

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570134

研究課題名(和文)ペルオキシソーム膜透過装置複合体とその制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Identification of core components of peroxisomal membrane translocator

研究代表者

田村 茂彦(Tamura, Shigehiko)

九州大学・基幹教育院・教授

研究者番号：90236753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソーム膜を介したタンパク質輸送とその制御システムを分子レベルで解明することを目的とした。AAAペルオキシシンがPex26pを介してPex14p/Pex5p複合体を作用標的とし、ATP依存的にそれらペルオキシシン間相互作用を制御していることを見いだした。さらに、Pex14pを主な構成成分とする3種の複合体I、II、IIIを同定し、この中でも複合体IがPex26pとの結合能を持つこと、そして3種の複合体が動的に複合体構造を変化させていることを明らかにし、ペルオキシソーム膜を介したタンパク質輸送機構解明に向けて新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the molecular mechanism of peroxisome biogenesis. Pex1p and Pex6p are required for the relocation of the import receptor Pex5p from the peroxisomal membrane to the cytosol. We show that mammalian Pex26p directly binds to Pex14p, the initial docking receptor of Pex5p, and interacts with Pex5p via Pex14p. The binding affinity of Pex26p to Pex14p is altered by Pex5p. Further evidence suggests that the N-terminal region in Pex26p acts as a scaffold protein to recruit Pex14p-Pex5p complex together with Pex1p-Pex6p complexes on peroxisomes. Pex26p binding to Pex14p was suppressed by overexpression of Pex1p and Pex6p in an ATP-dependent manner. These results suggested that peroxisome biogenesis requires Pex1p- and Pex6p-regulated dissociation of Pex14p from Pex26p. Taken together, in the peroxisomal protein import, AAA peroxins modulate the interaction between Pex26p and Pex14p on peroxisome membrane.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ペルオキシソーム 膜タンパク質複合体 オルガネラ形成

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは極長鎖脂肪酸の酸化、プラスマローゲンなどエーテルリン脂質の代謝、胆汁酸の生合成などを含め多くの重要な代謝機能を有し、その障害はペルオキシソーム欠損症と呼ばれる遺伝性の致死疾患をもたらす。その中でも代表的な例として、Zellweger 症候群と呼ばれる重症型の脳・肝・腎症候群は、新生児期より筋緊張低下、肝腫大、精神運動発達遅延など多発奇形を有する症候群で乳児期早期に殆ど死亡するという重篤な疾患である。このようにペルオキシソームは生体機能にとって不可欠なオルガネラであるが、その形成の分子機構の全容および機能障害による欠損症の発症メカニズムは未だ明らかにされていないのが現状である。

哺乳動物系において、これまでに14種類のペルオキシシン遺伝子 (PEX) が同定されている。PTS1 タンパク質の輸送システムを中心として、これまでに明らかにされているペルオキシソームマトリックスタンパク質の輸送システムを以下の3つの項目に分けて概説した。

(1) 受容体との結合 : PTS1 タンパク質が受容体ペルオキシシンである Pex5p と細胞質で結合。

(2) ペルオキシソーム膜へのターゲティングと輸送 : Pex5p と PTS1 タンパク質の複合体が膜上のドッキングタンパク質 (Pex14p) と結合した後、Pex14p を含む膜透過装置複合体を介してペルオキシソーム内腔へ輸送される。次にRING フィンガーを持つペルオキシシン (Pex2p, Pex10p, Pex12p) が Pex5p のモノユビキチン化に関与し、Pex5p がリサイクリングされるための修飾を受ける。

(2) 受容体のリサイクリング : AAA ペルオキシシンや Pex26p が関与した反応がペルオキシソーム膜上で行われた後、Pex5p が細胞質に戻ることで次の輸送に備える。

上記の(1)から(3)の過程を担うペルオキシシンの中でも、本課題研究の研究グループは PEX1, PEX2, PEX3, PEX5, PEX6, PEX12, PEX13, PEX14 および PEX19 を CHO 変異細胞を用いた機能相補スクリーニングで単離し、さらに PEX10, PEX16 を EST 法による、酵母遺伝子のヒトホモログとして単離した。そして、ヒトのペルオキシソーム欠損症における13種の相補性群の中でも最後まで病因(遺伝子)が不明であったA群(米国8群)の相補遺伝子である PEX26 を単離し、ヒトペルオキシソーム欠損症における全病因を解明した (Matsumoto N., Tamura S. and Fujiki Y. *Nat. Cell Biol.* (2003) 5, 454-460)。

本課題研究では特に、Pex14p を主要な構成因子とするペルオキシソーム膜透過装置複合体、AAA ペルオキシシンである Pex1p および Pex6p、そして Pex1p-Pex6p 複合体を

ペルオキシソーム膜へリクルートする Pex26p を研究の中心として位置づけた。AAA ペルオキシシンは、前述の(3)で示した過程に関与することを本課題研究の研究グループおよび Erdmann R. (独国)らの研究グループが示唆しているが、実際にどのような分子メカニズムで Pex5p のリサイクリングを担っているのか不明のままである。また、ペルオキシソーム膜透過装置はミトコンドリア等と異なり、マトリックスタンパク質の複合体構造を保持したまま内腔側へ輸送することが知られており、その輸送機序の解明は非常に興味深い。さらに、Pex14p はリン酸化修飾を受けることを酵母の実験系で他の研究グループから、そして哺乳動物細胞の実験系で我々の研究グループが見いだしているが、タンパク質輸送における Pex14p リン酸化の意義は明らかになっていない。これら未解決の課題を解明するためには、ペルオキシソーム膜透過装置複合体を分離・精製し、構造生物学的な解析を進めると共に試験管内での再構成実験系を構築することが必要不可欠と考えた。

2. 研究の目的

本課題研究は細胞内小器官ペルオキシソームをモデルオルガネラとして、膜を介したタンパク質輸送とその制御システムを分子レベルで明らかにすることを目的としている。これまで、ペルオキシソームマトリックスタンパク質の輸送を担う膜透過装置複合体の全体像とその輸送機序については明確な報告がなされていないのが現状である。本課題研究の研究グループは、膜透過装置複合体の主要な構成因子である Pex14p において、ペルオキシソーム移行シグナル1 (PTS1) の受容体である Pex5p が結合するドメインの結晶構造解析に成功し、詳細な結合様式を報告している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2009) 106, 417-421)。また、ペルオキシソーム形成を担う因子(ペルオキシシン)のなかでも唯一 ATP 加水分解能を持ち、Pex5p の膜透過装置複合体からの解離とリサイクリングに関与すると考えられている AAA ペルオキシシン (Pex1p と Pex6p) が ATP 依存的な構造変化を伴いながらダイナミックに細胞内局在を変化させていることを明らかにした (*Traffic* (2011) 6, 774-788)。さらに最近、AAA ペルオキシシンは Pex26p を介して Pex14p と相互作用することを見だし、AAA ペルオキシシンが作用する標的分子は Pex14p を含む膜透過装置複合体であることを示唆する結果を得ている。

そこで本課題研究では上記の研究をさらに発展させるために、Pex14p の部分的な構造だけでなく AAA ペルオキシシンが標的とする膜透過装置複合体の全容とその輸送機序の解明に研究の焦点を合わせ、以下の(1)から(3)の項目を達成目標とする。(1)ペルオキシソーム膜透過装置複合体の分離精製とその構

造解明、そして輸送機能を再構成する実験系の構築。(2)AAA ペルオキシシンによるタンパク質間相互作用の制御とペルオキシソーム輸送を担う分子メカニズム解明、(3)細胞分裂周期や細胞外からのシグナルに応答したタンパク質修飾が膜透過装置複合体によるタンパク質輸送を制御するメカニズム解明。

本課題研究は、以上の3方向からの研究アプローチから、ペルオキシソームへのタンパク質選別輸送とその制御システムを解明するための分子基盤を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

本課題研究の目的を達成するために、以下の三つの方向性をもって研究を計画し、遂行した。

まず第一の方向性として、ペルオキシソーム膜透過装置複合体の分離・精製と再構成実験系の構築からタンパク質の膜透過輸送を定量的に測定するための新たな実験系を構築する。これまで、ペルオキシソームマトリックスタンパク質を内腔側へ輸送するための膜透過装置複合体はPex14pを主な構成タンパク質としていること以外、複合体の大きさやタンパク質の組成、膜透過のメカニズム等を含めたその全体像は明らかにされていない。そこで本研究では、哺乳動物由来の培養細胞からPex14pを含む複数の複合体を分離・精製することで膜透過装置複合体の全容を解明する。さらに、リポソーム膜上に組み込むことでPex5pのターゲティングおよびマトリックスタンパク質輸送を定量的に測定する実験系を構築する。

次に第二の方向性として、膜透過装置複合体をAAAペルオキシシン機能の標的分子として捉え、AAAペルオキシシンがATP加水分解エネルギーを利用して膜透過装置複合体の構造を変化させ、Pex5pのリサイクリングを担うメカニズムを解明する。AAAペルオキシシン機能の欠損によりPex5pがペルオキシソーム膜から細胞質へリサイクリングされないことが知られているが、この障害のメカニズムは不明のままである。そこで、膜透過装置複合体の構造変化とPex5pの解離を引き起こすAAAペルオキシシン活性を測定するための実験系を確立する。こうしてAAAペルオキシシンによるタンパク質間相互作用の制御メカニズム解明という研究アプローチから、ペルオキシソームマトリックスタンパク質輸送機構の全容解明へ発展させる。

さらに第三の方向性として、膜透過装置複合体が細胞内外のシグナルに応答して機能制御されるメカニズムを解明する。Pex14pはリン酸化修飾を受けることが報告されているが、リン酸化によりどのような機能が制御されるのか未だ明らかにされていない。そこで、本研究では栄養状態の変化や細胞周期といった細胞内外からのシグナル情報を膜透過装置複合体に含まれるPex14pが受容し、

輸送能が制御されるメカニズムを解明する。最近、申請者は細胞分裂期においてPex14pが顕著にリン酸化され、間期では脱リン酸化されることを見いだしており、このリン酸化・脱リン酸化の役割に焦点を合わせて研究を進める。分離・精製した膜透過装置複合体と再構成実験系を用いてPex14pのリン酸化による複合体構造の変化とタンパク質輸送能の制御システムを解析し、ペルオキシソーム機能を制御するメカニズム解明へ展開させる。以上の方向性から、研究を計画そして遂行した。

4. 研究成果

本課題研究は、これまでその全体像が明確でなかったペルオキシソーム膜透過装置複合体を同定し、その構造解明と動的な構造変化およびペルオキシソーム移行シグナル受容体であるPex5pとの機能的な相互作用と膜透過輸送活性について解析を進め、Pex14p複合体による輸送機序解明に向けた分子基盤を得ることを目的として研究を展開した。そこで、ペルオキシソーム膜透過装置複合体の動的な構造変化およびペルオキシソーム移行シグナル受容体であるPex5pとの機能的な相互作用、さらにはAAAペルオキシシンとそのペルオキシソーム膜へのリクルート因子であるPex26pとの機能的な相互作用について解析を進めた。

(1) 哺乳動物細胞由来のPex14pを含む膜透過装置複合体をBlue Native-PAGEにより複合体I、II、IIIと名付けた3種の複合体として分離・同定し、それぞれ約600kD、800kD、1100kDの分子量であることを見いだした。次に、Flagタグを付加したPex14pをCHO細胞に発現させ、タグを指標とした免疫沈降により3種のFlag-Pex14p複合体を回収した後、Blue Native-PAGEにてそれぞれの複合体を分離した。分離後のゲル片を切り出し、透析バッファ中で電気泳動することでそれぞれの複合体を溶出させ、Pex14pを含む3種の膜透過装置複合体を分離して回収した。これまでのところ、分離・精製の操作をスケールアップすることで効率よく大量にPex14p複合体を調製することを可能とした。

次に、人工リポソーム膜を用いた再構成実験系の結果、複合体IIおよびIIIがPex5pを膜内腔へ輸送する活性を持つこと、Pex5pが結合することによって複合体IIIが解離して複合体IIへ構造変化することを見いだした。このとき、Pex5pとPTS1タンパク質の複合体も複合体IIIに結合して解離させる働きを持つことから、Pex5pとPTS1タンパク質の複合体つまりカーゴタンパク質が膜透過する際の入り口は複合体IIIであることを示唆する結果を得た。また複合体IIIの形成にはPex13pの関与が必要であることを既に見いだしており、膜透過輸送におけるPex14p複合体のダイナミックな構造変化と輸送機序に関する新たな知見が得られたと考えている。

(2) Pex5pのドッキングタンパク質であるPex14pはPex26pと結合し、さらにPex5pとも複合体を形成し得ること、そしてPex14pとPex26pの結合はATP依存的にPex1pとPex6pの働きによって解離することを免疫沈降実験およびpull-downアッセイによって明らかにした。一方、Pex5pとあらかじめ複合体を形成しているPex14pはPex26pに対する結合能を示さなかった。つまり、Pex14pは複合体構成の変化に伴ってPex26pとの結合能を変化させていることが示唆された。これらの結果から、AAAペルオキシンはPex26pを足場としながらPex14pに作用し、その構造変化を引き起こすことでPex26p-Pex14p-Pex5p複合体を解離させているものと推測される。次に、CHO-K1細胞から細胞質画分を調製してPex5pの複合体構造をBlue Nativeゲル電気泳動にて調べたところ、Pex5pは多量体および単量体として検出された。一方、Pex1pを欠損したCHO変異細胞であるZP107では、Pex5pの大部分は単量体として検出された。つまり、細胞質ではPex1pがホモ複合体を形成し、Pex5pのオリゴマー形成を促進する役割を担うことが示唆された。

以上のように、Pex26pとPex14pの相互作用およびその解離の分子機構にはAAAペルオキシンの重要な役割を果たしていることを研究期間内に報告しており(Tamura, S. *et al.*, (2014) *J. Biol. Chem.* **289**: 24336-24346)、複合体IIがPex26pと相互作用している標的であるという結果を分子レベルで裏付けることができた。

当初、設定した目的を達成することができており、今後の研究をさらに進展させていくための基盤を得ることができたと考えている。しかしながら、Pex14pを主な構成因子とする膜透過装置複合体構造の詳細を構造生物学的に明らかにするには至っていない。今後は、(1)膜透過装置複合体の構成因子や大きさ等、構造的な知見を得ること、(2)複合体タンパク質を培養細胞から分離・精製してくるのではなくリコンビナントタンパク質を用いて複合体を調製できるようにすること、(3)人工リポソーム膜への再構成実験系を安定的に構築し、さらにはPex5pおよびカーゴタンパク質輸送の簡便な検出系を開発すること、以上の3項目について重点的に解析を進め、最終的にペルオキシソーム膜透過装置による輸送機序を分子レベルで解明すべく研究を遂行していく。

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 4件)

以下、すべて査読有り

Tamura, S., Matsumoto, N., Takeba, R., and Fujiki, Y.: AAA peroxins and their recruiter Pex26p modulate the interactions of peroxins involved in peroxisomal protein import. *J. Biol. Chem.* **289**: 24336-24346 (2014)

Fujiki, Y., Okumoto, K., Honsho, M., and Tamura, S.: Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Frontiers in Physiology*, Epub. Aug. 15 (2014) doi: 10.3389/fphys.2014.00307

Fujiki, Y., Okumoto, K., Mukai, S., and Tamura, S.: Molecular basis for peroxisome biogenesis disorders. In: Brocard, C. and Hartig, A. (eds) *Molecular machines involved in peroxisome biogenesis and maintenance*, Springer-Verlag, Wien, Austria. pp. 91-110 (2014)

Fujiki, Y., Nashiro, C., Miyata, N., Tamura, S., and Okumoto, K.: New insights into dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p in shuttling of PTS1-receptor Pex5p in peroxisome biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta (Mol. Cell Res.)* **1823**: 145-149 (2012)

〔学会発表〕(計 4件)

発表者 田村茂彦 AAAペルオキシソームとPex26pによって制御されるペルオキシソーム相互作用: 第85回日本生化学会、平成24年12月15日、福岡国際会議場(福岡)

発表者 矢田裕人 細胞周期に着目したペルオキシソーム輸送機構の解明: 第85回日本生化学会、平成24年12月15日、福岡国際会議場(福岡)

発表者 田村茂彦 ペルオキシソームタンパク質膜透過装置複合体の同定と膜透過メカニズム: 第86回日本生化学会、平成25年9月13日、横浜国際会議場(横浜)

発表者 小川智大 ペルオキシソーム膜透過装置複合体の同定とマトリックスタンパク質輸送の分子メカニズム解明: 第87回日本生化学会、平成26年10月17日、京都国際会議場(京都)

〔その他〕 ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~molcellbiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 茂彦 (TAMURA SHIGEHICO)
九州大学・基幹教育院・教授
研究者番号: 90236753

(2) 研究分担者

藤木 幸夫 (FUJIKI YUKIO)
九州大学・カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所・教授
研究者番号: 70261237

(3) 連携研究者 なし