

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2007 ~ 2008

課題番号： 19770087

研究課題名 (和文) ユビキチン化修飾によるペルオキシソーム形成機構の制御

研究課題名 (英文) Regulation of peroxisome biogenesis by ubiquitin modification

研究代表者

奥本 寛治 (OKUMOTO KANJI)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号： 20363319

研究成果の概要：

ヒトにおいて重篤な遺伝性欠損疾患群が報告されているように、ペルオキシソームは生体内で重要かつ必要不可欠な細胞内小器官の一つである。本研究では、このペルオキシソームの形成機構の中で最も重要である、ペルオキシソームマトリクスタンパク質のペルオキシソーム内への輸送局在化において、これまでに知られていなかったユビキチン化修飾による制御機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・構造生物化学

キーワード： 細胞内小器官、ペルオキシソーム、ユビキチン化、タンパク質輸送

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは、過酸化水素の生成を伴う種々の物質の酸化や極長鎖脂肪酸の β 酸化、エーテルリン脂質の合成、胆汁酸の生合成等多くの代謝経路を担う酵素群を有する細胞内小器官である。ヒトにおけるペルオキシソームの形成不全は、Zellweger 症候群

等の重篤な先天性代謝異常症の原因となることが報告されており、医学的見地からもペルオキシソームの生理的機能の重要性が示されている。これまでにヒトペルオキシソーム欠損症は 13 の異なる相補性群に分類されており、精巧かつ複雑な過程から構成されると推定されるペルオキシソーム形成機構に

は、多数の因子 (PEX 遺伝子、その遺伝子産物をペルオキシソームと呼称) が関与することが示唆されてきた。

ペルオキシソーム生合成の分子メカニズム解明およびペルオキシソーム欠損症の原因遺伝子同定を目的として、研究代表者所属研究室では、研究代表者が同定したものを含む多数のペルオキシソーム欠損性変異細胞を哺乳動物培養細胞 (CHO (チャイニーズハムスター卵巣由来) 細胞) を用いて分離してきた。酵母系を用いた外国グループとの激しいクロージング競争の下、ペルオキシソーム欠損性CHO変異細胞を利用した機能相補スクリーニング法およびEST データベース検索により、研究代表者が単離したPEX12 (Okumoto et al, MCB (1998))、PEX10 (Okumoto et al, Hum. Mol. Genet. (1998)) を含めてこれまでに14種の哺乳動物ペルオキシソーム形成因子の単離に成功し、既知のヒト先天性ペルオキシソーム欠損症13群全ての原因遺伝子の同定を完了させていた。

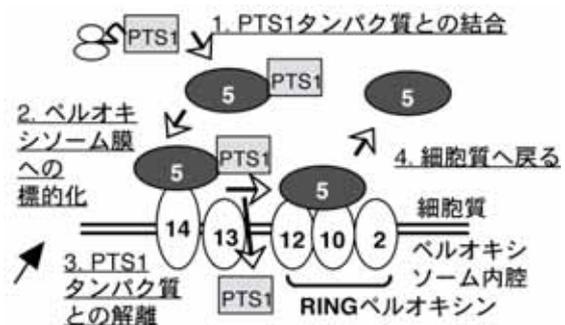
研究開始当初時点におけるこの分野での大きな課題の一つは、遺伝学的に同定された各ペルオキシソームの生理的機能の解析およびその統合的理解であった。これまでに同定された14種のペルオキシソームのうち、研究代表者が同定し研究対象としてきたPex12p、Pex10pを含む10種が、ペルオキシソームマトリクスタンパク質の輸送機構に関与することが判明していた (表1)。この中で中心的役割を果たすのが、ペルオキシソーム移行シグナル1型 (PTS1、C末端3アミノ酸配列) を持つペルオキシソームマトリクスタンパク質 (PTS1タンパク質と略) の細胞質レセプター、Pex5pである。これまでの私達および外国グループによる多くの研究結果から、Pex5pは、1) 遊離型リボソームで合成されたPTS1タンパク質を積荷として細胞質で認識、2) ペルオキシソーム膜

タンパク質であるPex14pを標的としてペルオキシソームに一過的に局在化、3) 他のペルオキシソーム膜タンパク質との相互作用を経る間にPTS1タンパク質をマトリクスへ移行させ、PTS1タンパク質と解離、4) 再び細胞質へと戻る、というシャトルレセプターとして機能することが提唱されていた (図1)。

表1. 哺乳動物ペルオキシソーム形成因子 (ペルオキシソーム) の機能

内腔タンパク質輸送	Pex10p, 12p, 2p (RINGフィンガー) Pex5p, 7p (PTS1&2レセプター) Pex14p, 13p (Pex5p結合タンパク質) Pex1p, 6p, 26p (Pex5pリサイクリング)
膜タンパク質輸送	Pex3p, 16p, 19p
形態制御	Pex11 α , β , γ

図1. Pex5pを介したペルオキシソームタンパク質輸送の概略



研究代表者は、C末に亜鉛結合性ドメインの一つ、RINGフィンガーを持つ3種の真在性ペルオキシソーム膜ペルオキシソームPex2p、Pex10pおよびPex12p(これらをRINGペルオキシソームと呼称)の機能解析を行ってきた。そして、これらRINGペルオキシソーム膜上で複合体を形成し、PTS1レセプターであるPex5pとの結合を介してペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送の制御に関与することを明らかにしていた (Okumoto et al, JBC (2000)) が、その分子機構についてはほとんど不明であった。一方、RINGフィンガーを持つタンパク質がユビキチン (Ub) の標的タンパク質への結合を触媒する酵素、Ubリガーゼ

として機能し、細胞周期、シグナル伝達、アポトーシス等多様な生命現象を制御する例が研究開始時前後に多数報告されてきていた。このような研究背景から研究代表者は、RING ペルオキシソーム複合体がペルオキシソーム膜上でUb 化酵素として機能することで、Pex5p を介したペルオキシソーム内腔タンパク質輸送を制御するという作業仮説を立て、解析を行うこととした。

2 . 研究の目的

この研究計画の立ち上げに先立ち、研究代表者は組換えRING ペルオキシソームを用いた *in vitro* Ub 化反応系を構築して3 種RING ペルオキシソームのUb リガーゼ活性を検討し、Pex10p のRING フィンガーがPex12p のRING フィンガーと複合体を形成することでUb リガーゼ活性を発揮することを明らかにしていた。そして、Pex10p/Pex12p 複合体のUb 化基質の一つが、PTS1 タンパク質レセプターである Pex5p であることを示す結果を得ていた。

従って本研究では、ペルオキシソーム膜上に存在するRING ペルオキシソームによるPex5p のUb 化修飾の分子機構、およびそのUb 化修飾によるペルオキシソーム内腔タンパク質輸送の制御機構を明らかにすることを目的とした。プロテアソーム依存的な特異的タンパク質分解にポリUb化修飾が必須であることは多数報告されているが、細胞内タンパク質輸送へのUb 化の関与は、ERAD (ER-associated degradation) 経路による変性タンパク質のER 内腔から細胞質への逆行輸送や、エンドサイトーシス経路を介したリソソーム/液胞への膜タンパク質選別機構等があるが、報告例は少なく、多くは酵母を用いた実験系で解析されていた。Ub 化修飾の関与が示唆される Pex5p を介したペルオキシソームタンパク質輸送は、細胞質との往來をする点で、上記2 例の細胞内タンパク質輸送よりむしろ核タン

パク質輸送に類似しているとの意見もあり、本研究は哺乳動物細胞を使った実験系であることも含め、新規性の高い、ペルオキシソーム独自の輸送機構およびその制御機構の解明につながると考えた。

3 . 研究の方法

(1) 研究代表者は、予備実験の段階で大腸菌組換えRING ペルオキシソームをE3 として使用した *in vitro* Ub 結合実験系を確立し、Pex10p/Pex12p 複合体がPTS1 レセプターであるPex5p を基質としてUb 化することを見出していた。この結果は、細胞内でもPex5p がRING ペルオキシソームによってUb 化されることを示唆しており、Ub 化修飾型Pex5p と無修飾型Pex5p の生理的機能の差異を見出すことが重要であった。そこでまず、Pex5p のUb 化標的Lys 残基を特定するために *in vitro*、*in vivo* 両方の実験を行った。

チャイニーズハムスターPex5p 分子内にはUb 化の標的部位と成り得る Lys 残基が 17 箇所存在するが、Lys 残基を Arg 残基に逐次置換した変異型 Pex5p を多数作製し、これを基質として *in vitro* Ub 結合実験に使用することでPex5p のUb 化標的部位を検索した。同様の Lys-Arg 置換型 Pex5p 変異体を動物培養細胞にも発現させ、*in vivo* における Pex5p のUb 化標的部位も検索した。

内在性Pex5p のUb 化について検討するために、所属研究室が所有する多数のペルオキシソーム欠損性CHO 変異細胞を用いた免疫沈降法、あるいはプルダウン法を試み、内在性Pex5p のUb 化へのRING ペルオキシソームの関与を検討した。Pex12p、Pex2p の欠損CHO 変異細胞ではPex5p のUb 化が消失している可能性が高かったが、他のペルオキシソーム欠損変異細胞でもPex5p のUb 化

の程度を検討し、ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送のどの段階にPex5pのUb化が関与するのかを推定した。

(2) ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送におけるPex5pへのUb化修飾の役割を明らかにすることが最大の課題であった。従って、上記の方法で検討したPex5pのUb化標的部位の知見に基づいて、Ub化標的LysをArgに置換したUb化修飾欠損型Pex5p変異体を作製し、以下に示す*in vitro*、*in vivo*の両実験系で、これまでに明らかとされてきたPex5pの機能について、Ub化修飾型Pex5pとの差異を検討した。

野生型およびUb化修飾欠損型Pex5p変異体を、PEX10欠損性ペルオキシソーム病患者由来線維芽細胞に導入し、Pex5pのUb化がペルオキシソーム形成回復活性に影響するのかを検討した。

これまでの研究によりPex5pはいくつかの因子と細胞内で相互作用することが知られており、分子のC末側領域にあるTPRドメインで基質のPTS1シグナルを認識、結合し、N末側領域でペルオキシソーム膜ペルオキシシンPex14pおよびPex13pと結合する(図1参照)。*in vitro* Ub化反応系で生成したUb化Pex5pおよび無修飾型Pex5pを準備し、これらと既知のPex5p結合因子との結合を検討することで、Pex5pとその結合因子との相互作用におけるUb化修飾の影響を調べた。また、Pex5pと既知のPex5p結合因子を前もって複合体として準備しておき、これらを基質として*in vitro* Ub化反応を行うことで、Pex5p結合因子がPex5pのUb化を制御する可能性を検討した。

Pex5pは定常状態でその90%は細胞質

に、残りの10%はペルオキシソームに局在化しており、細胞質とペルオキシソームの間を行き来していると考えられている(図1)。Ub化修飾欠損型Pex5p変異体をCHO細胞に導入し、免疫染色法、細胞分画法、および*in vitro* Pex5p輸送解析系を使って、Pex5pのUb化修飾がどのようにしてPex5pの細胞内局在に関与するのかを検討した。

4. 研究成果

(1) Pex5pのUb化標的Lys残基の特定

Pex5p分子内に存在する、Ub化の標的部位と成り得るLys残基をArg残基に逐次置換した変異型Pex5pを基質に、そしてPex10p/Pex12pをE3として利用した*in vitro* Ub結合実験を行い、複数のLys残基にUb修飾がなされていることを明らかにした。また、同様のLys-Arg置換型Pex5p変異体を動物培養細胞に発現させることで、*in vivo*におけるPex5pのUb化標的部位の同定を試みたが、*in vitro*におけるPex5pのUb化修飾は、その分子全体の中で非常に少ない割合でしかなされておらず、複数のLys残基にUb修飾が入っていることは確認できたものの、その部位については完全な特定にはいたらなかった。また*in vivo*においては、Pex10p/Pex12pを含めペルオキシソームおよびその機能が関与しない、全く独立なPex5pに対するUb化修飾機構も存在することを示唆する結果が得られた。

内在性Pex5pのUb化の検出については、内在性Pex5pの免疫沈降による検出効率が低かったため、Pex5p結合タンパク質であるPex14pのN末断片を使用したプルダウン法により検出を試み、確かに内在性Pex5pがUb化修飾を受けていることを確認した。しかしながら、上記の方法による

内在性Pex5p のUb 化修飾はHEK 細胞では観察できるものの、CHO 細胞ではほぼ検出限界レベルであり、当初計画していたペルオキシソーム欠損性CHO細胞を用いた内在性Pex5p のUb 化の有無の検討は行えなかった。

(2) RING ペルオキシシンによるPex5p のUb 化修飾は、ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送の効率化に關与する

Pex5p 分子内に存在するLys 残基17箇所全てをArg 残基に置換した変異型Pex5p (Pex5p-K0) を作製し、PEX5 欠損性CHO 変異細胞に導入しペルオキシソーム形成回復活性を検討したところ、野生型Pex5p に対してPex5p-K0 変異体では約40%程度の活性しか示さなかった。この時、確かにPex5p-K0 変異体はUb 化修飾を受けていないことも生化学的に確認した。これらのことから、Pex5p のUb 化はペルオキシソーム形成回復活性に必須ではないものの、その効率に關与することが示唆された。

in vitro Ub 化反応系で準備したUb 化Pex5p および無修飾型Pex5p と既知のPex5p 結合因子との結合を検討したところ、解析した全てのPex5p 結合因子との相互作用にPex5pのUb 化の有無で差異は見られなかった。この結果から、Pex5p のUb 化修飾は1対1の直接の結合にはほとんど影響がないことが判明した。一方、in vivo Pex5p のUb 化アッセイ系に既知のPex5p 結合タンパク質を加えて反応を行った結果、ペルオキシソーム膜タンパク質であるPex14p と結合した状態でのPex5p はUb 化を受けないということが明らかとなった。これらの結果から、Pex5p のUb 化修飾はPex5p がペルオキシソーム膜上のPex14pを標的としてペルオキシソーム膜へ到達し、その後

Pex14p と解離してから起こる反応であることが強く示唆された。

in vitro Pex5p 輸送検出系において、Pex5p-K0 変異体は野生型Pex5p と同様の効率でペルオキシソームへとインポートされた。一方、Pex5p-K0 変異体はペルオキシソーム膜から細胞質へのエクスポート量が野生型に比べて減少しており、この減少の割合はPex5p-K0変異体によるペルオキシソーム形成回復活性の低下度合と關与していた。これらの結果から、Pex5p のUb 化修飾は細胞質からペルオキシソームへのインポートには影響しないものの、ペルオキシソームから細胞質への効率的なエクスポートに必要であることが強く示唆された。

以上の研究成果をまとめると、基質であるPTS1 タンパク質と細胞質で結合した Pex5p は、ペルオキシソーム膜上の Pex14p を標的としてペルオキシソームへと局在化する。この時点では Pex5p への Ub 化修飾は行われませんが、PTS1 タンパク質をマトリクスに移行させ、Pex14p と解離した後、Pex10p/Pex12p 複合体により複数の Lys 残基が Ub 化修飾され、より効率的なペルオキシソームから細胞質へのエクスポートがなされると結論した。この研究期間中に、酵母において Pex5p の Ub 化修飾が Pex5p のペルオキシソームから細胞質へのエクスポート過程に重要であるという報告が海外のグループからなされたが、Pex5p を Ub 化修飾する Ub リガーゼ (Pex10p/Pex12p 複合体) の同定、およびその in vitro での再構成は本研究成果が酵母、哺乳動物を通じて初めての知見である。ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送における Ub 化修飾による制御機構についての分子レベルでの解析は世界的にも例がなく、インパクトは大きいと考えられる。現在これ

らの結果を論文としてまとめ、英文雑誌に投稿中である。

今後の展開としては、Pex10p/Pex12p 複合体により Ub 化された Pex5p がどのような分子および分子メカニズムにより認識されてエクスポート過程に關与するのかを検討することが大きな課題である。研究代表者はすでに *in vitro* で Pex5p を Ub 化する系を有しているため、これを利用した Ub 化 Pex5p 特異的な結合因子の同定を試みる予定である。また、ペルオキシソームには Pex10p、Pex12p の他にもう一つの RING ペルオキシシン Pex2p が存在しており、これも Ub リガーゼとして機能することが予想されることから、その基質同定および生理的機能の解析も重要な課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計5件)

奥本 寛治、亀谷 紫、藤木 幸夫

ペルオキシソームマトリクスに局在する2種のセリンプロテアーゼ、PsLon と Tysnd1 の生理機能解析

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)

平成20年12月9日

神戸ポートアイランド (神戸市)

奥本 寛治、藤木 幸夫

ペルオキシソーム移行シグナル1型レセプター Pex5p のドミナントネガティブ変異体の機能解析

平成20年度日本生化学会九州支部例会

平成20年5月18日

九州大学 (福岡市)

奥本 寛治、藤木 幸夫

ペルオキシソーム移行シグナル1型レセプター

—Pex5p のドミナントネガティブ変異体を用いたペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送機構の解析

第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会

平成19年12月13日

パシフィコ横浜 (横浜市)

奥本 寛治、藤木 幸夫

A dominant-negative mutant of peroxisome targeting signal type-1 receptor Pex5p is impaired in the export from peroxisomes. The American Society for Cell Biology, 47th Annual meeting (第47回アメリカ細胞生物学会)

平成19年12月5日

Washington Convention Center (ワシントン DC、アメリカ)

奥本 寛治、夏山 竜一、藤木 幸夫

Novel function of peroxisome targeting signal type-1 receptor Pex5p in Pex14p stability: study using a newly isolated peroxisome-deficient CHO mutant, ZPEG101. 第40回日本発生生物学会、第59回日本細胞生物学会 合同大会

平成19年5月30日

福岡国際会議場 (福岡市)

[その他]

研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページ

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/%7Eetashisa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥本 寛治 (OKUMOTO KANJI)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号: 20363319