを理解するには未だに多くの重要な問いが残されている。特に Pex1 と Pex6 からなる 700 kDa を超える大きなリサイクル複合体の詳細な機能メカニズムは不明であり、ATP の結合や加水分解に伴う分子の動きを理解するには立体構造の解明が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、Pex1:Pex6 複合体の機能を理解するために、*Saccharomyces cerevisiae* の Pex1p:Pex6p 複合体の高品質サンプルの精製とその構造解析を目指した。AAA+ファミリーの ATPase である Pex1p:Pex6p は、3 つの Pex1p と 3 つの Pex6p によって 6 量体のリング状の複合体を形成する。近年いくつかの研究グループから Cryo-EM 単粒子解析による Pex1p:Pex6p の解析結果が報告され、Pex1p と Pex6p が一つおきに並んだ特殊なヘテロ六量体を形成することがわかった。しかし、得られた三次元の再構成像の分解能が低く、Pex1p:Pex6p 複合体の正確な分子モデルの構築には至っていない。特に、ATP の結合によりリング構造を維持するための D1 ドメイン、ATP と結合して加水分解を行う D2 ドメインの詳細な分子モデルの構築は、Pex1:Pex6 複合体がペルオキシソーム膜からレセプタータンパク質をアンフォールディングして引き抜く動きを理解するためには不可欠である。本研究では精製方法を工夫することで、高品質のサンプルを取得し、Pex1p:Pex6p 複合体の構造解析を目指した。

Pex1p:Pex6p 複合体が機能するには、ペルオキシソームへの局在化が必要である。*S. cerevisiae* では、C 末アンカー型のペルオキシソーム膜タンパク質である Pex15p が Pex1p:Pex6p 複合体と結合することで Pex1p:Pex6p 複合体を局在化させることが知られているが、詳細なメカニズムは不明であった。Pex15p がどのように Pex1p:Pex6p 複合体と結合するのか、その相互作用の解析を目指した。

3. 研究の方法

(1) *S. cerevisiae* による組換えタンパク質の発現

真核生物である *S. cerevisiae* はモデル生物として様々な研究のツールとして用いられてきた。本研究では液胞のプロテアーゼである Pep4p を欠損した Δ pep4 の *S. cerevisiae* 株を用いて、Pex1p と Pex6p の共発現を行った。GAL1 プロモーターの下流に PEX1 と PEX6 の遺伝子を挿入したプラスミドを *S. cerevisiae* Δ pep4 株に導入し、ガラクトース培地を用いて、Pex1p と Pex6p の発現誘導を行った。Pex1p と Pex6p の共発現を行う際に、mCherry タグを付加した融合タンパク質として発現させることで、蛍光顕微鏡による観察を行い、高発現株を選択した。

(2) ナノボディを用いた精製法

Pex1p:Pex6p 複合体に付加した mCherry タグに対して特異的に結合するナノボディをレジンに固定し、アフィニティ精製を行った。プロテアーゼ処理により mCherry タグの除去を行ったのちに、ゲルろかクロマトグラフィーを行い、不純物の除去を行った。得られた Pex1p:Pex6p 複合体を濃縮し、構造解析や相互作用解析に用いた。

(3) クライオ電子顕微鏡単粒子解析法

銅製の凍結グリッドに Pex1p:Pex6p 複合体の濃縮サンプルを乗せてインキュベートし、ろ紙によって余分なサンプルを除いてから、素早く液体エタンに落とし込むことで観察用グリッドを作製した。得られたグリッドはクライオ電子顕微鏡 CRYO ARM 300 (日本電子)を用いて観察を行い、K3 検出器 (Gatan) によってデータセットを収集した。得ら

れたデータセットは Relion を用いて解析することで、3D 密度マップを再構成した。密度マップをもとに分子モデルを構築した。

(4) プルダウンアッセイ、化学架橋質量分析法による相互作用解析

精製した Pex1p:Pex6p 複合体は、グルタチオンセファロースのビーズに固定化した Pex15p の種々の変異体と混合し、プルダウンアッセイを行った。Pex15p に結合した Pex1p:Pex6p 複合体の量は SDS-PAGE によって検出し、評価を行った。

また、Pex1p:Pex6p 複合体と野生型の Pex15p を混合し、化学架橋剤である disuccinimidyl dibutyric urea (DSBU)を混合液に添加して架橋反応を行った。得られた架橋産物は Lys-C とトリプシンによって断片化し質量分析測定を行った。LC-MS/MS 測定によって得られたペプチド情報を MeroX により解析し、Pex1p:Pex6p 複合体と Pex15p の架橋部位の同定を行った。

4. 研究成果

(1) Pex1p:Pex6p 複合体の精製と構造解析

S. cerevisiae Δpep4 株に発現させた mCherry タグ付きの Pex1p:Pex6p 複合体は、蛍光顕微鏡で観察すると、主に細胞質に局在していたが、一部の細胞では細胞中のペルオキシソーム様の小さい斑点状の局在を示した。mCherry タグの蛍光シグナルが強く、多くの細胞に均一に発現している株を高発現株として選択した。Pex1p:Pex6p 複合体の高発現株を大量培養し、細胞破碎を行った後、mCherry タグに特異的に結合するナノボディによって、細胞破碎液から Pex1p:Pex6p 複合体を精製することができた。ゲルろかクロマトグラフィーを行い、最終的に得られた Pex1p:Pex6p 複合体を SDS-PAGE で確認したところ、Pex1p と Pex6p が 1:1 の量で複合体を作ることが確かめられた。また、ゲルろかクロマトグラフィーのスタンダードタンパク質の溶出体積と比較したところ、669 kDa の thyroglobulin の溶出体積と近く、得られた Pex1p:Pex6p 複合体は予想通り六量体を形成していると推測された。

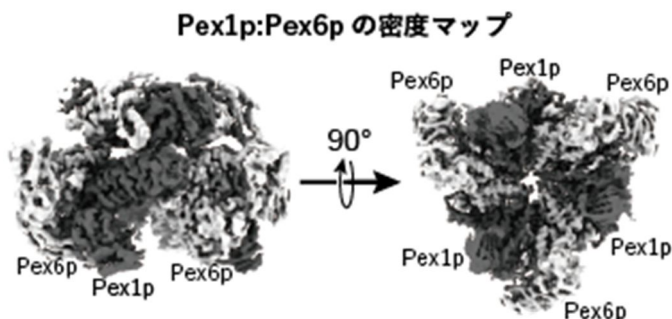
精製した高純度の Pex1p:Pex6p 複合体を用いてクライオ電子顕微鏡で観察したところ、先行研究で示された正三角形の粒子を確認することができ、大半の粒子は同様な大きさであることが確認できた。CRYO ARM 300 を用いて測定を行い、7000 を超える電顕画像を収集した。Relion を用いて、100 万を超える Pex1p:Pex6p 複合体の粒子画像を抽出し、2D classification により選別した粒子画像を用いて Pex1p:Pex6p 複合体の 3D 密度マップを再構成した。得られた密度マップをもとに分子モデルを作成した。

Pex1p:Pex6p 複合体の構造は先行研究で報告された通り、Pex1p と Pex6p が一つおきに並んだヘテロ六量体構造であった。Pex1p と Pex6p の D1 ATPase ドメイン同士でリング状構造を形成し、6 つの ATP が Pex1p と Pex6p の 6 つ相互作用面にサンドイッチされ、加水分解されずに結合していることが確認できた。Pex1p と Pex6p の D1 ATPase ドメインは ATP の加水分解に必要なアミノ酸残基が保存されていないため、加水分解しないと考えられていたが、今回初めて構造情報をもとに確かめることができた。一方で、Pex1p と Pex6p の D2 ATPase ドメインもリング状に相互作用していたが、螺旋状の配置になっていた。D1 リングと比較するとマップの精度が低いですが、こちらでも ATP の密度が観察された。

(2) Pex1p:Pex6p 複合体と Pex15p の相互作用解析

Pex15p の膜外領域を大腸菌の発現系により発現し、様々な大きさの Pex15p 断片を精製することができた。それらの Pex15p 断片をグルタチオンセファロースビーズに固定し、Pex1p:Pex6p 複合体との相互作用をプルダウンアッセイにより評価したところ、Pex15p の N 末端天然変性領域と中央部の球状ドメインの両方の領域が Pex1p:Pex6p 複合体との相互作用に関わっていることが確かめられた。

DSBU を用いた化学架橋質量分析法によって、Pex1p:Pex6p 複合体と Pex15p の相互作用解析を行ったところ、200 を超える DSBU 架橋を検出することができた。クライオ電子顕微鏡法によって得られた分子モデルに検出した DSBU 架橋をマップしたところ、分子モデル中の Pex1p と Pex6p の相互作用を裏付けることができた。Pex15p と Pex1p:Pex6p 複合体の間の架橋も検出でき、Pex15p の結合部位が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Pan Dongqing, Oyama Ryo, Sato Tomomi, Nakane Takanori, Mizunuma Ryo, Matsuoka Keita, Joti Yasumasa, Tono Kensuke, Nango Eriko, Iwata So, Nakatsu Toru, Kato Hiroaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structure of CmABCB1 multi-drug exporter in lipidic mesophase revealed by LCP-SFX	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 134 ~ 145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/s2052252521011611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 優作、加藤 博章、潘 東青
2. 発表標題 ペルオキシソームへのタンパク質輸送に関わるPex1p:Pex6p:Pex15p複合体の再構成
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 水沼 諒、小田 島圭、三和 空知、潘 東青、瀧川 紘、中津 亨、高須 清誠、加藤 博章
2. 発表標題 ABC多剤排出トランスポーター薬物複合体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 水沼 諒、潘 東青、小川 治夫、加藤 博章
2. 発表標題 立体構造に基づいたABC多剤排出トランスポーターCmABCB1の基質輸送に関わる残基の役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 潘 東青、筒井 隼一、宮田 知子、牧野 文信、難波 啓一、小川 治夫、加藤 博章
2. 発表標題 Candida albicansの多剤排出ABCトランスポーターCdr1pのクライオ電顕による単粒子解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 筒井 隼一、陳 月、中津 亨、加藤 博章、潘 東青
2. 発表標題 Candida albicansの多剤排出型ABCトランスポーターCdr1pの精製と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 陳 月、潘 東青、加藤 博章
2. 発表標題 ナノディスクに挿入したP糖タンパク質CmABC1のATPase活性に対する脂質成分の影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 小田島 圭、潘 東青、三和 空知、水沼 諒、瀧川 紘、高須 清誠、加藤 博章
2. 発表標題 親和性標識によるP糖タンパク質CmABC1の基質結合様式の同定
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 水沼 諒、小田島 圭、三和 空知、潘 東青、瀧川 紘、中津 亨、高須 清誠、加藤 博章
2. 発表標題 多剤排出トランスポーターCmABC1と基質アナログの結晶構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関