

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770146

研究課題名 (和文) ユビキチン修飾系を介したペルオキシソーム形成制御機構の解明

研究課題名 (英文) Regulatory mechanism of peroxisome biogenesis by ubiquitination

研究代表者

宮内 康弘 (MIYAUCHI YASUHIRO)

九州大学・大学院理学研究院・特任助教

研究者番号：00382218

研究成果の概要 (和文)：ペルオキシソームは、真核細胞に広く存在する細胞内小器官（オルガネラ）であり、その機能は極長鎖脂肪酸の β -酸化、エーテルリン脂質であるプラスマローゲンや胆汁酸の生合成など多岐にわたっており、各種ペルオキシソーム形成因子（*PEX* 遺伝子:その遺伝子産物、ペルオキシシン）によって形成・維持されるが、ペルオキシソーム形成の制御機構に関しては解析が遅れている。申請者は、ペルオキシソーム移行シグナル2型 (PTS2) を持つペルオキシソーム内腔タンパク質 (PTS2 タンパク質) の細胞質受容体である Pex7p がユビキチン/プロテアソーム系によって分解されることを見いだした。そこで、本年度は Pex7p の調節機構の解明をユビキチン化に関わる E3 の同定・機能解析から目指した。その結果、Pex7p の E3 を同定し、その E3 による Pex7p の調節機構の作用点を見出し、その成果についての論文を投稿準備中である。

研究成果の概要 (英文)：Peroxisomes are ubiquitous single membrane-bound organelles that contain about 100 different enzymes catalyzing various metabolic pathways such as fatty-acid β -oxidation and etherglycerolipid synthesis. Peroxisomes are formed by growth and division of preexisting peroxisomes after posttranslational import of newly synthesized peroxisomal matrix and membrane proteins. Two distinct signals, peroxisomal targeting signal type 1 (PTS1) and PTS2, direct proteins to the peroxisomal matrix. *PEX5* and *PEX7* encode the cytosolic receptors for PTS1 and PTS2, respectively. However, functional regulation of Pex7p by ubiquitin remains undefined.

To address the regulation, if any, of Pex7p by ubiquitination, we first investigated whether or not Pex7p is ubiquitinated and degraded by proteasomes in cells. Addition of a proteasome inhibitor, MG132 to cell culture delayed Pex7p degradation. Alternatively, we also attempted to isolate any potential Pex7p-binding proteins involved in the degradation system of Pex7p. From a cell line stably expressing FLAG-Pex7p, we isolated several Pex7p-binding proteins, termed P7BPs: Pex7p binding proteins. Suppression of P7BP1 by RNAi resulted in a delay of Pex7p degradation, as observed in the MG132-treated cells, hence implying that P7BP1 plays a role in Pex7p ubiquitination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ユビキチン、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、各種ペルオキシソーム形成因子 (**PEX** 遺伝子:その遺伝子産物、ペルオキシシン)によって形成・維持されるが、ペルオキシソーム形成の制御機構に関しては解析が遅れていた。特に、**PTS** 受容体による **PTS** 蛋白質輸送機構が明らかとされたが、細胞質で造られた **PTS** 蛋白質は常に輸送されているのか?どのような状況で輸送効率上がるのか?などといった **PTS** 蛋白質輸送の制御機構に関する未解決の問題点が数多く存在する。

2. 研究の目的

申請者は、ペルオキシソーム移行シグナル 2 型 (**PTS2**) を持つペルオキシソーム内腔蛋白質 (**PTS2** 蛋白質) の細胞質受容体である **Pex7p** がユビキチンリガーゼ **CRL4Pex7p**(**Cul4-Rbx1-DDB1-Pex7p**) 複合体を形成し、そのユビキチンリガーゼ活性が **PTS2** 蛋白質輸送を制御することを見いだした。研究目的・研究期間内に明らかにする点上記の成果を踏まえ、本研究計画では、**CRL4Pex7p** を介したユビキチン修飾系による **PTS2** 蛋白質輸送の制御機構の解析から、ペルオキシソーム形成制御機構の解明を目指した。

(1) **CRL4Pex7p** の基質側からの解析

CRL4Pex7p によって未知の基質がユビキチン化され、**PTS2** 蛋白質のペルオキシソームへの輸送が効率良く行われると考えられることから、**CRL4Pex7p** の基質の同定を試みる。さらに、基質のユビキチン化部位を特定し、ユビキチン化されない変異型基質による **PTS2** 輸送への影響を解析する。

(2) **CRL4Pex7p** 自身からの解析

PTS2 蛋白質輸送誘導時の **CRL4Pex7p** の活性化機構を **E3** 複合体形成と基質のユビキチン化を指標に解析する。さらに、**CRL4Pex7p** により形成されるユビキチン鎖を同定する。

(1)と(2)の2方向から解析し、**CRL4Pex7p** による **PTS2** 蛋白質輸送の制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

CRL4Pex7p を介したユビキチン修飾系による **PTS2** 蛋白質輸送の制御機構の解明を(1) **CRL4Pex7p** の基質の同定・機能解析と(2) **CRL4Pex7p** 活性化機構の解析の2方向から目指す。

(1) **CRL4Pex7p** (**Cul4-Rbx1-DDB1-Pex7p**)の基質探索と同定

CRL4Pex7p によって未知の基質がユビキチン化されることで、ペルオキシソームへの **PTS2** 蛋白質輸送が効率良く行われると考えられるので、**CRL4Pex7p** の基質の同定が急務であり、免疫沈降法と酵母 two-hybrid システムの両面から目指す。

① 免疫沈降法による **Pex7p** 結合蛋白質の単離・同定

② 酵母 two-hybrid システムによる **CRL4Pex7p** の基質探索と同定

③ 試験管内ユビキチン化再構成系の樹立

(2) **CRL4Pex7p** の活性化機構の解析
ユビキチン修飾系の時期特異的かつ選択的な基質認識という特徴からも、**E3** が恒常的に基質を認識しているとは考えにくく、また、常に **E3** 複合体の形で細胞内に存在するとは考えにくい。予備的な実験成果より、ペルオキシソームへの **PTS2** 蛋白質輸送に **CRL4Pex7p** の **E3** 活性が必要であることから、**PTS2** 蛋白質輸送が促進されると **Pex7p** が基質を認識し、**E3** 複合体を形成すると考えられる。そこで、**PTS2** 蛋白質輸送促進による **CRL4Pex7p** 複合体形成機構の解析を進める。

① ペルオキシソーム増殖剤による **PTS2** 蛋白質輸送の促進 (哺乳類培養細胞)

② 酵母系を用いた **PTS2** 蛋白質輸送の促進

(3) **CRL4Pex7p** により認識される基質の解析

① ユビキチン化部位の同定

② **PTS2** 蛋白質輸送誘導時のユビキチン化

③ RNA 干渉法による機能解析

(4) CRL4Pex7p により形成されるユビキチン鎖の決定

生体内にはユビキチン分子内の 7 個の Lys 残基を介して形成されるユビキチン鎖の存在が示されている。ユビキチン鎖はその結合様式によってその機能は異なり、標的蛋白質の分解や機能変化を促すことから、CRL4Pex7p により形成されるユビキチン鎖の決定をユビキチンの Lys-Arg 置換変異体を用いた試験管内ユビキチン化再構成系により行い、CRL4Pex7p の機能解明に繋ぐ。

4. 研究成果

ペルオキシソーム移行シグナル 2 型 (PTS2) を持つペルオキシソーム内腔タンパク質 (PTS2 タンパク質) の細胞質受容体である Pex7p がユビキチン/プロテアソーム系によって分解されることを見いだした。また、Pex7p の調節機構の解明をユビキチン化に関わる E3 の同定・機能解析から目指し、Pex7p の E3 を同定した。更にその E3 による Pex7p の調節機構の作用点を見出し、その成果についての論文を投稿準備中である。

今回得られた結果は、世界で初めて Pex7p の分解に関わるユビキチンリガーゼを同定しており、またその詳細な作用点も明らかとしている点でインパクトのある成果であるといえる。

今後は、Pex7p の分解されるシグナルを解明し、更なる PTS2 タンパク質輸送の制御機構の解明を目指す。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 宮内康弘、向井悟、藤木幸夫
ペルオキシソームの形成機構:PTS2 受容体 Pex7p の細胞内分解機構の解明
BMB2010 2010 年 12 月 9 日 神戸

② Yasuhiro Miyauchi, Satoru Mukai, Yukio Fujiki Turnover mechanism of the PTS2 import receptor, Pex7p
ISPC-Nara2010 2010 年 9 月 13 日 奈良

③ 宮内康弘、向井悟、藤木幸夫
Peroxisome biogenesis: Turnover and a

novel function of the PTS2 receptor, Pex7p
第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日 横浜

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 康弘 (MIYAUCHI YASUHIRO)
九州大学・大学院理学研究院・特任助教
研究者番号: 00382218

