

利用成果報告書

1 課題番号	H27-K10
2 報告者	長江雅倫 国立研究開発法人理化学研究所糖鎖構造生物学研究チーム
3 利用区分	成果公開有償利用
4 利用課題名	脂質修飾蛋白質に選択的な輸送装置であるp24複合体の分子間相互作用解析
5 使用装置名	BIACORE 分子間相互作用解析装置
6 使用期間	平成 28年 3月 3日 ~ 平成 28年 3月 7日

- グリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型蛋白質は翻訳後修飾の一種で、蛋白質に糖脂質であるGPIが結合するためにこのように呼ばれている。GPIアンカー型蛋白質はマラリア原虫や酵母、ヒトに至るまで高度に保存されているが、細胞内における糖脂質の生合成や蛋白質への付加機構、細胞表面への細胞内輸送機構に関する構造生物学的研究は一切行われていない。
- p24蛋白質は分子量が約24kDaのII型膜貫通蛋白質で、小胞体からゴルジ体までの内膜系に存在する蛋白質ファミリーである。p24蛋白質ファミリーは酵母からヒトまで高度に保存されており、p24alpha, p24beta, p24gamma, p24deltaという四種類のサブファミリーが存在する。p24蛋白質ファミリーのドメイン構成は共通しており、内腔側にGolgi dynamics (GOLD)ドメイン、コイルドコイル領域を持ち、短い細胞質領域に輸送小胞であるCOP I, IIの結合モチーフを持つ。遺伝的解析や細胞生物学的実験からp24蛋白質がGPIアンカー型蛋白質の細胞内輸送に関与していることが明らかになっているが、その分子メカニズムは一切明らかでない。またp24蛋白質は複合体を形成して様々な蛋白質の輸送に関わると考えられているが、複合体形成のメカニズムに関する知見もほとんど得られていない。
- GOLDドメインはp24蛋白質が持つ唯一の球状ドメインであり、積み荷蛋白質の細胞内輸送や自身の複合体形成に深く関与していることが予想されるが、その実態は明らかでない。そこで昨年度はp24alpha, p24beta, p24gamma, p24deltaの各GOLDドメインを発現・精製し、表面プラズモン共鳴法を用いた分子間相互作用解析によって分子間の結合の有無を調べた。実験機器はBIACORE T-100であり、センサーチップはSeries S sensor chip CM5を使用した。まず四種類のうちの三種類をNHS/EDCIによってアミンカップリングでセンサーチップ上に固定化し、続いて希釈系列を作成した四種類のGOLDドメインを順次注入した。その結果、アイソフォームに依存したヘテロ二量体間の相互作用を検出することができた。検出に成功したヘテロ二量体の組み合わせに関しては、より詳細な結合速度や解離定数をカイネティックモードで算出した。この結果は、p24蛋白質のヘテロ分子間相互作用を生化学的に解析した初めての事例であり、こうした相互作用はp24蛋白質が複合体を形成する駆動力として働く可能性がある。
- 今年度は特異的な相互作用として検出されたp24betaとp24deltaの相互作用をより詳細に調べるべく、p24delta側に六種類の点変異を導入しp24betaとの相互作用を検証した。実験機器、および測定方法は昨年度に準拠した。その結果、p24beta-p24delta間の相互作用はアミノ酸側鎖によらず、主鎖同士の相互作用が主である可能性が示唆された。
- GPIアンカー型の修飾はマラリア原虫を始めとする幾つかの寄生虫の生存に必須である。p24蛋白質の複合体の形成原理の解明およびGPIアンカー型蛋白質の輸送メカニズムが明らかになれば、マラリアに対する特効薬の開発へとつながるポテンシャルがある。本研究は複合体の形成に関わるアミノ酸残基の同定を目指しており、新たなPPI (Protein-Protein Interaction) 阻害剤の研究に発展する余地がある。
- 7 利用成果・実績の概要
- 9 学会等における口頭・ポスター発表 該当無し
- 10 学会誌・雑誌等における論文掲載 該当無し