

機関番号：17102  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21770117  
 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マトリクスタンパク質輸送の調節機構  
 研究課題名（英文） Regulation of peroxisome matrix protein import by ubiquitin modification  
 研究代表者  
 奥本 寛治（OKUMOTO KANJI）  
 九州大学・大学院理学研究院・助教  
 研究者番号：20363319

## 研究成果の概要（和文）：

細胞内小器官ペルオキシソームは、その欠損がヒトにおいて重篤な遺伝性代謝異常疾患に至ることが知られているように、生体内で重要かつ必要不可欠である。本研究では、ペルオキシソーム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が、ペルオキシソーム移行シグナル 1 型の細胞質レセプターである Pex5p に対する独特なユビキチン化修飾によって制御されていることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Peroxisome, one of the intracellular organelle, includes various physiological functions and the deficiency causes fetal genetic diseases in human. This study clarified that import of peroxisomal matrix proteins into peroxisomes, the most important process in peroxisome biogenesis, is elaborately regulated by unique ubiquitin modification of Pex5p, a cytosolic receptor of peroxisome targeting signal type-1.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：細胞内小器官、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 $\beta$ 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。ヒトにおいて、ペルオキシソームの形成不全が Zellweger 症候群等の重篤な先天性代謝異常症の一次的病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生理的機能の重要性が示されている。研究開始時において、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シンと呼称）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ニング競争の下、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, Mol.Cell.Biol. (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。特に研究担当者が焦点を当てたのが、ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送機構において中心的役割を果たす、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。これまでに同定された 14 種のペルオキシソームのうち、上記の 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。

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。しかし、この Pex5p によるペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送の分子機構、特に Pex5p のシャトルリングに関してはほとんど不明であった。

## 2. 研究の目的

申請者は、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 種の哺乳動物ペルオキシソーム膜局在性ペルオキシソーム Pex2p、Pex10p および Pex12p (RING ペルオキシソームと呼称) の機能解析を行い、これら RING ペルオキシソームが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た (Okumoto et al, JBC (2000))。

ここから申請者は、RING ペルオキシソームを用いた *in vitro* Ub 化アッセイ系を独自に構築し、(1) Pex10p が Pex12p と複合体を形成することで Ub リガーゼ (E3) 活性を発揮すること、(2) Pex10p/Pex12p 複合体が PTS1 レセプターである Pex5p をマルチモノ Ub 化すること、(3) Pex5p の Ub 化は、ペルオキシソーム膜から細胞質へ Pex5p が効率的にエクスポートされる過程に必要であること明らかにした。このような研究背景から、本研究では Ub 化 Pex5p 認識分子の同定およびその分子機構の解析を行い、Pex5p の Ub 化修飾、およびその Ub 化修飾によるペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送制御機構のより詳細な分子メカニズムの解明を目的とした。

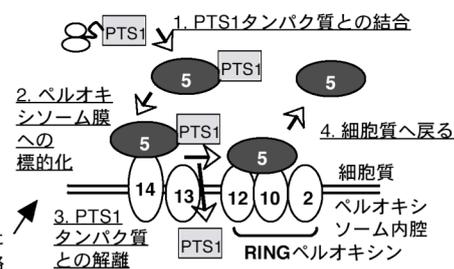
## 3. 研究の方法

私達はこれまでに 14 種のペルオキシソーム形成因子ペルオキシソームを同定し、そのうち 10 種がペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送に関与することを明らかにしていた (表 1)。中でも Pex5p はペルオキシソーム-細胞質間を行き来するシャトルレセプターとしてペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送の中心的役割を果たしている (図 1)。

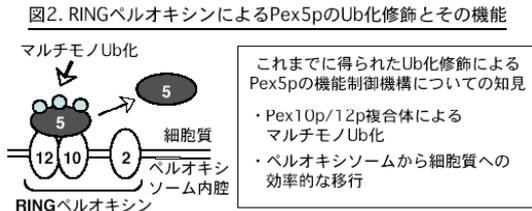
表.1. 哺乳動物ペルオキシソーム形成因子 (ペルオキシソーム) の機能

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	Pex11p $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$

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



(1) これまでの研究背景および予備的な実験結果から、Ub 化 Pex5p を特異的に認識し、Pex5p のシャトリングおよびマトリクスタンパク質輸送を制御する分子が存在する可能性が高いと考えられた (図2)。



従って、以下の方法で Ub 化 Pex5p 結合タンパク質の同定を試みた。

- ① *In vitro* Ub 結合実験系を用いて生成した Ub 化修飾型 Pex5p をビーズに固定化し、細胞抽出液、あるいは精製ペルオキシソーム抽出液から結合分子の精製を試みる。この時、無修飾型 Pex5p に結合するタンパク質とバンドパターンを比較し、Ub 化 Pex5p 特異的に結合するタンパク質を質量分析計で同定する。
- ② Pex5p-Flag 安定発現 HeLa 細胞の細胞質、オルガネラ画分を用いて抗 Flag 抗体により Pex5p-Flag を免疫沈降し、結合タンパク質の検索を行う。

(2) 上記の方法により同定したタンパク質に対し、特異的な抗体を作製する。Ub 化修飾型および無修飾型 Pex5p に対する結合の違いを、*in vitro* 結合実験および免疫沈降法で検証し、Ub あるいは Pex5p との結合に必要な領域を同定する。また、*In vitro* Pex5p 輸送実験系を用いて、ペルオキシソーム-細胞質間の Pex5p シャトリングにおける上記新規同定因子の役割を検討する。また、Pex5p 欠損 CHO 変異細胞に Pex5p と共に発現させることで、ペルオキシソーム相補活性への関与を調べる。

#### 4. 研究成果

##### (1) Pex5p 結合タンパク質の同定

① ビーズに固定化し Ub 化修飾型 Pex5p を用いて、細胞抽出液から結合分子の精製を試みたが、有意に結合するタンパク質は得られなかった。

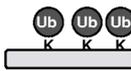
② Pex5p 安定発現 HeLa 細胞を用いた Pex5p の免疫沈降、およびその共沈物の質量分析により、新規 Pex5p 結合タンパク質を一つ同定し、P5BP1 (Pex5p-binding protein 1) と命名した。

##### (2) Pex5p 結合タンパク質の機能解析

P5BP1 は機能未知のタンパク質であったため、ヒト cDNA ライブラリーから cDNA を単離し、特異抗体を作製した。種々の機能解析により、P5BP1 が細胞質に主に局在するタンパク質で、その N 末領域で Pex5p と結合することを見出した。P5BP1 の過剰発現により、ペルオキシソームマトリクスタンパク質の輸送阻害が軽度に見られたことから、P5BP1 は細胞質で Pex5p と相互作用してペルオキシソームマトリクスタンパク質に関する新規因子であることが判明した。一方、P5BP1 はペルオキシソーム膜上における Pex5p ユビキチン化修飾に関する可能性は低いことが明らかとなり、ユビキチン化 Pex5p を認識する因子は他に存在すると考えられた。

研究代表者らが見出した、Pex10p/Pex12p 複合体の Ub リガーゼ (E3) 活性による Pex5p のマルチモノ Ub 化はリシン残基を介したイソペプチド結合によるものであり、Pex5p 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重要であることを明らかにしていた (図2)。一方で、研究代表者自身の研究および外国グループの酵母を用いた系での研究により、Pex5p の N 末に種を越えて保存されたシステイン残基がチオエステル結合による別の Ub 化修飾を受け (以下 Cys-Ub 化と記載)、これが Pex5p のエクスポートに必須であることが明らかになった (Okumoto et al, *Traffic in press*)。すなわち、Pex5p には 2 つの異なる様式の Ub 化修飾、リシン残基を介したモノ Ub 化、およびチオエステル結合による Cys-Ub 化修飾が存在し、ペルオキシソーム膜からのエクスポート制御に機能している (図3)。

図3. Pex5pに対する2種の異なるUb化修飾

様式	修飾残基/結合	E2	E3
	マルチモノUb化 リシン/イソペプチド結合	Ubc H5	Pex10p/Pex12p 複合体
	モノUb化 システイン/チオエステル結合	?	?

後者の Cys-Ub 化による Pex5p のエクスポート過程を詳細に解析し、Cys-Ub 化が Pex5p のエクスポートに必須であること、Cys-Ala 変異型 Pex5p はそのエクスポート活性を欠失するだけでなく、ペルオキシソームへのインポート過程をも阻害するドミナントネガティブ変異体として作用することを明らかに

した。これら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 の Cys-Ub 化による制御機構についての成果は、国際誌 *Traffic* に掲載が決定した (in press)。

一般的にチオエステル結合によるシステイン残基の Ub 化修飾は、最終産物である Ub 化基質のリシン残基に Ub 分子をイソペプチド結合させるための中間産物として、Ub 修飾システムの E1、E2、および HECT 型の E3 に見出されておらず、タンパク質の機能を制御する翻訳後修飾としてはほとんど報告がない。従って、現在ではその E2、E3 を含めて分子機構が明らかでない Pex5p の Cys-Ub 化修飾がどのようになされているかを解明することは今後の大きな課題である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 奥本 寛治、美園 紗知、宮田 暖、松元 由依、向井 悟、藤木 幸夫  
Cysteine-ubiquitination of peroxisome-targeting-signal type 1 (PTS1)-receptor Pex5p regulates Pex5p import and export  
*Traffic* in press. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 奥本 寛治、亀谷 紫、藤木 幸夫  
Functional roles of two serine proteases, Tysnd1 and PsLon, in peroxisome matrix  
The 3rd International Symposium on Protein Community  
平成 22 年 9 月 14 日 日航ホテル奈良 (奈良市)

② 奥本 寛治、藤木 幸夫  
Characterization of peroxisome membrane protein TMEM135/ PMP52  
第 62 回日本細胞生物学会大会  
平成 22 年 5 月 19 日 大阪国際会議場 (大阪市)

③ 奥本 寛治、野田 浩美、藤木 幸夫  
The complex of RING peroxins, Pex10p and Pex12p, functions as an ubiquitin ligase for the PTS1 receptor Pex5p and regulates peroxisomal matrix protein import  
第 32 回日本分子生物学会年会

平成 21 年 12 月 9 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

④ 奥本 寛治、野田 浩美、藤木 幸夫  
The complex of RING peroxins, Pex10p and Pex12p, ubiquitinates the PTS1 receptor Pex5p and regulates import of peroxisomal matrix proteins  
International meeting on peroxisome research  
平成 21 年 11 月 19 日 Institute for System Biology (シアトル、米国)

⑤ 奥本 寛治、野田 浩美、藤木 幸夫  
RING ペルオキシソーム Pex10p-Pex12p 複合体は PTS1 レセプター Pex5p をユビキチン化し、Pex5p のペルオキシソーム-細胞質間のシャトリングを制御する  
第 61 回日本細胞生物学会大会  
平成 21 年 6 月 3 日 名古屋国際会議場 (名古屋市)

[その他]  
ホームページ等

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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥本 寛治 (OKUMOTO KANJI)  
九州大学・大学院理学研究院・助教  
研究者番号：20363319