

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14511

研究課題名(和文)ペルオキシソームとミトコンドリアの協奏による新規酸化ストレス応答・恒常性維持機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying novel oxidative stress response and cellular homeostasis by coordination of peroxisomes and mitochondria

研究代表者

藤木 幸夫(Fujiki, Yukio)

九州大学・生体防御医学研究所・特任教授

研究者番号：70261237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化水素分解酵素カタラーゼのペルオキシソーム局在に障害を示す新規CHO変異細胞ZP114の原因遺伝子として、ミトコンドリア外膜タンパク質(ポリン)をコードするVDAC2遺伝子を同定していた。これを発端に、ミトコンドリア上でアポトーシス促進因子として機能するBAKがペルオキシソームにも一部局在化し、ペルオキシソームからサイトゾルへのカタラーゼ放出を介在することを発見した。さらに、広く知られたミトコンドリアでのBAKによる細胞死亢進とは逆に、ペルオキシソーム局在性BAKの活性化はカタラーゼの放出を介して抗酸化ストレス反応として作用するという世界初のアポトーシス制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that VDAC2 encoding a mitochondrial porin is a causal gene of a peroxisome-deficient CHO mutant, ZP114 showing the impaired import of peroxisome matrix proteins such as catalase. Loss of VDAC2 leads to localization shift of a proapoptotic factor BAK from mitochondria to peroxisomes, resulting in permeabilization of peroxisomal membrane in a manner similar to mitochondrial outer membrane. A part of BAK potentially localizes to peroxisomes and regulates peroxisome integrity and the release of catalase from peroxisomes to the cytosol in normal cells, which can counteracts with commitment of apoptosis by various oxidative stresses including reactive oxygen species.

研究分野：分子細胞生物学, 生化学

キーワード：ペルオキシソーム カタラーゼ BAK VDAC2 酸化ストレス 細胞死抑制 アポトーシス ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは、脂質代謝酵素や過酸化水素分解酵素であるカタラーゼなどを含む生命に必須なオルガネラである。本課題研究者らは、13種の相補性群のペルオキシソーム欠損性チャイニーズハムスター(CHO)変異細胞の分離とその相補遺伝子(PEX)の単離に成功し、さらにヒトペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子同定ならびに PEX 遺伝子産物(ペルオキシシン)の機能解明に多大な貢献を果たしてきた。

研究開始時、カタラーゼをはじめとするペルオキシソームマトリクスタンパク質の輸送異常を示す新規相補性群に属する CHO 変異細胞 ZP114 を分離し、その相補遺伝子としてミトコンドリア外膜タンパク質(ポリリン)をコードする VDAC2 (Voltage-Dependent Anion Channel 2)を同定していた。しかしながら、なぜミトコンドリア膜局在性の VDAC2 の欠損がペルオキシソームマトリクスタンパク質の局在に影響を及ぼすのか、その分子機構および生理的意義は全く不明であった。

ほ乳動物においてカタラーゼはペルオキシソーム局在性であるが、酵母や線虫ではサイトゾル局在性カタラーゼも別に存在する。また、本申請者らは、マトリクスタンパク質輸送欠損性変異細胞 ZP114 では、野生型 CHO 細胞に比べて活性酸素種(ROS)の一種、過酸化水素に対して有意に耐性を示すことを見出していた(未発表)。そこで本課題研究者らはカタラーゼにとくに着目し、ほ乳動物カタラーゼの細胞内局在変化には非常に重要な生理的意義があり、ZP114 細胞におけるカタラーゼのサイトゾル局在化がミトコンドリア障害による ROS 誘導性のアポトーシスを抑制している過程を再現していると考えた。すなわち、ROS に対する VDAC2 の脆弱化に伴い、カタラーゼはペルオキシソームからサイトゾルへと局在変化し、サイトゾルの ROS の量を調節することでアポトーシスを抑制する機構が存在するという斬新な仮説を立て、その分子メカニズムの全容解明を目的とする本研究課題を設定した。

2. 研究の目的

ミトコンドリア膜タンパク質 VDAC2 を介したペルオキシソーム局在性カタラーゼの細胞内局在制御の分子機構を明らかにする。それを基盤として、酸化ストレスの条件下においてカタラーゼがミトコンドリアとの連携によってサイトゾルへ移行し、サイトゾルに存在する過剰の過酸化水素を含む ROS を分解し、最終的にアポトーシスを抑制的に制御する機構が存在することを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題解決のため、大別して以下の2点を究明課題とした。

(1) ミトコンドリアとの連携を介したカタ

ラーゼのサイトゾルへの局在変化の分子機構の解明。

(2) サイトゾル局在性カタラーゼによるアポトーシス制御機構の解明。

これらを培養細胞実験系を用いた、分子細胞生物学的手法や生化学的手法を駆使して進めた。

4. 研究成果

(1) カタラーゼのサイトゾルへの局在変化の分子機構

① はじめに、VDAC2 がペルオキシソームに局在化する可能性を検討したが、これを支持する結果は得られなかった。よって、VDAC2 は何らかの因子を介して間接的にペルオキシソームマトリクスタンパク質の細胞内局在に影響するものと推察した。

そこで、アポトーシス促進因子の1つである BAK に着目した。BAK は VDAC2 を受容体としてミトコンドリアに輸送され、ミトコンドリア外膜透過性(MOMP)およびシトクロム c などの放出を制御するアポトーシス促進因子である。ZP114 細胞におけるカタラーゼや他のペルオキシソームマトリクスタンパク質のサイトゾル局在化は、BAK のノックダウンにより抑制され、ペルオキシソームへの輸送が回復した。また、BAK の阻害因子である BCL-X_L と MCL-1 の過剰発現によっても ZP114 細胞におけるカタラーゼのサイトゾル局在化は部分的に回復したが、別のアポトーシス促進因子である BAX のノックダウンでは変化が見られなかった。これらの結果から、VDAC2 欠損変異細胞である ZP114 細胞におけるペルオキシソーム障害に、BAK が特異的に関与することを明らかにした。

② 免疫蛍光染色法および細胞分画法により、ZP114 では BAK のミトコンドリア局在が減少し、サイトゾルに加えてその一部がペルオキシソームに局在することを見出した。

③ BAK の C 末膜貫通領域をペルオキシソーム局在性膜タンパク質である Pex26p の相同領域と置換した BAK-P26 変異体を作成した。これを野生型細胞において発現させ、BAK を強制的にペルオキシソーム膜へ移行させたところ、BH3 ドメイン依存的なペルオキシソームマトリクスタンパク質のサイトゾル局在化が観察された。さらに [³⁵S]メチオニンを用いたパルス標識チェイス実験により、ペルオキシソーム局在性 BAK が BH3 ドメイン依存的にペルオキシソーム内部からカタラーゼを放出させることを明らかにし、カタラーゼのサイトゾルからの輸送を阻害しているのではないことを示した。

以上の結果から、ZP114 細胞におけるペルオキシソームマトリクスタンパク質のサイトゾル局在化に直接関与するのは、アポトーシス促進因子 BAK であることが判明した。

ZP114細胞ではVDAC2欠損によりBAKがペルオキシソーム膜へ一部局在化しており、結果としてカタラーゼを含むペルオキシソームマトリクスタンパク質をペルオキシソーム内から放出させていることを明らかにした。

(2) サイトゾル局在性カタラーゼによるアポトーシス制御機構

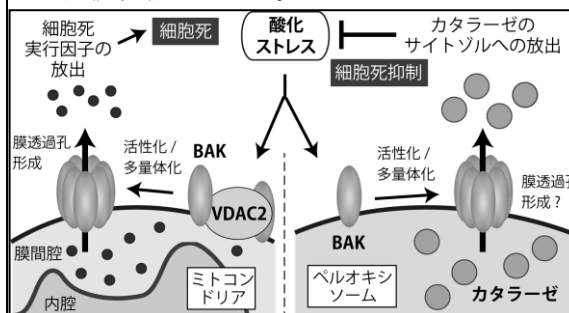
① 前項(1)では、VDAC2欠損性ZP114細胞におけるBAKのペルオキシソーム局在化、およびカタラーゼのサイトゾルへの放出を見出した。野生型細胞においてもBAKがペルオキシソームマトリクスタンパク質の局在を制御するのかを検討するため、密度勾配遠心法を用いた詳細な細胞分画により、HeLa細胞の内在性BAKの局在をウエスタンブロットで解析した。BAKの大部分はミトコンドリア画分に存在していたが、ペルオキシソーム画分にも少量のBAKが検出された。さらに、サイトゾルを除去したCHO-K1細胞を用いた免疫染色でも、内在性BAKのペルオキシソーム局在が部分的に観察された。よって、正常細胞においてもBAKがミトコンドリアに加えて一部がペルオキシソームに局在していることが示された。

② 野生型CHO-K1細胞を細胞分画法によりサイトゾル画分とオルガネラ画分に分離し、ウエスタンブロットを行ったところ、カタラーゼの大部分はペルオキシソームを含むオルガネラ画分に回収されたが、少量ではあるがサイトゾル画分にも検出された。CHO-K1細胞にBAKのshRNAを安定発現させて樹立したBAKノックダウン細胞株においては、サイトゾル画分に回収されるBAK量が野生型CHO-K1細胞に比べて有意に低下した。このBAK低減によるサイトゾル局在性カタラーゼの減少は、界面活性剤ジギトニンを用いたカタラーゼ活性の細胞内局在性、生化学的解析によっても同様の結果が示された。したがって、内在性BAKは野生型細胞においてもペルオキシソーム内からサイトゾルへカタラーゼを一部放出させていることが強く示唆された。

③ 野生型CHO-K1細胞におけるアポトーシス活性化因子PUMAおよびBIMの過剰発現により、カタラーゼがサイトゾルへ局在変化する、これがBAKのノックダウンで解消されることを明らかにした。一方、BAKの活性化能を持たないBADの過剰発現ではカタラーゼの局在に全く変化が見られなかった。これらの結果から、野生型細胞において少量ペルオキシソームに存在するBAKがPUMAおよびBIMにより活性化され、ペルオキシソーム膜の透過性を高めることでカタラーゼのサイトゾルへの放出に介在するものと推察された。

④ サイトゾルにカタラーゼが局在化しているペルオキシソーム欠損性CHO変異細胞では、過酸化水素に対する抵抗性が野生型CHO-K1細胞より高いことを明らかにした。したがって、カタラーゼのサイトゾル局在化は細胞生存に向けたROSに対する対抗反応であることが強く示唆された。

以上の結果をまとめると、野生型細胞においても、BAKは一部ペルオキシソームにも局在しており、上流アポトーシス活性化因子による制御のもとミトコンドリアと同様の機構によりペルオキシソーム膜の透過性を制御することが示された。広く知られているミトコンドリアでのBAKによる細胞死亢進とは逆に、ペルオキシソーム局在性BAKの活性化は、カタラーゼの放出を介して抗酸化ストレス反応として作用するという世界で初めてのアポトーシス制御機構を明らかにし、これらの成果を国際誌*J. Cell Biol.*に発表した(*J. Cell Biol.* 216: 709-721, 2017: 発表論文6)。この極めて重要な知見は、*J. Cell Biol.*: spotlight, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *Mol. Cell. Oncol.*誌(発表論文2)などで大きく取上げられ評価、報道された。



カタラーゼのサイトゾル放出による新規ストレス応答機構

(右) 酸化ストレスによりペルオキシソームに一部局在化するBAKが活性化される。ペルオキシソーム内の過酸化水素分解酵素カタラーゼがペルオキシソームからサイトゾルへ移行することで、酸化ストレス抵抗性および抗細胞死作用を呈する。

(左) VDAC2と共にミトコンドリア上で細胞死促進因子として働くBAKを示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] 全て査読有り。(計14件)

1. Honsho, M. and *Fujiki, Y.: "Focus on Plasmalogens" issue: Plasmalogen homeostasis: regulation of plasmalogen biosynthesis and its physiological consequence in mammals. *FEBS Lett.* in press (2017).
2. *Fujiki, Y., Miyata, N., Mukai, S., Okumoto, K., Cheng, E. H.: BAK regulates catalase release from peroxisomes. *Mol. Cell. Oncol.* 4: article: e1306610 (2017). doi: 10.1080/23723556.2017.1306610
3. Hossain, M. S., Abe, Y., Ali, F., Youssef, M., Honsho, M., Fujiki, Y., and *Katafuchi, T.:

- Reduction of ether-type glycerophospholipids, plasmalogens, by NF- κ B signal leading to microglial activation. *J. Neurosci.* **37**: 4074-4092 (2017). doi: 10.1523/JNEUROSCI.3941-15.2017
4. Honsho, M., Abe, Y., and *Fujiki, Y.: Plasmalogen synthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membrane. *Sci. Rep.* **7**: article 43936 (2017). doi: 10.1038/srep43936
 5. Abe, S., Nagai, T., Masukawa, M., Okumoto, K., Homma, Y., Fujiki, Y., and *Mizuno, K.: Localization of NDR2 to peroxisomes and its role in ciliogenesis. *J. Biol. Chem.* **292**: 4089-4098 (2017). doi: 10.1074/jbc.M117.775916
 6. Imoto, Y., Abe, Y., Okumoto, K., Honsho, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and *Fujiki, Y.: Defining dynamin-based ring organizing center on the peroxisome-dividing machinery isolated from *Cyanidioschyzon merolae*. *J. Cell Sci.* **130**: 853-867 (2017). doi:10.1242/jcs.199182
 7. Hosoi, K., Miyata, N., Mukai, S., Furuki, S., Okumoto, K., Cheng, E. H., and *Fujiki, Y.: The VDAC2-BAK axis regulates peroxisomal membrane permeability. *J. Cell Biol.* **216**: 709-722 (2017). doi: 10.1083/jcb.201605002
 8. Yagita, Y., Shinohara, K., Abe, Y., Nakagawa, K., Al-Owain, M., Alkuraya, F. S., and *Fujiki, Y.: Deficiency of a retinal dystrophy protein, Acyl-CoA Binding Domain-containing 5 (ACBD5), impairs peroxisomal β -oxidation of very-long-chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* **292**: 691-705 (2017). doi: 10.1074/jbc.M116.760090
 9. Kinoshita, N., Matsuura, A., and *Fujiki, Y.: Peroxisome biogenesis: a novel inducible *PEX19* splicing variant is involved in early stages of peroxisome proliferation. *J. Biochem.* **161**: 297-308 (2017). doi: 10.1093/jb/mvw075
 10. Fujiki, Y.: Peroxisome biogenesis and human peroxisome-deficiency disorders. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **92**: 463-477 (2016). doi: 10.2183/pjab.92.463
 11. Liu, Y., Yagita, Y., and *Fujiki, Y.: Assembly of peroxisomal membrane proteins via the direct Pex19p-Pex3p pathway. *Traffic* **17**: 433-455 (2016). doi: 10.1111/tra.12376
 12. Honsho, M., Yamashita, S., and *Fujiki, Y.: Peroxisome homeostasis: mechanisms of division and selective degradation of peroxisomes in mammals. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1863**: 984-991 (2016). doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.032
 13. Honsho, M., Abe, Y., and *Fujiki, Y.: Dysregulation of plasmalogen homeostasis impairs cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **290**: 28822-28833 (2015). doi: 10.1074/jbc.M115.656983
 14. Yoshida, Y., Niwa, H., Honsho, M., Itoyama, A., and *Fujiki, Y.: Pex11p mediates peroxisomal proliferation by promoting deformation of the lipid membrane. *Biology* **Open** **4**: 710-721 (2015). doi: 10.1242/bio.20141080
- [学会発表] 計 36 件中、以下主要な 14 件
1. Fujiki, Y., Kawamura, Y., and Tamura, S. Core components of peroxisomal membrane translocator of matrix proteins. EMBO Conference: Protein translocation and cellular homeostasis, (2017.3.18-22). Dubrovnik (Croatia).
 2. Liu, Y., Yagita, Y., Okumoto, K., Shinohara, K., Nagata, A., and Fujiki, Y. Biogenesis of peroxisome: assembly of nascent membrane proteins. 2016 ASCB Annual Meeting, (2016.12.3-6). San Francisco (USA).
 3. Honsho, M., Abe, Y., and Fujiki, Y. Plasmalogen synthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membrane. 第 39 回日本分子生物学会. 横浜パシフィコ (横浜市).
 4. Fujiki, Y. Peroxisome Homeostasis, Dysfunctions, and Disorders. (2016.11.7-8). The 1st INTERNATIONAL PLASMALOGEN SYMPOSIUM. 九州大学医学部百年講堂 (福岡市).
 5. Tamura, S., Kawamura, Y., and Fujiki, Y. Identification of core components of peroxisomal membrane translocator. (2016.9.25-27). 第 89 回日本生化学会大会. 仙台国際センター・東北大学川内キャンパス (仙台市).
 6. Honsho, M., Abe, Y., and Fujiki, Y. Plasmalogen synthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in plasma membrane. (2016.9.14-16). 5th Open European Peroxisome Meeting 2016. Vienna (Austria).
 7. Fujiki, Y., Liu, Y., Imoto, Y., and Honsho, M. Homeostasis of peroxisome biogenesis and functions. (2016.2.22-25). PEROXISYSTEM: Understanding peroxisomes as a complete biological system. Rehovot (Israel).
 8. Miyata, N., Mukai, S., Cheng, E. H., and Fujiki, Y. Regulation of peroxisome biogenesis by mitochondrial proteins. (2015.12.12-16). 2015 ASCB Annual Meeting. San Diego (USA).
 9. 奥本寛治, 永田愛子, 藤木幸夫. ペルオキシソーム局在性テイルアンカータンパク質 Pex26 の品質管理と膜局在化機構. (2015.12.1-4). BMB2015. 神戸ポートアイランド (神戸市).
 10. 細井謙一郎, 宮田暖, 向井悟, 古木聡美, Emily H. Cheng, 藤木幸夫. Bcl-2 ファミリータンパク質を介したペルオキシソーム形成制御. (2015.12.1-4). BMB2015. 神戸ポートアイランド (神戸市).
 11. 藤木幸夫. プラズマローゲンの恒常性維持とその破綻. (2015.10.29). プラズマローゲン研究会主催 第 2 回シンポジウム. 東京国際フォーラム(東京都).
 12. Fujiki, Y., Abe, Y., and Honsho, M. Plasmalogen homeostasis and peroxisomal

- disorders. (2015.7.15-17). 2015 GFPD & ULF International Peroxisome and Leukodystrophy Meeting. Omaha (USA).
13. 井元祐太, 本庄雅則, 奥本寛治, 大沼みお, 黒岩晴子, 黒岩常祥, 藤木幸夫. ミトコンドリアとペルオキシソーム分裂リングの収縮機構解明に挑む—原始紅藻シジムのポストゲノム情報を基盤として. (2015.6.30-7.2). 第 67 回日本細胞生物学会大会. タワーホール船堀 (東京都).
 14. 本庄雅則, 阿部雄一, 藤木幸夫. エーテルリン脂質プラスマローゲン依存的なコレステロールの生合成制御. (2015.6.28-29). 第 57 回日本脂質生化学会. 一橋大学一橋講堂 (東京都).

〔図書〕 (計 1 2 件)

< 英文図書 >

1. Honsho, M., and Fujiki, Y.: Analysis of plasmalogen synthesis in cultured cells. In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* (Series Ed.: Walker, J.M.), Springer, Humana Press, New York, USA. **1595**: pp. 55-61 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_6
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. **1595**: pp. 197-205 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_18
3. Liu, Y., Honsho, M., and Fujiki, Y.: *In vitro* PMP import analysis using cell-free synthesized PMP and isolated peroxisomes. In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* (Series Ed.: Walker, J.M.), Springer, Humana Press, New York, USA. **1595**: pp. 207-212 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_19
4. Okumoto, K., Honsho, M., Liu, Y., and Fujiki, Y.: Peroxisomal membrane and matrix protein import using a semi-intact mammalian cell system. In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* (Series Ed.: Walker, J.M.), Springer, Humana Press, New York, USA. **1595**: pp. 213-219 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_20
5. Yamashita, S., and Fujiki, Y.: Assessing pexophagy in mammalian cells. In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* (Series Ed.: Walker, J.M.), Springer, Humana Press, New York, USA. **1595**: pp. 243-248 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_23
6. Yamashita, S., Oku, M., Sakai, Y., and Fujiki, Y.: Experimental systems to study yeast pexophagy. In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols,

Methods in Molecular Biology (Series Ed.: Walker, J.M.), Springer, Humana Press, New York, USA. **1595**: pp. 249-255 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_24

7. Okumoto, K., and Fujiki, Y.: Generation of peroxisome-deficient somatic animal cell mutants. In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* (Series Ed.: Walker, J.M.), Springer, Humana Press, New York, USA. **1595**: pp. 319-327 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_29
8. *Fujiki, Y., Okumoto, K., and Honsho, M.: Protein Import into Peroxisomes: the principles and methods of studying (version 2.0). *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Chichester, UK (2015). doi: 10.1002/9780470015902.a0002618.pub2

< 和文総説 >

1. 藤木幸夫, 奥本寛治, 本庄雅則. 医歯薬出版. ペルオキシソーム形成異常と疾患. 別冊・医学のあゆみ特集『ストレスシグナルと疾患—細胞恒常性維持機構の破綻と病態』 2016. pp. 75-79.
2. 藤木幸夫. 診断と治療社. Zellweger 症候群. 小児科診療. 2016. 第 79 巻増刊号 pp.287-288.
3. 藤木幸夫, 本庄雅則. インフォノーツパブリッシング. エーテルリン脂質プラスマローゲンの生合成とその障害. 機能的食品と薬理栄養. 2016. Vol.19, pp. 322-327.
4. 藤木幸夫, 奥本寛治, 本庄雅則. 医歯薬出版. ペルオキシソーム形成異常と疾患. 医学のあゆみ 特集: ストレスシグナルと疾患—細胞恒常性維持機構の破綻と病態. 2015. Vol. 254, pp. 397-401.

〔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:

<http://www.organelle.kyushu-u.ac.jp/lab/organell'estasis/index.html>

6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
藤木 幸夫 (FUJIKI, YUKIO)
九州大学生体防御医学研究所・特任教授
研究者番号: 70261237
 - (2) 研究分担者 なし
 - (3) 連携研究者
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: 20303319

本庄 雅則 (HONSHO, MASANORI)
九州大学生体防御医学研究所・特任准教授
研究者番号: 90372747
 - (4) 研究協力者 なし