

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 11日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570116

研究課題名（和文） ペルオキシソーム機能制御における AAA ペルオキシンの役割

研究課題名（英文） Roles of AAA peroxins in peroxisome biogenesis

研究代表者

田村 茂彦（TAMURA SHIGEHICO）

九州大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：90236753

研究成果の概要（和文）：

細胞内小器官のひとつであるペルオキシソームをモデルオルガネラとして、その形成と代謝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。Pex14p の Pex5p 結合領域に対する X 線結晶構造解析から両者の結合様式を原子レベルで明らかにした。また、AAA ペルオキシソームが ATP 依存的にダイナミックに細胞内局在を変化させ、Pex26p を介して Pex14p/Pex5p 複合体を作用標的としていることを明らかにし、AAA ペルオキシソームの分子機能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. Pex14p is a central component of the peroxisomal protein import machinery, in which the conserved N-terminal domain mediates dynamic interactions with Pex5p. We reported the crystal structure of the conserved N-terminal domain of Pex14p with a three-helix bundle. Furthermore, AAA peroxins are most likely regulated in their peroxisomal localization onto Pex26p via conformational changes by the ATPase cycle, and modulate the interaction between Pex26p and Pex14p on peroxisome membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：細胞小器官、ペルオキシソーム

## 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β酸化、プラズ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性疾患をもたらす。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った。

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。これらペルオキシソーム生合成過程を担うペルオキシシンの中でも、本課題研究の申請者および所属する研究グループ (九州大・院理・藤木幸夫) 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)。

本研究では特に、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ヘリクルトする Pex26p を研究の中心として位置づけている。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。また、Pex1p は同じく AAA ファミリータンパク質であり膜融合に関わる NSF や VCP/p97 などと同様に、細胞質においてホモオリゴマーを形成していることを報告しているが (Tamura S. et al. *J. Biol. Chem.* (2006) 281, 27693-27704)、詳細な複合体構造およびホモオリゴマーとしての役割は明らかになっていない。さらに、Pex1p は NSF や VCP/p97 と一次構造だけでなくアミノ末端側約 200 アミノ酸領域の立体構造でも非常によく似た構造を持っていることから、NSF や VCP/p97 と同様にこの領域で Pex1p 特異的に結合するアダプタータンパク質が存在し、Pex1p の機能制御を担っている可能性もある。

## 2. 研究の目的

本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、その形成と代謝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。ペルオキシソーム形成を担う因子 (ペルオキシシン) の中でも、AAA ファミリータンパク質である Pex1p および Pex6p (AAA ペルオキシシン) に研究の焦点を合わせ、それらの構造生物学的な解析とタンパク質間相互作用の制御能に着目したペルオキシソーム形成システム解明という切り口から研究を遂行する。

以下、個別の達成目標を述べる。AAA ペルオキシシンは、他の AAA ファミリータンパク質と同様に ATPase 活性およびシャペロン様の活性を持つと推測している。そこで、AAA ペルオキシシンが担うタンパク質間相互作用の制御能を定量的に測定する新たな実験系を構築し、上記の過程 (3) での作用機序を分子レベルで解明することを第一の達成目標とした。

AAA ペルオキシシンに関しては、既にバキュロウィルス・Sf9 細胞を用いた発現系により純度の高いリコンビナントタンパク質の調製に成功している。これらを機能解析に供するだけでなく、電子顕微鏡によるタンパク質複合体の単粒子像解析を行い、ATP 加水分解や他の因子との相互作用に伴う構造変化を観察することで、AAA ペルオキシシン機能を明らかにするための構造生物学的な基盤を得ることを第二の達成目標とした。

Pex1p のアミノ末端側領域に特異的に結合する新規アダプタータンパク質を生化学的に同定する。この新規因子は NSF や VCP/p97 におけるアダプタータンパク質と同様に、ATPase 活性やオリゴマー構造の制御に関わると推測している。その制御メカニズム解明を手がかりとして、ペルオキシソーム機能全体の制御メカニズム解明に発展させることを第三の達成目標とした。

## 3. 研究の方法

研究計画について、以下に述べる 3 通りの方向性から研究を遂行した。

まず第一の方向性として、AAA ペルオキシシンがタンパク質間相互作用を制御する働き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、個々のペルオキシシン機能の解析はそのペルオキシシンを欠損した変異細胞に対するペルオキシソーム形成の相補活性として形態学的に調べる方法が主であった。また、タンパク質間相互作用解析については、免疫共沈降や two-hybrid システムなどを用いてきた。しかしながら、これらの方法では結合や解離を定量的に、そして連続して起きる反応過程を段階的に捉えて解析することが困難であった。そこで本研究では、ペルオキシシン機能を測定するための新たな手法として、表面プラズモン共鳴を応用した Biacore システムを用いることで、ペルオキシシンタンパク質間の結合および解離の速

さを定量的に、そして連続して起きる反応過程の中の一反応として捉えて解析する。つまり、ペルオキシソーム膜上で行われているタンパク質間相互作用の変化を、**Biacore** システムのセンサーチップ上において部分的に再構成させ、その動的な変化を定量的に測定する。このような実験系の構築により、ペルオキシソーム生合成機構の中でも、膜上でなされる **Pex5p** のターゲティングからリリースまでの一連の反応過程を解析すること、特に **AAA** ペルオキシシンによるシャペロン様の活性とタンパク質間相互作用を制御する働きに焦点を合わせて解析することが可能になる。

次に第二の方向性として、**Pex5p** のターゲティングとリサイクリングという一連の動的変化とその制御に関わるペルオキシシン群を構造生物学的に解析し、機能解明のための構造的な基盤を得る。**Pex1p** や **Pex6p** と同じく **AAA** ファミリータンパク質である **NSF** や **VCP/p97** は、ホモヘキサマーを形成すること、そして **ATP** 加水分解や他の因子との相互作用による構造変化と機能との相関が詳細に調べられている。**Pex1p** や **Pex6p** についても最近ようやく純度の高いリコンビナントタンパク質の調製に成功し、また **Pex1p** は約 **150kD** そして **Pex6p** は約 **110kD** という大きさのタンパク質であり、これらによって構成されるホモまたはヘテロ複合体は、電子顕微鏡による単粒子像の観察が十分可能であると考えている。また、その他のペルオキシシンについても、タンパク質相互作用に関わる機能ドメインについて構造生物学的な解析を進める。

さらに第三の方向性として、**Pex1p** のアミノ末端領域に結合する新規アダプタータンパク質を同定し、**AAA** ペルオキシシン機能制御のメカニズムを解明する。**Pex1p** のホモオリゴマーまたは **Pex6p** とのヘテロオリゴマーを精製・回収し、これらと共に複合体を形成するタンパク質を質量分析することで新規アダプタータンパク質の候補を同定する。こうして同定できたタンパク質が **Pex1p** 機能や複合体構造を制御する働きを分子レベルで解析する。

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

(1) **AAA** ペルオキシシンの機能解析、さらにはそれらの機能的な標的と推測している **Pex14p** の構造生物学的な解析からタンパク質選別輸送システムの解明を目指して研究を行った。

**Pex1p** および **Pex6p** の **D1D2** 領域のリコンビナントタンパク質を調製し、それらの **ATPase** 活性を測定する実験系を構築した。その結果、

**Pex1p** は 3 量体を形成し、**D2** 部分が **ATPase** 活性を担っていることを明らかにした。この **ATPase** 活性を利用して **Pex14p** のオリゴマー構造を変換していると推測している。また、**Pex14p** がアミノ末端部分で 2 量体を形成していることを構造生物学的に明らかにし、その機能的な意義について考察した。

(2) **AAA** ペルオキシシンをペルオキシソーム膜へリクルートする役割を持つ **Pex26p** が、膜透過装置の主要な構成ペルオキシシンである **Pex14p** と直接結合し、**AAA** ペルオキシシンが **Pex14p-Pex5p** 複合体と相互作用するための足場タンパク質として機能することを明らかにした。また **AAA** ペルオキシシンの細胞内局在に重要な役割を果たす **Pex26p** との相互作用をセミインタクト実験系を用いて解析し、**AAA** ペルオキシシンの細胞内におけるダイナミックな機能と立体構造の変化を解明した。さらに **AAA** ペルオキシシンの分子標的と考えている **Pex14p-Pex5p** 複合体の構造と結合親和性の相関を表面プラズモン共鳴の原理に基づいたピアコアシステムを用いて定量的に解明することで、**AAA** ペルオキシシンの分子機能解明に向けて新たな知見を得ることができた。

(3) **AAA** ペルオキシシンが **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) 12, 774-788)。また、**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た。さらに、**Pex14p** を主な構成因子とするペルオキシソーム膜透過装置複合体には、**complex I, II, III** と名付けた分子量の異なる 3 種類の複合体が存在することを **Blue Native-PAGE** 解析から見いだした。それぞれの複合体を分離・精製することにより構成タンパク質およびその複合体構成を明らかにし、リポソーム膜上で再構成させることで **Pex5p** をリポソーム内腔に輸送させることに成功した。この再構成実験系の構築により、これまでその実体が不明であったペルオキシソーム膜透過装置の構造および機能解明に向けて、重要な知見、実験基盤を得ることができた。

以上のように、当初、研究目的として設定した、**Pex1p** および **Pex6p** といった **AAA** ペルオキシシンの作用機序解明を目指した細胞内動態の解明、そしてこれらと相互作用する因子を同定するだけでなく、**AAA** ペルオキシシンの作用ターゲットと想定した膜透過装置複合体の実体解明に向けた、複合体の分離・精製および構造の解析、さらには **Pex5p** 輸送の再構成実験系の構築にまで発展させることができた。

今後は、ペルオキシソーム膜透過装置複合体の構造生物学的な解析をさらに進めること、さらに再構成実験系を駆使することで Pex5p やマトリックスタンパク質の輸送機序を分子レベルで解明することを目指す。また、AAA ペルオキシシンが、ATP 加水分解のエネルギーを用いて Pex5p を Pex14p から解離させ、細胞質へとリサイクリングさせるメカニズムを分子レベルで明らかにすること、また、Pex14p のリン酸化と輸送能の制御に着目して、細胞外シグナルに応答したペルオキシソーム機能制御機構の解明へさらに発展させることで、ペルオキシソームのみならずオルガネラ機能制御の普遍的なメカニズム解明へと研究を展開させる。

#### 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 4 件)

以下、すべて査読有り

① 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)

doi:10.1016/j.bbamer.2011.10.012

② Nashiro, C., Kashiwagi, A., Matsuzaki, T., Tamura, S. and Fujiki, Y.: Recruiting mechanism of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, to Pex26p on the peroxisomal membrane.

*Traffic* **6**, 774-788 (2011)

doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01182.x

③ Su, J.R., Takeda, K., Tamura, S., Fujiki, Y. and Miki, K.: Monomer-dimer transition of the conserved N-terminal domain of the mammalian peroxisomal matrix protein import receptor, Pex14p.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 217-221 (2010)

④ Su JR., Takeda K., Tamura S., Fujiki Y. and Miki K.: Crystal structure of the conserved N-terminal domain of the peroxisomal matrix-protein-import receptor, Pex14p.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 417-421 (2009)

[学会発表] (計 7 件)

① 発表者 田村茂彦 ペルオキシソーム形成とその障害の分子メカニズム：第6回先端医療薬学研究センター講演会（招待講演）、

平成24年3月16日、岩手医科大学薬学部（岩手）

② 発表者 田村茂彦 AAA peroxins and their recruiter Pex26p modulate the peroxin interactions involved in peroxisomal protein import：第9回国際AAAタンパク質会議、平成23年11月8日、熊本交通センターホテル（熊本）

③ 発表者 田村茂彦 ナンセンス変異の抑制によるペルオキシソーム障害の回復メカニズム：第84回日本生化学会、平成23年9月24日、京都国際会議場（京都）

④ 発表者 田村茂彦 BN-PAGE によるペルオキシシン複合体の解析：第11回蛋白質科学会、平成23年6月9日、ホテル阪急エクスポパーク（大阪）

⑤ 発表者 田村茂彦 AAA ペルオキシシンと Pex26p によって制御されるペルオキシシン相互作用：第83回日本生化学会・第33回分子生物学会合同大会、平成22年12月8日、神戸国際会議場（神戸）

⑥ 発表者 田村茂彦 Restoration of peroxisome biogenesis in peroxisome-deficient cells with a nonsense suppressor compound (G418).：第3回「タンパク質の社会に関する国際会議」、平成22年9月14日、ホテル日航奈良（奈良）

⑦ 発表者 田村茂彦 ペルオキシソーム形成における Pex5p のダイナミズムとその制御システム：第82回日本生化学会、平成21年10月21日、神戸国際会議場（神戸）

[図書] (計 0 件)  
なし

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田村 茂彦 (TAMURA SHIGEHICO)  
九州大学・大学院理学研究院・准教授  
研究者番号：90236753

##### (2) 研究分担者

藤木 幸夫 (FUJIKI YUKIO)  
九州大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：70261237

##### (3) 連携研究者

なし