

萌芽的研究支援（2008B1743）研究報告書

実験課題名：ペルオキシソームにおけるタンパク質輸送因子 Pex14p の結晶構造解析

課題番号：2008B1743 [萌芽的研究支援対象課題] (BL: BL38B1)

実験責任者：蘇 建栄 (D2)

所属機構：京都大学大学院理学研究科化学専攻生物構造研究室

研究概要：

ペルオキシソームは、真核生物に見られる細胞小器官であり、さまざまな物質の酸化反応を行っています。ペルオキシソームのタンパク質は細胞質で合成された後にペルオキシソーム内部に輸送されますが、輸送をつかさどる Pex タンパク質群の中で、Pex14p は輸送の中核を担う重要なタンパク質です。Pex14p はペルオキシソームの脂質膜に存在し、N 末端の保存ドメイン、膜貫通ドメイン、コイルドコイルドメインから構成される複雑なタンパク質です。その重要さにも関わらず、これまで分子構造に関する情報が全くありませんでした。研究グループでは、他の Pex タンパク質との相互作用を担っている保存ドメインに着目することで結晶作成に成功し、大型放射光施設 SPring-8 を利用して、その立体構造を決定することができました。その結果、この部分が三本のヘリックスから構成され、完全保存している二つのフェニルアラニン残基（Phe35 と Phe52）が他の Pex タンパク質との相互作用部位を形成していることが分かりました。

1. 背景

ペルオキソームは、真核生物に見られる細胞小器官で、脂質膜から構成され、内部では極長鎖脂肪酸の β -酸化やリン脂質の合成など多くの重要な代謝機能が行われています。また、致死性の遺伝性疾患をもたらすことから、生体機能にとって不可欠な細胞小器官として知られています。ペルオキソームで働くタンパク質は細胞質で合成され、Pex タンパク質群（Pex1～Pex26）によりペルオキソーム内部に輸送されます。輸送されるタンパク質は、2 種類あるペルオキソーム移行シグナル（PTS1、PTS2）のいずれかを持っています。PTS1 や Pex7p と結合した PTS2 はいずれも Pex5p に結合し、その Pex5p がさらにペルオキソーム膜に存在する Pex14p に結合することでペルオキソーム内部に輸送されます（図 1）。

Pex14p は、N 末端の保存ドメイン、膜貫通ドメイン、コイルドコイルドメインから構成される複雑なタンパク質です（図 2）。N 末端にある保存ドメインは Pex5p の WxxxF/Y モチーフと結合します。また、この部分は、Pex19p や Pex13p との相互作用部位としても働きます。つまり、Pex14p は Pex タンパク質群が集合して構成するタンパク質輸送装置において中心的役割を担う重要なタンパク質なのです。これまでの研究の結果、保存ドメインが他の Pex タンパク質との相互作用に関与していることが示唆されていましたが、立体構造がわからなかったために、さらなる研究が展開できない状況でした。

2. 研究手法と成果

我々は、ペルオキソームにおけるタンパク質輸送の分子レベルでのメカニズムの解明を目指して、ラット由来の Pex14p を研究対象に、その保存ドメインについてタンパク質分解酵素による切断実験や円二色性スペクトル測定を始めとするさまざまな生物学的実験を行いました。その結果、Pex5p に対する結合能を維持したまま安定に結晶化に使用することのできる変異体[Pex14p(25-70)]（図 2）を作成することができ、結晶作

成に成功しました。さらには、大型放射光施設 SPring-8 の構造生物学用ビームラインを用いて、X 線回折強度データを収集して構造解析を行った結果、 1.8 \AA 分解能という非常に高い精度で解析することに成功しました。

構造解析の結果、この保存ドメインが三本のヘリックスから構成されていることが分かりました（図 3）。また、分子の片側に保存性の残基によって疎水性の表面が形成されていました。さまざまな生物種で完全に保存している二つのフェニルアラニン残基（Phe35 と Phe52）がこの疎水性表面の中央部に突き出しており、正電荷を持った残基のかたまり（Lys34、Arg40、Lys55 及び Lys56）とともに、他の Pex タンパク質との相互作用部位を形成していることが分かりました（図 4）。 α ヘリックス構造を持つ Pex5p の W_{XXX}F/Y モチーフに存在する 2 つの芳香族アミノ酸（トリプトファン、フェニルアラニン／チロシン）はちょうどこの結合部位にすっぽりと収まります（図 5）。この場合、二つのタンパク質間には、 $\pi-\pi$ 相互作用とカチオン- π 相互作用が形成されます。実際、Pex14p のフェニルアラニンを変異させると Pex5p との結合能がなくなり、ペルオキシソームタンパク質輸送に異常が確認されました。

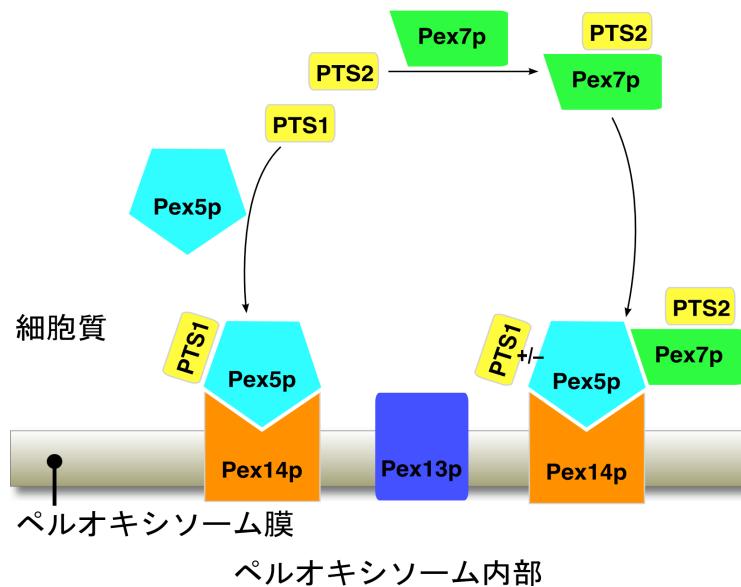


図 1 ペルオキシソームにおけるタンパク質輸送



図2 Pex14p の ドメイン構造

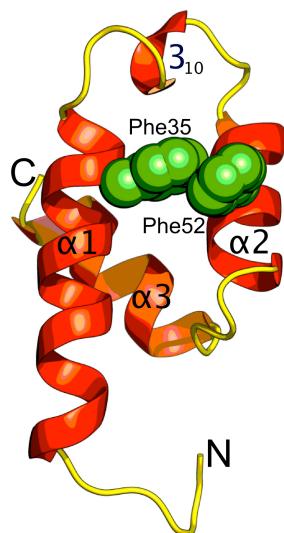


図3 Pex14p(25-70)の結晶構造

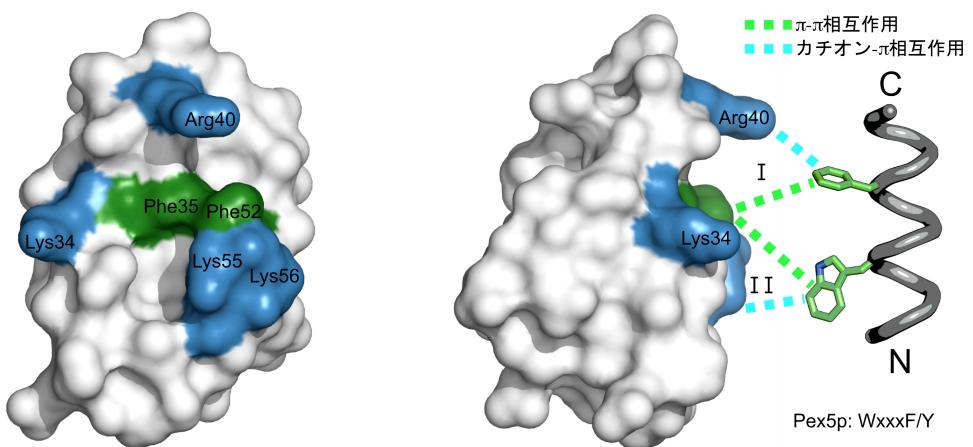


図4 Pex14p(25-70)の分子表面

図5 Pex5p の WxxxF/Y モチーフとの相互作用