

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590072

研究課題名(和文)ペルオキシソーム膜形成システムの解析とナノメディシンへの展開

研究課題名(英文)Analysis of peroxisome membrane biogenesis and application for Nano-medicine

研究代表者

今中 常雄(Imanaka, Tsuneo)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：50119559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソームの形成には、Pex3pとPex19やPex5pとPex14の相互作用が必要である。また、ペルオキシソーム膜タンパク質の局在化をPex3p結合タンパク質が制御している可能性がある。そこで、ヒトcDNAライブラリーを用いたyeast two-hybrid法を構築し、Pex3pと相互作用する10種の候補タンパク質を見出した。

また、原虫はペルオキシソームと類似したグリコソームをもつ。グリコソーム形成阻害をターゲットとした新規原虫感染症治療薬開発のため、原虫Pex5p-Pex14p間相互作用を評価する新規High-throughput assay系を構築した。

研究成果の概要(英文)：Pex3p, Pex19p and Pex5p, Pex14p are essential for the biogenesis of peroxisome. Putative Pex3p binding protein is suggested to regulate insertion of peroxisomal membrane proteins into the peroxisome. To identify the binding protein, we established yeast two-hybrid system using human cDNA library and found ten putative proteins.

Trypanosome has glycosome that resembles to human peroxisome. Impaired biogenesis of glycosome is known to show fatal effect for trypanosome. As an application of the knowledge about biogenesis of peroxisome, we tried to develop the therapeutic compounds for trypanosomiasis. We established a high throughput screening system to identify chemical compounds that inhibit the interaction between Pex5p and Pex14p. Using this screening system, we started to screen chemical libraries to find effective compounds.

研究分野：分子細胞機能学

科研費の分科・細目：生物系

キーワード：ペルオキシソーム グリコソーム ペルオキシソーム膜形成 膜タンパク質局在化 トリパノソーマ感染症治療薬 ハイスループットスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソーム形成に関わるタンパク質を Peroxin (Pex) と呼ぶ。ペルオキシソーム膜タンパク質の局在化では、遊離型ポリソーム上で翻訳されたペルオキシソーム膜タンパク質が、細胞質で Pex19p と複合体を形成し、Pex19p とペルオキシソーム膜上の Pex3p との相互作用を介し、膜へと挿入される。この過程で、Pex19p 上のペルオキシソーム膜タンパク質は、ペルオキシソーム膜上の受容体に認識され、トランスロコンを介して膜に挿入されると推定されが、その実体は不明である。

実際、ペルオキシソーム膜タンパク質と複合体を形成させた Pex19p と遊離型の Pex19p との間で、Pex3p との結合性が変わらないことより、細胞内では、Pex19p-ペルオキシソーム膜複合体がペルオキシソーム膜上の Pex3p と結合した後、ペルオキシソーム膜タンパク質を膜へ挿入し、遊離型 Pex19p を細胞質へリサイクリングさせる因子(タンパク質)が存在すると予想される。よって、ペルオキシソーム膜上の Pex3p と相互作用するタンパク質を同定し、その機能を解析することが重要である。

一方、トリパノソーマやリーシュマニアなどの病原性原虫は、ヒトペルオキシソームと類似したグリコソームをもつ。グリコソームと呼ばれる所以は、各種の糖代謝系酵素がペルオキシソーム局在化シグナルをもち、グリコソームに局在しているためである。すなわち、病原性原虫は生存戦略として、ヒトなどの宿主細胞内で効率よく糖代謝を行うためにグリコソームに糖代謝酵素を局在化させている。よって、ヒトと原虫間でペルオキシソーム(グリコソーム)形成に必須である Pex の相互作用の共通性と多様性の分子基盤を明らかにし、その多様性にに基づき Pex 間の相互作用を選択的に阻害することにより、原虫治療薬を開発できないか考えた。トリパノソーマ、リーシュマニアでは Pex19p ホモログは検出されたが、Pex3p ホモログは検出されず、Pex3p との類似性が低い Pex19p 結合タンパク質が存在すると予測される。一方、Pex5p と Pex14p は存在する。そこで、まず、Pex5p-Pex14p 間の相互作用を原虫選択的に阻害する化合物を検索することにより、病原性原虫治療薬を開発したいと考えた。また、原虫 Pex3p 様タンパク質を検索し、その利用も考えた。ペルオキシソーム形成分子を標的としたナノメディシン創薬への展開である。

2. 研究の目的

ペルオキシソームは真核生物の生育に必須のオルガネラであり、その形成には Pex を必要とする。中でも Pex3p、Pex19p と Pex5p、Pex14p はペルオキシソームタンパク質の局在化に中心的な役割を担っており、その機能とペルオキシソームタンパク質の局在化過程を明らかにすることは、ペルオキシソーム

形成の基本原則を理解する上で重要である。特に原虫では Pex19p と相互作用する Pex3p 様タンパク質の同定が重要である。Pex3p と Pex19p は動物、植物、酵母で保存されているが、原虫では Pex3p ホモログが存在せずペルオキシソーム膜タンパク質の局在化機構には多様性があることが予想される。また、Pex19p を欠損させると致死になることが知られている。

そこで本研究では、ペルオキシソーム膜タンパク質の局在化機構の詳細を理解するため、局在化に関わる新たなタンパク質を探索した。一方、ヒトと原虫間での Pex の多様性を基盤に、有効な治療法のない原虫(トリパノソーマやリーシュマニア)感染症に対してペルオキシソームをターゲットとした新規治療薬候補化合物のスクリーニング系を構築した。

3. 研究の方法

(1) Pex3p のペルオキシソーム膜上での存在状態の解析と Pex3p 結合タンパク質の探索

Pex3p のペルオキシソーム膜上での存在状態

ラット肝臓よりペルオキシソームを精製し、1% digitonin で可溶化後、10-35% ショ糖密度勾配遠心した。Pex3p の分子サイズは、immunoblotting で解析した。また、Pex3p の細胞質領域を GST と融合させた GST-Pex3p(AA.34-373)を大腸菌に発現・精製し、Pex3p 細胞質ドメインでのダイマー形成を解析した。ヒト Pex3p と相互作用するタンパク質の探索

ヒト Pex3p と相互作用するタンパク質を網羅的に解析するため、*HIS3* 遺伝子の上流に LexA 結合領域を導入した *Saccharomyces cerevisiae* Mav χ 株に LexA とヒト Pex3p の細胞質領域(AA.34-373)の融合タンパク質 LexA-HsPex3p を発現させた。この発現株 (Mav χ /LexA-HsPex3p) に Gal4 Activated Domain (Gal4 AD) が結合している human fetal brain MatchmakerTM cDNA Library ベクターを用いて形質転換し、histidine の栄養要求性により、ヒト Pex3p と相互作用するタンパク質が発現している株を選択した。

(2) 原虫ペルオキシソーム(グリコソーム)タンパク質の局在化をターゲットとした原虫治療薬の開発

ヒトならびにトリパノソーマ Pex5p、Pex14p の精製

ヒト及び *Trypanosoma brucei* の Pex5p、Pex14p を His タグもしくは GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させ、精製した。Pex5p は、Pex14p との結合に関与する WXXXF/Y モチーフをもつ(ヒトで 7

カ所、トリパノソームで3カ所)。モチーフを欠失した各種 *TbPex5p* を大腸菌に発現させ、同様に精製した。

ELISA アッセイ系の構築

Pex14p を 96 well plate に固相化し、*Pex5p* を加えた。次いで、His を認識する1次抗体を加え、HRP 標識した二次抗体と反応させた。o-phenylenediamine dihydrochloride を基質として加え、HRP 活性を測定することにより *Pex5p* の結合量を定量化した。トリパノソーム *Pex3p* 結合タンパク質の探索

リコンビナント *TbPex19p* をリガンドとして、トリパノソーム細胞質分画より、*Pex19p* と結合するタンパク質の単離を試みた。またトリパノソームの遺伝子配列から、タンパク質の2次構造を予測するソフト等を用いて、他の生物種の *Pex3p* とホモロジーをもつ遺伝子を検索した。

4. 研究成果

Pex3p のペルオキシソーム膜上での存在状態の解析ならびに *Pex19p* 結合タンパク質の探索と、原虫ペルオキシソーム(グリコソーム)タンパク質の局在化機構に基づく原虫治療薬の開発に関する研究を行い、以下の成果を得た。

(1) *Pex3p* のペルオキシソーム膜上での存在状態の解析と *Pex19p* 結合タンパク質の探索

Pex3p のペルオキシソーム膜上での存在状態

ラット肝ペルオキシソームを 1% digitonin で可溶化し、ショ糖密度勾配遠心で解析すると *Pex3p* は分子量約 170 kDa として存在した。*Pex3p* の分子サイズから、未知のタンパク質と相互作用していることが示唆された。また、GST-*Pex3p*(AA.34-373)がダイマーを形成していること、GST-*Pex3p*(AA.34-373)の変異体 V69Q、L80Q、G138E を用いた解析より、*Pex3p* の細胞質領域は、 α 2-helix を軸として6本の α -helix が巻き付いた構造を形成することが、*Pex3p* の構造維持と機能に重要であることが示唆された。ヒト *Pex3p* と相互作用するタンパク質の探索

一次スクリーニングで得られた 248 株から Library ベクターを単離し、より厳しい選別を行うため、histidine 合成阻害薬 3-amino-1, 2, 4-triazole を加えた培地により二次スクリーニングを行った。最終的に得られた約 100 株において、Library ベクターに含まれている遺伝子の配列を確認した後、Library ベクターを LexA-Hs*Pex3p* の C 末端側に HA-tag を融合させた Mav χ /LexA-Hs*Pex3p*-HA に形質転換し、anti-HA-tag magnetic beads を用いた pull down assay によりヒト *Pex3p* との相互作用を確認した。現在までに、heat shock protein

70 family protein, HSPA など 10 種の候補タンパク質を見出した。今後、これらタンパク質のペルオキシソーム膜タンパク局在化における役割を解析していく予定である。

(2) 原虫ペルオキシソーム(グリコソーム)タンパク質の局在化をターゲットとした原虫治療薬の開発

ヒトならびにトリパノソーム *Pex5p*、*Pex14p* の精製

ヒトならびに *T. brucei* の His-*Pex5p* 及び GST-*Pex14p* を可溶性タンパク質として高純度で精製することができた。また、これらの精製タンパク質を用いた pull down assay により *hPex5p* と *hPex14p*、*TbPex5p* と *TbPex14p* が、それぞれが特異的に相互作用することを明らかにした。また WXXXF/Y モチーフのうち、1,3 ならびに 2,3 のモチーフを欠失した Δ 1,3*TbPex5p*、 Δ 2,3*TbPex5p* は *TbPex14p* に結合しないことが pull down assay により示唆された。

ELISA アッセイ系の構築

TbPex5p と *TbPex14p* が特異的に相互作用することから、原虫細胞内においても *Pex5p* と *Pex14p* の直接相互作用が原虫グリコソーム形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、96 well plate 上で精製 *TbPex5p*-*TbPex14p* 間の相互作用を高感度で迅速に評価できるアッセイシステムを検討した。*TbPex14p* を固相化し、*TbPex5p*-His の添加量を 0~10 μ g まで変化させ測定を行ったところ、HRP の活性は *TbPex5p*-His の添加量とともに増加した。本 assay システムを用い、現在化合物スクリーニングをはじめている。トリパノソーム *Pex3p* 結合タンパク質の探索

Pex19p をリガンドとして *Pex3* 様のタンパク質を検出しようとしたが、現時点では成功していない。そこで、タンパク 2 次構造予測モデル等を使って、トリパノソーム遺伝子から候補タンパク質をコードする遺伝子の検索を行っている。

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 8 件)

Hama K., Nagai T., Nishizawa C., Ikeda K., Morita M., Satoh N., Nakanishi, H., Imanaka, T., Shimozawa N., Taguchi R., Inoue K., and Yokoyama K.: Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of

Zellweger syndrome. *Lipids* 48, 1253-1267, 2013. 査読有

Morita M., Kobayashi J., Yamazaki K., Kawaguchi K., Honda A., Sugai K., Shimozawa N., Koide R., and Imanaka T.: A novel double mutation in the *ABCD1* gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. *JIMD Rep.* 10, 95-102, 2013. 査読有

Morita M., and Imanaka T.: Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1387-1396, 2012. 査読有

Morita M., Shinbo S., Asahi A., and Imanaka T.: Very long chain fatty acid β -oxidation in astrocytes: Contribution of the ABCD1-dependent and -independent pathways. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 1972-1979, 2012. 査読有

Morita M., Shimozawa, N., Kashiwayama Y., Suzuki Y. and Imanaka T.: ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. *Curr. Drug Targets* 12, 694-706, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

Imanaka T. New insight into ABC protein subfamily D: Substrate transport of ABCD1 and targeting of ABCD4 to lysosome. 5th FEBS Special Meeting on ABC Protein; 2014. Mar 8-14; Innsbruck, Austria.

Watanabe Y., Okuyama N., Kawaguchi K., Morita M., Kashiwayama Y., and Imanaka T.: A new therapeutic approach for trypanosome protozoa: Screening of chemical compounds that inhibit biogenesis of glycosome. 第 36 回日本分子生物学会年会; 2013, Dec 3-6; 神戸.

高崎満喜子, 渡邊雄一, 深澤力也, 川口甲介, 守田雅志, 大熊芳明, 今中常雄: ペルオキシソーム膜形成因子 Pex3p と相互作用するタンパク質の検索. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会; 2013, Nov 17; 金沢.

渡邊雄一, 奥山尚輝, 楠本梨賀, 川口甲介, 守田雅志, 柏山恭範, 今中常雄: グリコソーム形成因子をターゲットとした原虫感染症治療薬開発のためのスクリーニング系の構築. 第 85 回日本生化学会大会; 2012, 12, 14-16, 福岡.

〔図書〕(計 1 件)

今中常雄: 細胞構造: 第 3 版「分子生物学」田沼靖一編, 丸善.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/labatory/cellbio/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今中 常雄 (IMANAKA, Tsuneo)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授

研究者番号: 50119559

(2) 研究分担者

柏山 恭範 (KASHIWAYAMA, Yoshinori)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・助教

研究者番号: 20401812