

氏名	佐藤康彦
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第637号
学位授与の日付	平成20年3月24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	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	Characterization of the Interaction between Peroxin Pex3p and Pex19p involved in Peroxisomal Membrane Protein Translocation (ペルオキシソーム膜タンパク質輸送に関与するperoxin Pex3pとPex19pとの相互作用に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 加藤博章 教授 松崎勝巳 教授 半田哲郎

論文内容の要旨

序論

ペルオキシソームの形成に関わるタンパク質群はperoxin (Pex) と称される。それらPexのうち、Pex3pとPex19pは、多様なペルオキシソーム膜タンパク質 (Peroxisome Membrane Protein, PMP) の局在化に関与する。Pex19pは遊離リソソームで合成されたPMPと結合して細胞質中を移動する輸送担体であり、Pex3pがPex19p-PMP複合体を受容する。これら三者の特異的な相互作用はPMP局在化機構の鍵であると考えられており、細胞生物学的な手法によって相互作用部位の探索が進められているが、タンパク質レベルでの詳細な分子メカニズムは不明である。そこで、本研究では、Pex3pがPex19pを特異的に結合する分子機構を明らかにするために、Pex3pの精製標品を調製し、物理化学的な手法を用いて結合様式を調べた。

第一章 Pex3pの発現精製

ヒトPex3pの発現精製法の構築を行った。Pex3pは373アミノ酸からなるペルオキシソーム膜タンパク質である。N末端側1-33残基が膜貫通領域で、残りは細胞質側に露出しているものと推察されている。そこで、大腸菌発現系を用いて、Hisタグを付した34-373残基を発現させたところ、可溶性タンパク質として回収できた(以下Pex3p (34-373)を指してPex3pと記す)。Ni-NTAカラムで部分精製した標品は非常に凝集しやすかったが、溶解性を高める溶液組成を見いだすことで、高純度のPex3pを精製することに初めて成功した。

第二章 Pex3p-Pex19p結合様式の解析および結合に必要なPex3pのアミノ酸残基Trp104の同定

ヒトPex3p-Pex19p結合の特徴を明らかにするために、結合のストイキオメトリーと解離定数 K_D の決定、さらに、Pex3p上のPex19p結合部位の決定を行った。まず、Pex3pに含まれる二つのTrp残基(Trp104, Trp224)の蛍光を、Trp残基を欠失させたPex19pで滴定したところ、その蛍光スペクトルのピークは340nmから322nmへとブルーシフトしながら強度が上昇した。322nmの蛍光強度変化とPex19pの濃度のプロットにおいて、強度変化は1 mol : 1 molでの混合で飽和した。Pex3p, Pex19pともにモノマーであることから、1分子のPex3pが1分子のPex19pに結合することが明らかとなった。

ついで、Trp蛍光の変化を手掛かりとして、Pex3pのTrp残基がPex19pとの結合に直接寄与しているかどうかを調べた。一般に、Trp蛍光スペクトルのブルーシフトは、その周囲の環境が疎水性に変化したことを示す。Pex3pのTrp蛍光スペクトルはPex19pの結合により大きくブルーシフトしたことから、Pex3pのTrpは、直接Pex19pに結合していることが予想された。そこで、Pex3p W104AとPex3p W224A変異体を用いて、pull-down結合実験を行ったところ、W104A変異体は結合力が減少した。しかしW104F変異体を用いて同様の実験を行ったところ野生型に準じる結合力を保持していた。このことから、Trp104のインドール側鎖が結合に関与していることが示された。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により定量的な解析を行った。CM5チップにGST-Pex19pを固定し、野生型Pex3p, W104A, W104F変異体を送液した。センサー

グラムの平衡値をLangmuir型1-siteモデル式により解析した結果、野生型の K_D は3.4nMであり、W104A、W104Fはそれぞれ、1080nM、66nMであった。すなわち、TrpからPheへの改変が20倍の結合低下を示したのに対し、Alaへの変換は、300倍の低下を引き起こすことが判明した。

さらに、Trp104の機能を細胞レベルで評価するため、これらの変異体のPEX3変異細胞ZPG208におけるペルオキシソーム形成能を評価した。その結果、野生型とW104Fはペルオキシソーム形成能を示したのに対して、W104Aは示さなかったことから、Trp104を介した結合は、細胞内でも重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、ペルオキシソームの形成にはPex3pとPex19pとのnMオーダー K_D での強い結合が必要であることが示された。

第三章 Pex3pのTrp104と結合するPex19pのアミノ酸残基Phe29の同定

Pex3p Trp104の受け手となるPex19pの領域を、様々な長さのPex19pフラグメントとの結合力を指標として探索した。Pex19p (1-44)はpull-down結合実験、Trp蛍光滴定ともに全長と同様の結合力および、蛍光スペクトルの大きなブルーシフトを示した。一方、Pex19p (1-28)では結合力が減少し、ブルーシフト幅が5nmと小さくなり、強度上昇を示さなかったことから、Pex19p (1-28)はTrp104と結合する残基を含まないことが示唆された。さらに29-44残基間の変異体を用いて同様の実験を行った結果、Phe29が同定された。SPR解析においてPex19p F29AとPex3pとの K_D は1100nMへと低下していた。この値はPex19pとPex3p W104Aとの K_D 、1080nMとはほぼ同値であった。この結果から、二つのアミノ酸の側鎖どうしの相互作用がPex3p-Pex19p結合の中心的役割を担っていることが明らかとなった。

以上、本研究では、Pex3pの発現精製に初めて成功し、Pex3pとPex19pとはモノマー1分子どうしがnMオーダーの K_D で強く結合すること、その結合にはPex3pのTrp104の側鎖が関与することを明らかにした。また、Trp104が形成する強い結合は、細胞内でのペルオキシソーム形成においても必須であることが明らかとなった。さらに、Pex3p Trp104の結合相手はPex19p Phe29であることが明らかとなった。この成果はPMP輸送機構、さらにはペルオキシソーム形成メカニズムの分子機構を明らかにするための基礎的知見となるものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)の輸送に必須のタンパク質因子であるPex3pとPex19pの相互作用様式を解明したものである。ペルオキシソームの形成にはperoxin(Pex)と称されるタンパク質群が関与する。それらPexのうち、Pex3pとPex19pは、多様なPMPの局在化に関与するとされている。すなわち、Pex19pは遊離リボソームで合成されたPMPと結合して細胞質中を移動する輸送担体であり、Pex3pがPex19p-PMP複合体を受容するというものである。したがって、これら三者の特異的な相互作用はPMP局在化機構の鍵であると考えられており、細胞生物学的な手法によって相互作用部位の探索が進められてきたが、タンパク質レベルでの詳細な分子メカニズムは不明である。申請者は、Pex3pがPex19pを特異的に結合する分子機構を明らかにするために、Pex3pの精製標品を調製し、物理化学的な手法を用いて結合様式を解明した。

申請者はまず、ヒトPex3pの発現精製法を構築した。Pex3pは大腸菌を宿主として、その細胞質側ドメインを発現させることができた。部分精製した標品は非常に凝集しやすかったが、溶解性を高める条件を見いだすことで、高純度のPex3pを精製することに初めて成功した。

つぎに申請者は、ヒトPex3p-Pex19p結合の特徴を明らかにするために、結合の化学量論と解離定数 K_D の決定、さらに、Pex3p上のPex19p結合部位の同定を行った。Pex3pに含まれる二つのTrp残基(Trp104、Trp224)に由来する蛍光を、Trp残基を欠失させたPex19pで滴定することにより、Pex3pとPex19pが1mol:1molの化学量論で結合することを見出した。ついで、Pex3pのTrp残基に変異を導入した2つの変異型Pex3pを用いることにより、Pex3pのTrp104がPex19pとの結合に直接寄与していることを見出した。また、表面プラズモン共鳴(SPR)法によって、Pex3pとPex19pとの相互作用の解離定数 K_D を測定し、この両者の結合が、3.4nMという非常に低い解離定数を有する強力なものであることを明らかにした。さらに、野生型およびTrp変異型Pex3pの遺伝子のPEX3欠損細胞ZPG208におけるペルオキシソーム形成能を調べたところ、野生型と異なり、Trp104をAlaへと変更したW104A変異型ではペルオキシソーム形成能を回復しないことを明らかにした。この結果から、Trp104を介したPex3p-Pex19p結合は、タンパク質分子間の結合形成に直接関与している

だけでなく、細胞内でも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

さらに申請者は、Pex3pのTrp104と結合しているPex19pのアミノ酸残基を同定した。すなわち、種々のPex19p変異体とPex3pとの結合力を調べたところ、Pex19pのPhe29を候補として見出した。さらに、Phe29をAlaに変異を導入したところ、Pex3pのTrp104由来の蛍光変化を引き起こす能力を失っていることが確認されたこと、ならびに、SPR解析においてこのPhe29変異型Pex19pとPex3pとの K_D はPex19pとTrp104変異型Pex3pとの K_D とほぼ同値であったことから、Pex19pのPhe29がPex3pのTrp104の相互作用相手であると同定された。また、Phe29の変異も細胞内においてペルオキシソーム形成能に影響を及ぼすことが確認された。

以上本研究は、ペルオキシソーム形成に関与するPex3pとPex19pとの結合を担う重要なアミノ酸残基を同定し、その相互作用様式をタンパク質分子レベルで明らかにしたものである。この成果はペルオキシソーム膜タンパク質輸送機構、さらにはペルオキシソーム形成メカニズムの分子機構を明らかにするうえで、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20年2月22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。