

学位審査報告書

（ふりがな） 氏 名	すー じゃんろん 蘇 建 栄
学位（専攻分野）	博 士 （ 理 学 ）
学位記番号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科化学専攻
（学位論文題目） Structural studies of the peroxisomal matrix protein import factor, Pex14p （ペルオキシソームタンパク質輸送因子 Pex14p の構造研究）	
論文調査委員	（主査） 三 木 邦 夫 教授 杉 山 弘 教授 秋 山 芳 展 教授

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	蘇 建 栄
論文題目	Structural studies of the peroxisomal matrix protein import factor, Pex14p (ペルオキシソームタンパク質輸送因子 Pex14p の構造研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ペルオキシソームは真核生物に見られる細胞小器官で、その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る。ペルオキシソームで働くタンパク質は細胞質で合成された後、Pex タンパク質群 (Pex1~Pex26) によりペルオキシソーム内部に輸送される。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、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である。その N 末端保存ドメインは、シグナルペプチドの受容体 Pex5p の WxxxY/F モチーフや、他の Pex タンパク質 Pex19p, Pex13p との相互作用部位である。本研究では、ラット由来の Pex14p を研究対象に X 線結晶構造解析を行い、Pex5p との相互作用やオリゴマー状態変化について考察した。</p> <p>Pex14p は複数のドメインを持つ膜タンパク質であり、その全長を結晶化することはできなかった。そこで、N 末端に位置する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行い、Pex5p に対する結合能を維持したまま、安定に結晶化に用いることのできる変異体 Pex14p(25-40)を作成した。可溶性のドメインであるにもかかわらず、界面活性剤を共存させることで結晶を得ることができた。Os 誘導体を用いた単一波長異常分散 (SAD) 法により位相を決定し、最終的に 1.8 Å 分解能という非常に高い精度で構造を決定できた。この保存ドメインは三本のヘリックスから構成され、分子の片側には保存性の高い残基によって疎水性表面が形成されていた。さまざまな生物種で完全に保存されている 2 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露出しており、周辺の塩基性残基 (Lys34, Arg40, Lys55 および Lys56) とともに、他の Pex タンパク質との相互作用部位になりうる 2 つのポケットを形成していた。そこで、αヘリックス構造をもつ Pex5p の WxxxY/F モチーフに存在する 2 つの芳香族アミノ酸 (トリプトファンとフェニルアラニン/チロシン) がちょうどこれらのポケットに結合することを予測して複合体モデルを構築した。このモデル構造から、2 つのタンパク質間には π-π相互作用とカチオン-π相互作用が形成されることが示唆されたため、相互作用に関与する芳香族残基についての変異体解析を行い、これらの残基の重要性を確認した。</p> <p>N 末端の保存ドメインは結晶中で二量体を形成していたが、二量体形成に関わる部分は Pex5p との相互作用部位とほぼ同一であった。一方、これまでの研究で、Pex5p の結合が Pex14p のオリゴマー状態に影響を与えることが示されていた。そこで、この二量体形成について詳しく調べるために、電気泳動とゲルろ過による実験を行った。その結果、溶液中では二量体は単量体と平衡状態にあり、Pex5p の WxxxY/F モチーフとの結合により完全に単量体に解離することが明らかになった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、ペルオキシソームでのタンパク質輸送において中心的役割を担う Pex14p の N 末端保存ドメインの X 線結晶構造解析を行い、変異体解析や生化学実験の結果とあわせることによって、シグナルペプチドの受容体 Pex5p との相互作用やオリゴマー状態変化について考察したものである。Pex14p の N 末端保存ドメインは、Pex5p の WxxxF/Y モチーフ、さらには他の Pex タンパク質である Pex19p や Pex13p との相互作用部位であり、多数の 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を担う重要な部分となっている。

本研究では、哺乳類（ラット）由来の Pex14p を研究対象にしている。Pex14p は複数のドメインを持つ膜タンパク質であり、全長タンパク質の結晶化は困難であったため、N 末端に位置する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駆使して、Pex5p に対する結合能を維持したまま安定に結晶化できる変異体、Pex14p(25-40)を作成している。この変異体を用いることで結晶化にも成功し、最終的には 1.8 Å 分解能という非常に高い精度で立体構造を決定している。

構造解析の結果から、このドメインが三本のヘリックスで構成され、保存性の高い残基によって分子の片側に疎水性表面が形成されていることが明らかになっている。また、この疎水性の表面には、他の Pex タンパク質との相互作用部位となりうる 2 つのポケットが存在することも明らかにしている。さらには、Pex5p の WxxxF/Y モチーフとの複合体モデルを構築し、変異実験によってそのモデルの妥当性を確認している。加えて、電気泳動とゲルろ過によって、結晶中で見られる二量体構造を詳細に調べ、溶液中では二量体と単量体とが平衡状態にあり、Pex5p の WxxxF/Y モチーフとの結合により完全に単量体に解離することを見だし、Pex14p のオリゴマー状態の変化の分子機構について考察している。

以上のように、本研究は、ペルオキシソームにおけ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、Pex14p の結晶構造を解明し、得られた構造情報と変異体解析や生化学実験の結果から、Pex5p との複合体形成やオリゴマー状態変化に重要な知見を得たものと評価することができる。これらの研究結果は当該研究分野の発展に大きな寄与を果たすものであり、よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められた。また、平成 22 年 1 月 20 日に論文内容とそれに関連する分野について口頭試問を行った結果、合格と認められた。