

萌芽的研究支援（2009A1647）研究報告書

実験課題名：ペルオキシソームタンパク質輸送システム Pex14p-Pex5p 複合体の結晶構造解析

課題番号：2009A1647 (BL38B1)

実験責任者：蘇 建栄 (D 3)

所属機構：京都大学大学院理学研究科化学専攻生物構造化学研究室

ペルオキシソームはほぼ全ての真核細胞が持つ細胞小器官で、多様な物質の酸化反応を行っており¹⁾、ペルオキシソーム機能異常を引き起こす ALD や Zellweger などの遺伝病に関連していることが知られている。ペルオキシソームの内部で働くタンパク質は、細胞質で合成された後にペルオキシソーム内に輸送される。これらのタンパク質は細胞質で合成された後、ペルオキシソームの膜あるいはその近傍に存在するさまざまな Pex タンパク質 (Pex1p ~ Pex26p) のはたらきにより、ペルオキシソーム内部に輸送される^{2,4)}。輸送されるタンパク質は、2種類あるペルオキシソーム移行シグナル (Peroxisomal Targeting Signal, PTS1 と PTS2) のうち、いずれかを持っている。このうち PTS1 はタンパク質の C 末端に存在する 3 残基のアミノ酸から構成され、Pex5p に直接結合する (図 1)。

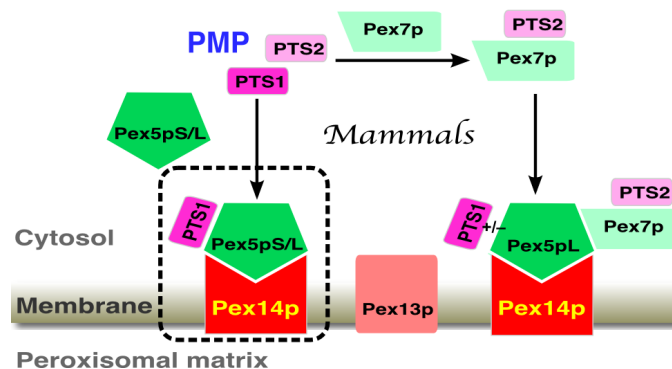


図 1：ヒトを含めた哺乳動物系でペルオキシソーム局在化シグナル 1 (PTS1) を有するタンパク質は PTS1 レセプター Pex5p により運ばれる一方、PTS2 タンパク質は PTS2 レセプター Pex7p に結合後 Pex5p との複合体によって輸送され、Pex14p を主体とした膜透過装置を経てペルオキシソーム内へ局在化される。その後で Pex13p に渡す。

一方、ヒトを含めた哺乳動物系で PTS2 はタンパク質の N 末端に存在し、Pex7p を介して間接的に Pex5p に結合する。いずれの場合においても、Pex5p がさらにペルオキシソーム膜に存在する Pex14p に結合し、ペルオキシソーム内部に輸送される。このことから、Pex14p は Pex タンパク質群が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であると見られている⁵⁾。

これまでに我々は、Pex14p の N 末端ドメインの構造解析に成功し、このドメインから 3 本の α ヘリックスから構成されることを解明した⁶⁾。また、分子表面に突き出た 2 つのフェニルアラニンが、Pex5p との相互作用に重要であると予想された (図 2)。

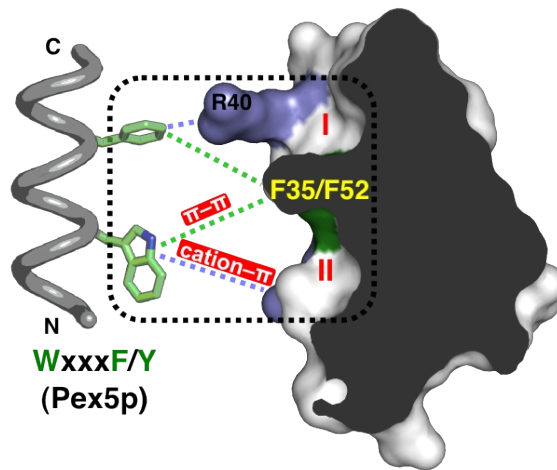


図 2 : Pex5p との結合様式⁶⁾。Pex14p の断面図を、ヘリックス構造を持つ WxxxF/Y モチーフペプチドとともに表示した。

Pex14p-Pex5p 間の相互作用が欠失すると、タンパク質がペルオキシソーム内に入らなくなる。Pex14p はペルオキシソーム膜にあり、N 末端にある保存ドメイン、膜貫通ドメインとコイルドコイルドメインから構成される複雑な膜タンパク質である。Pex5p は天然変性の N 末端ドメインと C 末端にある TPR ドメインを持つ。Pex14p の保存ドメインは、Pex5p 天然変性の N 末端ドメインに複数個存在する WxxxF/Y モチーフと結合する。Pex14p-Pex5p 結合の分子メカニズムの解明には、Pex14p-Pex5p 複合体構造が必要である。

複合体の結晶構造解析のためにいくつかの Pex14p 保存ドメインを持つバリエーションを精製し、Pex5p から WxxxF/Y ペプチドを人工合成した。Pex14p(25-70) と Pex14p(21-70) は、WxxxF/Y ペプチドの結合能を維持していることを確認し (図 3) 、ペプチドとの複合体で結晶化を行った。

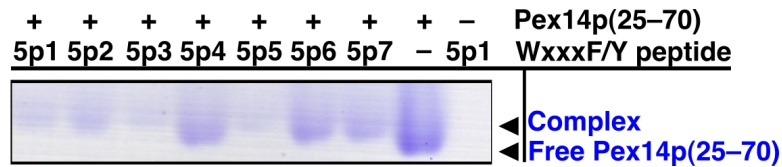


図 3 : Native-PAGE : 保存ドメインの Pex14p(25-70) と Pex5p の WxxxF/Y ペプチド結合する。

しかし、Pex14p と WxxxF/Y ペプチドの複合体からの結晶を得ることはできなかったが、ペプチドに対応する電子密度を確認できなかった。今後、Pex14p と WxxxF/Y ペプチドにおける配列や長さ等を再検討し、この複合体の結晶構造解析を目指す。

参考文献

- 1) H. van den Bosch, R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders and J. M. Tager: *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 157 (1992).
- 2) S. Subramani, A. Koller and W. B. Snyder: *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 399 (2000).
- 3) V. I. Titorenko and R. A. Rachubinski: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 357 (2001).
- 4) H. W. Platta and R. Erdmann: *FEBS Lett.* **581**, 2811 (2007).
- 5) J. E. Azevedo and W. Schliebs: *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1574 (2006).
- 6) J.-R. Su, K. Takeda, S. Tamura, Y. Fujiki and K. Miki: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 417 (2009).