

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06711

研究課題名(和文) ペルオキシソームタンパク質輸送を制御するユビキチンシグナルの役割

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of ubiquitin signaling regulating protein transport to peroxisomes

研究代表者

真野 昌二 (Mano, Shoji)

基礎生物学研究所・オルガネラ制御研究室・准教授

研究者番号：20321606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナ apem7 (aberrant peroxisome morphology 7) 変異体の解析から、ペルオキシソームタンパク質膜上のユビキチン化の分子機構を明らかにした。APEM7遺伝子が植 Peroxin 4 (PEX4) をコードしており、ユビキチン系のE2酵素であるユビキチン結合活性をもち、apem7変異によるユビキチン化の異常がペルオキシソームタンパク質輸送効率の低下を引き起こすことが明らかとなった。このユビキチン化を介したペルオキシソームタンパク質輸送経路は、基部陸上植物のゼニゴケにおいても存在することから、植物の陸上化の初期に既に獲得されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン化によるペルオキシソームタンパク質輸送制御は、酵母や動物でも報告されているものの植物での知見は少なかった。同定したPEX4は植物以外では酵母でのみ確認されており、実際にユビキチン結合活性を確認できたのは、多細胞生物では本研究が初めてである。また、進化過程における基部陸上植物のゼニゴケにおいても、同じ制御機構の存在が示されたことから、この制御機構の植物における普遍性に迫ることができた。しかしながら、この制御機構は動物や酵母で全く同じではなく、生物種に応じた違いがあることが示唆され、真核生物におけるユビキチン制御以降の共通性と多様性の理解に繋がる知見として意義がある。

研究成果の概要(英文)：To better understand molecular mechanism(s) of ubiquitination on the peroxisome membrane, we analyzed the Arabidopsis apem7 (aberrant peroxisome morphology 7) mutant, which exhibits reduced protein transport efficiency. The APEM7 gene encodes PEX4 (Peroxin 4), which had the ubiquitin conjugating activity. This study revealed that the abnormal ubiquitination caused by the apem7 mutation affects protein transport to peroxisomes. In addition, we succeeded in the identification of proteins involved in the ubiquitination on peroxisomal membranes in an early diverging land plant, the liverwort *Marchantia polymorpha*. The results showed the presence of ubiquitination-dependent protein transport to peroxisomes in *Marchantia polymorpha*, indicating that the ubiquitination-dependent protein transport to peroxisomes was acquired early in the evolution of land plants.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ペルオキシソーム シロイヌナズナ apem変異体 タンパク質輸送 Peroxin ユビキチン化 ゼニゴケ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは、植物のみならず酵母や動物など真核細胞に普遍的に存在するオルガネラで、脂肪酸代謝や活性酸素の除去といった共通の機能をもつ。それらの共通の機能に加え、酵母ではアルコールの代謝、動物ではコレステロールや胆汁酸の生合成、植物では光呼吸やジャスモン酸の生合成など生物種に特化した機能が存在する。ペルオキシソームは独自のオルガネラゲノムが存在しないため、構成するタンパク質は全て核ゲノムにコードされている。そのためペルオキシソームが様々な機能を発揮するには、ペルオキシソームへの正確なタンパク質輸送が必須である。このペルオキシソームへのタンパク質輸送の解明は、動物、植物、酵母において精力的に解析されているものの、その全容は明らかになっていない。我々は、ペルオキシソームの形態や大きさ、数、細胞内分布、タンパク質輸送に異常を示すシロイヌナズナ *apem* (*aberrant peroxisome morphology*) 変異体を多数単離して、ペルオキシソームの機能や形成機構の解析を進めてきた。これまでに、*APEM1*、*APEM2*、*APEM3*、*APEM4*、*APEM9*、*APEM10* 遺伝子の同定とそれら遺伝子産物の機能について明らかにしている。*apem7* 変異体は、ペルオキシソームタンパク質輸送の効率が低下した変異体として単離し、*APEM7* 遺伝子に1塩基置換を生じ、その結果、アミノ酸のプロリンがロイシンに置換することが明らかとなっていた。この *APEM7* 遺伝子は、酵母でのみ報告されている Peroxin 4 (PEX4) に相同性があるタンパク質をコードしていた。PEX4 はユビキチン系の E2 酵素として働くユビキチン結合活性をもつことが報告されているものの、シロイヌナズナの PEX4 がユビキチン結合活性をもつのか、ユビキチン化によるタンパク質輸送制御機構は存在するのかわからないままであった。

また、基部陸上植物として位置づけられている、ゼニゴケのゲノム解読が終了し、バイオインフォマティクス解析により、ゼニゴケにおけるペルオキシソーム遺伝子の探索が可能になったことから、シロイヌナズナから得られた知見が、他の植物にも当てはまるのか、あるいは特異性があるのかを解析できるようになった。

### 2. 研究の目的

本研究は、シロイヌナズナ *apem7* 変異体の解析を進め、シロイヌナズナの PEX4 の機能を明らかにするとともに、*apem7* によるタンパク質機能及び植物個体への影響を明らかにすること、バイオインフォマティクス解析からゼニゴケのシロイヌナズナのペルオキシソーム因子のホモログを同定し、それらの機能解析から共通性あるいは特異性を明らかにすることを計画した。

### 3. 研究の方法

(1) *APEM7* 遺伝子がコードするタンパク質は、ユビキチン結合活性をもつ酵母の PEX4 と相同性を示す。既に、ウサギ網状赤血球ライセートを用いた無細胞翻訳系を用いてユビキチン化の検出を試みたところ、非還元条件下では PEX4 の大きさに相当する約 17 kD のタンパク質に加え、ユビキチン 1 分子が結合した PEX4 相当の約 27 kD のタンパク質が検出された。この 27 kD のタンパク質は、メルカプトエタノールを添加した還元条件下では消失し、17 kD タンパク質の量が増加することが明らかとなった。また、ユビキチンが結合すると想定されたシステインをアラニンに置換した場合には、非還元条件下でも 27 kD タンパク質は検出されないことから、PEX4 がユビキチンを結合する活性を有していることが明らかとなった。このユビキチン結合能をさらに詳細に検討するために、*in vitro* ubiquitination アッセイ及びアミノ酸置換をもつ PEX4 を *apem7* 変異体に導入して検討した。

(2) PEX4 タンパク質の細胞内局在解析を行うため、作製した PEX4 特異抗体を用いて、免疫電子顕微鏡観察と細胞分画後のウエスタンブロット解析を行った。

(3) *apem7* の変異とペルオキシソーム機能との関係を明らかにするために、ショ糖要求性、4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid 耐性との検討を行った。

(4) *APEM7* 遺伝子発現を明らかにするために、*APEM7* プロモーターの下流に *GUS* 遺伝子をつないだ融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを用いた *GUS* 染色を行った。

(5) ペルオキシソームタンパク質輸送を含むペルオキシソーム形成機構の共通性及び多様性に関する知見を得るために、ゼニゴケ及び近縁種のバイオインフォマティクス解析を行い、PEX4 を含む Peroxin 因子群の同定を試みた。

(6) バイオインフォマティクスにより明らかにしたゼニゴケのペルオキシソーム遺伝子のいくつかを *Crispr/Cas9* 法によるゲノム編集に破壊し、その影響を検討した。

(7) モデル植物であるシロイヌナズナやゼニゴケとは異なる植物におけるペルオキシソームタンパク質輸送機構の共通性及び多様性に迫るために、トウダイグサ科トウゴマ属のヒマを用いた解析を開始した。ゲノム編集技術による遺伝子破壊を行うためのツールとして、ヒマ用の Crispr/Cas9 ベクターの構築を開始した。

#### 4. 研究成果

(1) In vitro ubiquitination アッセイに供するために、野生型 PEX4 (PEX4WT)、*apem7* 変異をもつ PEX4 (PEX4P123L)、ユビキチンが結合すると予想されるシステインをアラニンに置換した PEX4 (PEX4C90A)、及びペルオキシソーム膜上で E3 酵素として機能すると予想される PEX2、PEX10、PEX12、E3 酵素を介してユビキチンを最終的に受け取る人工基質のタンパク質を得るために、タグを付けた融合遺伝子を大腸菌で発現させ、タンパク質の精製することには成功した。それらを用いて、様々な条件の下、in vitro ubiquitination アッセイを試みたが、PEX4WT を用いてもユビキチン結合能を見いだすことはできなかった。

そこで、PEX4WT、PEX4P123L、PEX4C90A を *apem7* 変異体に導入することで、ユビキチン活性の影響を検討した。*apem7* 変異体は、ペルオキシソーム局在型の GFP を発現している形質転換シロイヌナズナ (GFP-PTS1) を親株として作製されており、GFP-PTS1 では粒状として GFP が観察されるが、*apem7* 変異体では GFP がサイトソルに局在する。PEX4WT を *apem7* 変異体で発現させると GFP の蛍光は粒状に観察された。一方、PEX4P123L や PEX4C90A を発現させた場合は GFP の蛍光はサイトソルで観察され、*apem7* の表現型を相補できなかった。PEX4C90A を導入しても相補できないという結果は、PEX4 のユビキチン結合活性が GFP のペルオキシソームへの輸送へ必要であることを示している。次に GFP-PTS1、*apem7*、PEX4WT を発現している *apem7* 植物体から総タンパク質を抽出し、PEX4 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。非還元条件下では PEX4 の大きさに相当する約 17 kD のバンド及び、ユビキチン 1 分子が結合した PEX4 相当の約 27 kD のバンドが全てのタンパク質中に検出された。しかしながら、メルカプトエタノールを添加した還元条件下において、GFP-PTS1 と PEX4WT を発現している *apem7* 植物体では、約 27 kD のバンドが消失し 17 kD タンパク質の量が増加するものの、*apem7* 植物体では約 27 kD のバンドは完全には消失しなかった。この結果は、*apem7* 変異により PEX4 の構造が変化した結果、還元剤がアクセスできない状態になっているか、PEX4 の異なる部位にユビキチンが結合していることを示唆している。

(2) PEX4 抗体及びペルオキシソームのマーカー酵素であるカタラーゼの抗体を用いて二重電子顕微鏡観察を行ったところ、マトリクス酵素であるカタラーゼはペルオキシソーム内部に、PEX4 はペルオキシソーム膜周辺部にシグナルが観察された。次に、親株の GFP-PTS1 と *apem7* 変異体から総タンパク質を抽出後、膜画分と可溶性画分に分画しウエスタンブロット解析を行ったところ、非還元条件下において PEX4 の大きさに相当する約 17 kD のバンド及び、ユビキチン 1 分子が結合した PEX4 相当の約 27 kD のバンドが膜画分に検出された。以上の結果から、PEX4 はペルオキシソーム膜に局在し、ユビキチン化はペルオキシソーム膜上で行われていることが明らかとなった。

(3) *apem7* 変異によるペルオキシソーム機能への影響を明らかにするために、ペルオキシソーム機能の一つである脂肪酸酸化の活性を、シヨ糖要求性と 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid (2,4-DB) 耐性として検討した。脂肪酸酸化の機能が低下すると、シヨ糖を含まない培地での発芽が抑制される一方、2,4-DB を含む培地での発芽抑制が抑えられ、野生型では発芽できないものの脂肪酸酸化の変異体では発芽可能となる。シヨ糖を含まない培地と 2,4-DB 培地を併用して、*apem7* 変異体の発芽試験を行ったところ、野生型に比べるとシヨ糖を含まない培地での発芽は著しく低下し、2,4-DB 培地においては少し耐性を示したことから、*apem7* 体では脂肪酸酸化系は完全に抑制されていないものの、活性が低下していることが明らかとなった。

(4) 植物個体において PEX4 機能が必要となる器官や時期を明らかにするために、既に作製した PEX4 プロモーター下で GUS を発現する形質転換シロイヌナズナを用いて、GUS 染色実験を行った。PEX4 遺伝子は、葉や花弁の維管束、雌しべの柱頭で強く発現するほか、老化が始まった古い葉においても発現が高いことが明らかとなり、このような組織や時期において PEX4 を介したペルオキシソームタンパク質輸送が必要であることが示唆された。

(5) *Marchantia polymorph*、*Mesotaenium endlicherian*、*Klebsormidium nitens* のゲノムに対してパイオインフォマティクス解析により、PEX4 を含むペルオキシソーム形成に関わる PEX 因

子群を同定したところ、ほぼ全ての PEX 因子を同定することに成功した。シロイヌナズナでは 2 つ存在する *PEX3* と *PEX19* 遺伝子は、3 つの種では 1 つであり、シロイヌナズナで 5 つ存在する *PEX11* 遺伝子は、*Marchantia polymorpha*、*Mesotaenium endlicherianum* では 2 つ、*Klebsormidium nitens* では 1 つであることが明らかとなり、シロイヌナズナは進化の過程で遺伝子数を増やしていったことが推測された。

(6) 上記の同定した *Marchantia polymorpha* の *PEX* 遺伝子の中で、まずユビキチン系に関わる *PEX4*、*PEX12*、*APEM9* 遺伝子のゲノム編集株の作製を、蛍光タンパク質の Citrine によりペルオキシソームが可視化されている形質転換ゼニゴケを親株として Crispr/Cas9 法により試みた。先行して作製できた *PEX4* 遺伝子破壊株については、野生株よりも個体の成長が遅れる表現型を示した。*PEX12* と *APEM9* については、破壊株は得られなかった。現在、別の guide RNA を用いて再挑戦しているが、これらの破壊株は致死になる可能性もあるため、RNAi による抑制株の作製に変更しなければならない可能性も考慮して、今後の研究を進めていきたい。

(7) ヒマのゲノム編集株作製を目的として、ヒマ用の Crispr/CAS9 ベクターの構築を進めた。ヒマの U6 プロモーターを同定したところ 6 つ存在することが明らかとなり、U6 RNA の上流 2 kb に GFP-PTS に繋げ、ヒマ細胞で発現させたところ、全てのプロモーターにおいてペルオキシソームを可視化させることに成功した。その後、上流 500 bp、300 bp と領域を狭めたところ、300 bp においてもプロモーター活性があることが明らかとなった。今後、このヒマ U6 プロモーターに加え、ヒマ EF1 プロモーターも同定し、ヒマ用の Crispr/CAS9 ベクターを作製する。ベクター構築後は、それを用いてヒマのユビキチン系遺伝子の破壊株の作製を進め、ユビキチンシグナリングの共通性と多様性を明らかにする。

以上のように、当初計画していたシロイヌナズナにおけるペルオキシソーム輸送を制御するユビキチン系を介したタンパク質輸送について知見を得ることができ、論文及び図書の一章として発表することができた。加えて、国内の学会で発表するとともに、シロイヌナズナの国際学会ではトークにも選ばれた。

このシロイヌナズナで明らかにされたユビキチン系を介したペルオキシソームのタンパク質輸送機構については、ゼニゴケなど進化過程の初期に出現した植物においても保存されていることが明らかとなり、今後はその制御機構の共通性や多様性についても明らかにしていく必要がある。ゼニゴケにおける Crispr/Cas9 法による遺伝子破壊実験は、一部の遺伝子の破壊株しか得られなかったが、これはゼニゴケの葉状体がハプロイドであり、細胞におけるペルオキシソーム機能の重要性を考えると、遺伝子破壊された株が致死になってしまっている可能性がある。今後は RNAi 等の機能抑制株による解析も検討する必要がある。

次世代シーケンサーの発達により非モデル植物における解析も可能となったことから、現在、菌従属植物のギンリョウソウと絶対寄生植物のオロバンキという生存戦略がシロイヌナズナやゼニゴケと全く異なる植物におけるユビキチン系の制御機構の有無、その役割について解析を開始している。これらの知見から、植物におけるユビキチン系を介したペルオキシソームタンパク質輸送の分子機構の共通性と多様性に迫っていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goto-Yamada, S., Oikawa, K., Hayashi, Y., Mano, S., Yamada, S. and, Nishimura, M.	4. 巻 2003
2. 論文標題 Pexophagy in plants: a mechanism to remit cells from oxidative damage caused under high-intensity light	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2023.2175570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Oikawa, K., Goto-Yamada, S., Hayashi, Y., Takahashi, D., Kimori, Y., Shibata, M., Yoshimoto, K., Takemiya, A., Kondo, M., Hikino, K., Kato, A., Shimoda, K., Ueda, H., Uemura, M., Numata, K., Ohsumi, Y., Hara-Nishimura, I., Mano, S., Yamada, K., and Nishimura, M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Pexophagy suppresses ROS-induced damage in leaf cells under high-intensity light	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 7493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-35138-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mano, S., Hayashi, Y., Hikino, K., Otomo, M., Kanai, M., and Nishimura, M.	4. 巻 298
2. 論文標題 Ubiquitin-conjugating activity by PEX4 is required for efficient protein transport to peroxisomes in Arabidopsis thaliana.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 102038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Goto-Yamada, S., Oikawa, K., Yamato, T.K., Kanai, M., Hikino, K., Nishimura, M., and Mano, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Image-based analysis revealing the molecular mechanism of peroxisome dynamics in plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 883491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.883491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真野昌二、林八寿子、曳野和美、大友政義、金井雅武、西村幹夫
2. 発表標題 シロイヌナズナのペルオキシソームへの効率的なタンパク質輸送にはPEX4によるユビキチン結合活性が必要である
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 及川和聡、後藤(山田)志野、林八寿子、柴田美智太郎、近藤真紀、真野昌二、上田晴子、西村いくこ、山田健志、西村幹夫
2. 発表標題 植物ペキシソファジーは、強光下でおこるROS生成による植物細胞の傷害を抑制する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 真野昌二、林八寿子、曳野和美、大友政義、金井雅武、西村幹夫
2. 発表標題 ユビキチン系に制御されたペルオキシソームタンパク質輸送系の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤(山田)志野、及川和聡、真野昌二、西村幹夫、山田健志
2. 発表標題 ペルオキシソームのオートファジー分解に関わるPEUP10タンパク質の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神垣あかね、西村幹夫、真野昌二
2. 発表標題 ペルオキシソーム形成に関わるシロイヌナズナAPEM6様タンパク質の機能比較
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石本聖絵、鈴木雅晴、杉木愛、木寄暁子、真野昌二、野坂（高橋）実鈴、鈴木俊哉、タキムニユン、志水（佐藤）佐江、豊田敦、鈴木孝征、田畑亮、櫻井望、澤進一郎、長戸康郎、マッカーティードナルド、佐藤豊
2. 発表標題 水溶性ビタミンを介した母体による胚と胚乳の発生制御
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kanai, M., Tamura, K., Tarnawska-Glatt, K., Goto-Yamada, S., Yamada, K., and Mano, S.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 CABI	5. 総ページ数 270
3. 書名 In Plant Omics. Advances in big data biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関