

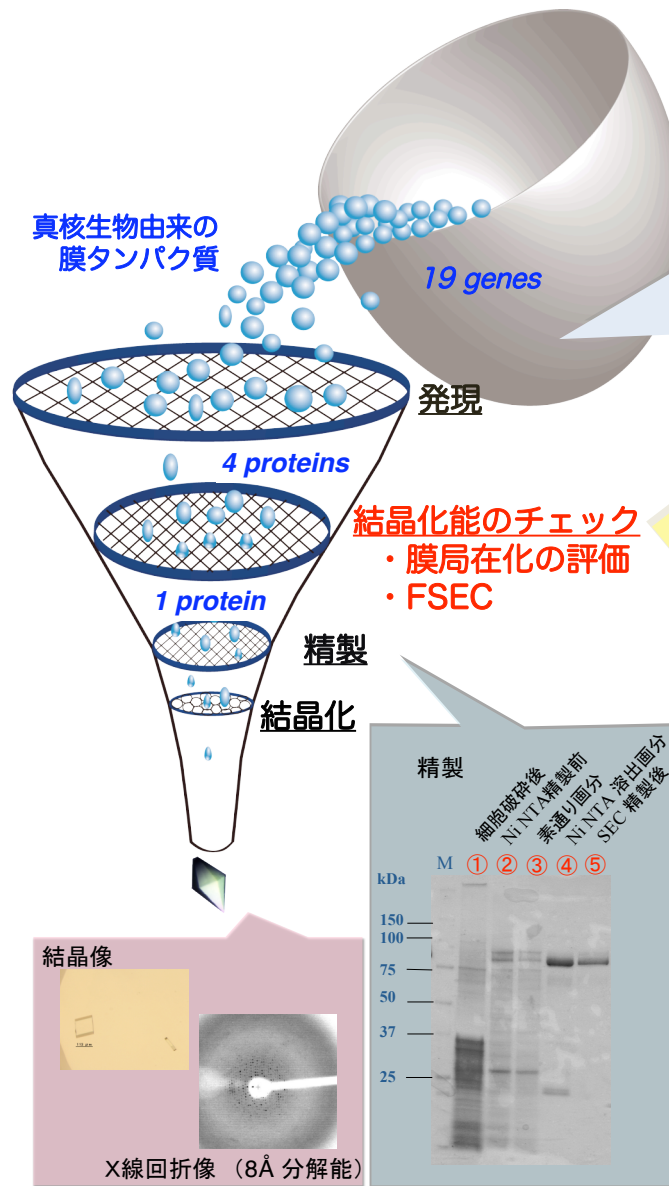
膜タンパク質の結晶化を目指した *Pichia pastoris* 発現系の構築の実際

京都大学大学院薬学研究科 平井秀憲、崎山慶太、寺角香菜子、江川響子、佐藤友美、中津亨、加藤博章

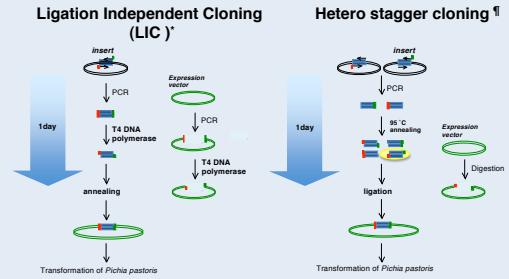
課題「膜タンパク質結晶化の革新的支援法の開発」では、真核生物由来の膜タンパク質の立体構造解析を推進するための技術開発として、膜タンパク質に適した過剰発現系（京大院薬・加藤G）と膜タンパク質の結晶化能の評価系（理研播磨・山下G）について技術開発を行っている。昨年度までに構築したメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いた発現技術と、GFP融合タンパク質技術を利用した結晶化能評価系を、我々は実際に結晶化に適した真核生物由来の膜タンパク質のスクリーニングに対して適用した。我々が開発している膜タンパク質支援技術の実用例として紹介する。

また、ペルオキシソーム膜を利用する過剰発現技術を開発する上で重要な、ペルオキシソーム膜タンパク質輸送メカニズムに関する研究の進捗状況を紹介する。

結晶化に適した真核生物由来膜タンパク質のスクリーニング



【多検体の発現系構築】 High-throughput Cloning



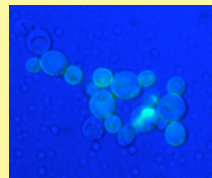
目的の膜タンパク質のN末またはC末にGFPが融合する発現系をそれぞれ構築し、*Pichia pastoris*に形質転換を行う。

*C.D. Aslanidis & P.J. de Jong (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6069–6074.
*Z. Liu (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2458–2459.

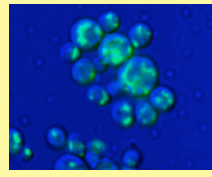
【結晶化能のチェック】 微量サンプル(2 ml 培養から得られる細胞量)で分析が可能

膜局在化の評価

(蛍光顕微鏡による観察)



サンプルA：細胞膜表面に局在

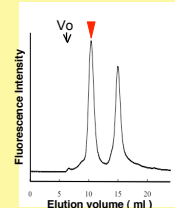
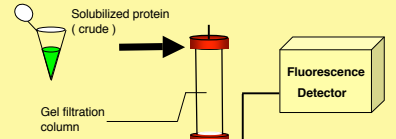


サンプルB：細胞内小器官に局在 (局在場所が不適切)

FSEC

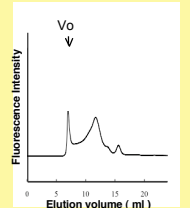
(fluorescence size exclusion chromatography)

・目的タンパク質の結晶化能を未精製状態で評価



・妥当な溶出位置に对称性の良いピークが検出される

↓
標的タンパク質が単分散状態で溶液中に存在し結晶化能が高い



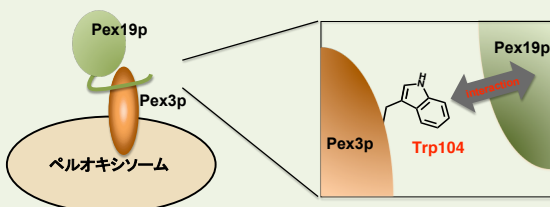
・Void volume (Vo)に高いピークが検出される

↓
標的タンパク質が凝集しており結晶化能が低い

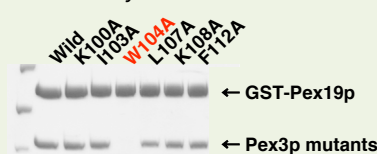
ペルオキシソーム膜タンパク質輸送メカニズムに関する研究

ペルオキシソーム膜輸送のメカニズムに関する知見は、ペルオキシソーム膜の利用技術を開発する上で重要な基礎となる。我々はペルオキシソーム膜輸送過程において必須であるPex19pとPex3pの相互作用の特徴を明らかとした。さらにはPex3pとPex19pフラグメントの複合体の結晶化を試みたところ、針状結晶が得られた。

Pex19p-Pex3p 相互作用様式



Pull-down assay



Pex19pとPex3pの相互作用にTrp104は重要

Pex3p-Pex19pフラグメント結晶像

