

京都大学	博士 (薬学)	氏名	江川 響子
論文題目	Structural Biology Studies on the Overexpression and Translocation of Peroxisomal Membrane Protein (ペルオキシソーム膜タンパク質の大量発現と膜局在化に関する構造生物学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)は、ペルオキシソームの生合成や機能発現において重要な役割をもつ。その局在化過程には、Peroxin(Pex)と称されるペルオキシソーム形成因子のうち、Pex19p と Pex3p が必須である。Pex19p は遊離のリボソームで合成された PMP と結合し、ペルオキシソームへと PMP を運ぶ。その後 Pex19p がペルオキシソーム膜上にある Pex3p と相互作用することで PMP がペルオキシソームへ局在化すると考えられている。これまでヒト Pex19p と Pex3p の相互作用についての研究がなされてきたが、Pex19p と PMP の相互作用に関する知見は、PMP の調製が困難であったためにほとんど得られていない。そこで申請者は、ほ乳類 PMP の中でも最も存在量の多い PMP22 に着目しメタノール資化性酵母 <i>Pichia pastoris</i> を用いた大量発現系および精製系の構築を行った。さらに <i>P. pastoris</i> におけるほ乳類由来 PMP の膜局在化についての解析を行うとともに、ヒトと <i>P. pastoris</i> における、Pex19p と Pex3p の相互作用様式の違いを解析した。</p> <p>第一章 <i>Pichia pastoris</i>を用いたラット由来PMP22の大量発現および精製 Pex19pとの相互作用解析の実験に供するため、<i>P.pastoris</i>を用いてラットPMP22(RnPMP22)の大量調製法の検討を行った。その結果、流加培養法により4リットルの培養で90 mgのタンパク質が得られるようになった。精製RnPMP22は、CDスペクトル解析により、<math>\alpha</math>ヘリックスを多く持つ構造である可能性が示唆された。また、精製RnPMP22がヒトPex19p(HsPex19p)と相互作用することをゲル濾過クロマトグラフィー分析によって確認した。</p> <p>第二章 <i>Pichia pastoris</i>におけるほ乳類由来PMP22の細胞内局在解析 <i>P. pastoris</i>細胞内におけるヒトPMP22(HsPMP22)の局在場所について調べるため、HsPMP22のN末端にGFPを付加したGFP-HsPMP22の遺伝子を<i>P. pastoris</i>に導入した。すると、GFPに由来する蛍光は核膜と小胞体で観察された。しかし、HsPex19pを共発現させたところGFPの蛍光は通常核膜と小胞体とは異なる形状の膜構造に局在していた。そこで、その場所を同定するために、ペルオキシソームのマーカーであるDsRED-SKLおよび、小胞体のマーカーとして用いたN末端にalpha factorシグナル配列、C末端にHDEL配列を付加したDsREDと比較したところ、後者の局在部位と一致した。このことから、HsPex19pとの共発現下でもHsPMP22は<i>P. pastoris</i>細胞内で小胞体の構造へと移行することがわかった。これらのことから、HsPMP22はPp-Pex19pによって<i>P. pastoris</i>のペルオキシソームへと運搬されないこと、また、HsPex19pは<i>P. pastoris</i>では機能できないことが示唆された。</p> <p>第三章 ヒトおよび<i>Pichia pastoris</i>由来Pex3p-Pex19p間相互作用の比較 第二章において、HsPMP22の輸送に必要なHsPex19pを共発現させても、HsPMP22がペルオキシソームへと移行しなかった。その理由を調べるた</p>			

め、HsPex19p-HsPex3p相互作用部位が、*P. pastoris*においても同様の機能を有しているかどうかを解析した。まず、PpPex3pとPpPex19pを大腸菌により発現させ、高純度精製を行い、得られたPpPex3pがPpPex19pと結合することをプルダウン実験により確認した。次に、HsPex19pにおいてHsPex3pとの結合部位であるN末端アミノ酸1—45残基に相当するPpPex19pの対応部位がPpPex3pとプルダウン実験により結合することを確認した。また、HsPex3pにおいてHsPex19pのN末端部分と相互作用する残基に相当するPpPex3pのTrp144に変異を導入すると結合が低下することを確認した。さらに、HsPex19pはPpPex3pとほとんど結合しないことをプルダウン実験にて確認した。以上より、*P. pastoris*もヒトと同様に、Pex19pのN末端領域とPex3pのTrp残基(Trp-144)を用いて相互作用しており、ヒトと*P. pastoris*間のPex19pのN末端領域の配列の違いが、それぞれのPex3pとの結合に大きく影響を与えることが明らかになった。

以上申請者は、*P. pastoris*を用いたほ乳類由来PMPの発現系の構築ならびに発現時における細胞内でのPMP22の動態を調べた。その結果、ほ乳類由来PMP22は*P. pastoris*において大量発現すること、その細胞内での局在場所は核と小胞体であり、hPex19pの導入だけではペルオキシソームへ移行させるには不十分であること、さらに、*P. pastoris*のPex3pとPex19pも、ヒトと同様の領域間での相互作用を行っているものの、ヒトと*P. pastoris*では、Pex19pとPex3pの相互作用が著しく低下することを明らかにした。本研究結果は、ペルオキシソーム生合成機構の解明を行う上での重要な基盤となるものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、哺乳類由来ペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)の構造生物学的解析実現のため、メタノール資化性酵母*Pichia pastoris*における大量調製と分子機能解析ならびにその局在場所の同定を行ったものである。PMPは、ペルオキシソームの生合成や機能発現において重要な役割を担っており、その局在化過程には、Peroxin(Pex)と称されるペルオキシソーム形成因子のうち、Pex19pとPex3pが必須である。これまでヒト由来のPex19p(HsPex19p)とPex3p(HsPex3p)の相互作用についての研究がなされてきたが、Pex19pとPMPの相互作用に関する知見は、PMPの調製が困難であったためにほとんど得られていない。そこで申請者は、哺乳類PMPの中でも最も存在量の多いPMP22に着目し*P. pastoris*を用いた大量発現系および精製系の構築を行い、得られたPMP22の性質と*P. pastoris*細胞での動態、そして、PMP22輸送とPex19p-Pex3p相互作用との関係について研究を行った。

まず申請者は、*P. pastoris*を用いてラットPMP22の大量調製法の検討を行った。その結果、流加培養法により4リットルの培養で90 mgのタンパク質が得られるようになった。また精製されたラットPMP22は、 $\alpha$ ヘリックス構造を持つことが示唆され、HsPex19pと相互作用することが示された。

次いで申請者は、*P. pastoris*におけるPMP22の細胞内局在解析を行った。ヒトPMP22のN末端にGFPを付加した遺伝子を*P. pastoris*に導入したところ、GFPに由来する蛍光は核膜と小胞体で観察された。また、HsPex19pを共発現させると、GFPの蛍光は通常の核膜と小胞体とは異なる形状の小胞体に局在することが同定された。これらのことから、ヒトPMP22は、*P. pastoris*のPex19p(PpPex19p)によって*P. pastoris*のペルオキシソームへと運搬されないこと、また、HsPex19pとの共発現下でもヒトPMP22は*P. pastoris*細胞内で小胞体の構造へと移行することが判明した。

さらに申請者は、ヒトおよび*P. pastoris*由来Pex3p-Pex19p間相互作用の比較を行った。まず、均一に精製した*P. pastoris*由来Pex3p(PpPex3p)がPpPex19pと結合することをプルダウン実験により確認した。次に、HsPex19pにおいてHsPex3pとの結合部位であるN末端アミノ酸に相当するPpPex19pの対応部位がPpPex3pとプルダウン実験により結合することを確認した。また、HsPex3pにおいてHsPex19pとの相互作用に重要なTrpに相当するPpPex3pのTrp144残基に変異を導入するとPpPex19pとの結合が低下することを確認した。さらに、HsPex19pはPpPex3pとほとんど結合しないことをプルダウン実験にて確認した。以上より、*P. pastoris*もヒトと同様にPex19pのN末端領域とPex3pのTrp残基(Trp144)を

用いて相互作用しているものの、ヒトと*P. pastoris*間のPex19pのN末端領域の配列の違いが、それぞれのPex3pとの結合に大きく影響を与えることが明らかになった。

以上本研究は、機能を保持したPMPを*P. pastoris*を用いて大量に調製する系を構築し、その分子の性質、細胞内におけるPMP22の動態、そして、PMP輸送に関わるPex3p-Pex19p間相互作用のヒトと*P. pastoris*での共通点と相違点を解明したものである。本研究成果は、ペルオキシソーム生合成機構の解明、特に、ペルオキシソーム膜タンパク質の構造研究を行う上での有用な知見となるものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降