

令和元年6月4日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07275

研究課題名(和文) ペルオキシソーム膜透過輸送の分子機序とその制御システム解明

研究課題名(英文) Functional analysis 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題研究は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研究を行った。Pex14pを主な構成因子とする3種の輸送装置複合体を同定し、動的な構造変化を伴いながら輸送に寄与すること、その輸送はPex14pの細胞周期依存的なリン酸化によって抑制されること、Pex26pの51番PheからLeuへの点変異置換がPex14pとの相互作用及びマトリックスタンパク質の輸送効率を著しく低下させることで遺伝性聴覚障害の病因となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題研究にてペルオキシソーム膜透過輸送装置を同定し、リン酸化による機能制御システムを明らかにしたことで、その生合成機構の全容解明に向けた分子レベルでの手がかりを得ることができた。また、PEX26の病因変異解析から、ペルオキシソーム代謝障害と聴覚障害の相関を明らかにした。つまり、タンパク質の細胞内選別輸送やオルガネラ形成とその恒常性維持などプロテインキネシスにおける課題解明だけでなく、中枢神経系の中でもとくに聴覚神経細胞の発達と維持のメカニズム解明など医学領域への多大な貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)： Peroxisomal matrix proteins are imported into peroxisomes via membrane-bound docking/translocation complex comprising as a major component membrane peroxin Pex14p that binds Pex5p. In this study, we isolated three types of Pex14p complexes, termed complexes I, II, and III, as a docking/translocation complex. Transition of Pex14p complex structures between complexes I, II, and III more likely plays important roles in matrix protein import. Next, using clinical exome sequencing (ES), we identified an autosomal recessive missense variant, c.153C>A (p.F51L), in the peroxisome biogenesis factor 26 gene (PEX26) in a 19-yr-old female who was referred for moderate to severe hearing loss. The functional data of Pex26p support the mild phenotype of non-syndromic hearing loss in patients harboring the F51L variant in PEX26.

研究分野：分子細胞生物学

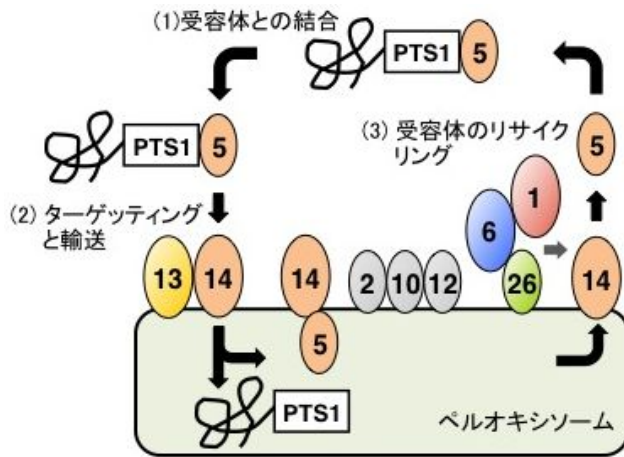
キーワード：ペルオキシソーム 膜透過輸送 病因変異解析

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的疾患をもたらす。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などは未だ明らかにされていないのが現状である。

ペルオキシソーム形成を担うペルオキシシンの中でも、本課題研究の申請者らは *PEX1*, *PEX2*, *PEX3*, *PEX5*, *PEX6*, *PEX12*, *PEX13*, *PEX14* および *PEX19* について 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

図1 PTS1 タンパク質輸送の概略図



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 (*Nat. Cell Biol.* (2003) 5: 454-460) (図 1)。

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輸送装置を研究の中心として位置づけるが、輸送機序の全体像を明らかにするためには他のペルオキシシンの機能的な相互作用機構も解明する必要がある。そこで、Pex5p のリサイクリングを担う AAA ペルオキシシン (Pex1p-Pex6p)-Pex26p 複合体の作用機序にも着目する。AAA ペルオキシシン

は Pex5p のリサイクリング過程に関与することを申請者ら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。そこで、申請者は AAA ペルオキシシンが 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 ATP の加水分解エネルギーを利用して作用する標的分子は Pex14p を含む膜透過輸送装置であることを明らかにした (*J. Biol. Chem.* (2014) 289: 24336-24346) (図 1)。また、申請者らは Pex14p における Pex5p 結合ドメインの結晶構造を明らかにし、Pex5p と Pex14p の詳細な結合様式を報告している (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2009) 106: 417-421)。一方、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が、そして哺乳動物細胞の実験系で申請者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。さらに、ペルオキシソーム膜透過輸送はミトコンドリア等とは異なり、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、その輸送の分子機序解明は非常に興味深い。以上のような背景をふまえ、これら未解決の課題解明と合わせてペルオキシソーム膜透過輸送装置の形成と輸送の分子機序、機能制御システムを解明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、本課題研究の申請者らはペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子解明からペルオキシソーム形成を担う因子 (ペルオキシシン) の同定と個々のペルオキシシンの機能解析を精力的に進めてきた。しかしながらペルオキシソーム内へのタンパク質の移行を担う膜透過輸送 (インポート) 装置の全体像とそれが担う輸送の分子機序、さらには細胞内外のシグナルに応答した輸送制御メカニズムについては未だ明確な報告がなされていないのが現状である。そこで本課題研究では、ペルオキシソーム形成において中心的な役割を果たすと考えられる膜透過輸送装置の複合体構造とその形成メカニズム解明、その複合体が担うペルオキシソーム膜を介したタンパク質輸送機序の解明、さらには輸送を制御する分子メカニズム解明に研究の焦点を合わせる。このようにして、ペルオキシソームに関する研究の中で

も特に、マトリックスタンパク質はどのようなしくみで膜内へ輸送されるのか、その輸送はいかにして調節を受けるのか、という課題に対して明確な答えを導き出すことを目指す。

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、A) ペルオキシソーム膜透過輸送装置の形成と膜を介した輸送の分子メカニズムを解明する。そのためには、複合体、
、
の形成に必要な因子を同定し、それぞれの複合体がダイナミックに構造や構成を変化させながら膜透過輸送を担う分子メカニズムを *in vitro* での輸送再構成実験系を用いて解明する。また、AAA ペルオキシシン-Pex26p 複合体を含めた他のペルオキシシンとの機能的な相互作用とその作用メカニズム解明と合わせて、マトリックスタンパク質輸送の分子機序を包括的に明らかにする。

第二の方向性として、B) 複合体、
、
の構成タンパク質と複合体構造を構造生物学的に明らかにすることで輸送機能と構造の相関を解明する。3種の複合体について、それぞれの構成タンパク質や複合体構造を質量分析や電子顕微鏡による単粒子解析から明らかにする。このとき、リコンビナントタンパク質を用いて膜透過輸送装置を再構成させ、リポソーム膜上に組み込むことによる輸送再構成実験系の構築と定量的な輸送活性測定システムの構築と合わせて輸送機能と構造の相関を解明する。

第三の方向性として、C) 膜透過輸送装置が細胞内外のシグナルに応答して機能制御を受けるメカニズムを解明する。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が膜透過輸送装置の主な構成因子である Pex14p へどのようにして伝達され、その輸送が制御されるのかについて明らかにする。

以上のように、生化学・分子細胞生物学と構造生物学に基盤をおいた研究アプローチの機能的な融合を図りながら研究を展開し、ペルオキシソーム膜透過輸送の分子機序とその制御システム解明に向けた研究を遂行した。

4. 研究成果

[Pex14p 膜透過複合体の解析]

遊離型リポソームで合成されたペルオキシソーム移行シグナル-1 (PTS1) タンパク質は、1) サイトゾルで Pex5p と結合、2) Pex5p とペルオキシソーム膜上の Pex14p との結合を介してペルオキシソームに標的化、3) Pex14p を含む複数の膜局在性ペルオキシシンからなる膜透過複合体による膜透過、という過程を経てマトリクスへ移行する (図1参照)。このように数多くのペルオキシシンのなかでも Pex14p は PTS1 受容体である Pex5p のペルオキシソーム膜上ドッキングタンパク質であり、Pex5p-マトリックスタンパク質複合体のペルオキシソームマトリクスへの移入において中心的な役割を担うことが知られている。この新生鎖タンパク質移入に際し、マトリックスタンパク質の一つであるカタラーゼは4量体構造を維持したまま輸送されることを我々は報告しているが、このような特異な輸送メカニズムの詳細は殆ど明らかにされていない (Otera and Fujiki *Traffic* 13: 1364-1377, 2012)。そこで、ペルオキシソーム膜透過輸送の分子メカニズム解明を目的として、Pex14p を主な構成因子とする輸送装置複合体の同定、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行った。哺乳動物細胞由来の Pex14p を主な構成因子とする3種の複合体を Blue Native-PAGE により新たに分離・同定し、それぞれ複合体 I (600 kDa)、II (770 kDa)、III (1,100 kDa) と名付けるとともに、これらが協調して膜透過輸送を担うことを示唆する結果を得ている。つまり、Pex5p-マトリックスタンパク質複合体は複合体 I と相互作用し、その後、複合体は AAA ペルオキシシンと Pex26p の働きにより ATP 依存的に解離することで複合体 II を形成することを見いだした。この時、複合体 III の解離を薬剤依存的に抑制する実験系を構築し、複合体構造変化と輸送能の相関について詳細に調べたところ、複合体 III の解離抑制はマトリックスタンパク質の輸送能を著しく低下させることを明らかにした。また、複合体 III をリポソーム膜上に再構成した Pex5p の輸送実験系を用いた解析から複合体 III が PTS1 タンパク質輸送を担うことを示唆する結果を得ている。さらに、複合体 II から Pex5p が解離することで複合体 I が形成され、そして複合体 III が再び形成されるためにはペルオキシソーム膜上に局在する必要がある Pex5p を含めた他の因子の関与が示唆された。すなわちペルオキシソーム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を得ることができた。

一方、Pex14p に対して近位依存性ビオチン標識(BioID)法を適用することで、3種の高分子複合体を構成する因子の同定、加えてこれら3種の複合体がダイナミックに複合体構造を変化させる過程で一過的に相互作用する新規因子の探索を行った。その結果、Pex14p と相互作用する既知のタンパク質因子とともにいくつかの新規因子の同定に成功、さらにはリボソームタンパク質複合体が Pex14p を主な構成因子とする輸送装置複合体に近接していることを示唆する結果が得られた。このように Pex14p 複合体が担うペルオキシソーム膜透過輸送の分子メカニズムに関する新たな知見を得た。

[ペルオキシソーム欠損症病因遺伝子 *PEX26* の新規変異同定とその障害のメカニズム]

Pex26p は AAA タンパク質ファミリーに属する Pex1p と Pex6p(AAA ペルオキシシン)をペルオキシソームヘリクルートする役割を担い、膜透過輸送装置複合体の主な構成因子である Pex14p と相互作用することをすでに報告している。ごく最近、本研究において米国コロンビア大学で遺伝性の聴覚障害として報告された患者の病因遺伝子変異が、全エクソームシーケンス解析により Pex26p の 51 番 Phe から Leu への点変異置換を有することを見出した。この患者由来の線維芽細胞を用いた形態学的な観察からはマトリクスタンパク質の輸送障害は見かけ上認められないが、この変異に起因した Pex26p と Pex14p との結合能の低下、新たに翻訳されたマトリクスタンパク質の輸送効率が著しく低下することを定量的に示した。この症例ではこれまでに報告されている重篤なペルオキシソーム欠損症とは全く異なる病態を示し、*PEX* 遺伝子の変異によって聴覚低下・損失のみを引き起こすものである。こうして得られた、Pex14p に対する Pex26p 結合能の低下が聴覚損失の病因になるという知見は、ペルオキシソーム代謝障害が神経系の発達および維持に異常をきたす病態発症のメカニズム解明に大きく寄与するものと期待される (Tanaka et al. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* 5: a003483, 2019)。

[ペルオキシソーム膜透過装置の細胞周期依存的なリン酸化による機能制御]

Pex14p の翻訳後修飾が及ぼす影響の解析からペルオキシソーム機能制御機構解明への手がかりを得ることを目的とし、CHO K1 及び HeLa 細胞の細胞溶解液を Phos-tag SDS-PAGE を用いて分離し、ウェスタンブロッティングにより内在性 Pex14p を検出した。その結果、Pex14p の一部がリン酸化されていることを見出し、このリン酸化は細胞周期に依存したものであると推測した。CHO K1 及び HeLa 細胞を間期または分裂期に分けて細胞溶解液を調製し、Phos-tag SDS-PAGE を行ったところ、分裂期において Pex14p が顕著にリン酸化され、そのリン酸化部位は Pex14p の C 末端側ドメインに存在することを明らかにした。また、HeLa 細胞を用いた形態学的及び生化学的な解析から、Pex14p がリン酸化された分裂期ではマトリクスタンパク質の輸送能が著しく低下していることを示した。このように、分裂期特異的な翻訳後修飾によりペルオキシソーム機能を制御することで細胞内恒常性維持に寄与するという可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. [†]Tanaka, A.J., [†]Okumoto, K., [†]Tamura, S., Abe, Y., Hirsch, Y., Deng, L., Ekstein, J., Chung, W.K., and ^{*}Fujiki, Y.: A newly identified mutation in the *PEX26* gene is associated with a milder form of Zellweger spectrum disorder. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* 5: a003483 (2019) ([†]equally contributed). 査読有
DOI: 10.1101/mcs.a003483
2. Okumoto, K., Tamura, S., and ^{*}Fujiki, Y.: Blue Native PAGE: Applications to study peroxisome biogenesis. In: Schrader, M. (ed.) *Peroxisomes: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology (Series Ed.: Walker, J.M.), Springer, Humana Press, New York, USA. pp. 197-205 (2017). 査読有
DOI: 10.1007/978-1-4939-6937-1_18

[学会発表] (計 11 件)

1. Yukio Fujiki: Peroxisome homeostasis: Tightly regulated import and export of matrix enzyme, catalase. EMBO Workshop “Current advances in protein translocation across membranes” (2019). 3/23-27

2. 奥本寛治、田村茂彦、八木田悠一、本庄雅則、藤木幸夫: ペルオキシソーム局在性テイルアンカー型膜タンパク質の輸送局在化機構. 第 41 回日本分子生物学会年会 (2018). 11/28-30
3. 山下昂一郎、田村茂彦、藤木幸夫: ペルオキシソーム形成因子 Pex14p の細胞周期依存的なリン酸化による機能制御メカニズムの解析. 第 94 回日本生化学会大会 (2018). 9/24-26
4. 山下昂一郎、田村茂彦、藤木幸夫: ペルオキシソーム形成因子 Pex14p の細胞周期依存的なリン酸化による機能制御. 平成 30 年度日本生化学会九州支部例会 (2018). 6/30-7/1
5. 小山桂恵奈、奥本寛治、田村茂彦、藤木幸夫: テイルアンカー型タンパク質 ACBD5 の翻訳速度とペルオキシソームへの輸送・局在化効率の関連性の検討. 平成 30 年度日本生化学会九州支部例会 (2018). 6/30-7/1
6. 田村茂彦、河村優子、藤木幸夫: ペルオキシソーム膜透過装置複合体の同定と輸送メカニズムの解明. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017). 12/6-9
7. Yukio Fujiki, Yuko Kawamura, and Shigehiko Tamura: Peroxisomal matrix protein transport requires a series of constitutional changes of Pex14p homo-oligomers. EMBO conference "Protein translocation and cellular homeostasis"(2017). 3/18-22
8. Yukio Fujiki, Yuko Kawamura, and Shigehiko Tamura: Core components of peroxisomal membrane translocator of matrix proteins. EMBO conference "Protein translocation and cellular homeostasis" (2017). 3/18-22
9. 河村優子、田村茂彦、藤木幸夫: ペルオキシソーム膜透過輸送には Pex14p 複合体の動的な構成変化が必要である. 第 39 回日本分子生物学会 (2016). 11/30-12/2
10. Yuqiong Liu, Shigehiko Tamura, Kanji Okumoto, Yuichi Yagita, Yuko Kawamura, Aiko Nagata, and Yukio Fujiki: Peroxisome biogenesis: Import of nascent membrane and matrix proteins. 第 39 回日本分子生物学会 (2016). 11/30-12/2
11. Shigehiko Tamura, Yuko Kawamura, Yukio Fujiki: Identification of core components of peroxisomal membrane translocator. 第 89 回日本生化学会大会 (2016). 9/25-27

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 藤木 幸夫
 ローマ字氏名： Fujiki Yukio
 所属研究機関名： 九州大学
 部局名： 生体防御医学研究所
 職名： 特任教授
 研究者番号 (8 桁)： 70261237

(2)研究協力者