

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440030

研究課題名(和文)ペルオキシソーム形成過程のペルオキシソーム膜蛋白質特異的輸送の構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural study of the peroxisomal membrane protein specific transport system in the peroxisome biogenesis

研究代表者

丹羽 一 (NIWA, Hajime)

京都産業大学・総合生命科学部・研究員

研究者番号：30610266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：普遍的なミトコンドリア外膜タンパク質の品質管理機構の解明のために、酵母Msp1、ヒトATAD1の結晶構造解析を行い、酵母Msp1では原子モデルを構築でき、その結晶構造はp97-D2ドメインと非常に似ていることを見出した。またペルオキシソームマトリックス蛋白質の移送に必須のPex7pに結合する新規AAAタンパク質として単離されたP7BP2の高速AFM観察では、AAA六量体リング構造の典型的な中央に穴のあるリング構造が観察され、1本のポリペプチド鎖で疑似六量体リング構造をとる、ダイニンタイプの新規AAA蛋白質であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To analysis the quality control of mitochondria outer-membrane, we have crystallized Yeast Msp1 and human homologue ATAD1. Yeast Msp1 can be almost solved the structure and revealed the atomic-model which is similar to the p97-D2 domain. Pex7p is the cytosolic receptor protein that is essential for the import of peroxisomal proteins. Newly isolated as a binding protein of Pex7p, termed P7BP2, was found to be a disk-like ring with a central hole under high-speed atomic force microscope (AFM), and implicate that P7BP2 is a novel dynein-type AAA+, whose domains are arranged into a pseudo-hexameric ring structure.

研究分野：生物学

キーワード：タンパク質複合体 結晶構造解析 高速AFM ペルオキシソーム ミトコンドリア AAAタンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核細胞は多様に分化した膜構造で仕切られたオルガネラで構成され、各オルガネラに特定のタンパク質が局在化することにより、高度な空間的秩序に基づく生命活動が実現されている。こうしたオルガネラの一つ、ペルオキシソームでは、ペルオキシソーム形成必須因子(Pex タンパク質)を始めとしたペルオキシソーム膜蛋白質 (Peroxisomal Membrane Protein; PMP) の適切な局在化が、わずか3つの因子で行われている比較的単純な系であり、オルガネラタンパク質輸送制御機構のよいモデル系となっているが、それら必須因子の立体構造は未解明であった。また PMP の品質管理機構はほとんど不明で、別のオルガネラに誤局在した PMP の管理機構も不明であった。

(2) ペルオキシソームマトリックスタンパク質の適切な輸送には Pex1/Pex6 複合体が必須で、膜タンパク質の品質管理には p97 が関与している可能性が指摘されているが、どちらも AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities) タンパク質と呼ばれる ATPase タンパク質ファミリーに属す。こうしたオルガネラタンパク質分配機構に関わる AAA タンパク質の役割が徐々に知られるようになり、研究代表者らのグループが Pex7 結合タンパク質のひとつとして新規 AAA タンパク質、Pex7 binding protein 2 (P7BP2) を単離した。

2. 研究の目的

(1) (日) 研究代表者らは PMP の局在化に必須の因子の結晶構造解析、高速 AFM 解析を行い、ペルオキシソーム蛋白質の特異的局在化機構を構造生物学的に解明することを目的とする。必須因子とはシャペロンとして細胞質中で合成される PMP を折りたたみ、可溶化、安定化し、ペルオキシソームまで運ぶ Pex19p、そのペルオキシソーム膜上の標的分子である Pex3p、Pex16p である。

(1) (月) 最近報告された、ミトコンドリア外膜にある AAA タンパク質、分裂酵母 Mitochondrial Sorting of Proteins 1 (Msp1) は、ミトコンドリアに誤局在した PMP の外膜からの引き抜き、分解を行い、ミトコンドリア外膜の品質管理に働く考えられるが、その結晶構造解析、高速 AFM 解析でオルガネラ膜品質管理機構の解明を目指す。

(2) 新規 AAA タンパク質 P7BP2 は AAA ドメインを3つ擁する、アミノ酸 2000 残基近い長大なタンパク質であるが、ダイニンタイプの新規 AAA タンパク質なのか、これまで見つかっていない3つの AAA リングを持つ第三のタイプなのか、その構造はまったく不明である。そこで高速 AFM 解析を行い、P7BP2 の三次元構造を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) (日) Pex19、Pex3 及び Pex16 を大腸菌で

発現させ、単独または複合体として単離、精製した。Pex19 は代表的な PMP として Pex11 との複合体を調整し、結晶構造解析を行った。また Pex19、Pex3 をタンデムにつないで1本のペプチド鎖として発現、精製させ、構造解析に用いた。

(1) (月) 酵母 Msp1 のヒトホモログ ATPase family AAA domain-containing protein 1 (ATAD1) を大腸菌で発現、精製し、結晶化に用いた。また分裂酵母をはじめとした複数の酵母から Msp1 ホモログを単離、発現させ、結晶化に最適な種を選定した。

(2) P7BP2 を大腸菌で発現させ、精製、構造解析に用いた。高速 AFM 解析ではヌクレオチドの有無、基盤への吸着にタグの利用や、アミノシランなど化学的修飾を施し、マイカ膜への固定を最適化した。

4. 研究成果

(1) (日) Pex19p はシャペロンとして細胞質中で合成される PMP を折りたたみ、可溶化、安定化し、ペルオキシソームまで運ぶ。すべての PMP が基質となるが、配列特異性などを持たないことから、結晶構造が報告された C 末側の比較的な安定なドメインに対してプロテアーゼ感受性の N 末側の柔軟な構造が基質を捕まえると考えた。Pex19p のアミノ酸配列から、N 末側は基質なしでは特定の構造を持たない Intrinsic Disorder 領域であることも示唆された。そこで結晶化ターゲットとして Pex19p 単独の精製と並行して PMP-Pex19p 複合体の精製も行った。代表的な PMP としてペルオキシソームの分裂、増殖に関与する Pex11 $\alpha$ p を基質として Pex11 $\alpha$ p-Pex19p をゲルろ過で単離したところ、Pex11 $\alpha$ p と Pex19p が 1 対 1 の比で結合した安定な複合体が得られた。これまで膜上の Pex19p 受容体である特別な PMP、Pex3p と Pex19p との複合体が唯一報告されていたが、Pex3p の Pex19p 相互作用領域は通常の PMP の Pex19p 相互作用部位とは異なることから、基質 PMP を捕まえた Pex19p を初めて検出したことになる (図)。

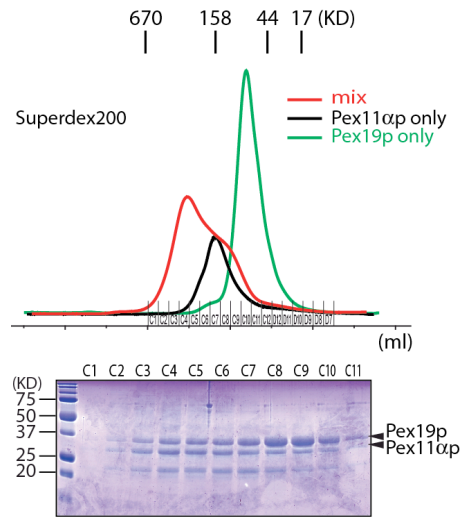


図 Pex11 $\alpha$ p-Pex19p 複合体中、両者の存在比は1:1

更に我々は Pex14p-Pex19p 複合体の精製にも成功し、このとき膜タンパク質である Pex14p を擁する複合体が界面活性剤を含まない溶液中でも安定に存在できることを示した。このことは Pex19p が細胞質中で PMP の疎水性領域をマスクし、安定化する過程を再現できたことを示している。更に Pex19-Pex3 タンデムタンパク質もゲルろ過で均一な構造をとっていることがわかり、その高速 AFM 観察では、それぞれ Pex19、Pex3 と考えられる球状の構造物が観察できた。

(1) (月) PMP は本来 Pex19p によってペルオキシソームへと運ばれるが、ミトコンドリア外膜に局在する AAA タンパク質 Msp1/ATAD1 が、ミトコンドリアに誤局在した Pex15p (出芽酵母) /Pex26p (ヒト) をミトコンドリア外膜から速やかに分解、除去することが報告された。Msp1/ATAD1 は酵母からヒトまで、真核生物種間で高度に保存されていることから、普遍的なミトコンドリア外膜タンパク質の品質管理機構の存在が示唆された。そこでミトコンドリア関連分解 (MAD) の新しい理解を得るために Msp1/ATAD1 の構造、機能解析に着手した。まずは N 末端側膜貫通領域を除去した Msp1/ATAD1 について、大腸菌の発現系を用い、酵母からヒトまでの様々なホモログ (計 8 種類) を精製、結晶化スクリーニングを行い、耐熱性酵母 *K. marxianus* 由来の Msp1 と、ヒトホモログ ATAD1 から結晶構造解析に適した結晶を得た。大型放射光施設での回折実験の結果、*K. marxianus* Msp1 の結晶から 2.8 Å 高分解能データを取得、現在、全 320 残基中 230 残基の原子モデルを構築し、構造精密化を行っている (図)。

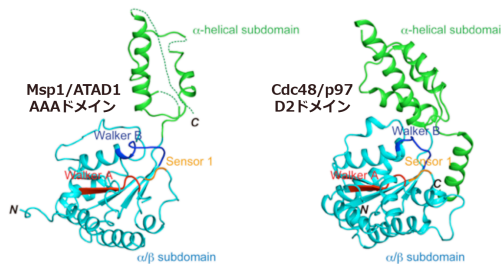


図 Msp1/ATAD1の結晶構造はCdc48/p97のD2ドメインとよく似ている

またヒト由来 ATAD1 の結晶は、機能を反映した 6 回対称性を持つことが示唆されており、構造機能相関から、機能の推定に重要な情報が得られると期待している。また出芽酵母 *S. cerevisiae* の結晶も同様に六角柱状の結晶が得られており、まだ低分解能に留まっているが、高分解能データ取得の暁には、ヒトホモログとの構造比較など、その生物学的機能解析に重要な構造情報を得られると期待している。また Msp1/ATAD1 はペルオキシソームにも局在することが示唆されており、ペルオキシソーム膜上でのタンパク質品質管理にも働いている可能性が考えられ、実際、ペルオキシ

ソーム上に正しく配置された Pex15p/Pex26p の分解に関わっていることを示唆する初期データが得られている。今後は、X 線結晶構造解析で Msp1/ATAD1 の原子レベルでの三次元構造を決定するとともに、高速 AFM を用いて ATP 加水分解における構造変化を観察する。またこれまで報告されている基質との複合体の AFM 像を仔細に観察することで、基質の認識、取り込み/送り込み機構の解明につなげる。また結晶構造をもとに、基質タンパク質の認識やミトコンドリア外膜からの引き抜きに重要な残基を推定し、その変異体を解析する。Pex15p を基質としてその分解活性を定量できる系が完成したので、更に Msp1/ATAD1 のミトコンドリア外膜、内膜上の新たな基質の探索、タンパク質分解系とつながる因子の探索を行う基盤が整った。

(2) ペルオキシソームマトリックス蛋白質の移送に必須の Pex7p に結合する新規タンパク質として単離した P7BP2 の構造解析では、高速 AFM 観察で、1 本のポリペプチド鎖で疑似六量体リング構造をとる、ダイニンタイプの AAA 蛋白質であることがわかった。それは高速 AFM 観察から、AAA 六量体リング構造の典型的なサイズである直径約 16 nm、高さ約 3 nm の円板型で、中央に穴のあるリング構造が観察されたことから明らかとなった (図)。

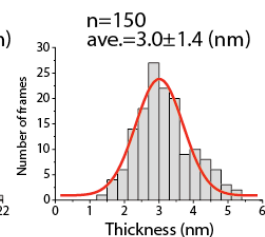
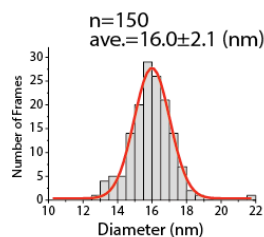
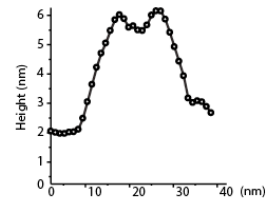
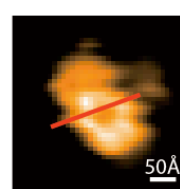
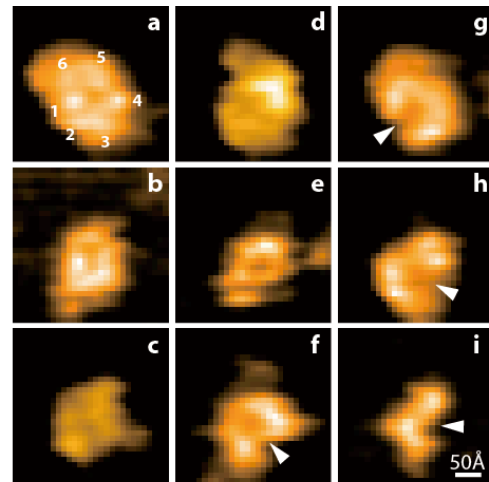


図 P7BP2は中央に穴のあるリング構造

この構造が1本のポリペプチド鎖からなることはリングが開裂し、伸びたような構造が観察されたことからわかった。ゲルろ過でP7BP2タンパク質が溶液中、単量体で存在することも、疑似六量体リング構造を取るダイニンタイプであることを支持する。ただダイニンと同じ疑似六量体リング構造といえども、P7BP2は明確なAAAドメインと、AAAドメインとは非常に相同性の低い構造ドメインとからなり、リングを構成する6つのAAAドメインが互いに似通っていて進化的に同じルーツを持つと考えられるダイニンとは成り立ちが違うようだ。これまでダイニンタイプのAAA蛋白質はダイニン以外に1つだけしか見つかっていないことから、P7BP2はAAA六量体リング構造の進化的な変化、その生物学上の意義を知る上で貴重な例となる。これらの結果を、これまでの生化学的な性格付けとあわせて、論文にまとめ、近日中に投稿予定である。またP7BP2と相互作用するタンパク質の候補が得られているが、P7BP2のペルオキシソームでの役割を解明するために、それらP7BP2結合タンパク質の役割をRNAiなどを使い探っていく。

## 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 3 件)

① Yoshida Y., Niwa H., Honscho M., Itoyama A., Fujiki Y. (2015) 査読有、Pex11p mediates peroxisomal proliferation by promoting deformation of the lipid membrane. *Biol. Open* 4, pp710-721.  
DOI: 10.1242/bio.201410801

② Noguchi M., Honscho M., Abe Y., Toyama R., Niwa H., Sato Y., Ghaedi K., Rahmanifar A., Shafeghati Y., Fujiki Y. (2014) 査読有、Mild reduction of plasmalogens causes rhizomelic chondrodysplasia punctata: functional characterization of a novel mutation. *J. Hum. Genet.* 59, pp387-392.  
DOI: 10.1038/jhg.2014.39

③ Yeung H.O., Förster A., Bebeacua C., Niwa H., Ewens C., McKeown C., Zhang X., Freemont P.S. (2014) 査読有、Inter-ring rotations of AAA ATPase p97 revealed by electron cryomicroscopy. *Biol. Open* 4, pp130142.  
DOI: 10.1098/rsob.130142

[学会発表] (計 2 件)

① Recent advances and future directions in high-speed AFM imaging of ATP/GTP-driven molecular machinery (231st IMEG seminars & mini-symposium、発生医学研究所、熊本大学、熊本、2014.2.21)、AFM

study of peroxisomal membrane protein import. Niwa H.

② 10<sup>th</sup> International Meeting on AAA Proteins (Neuss, Germany, 2013.9.15-19), A novel AAA ATPase interacting with Pex7 modulates plasmalogen synthesis. Niwa H., Miyauchi-Nanri Y., Honscho M. Fujiki Y.

[その他]

ホームページ等

<http://www.organelle.kyushu-u.ac.jp/lab/organellestasis/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 一 (NIWA, Hajime)

京都産業大学・総合生命科学部・研究員

研究者番号：30610266

(2) 研究分担者

藤木 幸夫 (FUJIKI, Yukio)

九州大学・生命防御医学研究所・特任教授

研究者番号：70261237