

令和元年6月3日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18142

研究課題名(和文)哺乳類細胞におけるペルオキシソームde novo合成の解析

研究課題名(英文)Study of de novo synthesis of peroxisomes in mammalian system

研究代表者

杉浦 歩(Sugiura, Ayumu)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：70784974

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):本研究はペルオキシソームde novo合成の生理的意義を解明することを目的とし、オリゴデンドロサイトの分化過程におけるペルオキシソームを解析した。分化過程の細胞の形態変化とともに、突起細部までペルオキシソームが広く分布することが観察された。また、ペルオキシソーム発現タンパク質や比重の不均一性も観察され、オリゴデンドロサイトの分化過程においてペルオキシソームがヘテロな集団として増殖していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペルオキシソームの個体における重要性は先天性ペルオキシソーム形成異常症の患者やそのモデル生物を用いた研究などから理解が進みつつあるが、正常な個体における動態やその意義については未知な部分が多く残されている。本研究でオリゴデンドロサイトの分化過程において、ペルオキシソームはヘテロな集団として増加することが観察された。ペルオキシソームの機能が生物種や細胞種間で異なることは明らかとされているが、本研究の結果は単一細胞内でも異なることを示唆している。今後はその機能の違いも明らかにすることにより、ペルオキシソーム生合成の生理的意義やオリゴデンドロサイト分化機構の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文):This study aims to uncover the physiological meaning of de novo synthesis of peroxisomes by analyzing peroxisomes in the differentiation of oligodendrocytes. Peroxisomes proliferated and distributed diffusely to the processes of oligodendrocytes during the differentiation. Moreover, peroxisomes presented heterogeneity of proteins and specific gravity, suggesting that peroxisomes proliferate as heterogenous populations during the oligodendrocyte differentiation.

研究分野:細胞生物学

キーワード:ペルオキシソーム オリゴデンドロサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは細胞骨格依存的に細胞内を動き回り、細胞内外の環境に応じて数が変化するダイナミックなオルガネラである。その数は成長・分裂あるいは *de novo* 合成により正に、ペルオキシソーム特異的なオートファジー（ペキソファジー）によって負に制御されている。*De novo* 合成は出芽酵母を用いた研究を中心に小胞体を起源とするモデルが広く受け入れられているが、哺乳類では未知な部分が多く残されていた。

Pex3 は酵母から哺乳類まで広く保存されているペルオキシソーム膜タンパク質で、Pex3 欠損細胞はペルオキシソームを欠くことから、ペルオキシソームの形成や維持に必須であると考えられている。Pex3 欠損出芽酵母に Pex3 を再発現させると、発現初期は小胞体に局在し、その後未成熟ペルオキシソームとして放出され、その他の膜や内腔タンパク質を取り込むことにより成熟していく。一方、Pex3 欠損哺乳類細胞を用いて同様の実験を行うと、ペルオキシソーム形成は回復されるが、Pex3 の発現初期における局在はミトコンドリアである。しかし、これは発現系のアーティファクトとして解釈され、詳細な解析は行われてこなかった。

本研究課題の申請時における予備的な実験で、Pex3 欠損哺乳類細胞に Pex3-YFP を再発現させると、それまでに報告されていたように発現初期においては Pex3-YFP はミトコンドリアに局在し、時間経過とともに成熟ペルオキシソームを形成することが観察された。さらにライブセルイメージングにより、Pex3-YFP 陽性の小胞様構造がミトコンドリア上で形成・放出されることが観察され、哺乳類細胞ではミトコンドリアがペルオキシソーム *de novo* 合成の起源となっていることが示唆されていた。その後の詳細な解析により、新生ペルオキシソームはミトコンドリアと小胞体のハイブリッドとして形成されることを見出し、哺乳類細胞におけるペルオキシソーム *de novo* 合成の新規モデルを提唱した (Sugiura *et al.*, *Nature*. 2017)。

2. 研究の目的

ペルオキシソームは生物種や組織による機能の多様性に加え、細胞膜構造から新たに *de novo* 合成されるなど可塑性の高いユニークなオルガネラである。また、細胞内代謝の中心的オルガネラの一つでもあり、ペルオキシソームの形成異常は複数の器官に異常をきたす重篤な疾患を引き起こす。哺乳類細胞では成長・分裂モデルを中心に研究が展開されており、*de novo* 合成の研究とその理解は酵母に比べ大きく遅れをとっている。研究開発者らは先行研究で哺乳類細胞におけるミトコンドリアを介した新規のペルオキシソーム *de novo* 合成経路を発見した。本研究では研究開発者らが見出した新規モデルを中心に解析することにより、ペルオキシソーム *de novo* 合成の生理的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞分画法

出生後 2 日目のマウス脳より大脳皮質を単離し、その組織ホモジネイトを 2,000 x g、20,000 x g、100,000 x g の遠心により段階的に分画した。各遠心後の沈殿物と最終上清をウェスタンブロッティング法により解析した。

(2) オリゴデンドロサイト培養

胎生期 14 日目のマウス大脳皮質より神経幹細胞塊 (neurosphere) を単離培養した。Neurosphere を 30 ng/ml の 3,3,5-triiodothyronine (T3) と 10 ng/ml の PDGF-AA 添加培地で培養することによりオリゴデンドロサイトへの分化を誘導し、誘導開始から各期間の細胞を免疫蛍光染色法により解析した。

4. 研究成果

<研究計画1 ペキソファジー後のペルオキシソーム数の回復>

ペルオキシソームは細胞内外の環境に応答して、数が変化するダイナミックなオルガネラである。ペルオキシソームの分解は主にペキソファジーにより行われ、げっ歯類を使った研究で肝臓におけるペルオキシソームの70-80%はペキソファジーによって分解されることが報告されている。ペキソファジーが誘導される条件やその分子機構についての研究は盛んに行われており、理解が進みつつあるが、その後どのようにペルオキシソーム数が回復していくかについてはほとんど不明のままである。そこで、研究開発者はペキソファジー後、定常状態に戻っていく過程でペルオキシソーム *de novo* 合成が誘導されるのではないかという仮説を立て、その検証を行った。既報の条件も含め種々の条件を試したが、細胞の生存能を保ちつつペキソファジーを誘導する適切な条件を設定するには至らなかった。仮説を正しく検証するためにはさらなる検討が必要である。

<研究計画2 発生・分化過程における *de novo* 合成の解析>

個体発生では様々な細胞が増殖や分化を活発に行う。その過程で細胞内代謝システムもダイナミックに変化し、その制御機構が徐々に明らかにされつつあるが、代謝の生化学的反応の場であるオルガネラ、特にペルオキシソームの発生や分化過程における役割は不明な点が多く残っている。ペルオキシソームは種々の細胞内代謝に関与しており、ミエリンを構成する主要なリン脂質であるプラズマローゲンの生合成もその一つである。中枢神経系では神経細胞の軸索にオリゴデンドロサイトの突起が巻き付きミエリンを形成している。ミエリンは跳躍伝導や神経軸索を保護する役割を担い、その異常や破綻は多発性硬化症などを引き起こす。げっ歯類を使った研究によりミエリン形成の盛んな出生直後にプラズマローゲン量が劇的に増加することが報告されているが、そのときのペルオキシソームの役割や挙動に関する十分な理解は得られていない。本研究ではペルオキシソーム *de novo* 合成の生理的意義を解明するために、オリゴデンドロサイトの分化過程に着目しペルオキシソームを解析した。

(1) ペルオキシソーム膜タンパク質のマウス脳発生時の局在

マウス脳におけるオリゴデンドロサイトの分化は出生前後で盛んに行われる。この過程で細胞は突起伸長などの動的な形態変化を示し、細胞膜の材料となる脂質の合成も盛んに行われる。ミエリンの主成分であるプラズマローゲンに加え、細胞膜脂質成分の一つであるコレステロールの生合成もペルオキシソームを介して行われる。ペルオキシソーム *de novo* 合成のときに一部のペルオキシソーム膜タンパク質はミトコンドリアや小胞体に局在する。そこで、出生後2日目の

マウス大脳皮質を単離し、細胞分画法により各分画を分け、ウェスタンブロッティング法によりペルオキシソーム膜タンパク質を解析した。それぞれの分画は2,000 x g はミトコンドリアが、20,000 x g はペルオキシソームが、100,000 はマイクロソームが濃縮されている(図1)。Pex3、

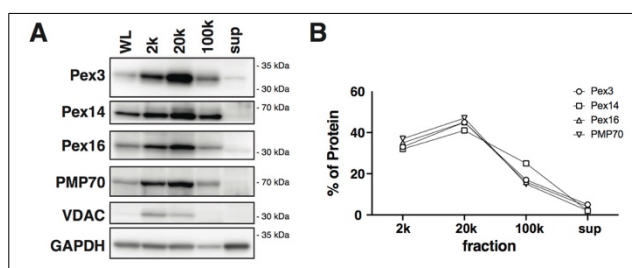


図1. マウス脳におけるペルオキシソームタンパク質の局在

A. 出生後2日目のマウス大脳皮質ホモジネートを細胞分画法により表記の各分画に分けた。5 μgの各分画をウェスタンブロッティング法により表記の抗体を用いて解析した。WL:全組織抽出。2k、20k、100k:各速度(x g)で遠心後の沈殿物。sup:最終上清。Pex3、Pex14、Pex16、PMP70:ペルオキシソーム膜タンパク質、VDAC:ミトコンドリア外膜タンパク質、GAPDH:細胞質タンパク質、ローディングマーカー

B. 各分画のバンド濃度の総和に対する各分画の割合。

Pex14、Pex16、PMP70 はいずれもペルオキシソーム膜タンパク質であり、20,000 x g 分画に最も濃縮されていたが、Pex14 は他のペルオキシソーム膜タンパク質と比べて 100,000 x g 沈殿分画にも多く回収され、特異的な局在を示した。

(2) オリゴデンドロサイト分化過程におけるペルオキシソームの分布

上記の結果は神経細胞やアストロサイトなど他の細胞も含めた全組織ホモジネイトであるので、次に *in vitro* 培養系を用いてより詳細なオリゴデンドロサイトへの分化過程におけるペルオキシソームを解析した。胎生期 14 日目のマウス大脳皮質より neurosphere を単離培養し、T3/PDGF-AA 添加培地でオリゴデンドロサイトへの分化を誘導をした。オリゴデンドロサイトへの分化はマーカータンパク質の発現と形態によりいくつかの段階に分類されている (図 2)。

分化誘導開始から細胞が突起を伸ばし始め、NG2 陽性/O4 陰性 (図 3 上段、OPC: Oligodendrocyte progenitor cell)、NG2 陽性/O4 陽性 (図 3 中段、Pre-OL: Preoligodendrocyte)、NG2 陰性/O4 陽性 (図 3 下段、Immature OL: Immature oligodendrocyte) と段階的にオリ

ゴデンドロサイトへと分化していき、ミエリン形成前の未成熟オリゴデンドロサイト (Immature oligodendrocyte) まで分化が誘導された。これらの細胞のペルオキシソームを蛍光免疫染色法により観察すると、細胞が突起を伸ばす形態変化とともにペルオキシソームも広く分布し、伸長した突起内までペルオキシソームが分布していることが観察された (図 3、矢頭)。

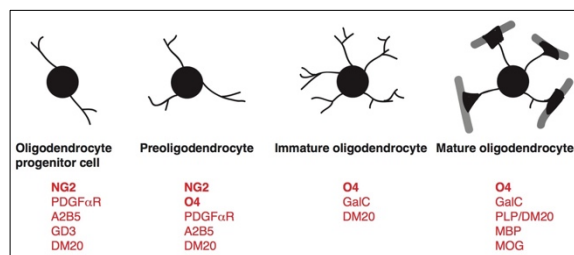


図 2. オリゴデンドロサイトの分化過程におけるマーカータンパク質と形態の模式図

各段階における形態と名称。赤字は各段階のマーカータンパク質、赤太字は本研究課題で用いたマーカータンパク質を表す。

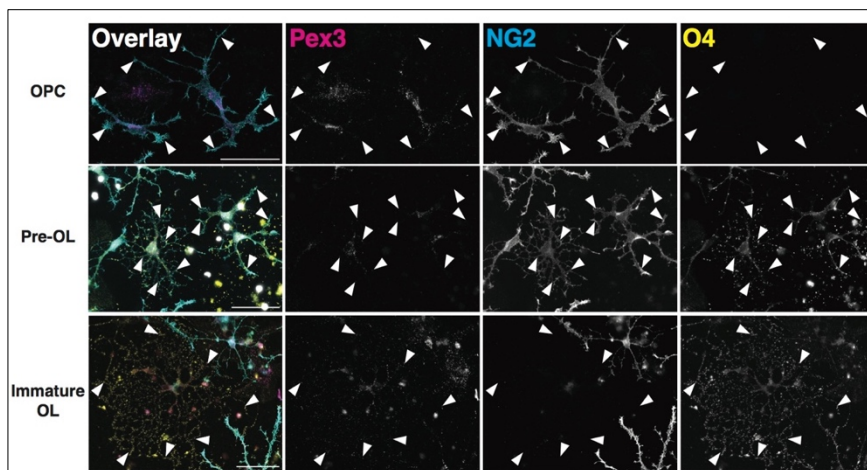


図 3. *In vitro* 培養系におけるオリゴデンドロサイトの分化過程におけるペルオキシソーム Neurosphere を 10 ng/ml の T3 と 30 ng/ml の PDGF-AA 添加培地で 1 週間 (OPC: Oligodendrocyte progenitor cell)、2 週間 (Pre-OL: Preoligodendrocyte)、3 週間 (Immature OL: Immature oligodendrocyte) 培養した後、固定し、免疫蛍光染色を上記の抗体で行った。矢頭は各細胞の末端のペルオキシソームを示す。スケールバー: 50 μ m

(3) ペルオキシソームの不均一性

図 1 の生化学的な解析により示されたペルオキシソーム膜タンパク質の分布の違いを免疫蛍光染色法により解析した。分化誘導されたオリゴデンドロサイトサイトを複数のペルオキシソームマーカーで染色すると、多くのペルオキシソームは全てのマーカー陽性であるが、一部のペルオキシソームで不均一な染色が観察された。Pex14 はどのペルオキシソームにも一様に染まっているが、PMP70 は弱く、Pex3 は検出されないペルオキシソームが観察された (図 4、矢

頭)。これらの結果はオリゴデンドロサイトにおけるペルオキシソームの不均一性を示し、分化過程にいてにヘテロに増殖したことを示唆している。また、図1の結果より、矢頭で示された Pex14 陽性のペルオキシソームの比重は軽いことが示唆される。しかし、これらのペルオキシソームの機能的な特徴を同定するためにはさらなる解析が必要とされる。

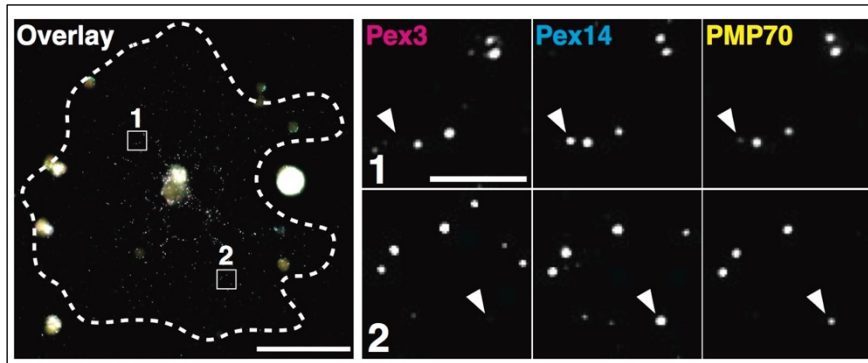


図4. 未成熟オリゴデンドロサイトにおけるペルオキシソームの不均一性
 誘導3週間後のオリゴデンドロサイトを固定し、上記の抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。左側の図の四角部分の拡大図の各チャンネルを右に示す。左側の図の点線は細胞の輪郭を示す。
 スケールバー: 50 μm (左図)、5 μm (右図)

(4) 考察・今後の展望

本研究はペルオキシソーム *de novo* 合成の生理的意義を解明することを目的とし、オリゴデンドロサイトの分化過程におけるペルオキシソームを解析した。分化過程とともにペルオキシソームが突起細部まで広く分布することが観察された。また、ペルオキシソーム発現タンパク質や比重の不均一性も観察され、オリゴデンドロサイトの分化過程においてペルオキシソームがヘテロな集団として増殖していることが示唆された。

ペルオキシソームの不均一性は他の組織や培養細胞でも報告されているが、その生物学的意義や形成機構は不明である。ペルオキシソームは多様な代謝機能を有しているが、それらが全て同一ペルオキシソーム内で行われているのではなく、細胞内にはある特定の機能に特化したペルオキシソームが存在することにより細胞内代謝装置として機能しているのかもしれない。本研究課題で特徴的な局在を示した Pex14 は、ペルオキシソーム内腔の酵素などを取り込むチャンネルを形成していることから、その可能性が考えられる。ヘテロなペルオキシソームが形成される機構としては既存のペルオキシソームの形質転換や非対称分裂に加え、*de novo* 合成が考えられる。今後は複数のペルオキシソームタンパク質を用いたライブセルイメージングや神経細胞との共培養によって、オリゴデンドロサイトへの分化過程におけるペルオキシソームの不均一性に対する *de novo* 合成の関与を解析したい。

ペルオキシソームの個体における重要性は先天性ペルオキシソーム形成異常症の患者やそのモデル生物を用いた研究などから理解が進みつつあるが、正常な個体における動態やその意義については未知な部分が多く残されている。本研究はペルオキシソーム *de novo* 合成の生理的意義の解明を目指したが、目的を達成するためにはさらなる解析が必要である。本研究でオリゴデンドロサイトの分化過程において、ペルオキシソームはヘテロな集団として増加することが観察された。ペルオキシソームの機能が生物種や細胞種間で異なることは明らかとされているが、本研究の結果は単一細胞内でも異なることを示唆している。今後はその機能の違いも明らかにすることにより、ペルオキシソーム *de novo* 合成が誘導される条件やその生理的意義の解明を目指す。

5. 主な発表論文等

該当なし

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

該当者なし

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。