

## 酵母 *Candida tropicalis* の二種類の ペルオキシソームタンパク質の輸送に関する研究\*

丹 浩伸\*\*

広島大学大学院生物圏科学研究科

### A Study on Import of Two Peroxisomal Proteins of the Yeast *Candida tropicalis*

Hironobu TAN

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University  
Hiroshima 730, Japan

#### 要 旨

真核生物の細胞には独自の構造と機能を持った膜系 (オルガネラ) が存在する。ペルオキシソームは一層の脂質二重膜で囲まれたオルガネラであり、その機能は生物種により様々であるが、共通している点は細胞内での過酸化水素の発生を局限化し、これを分解することである。ペルオキシソームの重要性は、このオルガネラを欠失した遺伝病 (Zellweger 症) のヒトの多くが生後一年以内に死亡するという事実によって推察される。

オルガネラを構成するタンパク質の大部分は、核の遺伝子にコードされており、細胞質で合成される。従ってこれらのタンパク質は目的のオルガネラに正しく輸送されるための情報 (輸送シグナル) をその分子内に含んでいる。近年、小胞体 (分泌) タンパク質やミトコンドリアタンパク質ではその輸送シグナルの概略が明かとなり、シグナルの受容体や輸送の前後で働く分子シャペロンが解明されつつある。ある種のペルオキシソームタンパク質の輸送シグナルはC末端のトリペプチド (-Ser-Lys-Leu) であることが示されている。しかし、この配列を持たないペルオキシソームタンパク質も多数存在する。本研究ではペルオキシソームタンパク質の輸送シグナルの全体像を明らかにすることを目的とし、このオルガネラの形成が著しい酵母 *Candida tropicalis* のアシル-CoA 酸化酵素のサブユニット (PXP-4) と機能未知のタンパク質 (PXP-18) を材料にしてそれらの輸送シグナルを細胞内輸送系を用いて解析した。以下に主要な結果の3点を要約する。

1. *C. tropicalis* のアシル-CoA 酸化酵素のサブユニットである PXP-2 (82kDa) と PXP-4 (79 kDa) の遺伝子を近縁酵母 *Candida maltosa* に導入し、その発現産物が宿種ペルオキシソームへ輸送されることを見いだした。PXP-4 の短縮型ペプチドの輸送を解析し、PXP-4 のカルボキシル末端 2/3 からなるペプチド-Cは、PXP-4 と同じ効率で宿主ペルオキシソームへ輸送されることを示

---

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第19巻 (1993)

\* 広島大学審査学位論文

口頭発表日 1993年2月17日、学位取得日 1993年3月3日

\*\* 現在の所属：住友製薬株式会社総合研究所 創業第一研究所

した。一方、アミノ末端1/3からなるペプチド-Nも僅かながらペルオキシソームへ輸送されていたことから、PXP-4の輸送シグナルは少なくとも強弱2種類存在することを明らかにした。ペプチド-Cを更に短くした4種類のペプチドの解析からPXP-4の輸送シグナルはペプチド-Cの内部に分散して存在していることが示された。また、ある種の短縮型ペプチドは、一部の宿種ペルオキシソームタンパク質の輸送を阻害し、別の一部のものの輸送を阻害しなかったことから、ペルオキシソームタンパク質の輸送機構が複数存在することが示唆された。しかし、ペプチド-Cでさえ50kDaという大きなタンパク質であるために、またこの解析法の定量性が低かったために輸送に必要なアミノ酸配列の同定には至らなかった。

2. 分散型の輸送シグナルを解析するには、分子全体の解析が容易な低分子量のタンパク質を研究対象とすべきである。そこでこの酵母の機能未知の低分子量ペルオキシソームタンパク質 PXP-18 (16kDa) に着目し、その遺伝子の塩基配列を決定した。塩基配列からPXP-18は126アミノ酸からなる分子量13,675の塩基性タンパク質であり、その推定アミノ酸配列は、膜間での様々な脂質の輸送を促進するラットの非特異的脂質輸送タンパク質と33%の類似性のあることが判明した。ペルオキシソームから精製したPXP-18にもリボソームからミトコンドリアへのホスファチジルエタノールアミンの輸送を促進する非特異的脂質輸送活性を見いだした。これは酵母に非特異的脂質輸送タンパク質が存在することを示す最初の結果である。RNAプロット実験によりPXP-18がオレイン酸生育細胞で特異的に発現していること、また電子顕微鏡を用いた免疫学的方法によってPXP-18の局在部位がペルオキシソームのマトリックスであることを示した。これらの事実はPXP-18の本来の機能が細胞内の膜間でのリン脂質の輸送を促進することではなく、オレイン酸生育細胞に特異的なペルオキシソームの内部で必要とされる、何か別のものであることを予想させる。そこで、酵母ペルオキシソームの重要な役割の一つである脂肪酸の $\beta$ -酸化に着目し、これを律速するアシル-CoA酸化酵素への作用を調べた。その結果、PXP-18がこの酵素を酸性条件下で起こる失活から保護する能力のあることを見だし、ペルオキシソームで働く分子シャペロンである可能性を示した。

3. 上記2.の結果からPXP-18が確かにペルオキシソームのマトリックスに局在するタンパク質であることが確認された。そこで、PXP-18とその誘導体を酵母 *C. maltosa* と *Saccharomyces cerevisiae* で発現させ、発現産物の輸送を免疫化学的に定量することによって、このタンパク質の輸送シグナルを明らかにしようとした。野生型PXP-18は、いずれの酵母を用いた場合でも、可溶化した宿主ペルオキシソーム画分に有意な量認められ、その量はペルオキシソームを可溶化する前に測定された量（オルガネラの表面に存在する量を反映する）に比べて10倍以上高かった。これは異種酵母細胞内で発現したPXP-18も *C. tropicalis* 細胞内におけるのと同様、ペルオキシソームの内部に輸送されていることを示す。それに対して、C末端の4アミノ酸 -Arg-Pro-Lys-Leu を -Asp に置換した変異型PXP-18はペルオキシソーム画分に僅かにしか検出されず、しかもその量はペルオキシソームの可溶化の前後で殆ど変化しなかった。この結果は、C末端の4アミノ酸がPXP-18の輸送に必要であることを示すものである。動物で見いだされたペルオキシソームタンパク質の輸送シグナルがカルボキシル末端の -Ser-Lys-Leu であることから、PXP-18の輸送シグナルがカルボキシル末端のトリペプチド -Pro-Lys-Leu であると推定される。本研究はPXP-4に見られた分散型輸送シグナルの解明を目的としてPXP-18を解析したものであるが、期待に反してその輸送シグナルは既知のC末端型のものであった。しかし、-Pro-Lys-Leu はこれまでに同定された高等動物ペルオキシソームタンパク質のC末端輸送シグナルの類型としては認められていない配列であり、酵母で許容されるシグナルの範囲が動物のものとは異なることを示すことができた。