

# ペルオキシソーム膜蛋白質輸送機構の構造生物学的研究 Structural study for the peroxisomal membrane protein targeting mechanism

丹羽一

九州大学大学院理学研究院生命科学部門, 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Hajime Niwa

Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University Graduate School,  
6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581, Japan

## 1 はじめに

ペルオキシソームは真核生物に普遍的に存在する細胞内小器官で、極長鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化をはじめ、生体に不可欠な多くの代謝機能を担っている。ペルオキシソーム形成不全は Zellweger 症候群のような重篤な神経疾患を引き起こすことが知られているが、これまでヒトでは、ペルオキシソームと呼ばれるペルオキシソーム形成必須蛋白質が 14 種同定されている [1]。そのうち 9 種までがペルオキシソーム膜上に局在する膜蛋白質である。

ペルオキシソーム膜蛋白質 (Peroxisomal Membrane Protein, PMP) は細胞質で合成され、シャペロン機能を持ったペルオキシシン Pex19p と結合し、ペルオキシソームへと運ばれる。それぞれ PMP には 1 つまたは 2 つの Pex19p 結合領域があり、Pex19p 結合配列を介して PMP と結合した Pex19p は、ペルオキシソーム膜上のペルオキシシン Pex3p を標的にペルオキシソームに移行する。これまで Pex19p の N 末ペプチドと Pex3p 細胞質領域との共結晶構造が報告されており、Pex19p の N 末領域が Pex3p と相互作用することが分かっている。しかし PMP を結合した Pex19p がペルオキシソーム膜上の Pex3p と相互作用するだけでは十分ではない。PMP には、Pex19p 結合部位以外にペルオキシソーム局在に重要な配列があることが分かっている。例えばペルオキシシン Pex11 では、N 末 180 アミノ酸を欠失してもペルオキシソームに限定局在出来るが、N 末 210 アミノ酸を欠くとペルオキシソームへの局在の特異性が失われ、ミトコンドリアにも誤局在してしまうようになる。N 末 210 アミノ酸欠損でも、Pex19p 結合部位を含み、Pex19p とは安定な複合体を形成できるので、Pex19p との複合体形成だけではペルオキシソームへの限定局在に十分でないことがわかる。また別のペルオキシシン Pex14p は、Pex19p と安定な複合体を形成するにも関わらず、ペルオキシソームに局在出来なくなる欠損変異があることが我々の研究からわかっている。更に Pex16p は Pex19p-Pex3p の相互作用なしで膜に挿入されるなど、Pex19p を介した PMP 膜挿入メカニズムは単純ではない。

これまで PMP 結合に直接関わる Pex19p-C ドメインの結晶構造は報告されているが、PMP 結合には Pex19p 全長が必要な場合が多く、全長構造解析が待

たれている。そこでまず我々はヒト Pex19p 全長の構造解析に着手した。Pex19p は His タグリコンビナント蛋白質として大腸菌でよく発現する。更に構造的に不安定であると考えられる Pex19p-N 末領域を保護するために、N 末 GST 融合蛋白質としても発現、精製した。

## 2 実験

### 2-1) 蛋白質発現、精製

His-Pex19p、GST-Pex19p の大腸菌発現系は、それぞれ pCold1、pGEX6P-1 ベクターの NdeI/XhoI 部位に、PCR で増幅させた Pex19p (15-280aa) をコードする領域を挿入し、これを大腸菌 Rosetta2(DE3) に形質転換して構築した。終濃度 0.1 mM IPTG で発現誘導し、15°C、24 時間培養し、集菌した。GST-Pex19p は、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 M NaCl で細胞を懸濁、超音波破碎後、遠心し、上清をグルタチオンアフィニティークラムにかけ、5 mM グルタチオンで容出させた。これを更にゲル濾過 (superdex200) に通し、分子量的に均一の試料を結晶化に用いた。最終試料の組成は 20 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl、0.1 mM DTT。同様にして His-Pex19p は、グルタチオンカラムの代わりにニッケルカラムを用いて精製した。終濃度 20 mg/ml 程度まで濃縮し、結晶化に用いた。

### 2-2) 蛋白質表面リジン残基のメチル化

Walter et al., (2006) [2] を基本とした。蛋白質試料を 1 mg/ml に希釈し、1 mlにつき、20  $\mu$ l の 1 M Dimethylamine-borane complex (ABC)、40  $\mu$ l の 1 M formaldehyde を加え、穏やかに攪拌、4°C で 2 時間置いた。この操作を 2 回繰り返し、1 mlにつき 10  $\mu$ l の ABC を加え、4°C で終夜置いた。ゲル濾過 (superdex200) で試薬を分離、精製し、濃縮後、結晶化に用いた。

## 3 結果および考察

GST-Pex19p は蛋白質とリザーバー溶液 (0.1 M Tris-HCl (pH8.5)、20 % PEG3350、0.2 M NaF) を等量混合し、ハンギングドロップによる蒸気拡散法で結晶を得た。この結晶を NW12A で回折実験を行った結果、回折点はまったく得られなかった。His-Pex19p ではこれまで結晶が得られていない。また表

面リジン残基のメチル化は、どちらの試料も効果が見られなかった。これらのことは、N 末の構造的な不安定性が大きく影響しているのではないかと考えられる。

今後、GST-Pex19p 結晶の更なる条件検討を行うと同時に、MBP 融合による N 末領域の安定化も試みる。Pex19p の部分構造解析から 15 残基目からヘリックスであることは分かっている。そこで活性にも必須でない N 末端の 14 アミノ酸を削り、MBP の最後のヘリックスと直結させることで、長いヘリックスをし、構造の安定化を計る。ヘリックス構造の性質上、リンカーの長さが 1 残基違うだけで MBP との相対配置が 90 度変わって来るので、現在 2-6 残基の 5 種類のリコンビナント蛋白質を作り、結晶化を行っている。また別種の Pex19p での結晶化も進めている。

#### 参考文献

- [1] Fujiki, Y. *Encyclopedia of Life Sciences* pp1-9 (2011)
- [2] Walter et al., *Structure* 14 pp1617-1622. (2006)