

膜タンパク質結晶化の 革新的支援法の開発

代表機関：京都大学大学院薬学研究科

代表研究者：加藤博章

背景

- 膜タンパク質は大量合成も結晶化も難しいことが、構造解析のネックとなっている
- 結晶化能を判定する技術はいろいろあるが、より正確で、より速い技術が求められている

成果

- 高感度で、結晶化能の判定に適した分離のできる電気泳動法を開発した
- メタノール資化性酵母の小器官ペルオキシソームに、ヒト由来の膜タンパク質を局在化した状態で生成できた

膜タンパク質は、生命現象においても、創薬のターゲットとしても重要です。しかし、大量合成も結晶化も難しいことが、構造解析のネックとなっています。

そこで私たちは、ヒトを中心とする真核生物の膜タンパク質について、結晶化するかどうか（結晶化能）を少ない試料で迅速に判定する技術（スクリーニング）と、膜タンパク質を大量に生産する技術を開発してきました。開発した技術で、「食環A4」グループ、「食環B2」グループの研究を支援しました。

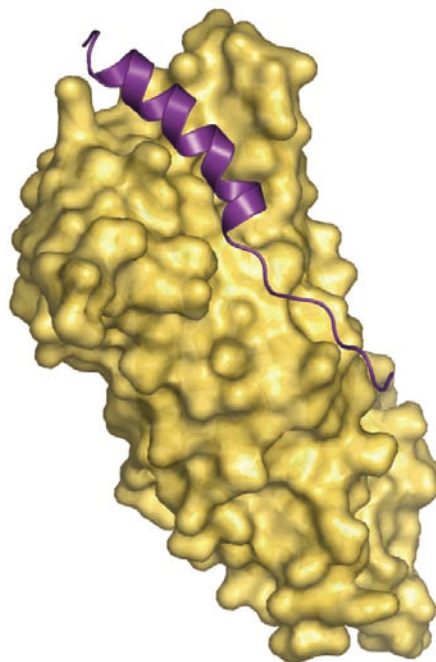
結晶化能のスクリーニング技術として開発したのは、GFP融合タンパク質In-gel蛍

光Native電気泳動法です。これは、目的のタンパク質にGFP（蛍光タンパク質）を付加しておき、電気泳動で分離した後、蛍光で検出するものです。微量のタンパク質でも検出できるよう、検出感度の向上を図りました。また、タンパク質の結晶化能は、そのタンパク質の溶液中での分散状態（単独のもの、2個、3個・・・と集まったものの比率）に大きく左右されます。私たちは、この分散状態が的確に現れるような電気泳動の条件を見いだしました。この手法は、多数の試料の結晶化能を同時に評価するのに利用できると期待しています。

一方、膜タンパク質の大量合成法として、

メタノール資化性酵母を用いる方法を開発しています。この酵母は、メタノールを与えて培養すると、ペルオキシソームという細胞内の小器官が大きくなります。そこで、酵母にヒトの膜タンパク質をたくさんつけさせ、このペルオキシソームの膜に集めようと考えたのです。しかし、細胞内には、ほかにも膜で囲まれた小器官があり、つけさせたタンパク質がそちらの膜に入ってしまうという問題が起きました。

そこで、ヒトの細胞でペルオキシソームの膜にタンパク質を運ぶはたらきをするPex19pというタンパク質をこの酵母に導入し、ヒト由来のペルオキシソーム膜タンパク質をつくらせたところ、このタンパク質がペルオキシソーム様の膜に入ってくれました。この研究には、Pex19pとその受容体であるPex3pの複合体の構造解析に成功したことが大いに役立ちました。今後は、この手法をほかの膜タンパク質にも応用できればと考えています。



ヒトPex3p-Pex19p (1-44) 複合体の結晶構造。ペルオキシソーム膜タンパク質群を輸送するPex19pの断片（紫色）が、その受容体であるPex3p（黄色）に結合している。

図版提供：加藤博章