

京都大学	博士（ 薬学 ）	氏名	潘 东青
論文題目	ペルオキシソーム輸送シグナル PTS2 の分子認識機構		
（論文内容の要旨） 輸送シグナルは、生合成された蛋白質の細胞内局在の決定要因であり、オルガネラの形成にとって必要不可欠な役割を果たしている。ペルオキシソーム内部に輸送される蛋白質の多くは2種類のペルオキシソーム輸送シグナル（PTS1、PTS2）のいずれかを持つ。PTS1 と PTS2 は配列モチーフが異なる上、PTS1 は蛋白質の C 末端、PTS2 は N 末端付近に位置し、それぞれ異なるレセプター蛋白質に結合し、認識される。PTS1 の認識は Pex5 が司る。一方、PTS2 の認識には、Pex7 とコレセプターの 2 種類の蛋白質が必要である。2 つのレセプター蛋白質が協奏的に輸送シグナルを認識する例は PTS2 に特徴的であり、他に例がない。また、ヒトの Pex5 や Pex7 に機能異常が生じると、ペルオキシソームへの蛋白質輸送に支障を来し、重篤なペルオキシソーム病を引き起こすことが知られている。Pex5 による PTS1 の認識機構については、すでに結晶構造に基づいた理解が進んでいる。しかし、PTS2 の認識機構の解明については、Pex7 の発現精製系の構築など結晶化の前に解決すべき課題が多く、未だ構造解析例が全くない。 そこで申請者はメタノール資化酵母 <i>Pichia pastoris</i> を用いて <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 由来の Pex7 の発現系を構築し、得られた Pex7 と、コレセプターである Pex21 の C 末端領域、そして、ペルオキシソーム 3-ketoacyl-CoA thiolase (Fox3) の PTS2 との三者複合体の結晶構造を決定した。さらに、得られた結晶構造に基づいて Pex7 と Pex21 の変異体を作製し、立体構造から予想されたメカニズムを実証するための機能解析を行った。 第一章 Pex7、Pex21C、Fox3、Fox3N-MBP の発現精製系の構築 Pex7 は大腸菌の発現系では正しく折り畳まれたものを発現させることが困難であったが、<i>P. pastoris</i> を用いて発現を行うことで、結晶化に十分な高品質の Pex7 を大量に得ることができた。一方、Pex21 の C 末 99 アミノ酸 (Pex21C)、Fox3、Fox3 の PTS2 を含む N 末 15 アミノ酸と大腸菌のマルトース結合蛋白質(MBP)の融合蛋白質(Fox3N-MBP)は、大腸菌で発現を行ない、高分解能の結晶化に適したそれぞれの配列領域を決定した。 第二章 Pex7/Pex21C/Fox3N-MBP 複合体の結晶構造解析 単独で精製したPex7、Pex21、Fox3N-MBPは混合することで三者複合体を形成し、結晶化に用いたところ、ハンギングドロップ蒸気拡散法によりX線解析に適し			

た板状の単結晶を得ることに成功した。得られた結晶からX線回折強度データを収集し、分子置換法により構造決定を行った。結晶構造は 1.8Å 分解能で R_{free} 値が 0.224 になるまで精密化した。

得られた結晶構造では三者が 1 対 1 対 1 のヘテロ三量体を形成し、Pex7 と Pex21C が協調的に Fox3N の結合ポケットを形成していた。Pex7 は 7 つの β シートからなるリング状構造を成し、その表面には保存されたアミノ酸残基によって PTS2 の結合部位が形成され、長く伸びた構造の Pex21C は Fox3N と Pex7 の両方にかぶさるように結合して複合体を安定化していた。三者複合体の中で Pex7、Pex21C、Fox3N の疎水性残基は疎水性コアを形成しており、この疎水性コアは三者複合体の安定性に大きく寄与していることが示唆された。

Fox3N の PTS2 配列 (RLQSIKDHL) は両親媒性の α ヘリックスを形成することで、PTS2 モチーフの疎水性残基 (一重下線) と極性残基 (二重下線) は二つの領域に二分され、Pex7 と Pex21C によって形成される疎水性ポケットと親水性ポケットにそれぞれ相補的に結合することで認識されることが明らかとなった。

第三章 Pex7 と Pex21 の部位特異的変異体を用いた機能解析

結晶構造の情報に基づいて、Pex7 と Pex21 のアミノ酸残基に部位特異的変異を導入し、変異型蛋白質を用いた結合実験や、Pex7 もしくは Pex21 を欠失させた *S. cerevisiae* 株に発現させてオレイン酸代謝能を比較することで、変異導入部位の重要性を評価した。疎水性コアを形成する Pex7 と Pex21 の疎水性残基を酸性残基に換えると、複合体形成が阻害された。またそれらの変異体を発現させた酵母は、野生型と異なり、オレイン酸を代謝できなかった。同様に PTS2 と水素結合を形成する Pex7 の親水性残基に変異を導入して、それらの残基の重要性を確かめることができた。

以上、申請者は *S. cerevisiae* 由来の PTS2 とそれを認識するレセプター蛋白質 Pex7 と Pex21 の機能複合体の精製系を確立し、三者複合体の結晶構造解析と機能解析を行った。その結果、Pex7 と Pex21 の協調的な PTS2 の認識メカニズムを明らかにした。アミノ酸配列の類似性から考えると、本立体構造で明らかとなったメカニズムはヒトの相同蛋白質でも保存されていると予想されることから、本研究の結果は PTS2 の認識異常によって発症するペルオキシソーム病を理解するための重要な分子構造基盤となるものである。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、長年不明であったペルオキシソーム輸送シグナル PTS2 の分子認識機構の立体構造基盤を原子レベルで解明したものである。1990 年代初期に発見された PTS2 は多くのペルオキシソームのマトリックス蛋白質をペルオキシソームに導く重要な輸送シグナルである。PTS2 は複数の受容体のタンパク質によって認識されることが知られており、単独の受容体が認識できる他の細胞内輸送シグナルとは全く異なることからその解明が待ち望まれていた。しかし、機能的な PTS2 と受容体および補受容体の三重複合体を結晶化することが困難であったため、認識機構の解明が遅れていた。

まず申請者は、X 線回折実験に適した結晶を作製するために必要な受容体の大量精製系の確立を行った。そして、従来、発現が困難であった受容体 Pex7p をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* の発現系を用いて大量発現させる系を確立した。そして、補受容体である Pex21p については、PTS2 認識複合体の形成に必要な部分を含みながら結晶化に適している領域を同定することにより、結晶化に適した領域の単離を可能にした。さらに、PTS2 の結晶化能を改善するためにパン酵母の peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 由来の PTS2 をマルトース結合蛋白質に融合した Fox3N-MBP を設計し、その大量精製系を確立した。

次いで申請者は、上記の試料の混合物から PTS2 認識複合体を精製する方法を確立し、その結晶化を達成した。その結晶を用いて X 線回折実験を行い、1.8Å 分解能において結晶構造を決定することに成功した。決定された構造では、Pex7 と Pex21 が協調的に PTS2 結合ポケットを形成しており、その認識部位の成り立ちは、他の輸送シグナル認識では見られたことのない全く新規なものであった。その結合ポケットには PTS2 の疎水性と親水性のアミノ酸残基を別々に認識するための 2 つの溝が用意されており、それらの溝も疎水性もしくは親水性の性質を持つことで、PTS2 を相補的に認識できる仕組みであることが明らかとなった。

さらに申請者は、Pex7 と Pex21 に部位特異的変異を導入して機能解析することで、PTS2 認識複合体形成や PTS2 を持つタンパク質の輸送に対する変異導入部位の重要性を検証した。すなわち、精製タンパク質を用いた *in vitro* での結合実験、そして酵母を用いた相補性検定による *in vivo* での実験により、立体構造から洞察した PTS2 認識機構の正しさが確認された。また、それぞれの PTS2 認識複合体の形成の異常が、PTS2 タンパク質をペルオキシソームに輸送する上で不可欠であることが実証された。

以上本研究は、PTS2 認識受容体三重複合体の発現精製系を確立することにより、その結晶化を達成し、同複合体の立体構造の解明に初めて成功するとともに、結晶構造から示された認識機構を生化学的手法や遺伝学的手法により実証した

ものである。本研究成果は、ペルオキシソーム形成機構、細胞内タンパク質輸送、そして PTS2 によるタンパク質輸送の異常によって引き起こされるペルオキシソーム病の解明において重要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 25 年 2 月 27 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 25 年 9 月 1 日以降