

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770130

研究課題名(和文) システイン残基修飾を介したペルオキシソームタンパク質輸送の制御

研究課題名(英文) Regulation of peroxisomal protein import by modification of cysteine residue

研究代表者

奥本 寛治 (Okumoto, Kanji)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20363319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソームはヒトの生存に必須な細胞内小器官であり、その機能を担う酵素群を含むペルオキシソーム局在性タンパク質の選別輸送機構の解明は重要な課題である。本研究では、ペルオキシソームマトリクスタンパク質の輸送の中心的因子であるPex5pが、システイン残基のモノユビキチン化修飾を含む3種の異なるユビキチン化修飾を受けることを見出した。また、Pex5pのそれぞれのユビキチン化修飾による異なる機能制御の分子メカニズムも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Peroxisome is an essential organelle containing various metabolic pathways and the physiological functions are assured by selective protein import into peroxisomes. Pex5p, a cytosolic receptor of peroxisome targeting signal type-1, plays a pivotal role in peroxisome matrix protein import. This study clarified that Pex5p is modified by three distinct modes of ubiquitination, a cysteine-linked monoubiquitination and two types of lysine-linked monoubiquitination. Cys-linked ubiquitination of Pex5p is prerequisite for export of Pex5p from peroxisomal membrane to the cytosol and its complementing activity. On the other hand, monoubiquitination of Pex5p at multiple lysine residues ensures the efficient export of Pex5p from peroxisomes. Monoubiquitination of Pex5p at Lys520 in vivo might play a role in self-inhibition of Pex5p in the cargo recognition in the cytosol. Therefore, import of peroxisome matrix proteins is elaborately regulated by unique ubiquitin modifications of Pex5p.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞内小器官 ユビキチン化 タンパク質輸送 RINGフィンガー

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは真核生物全般に存在する細胞内小器官であり、種々の物質の酸化や極長鎖脂肪酸のβ酸化等、多くの代謝経路を担う酵素群を有している。ヒトにおいてはペルオキシソームの形成不全が起因であるZellweger症候群等の重篤な先天性代謝異常症が知られており、医学的見地からもペルオキシソームの生理的機能の重要性が示されている。研究代表者所属研究グループを中心とした研究により、哺乳動物ペルオキシソームの形成過程に必須な14種の因子(PEX遺伝子、その遺伝子産物をペルオキシシンと呼称)が同定され、既知のヒト先天性ペルオキシソーム欠損症13群全ての原因遺伝子の同定が完了していた。

研究開始時における大きな課題は、遺伝学的に同定された各ペルオキシシンの生理的機能の解析およびその統合的理解であった。なかでも最も重要と考えられているのは、ペルオキシソーム移行シグナルI型(PTS1)を持つマトリクスタンパク質(PTS1タンパク質と略)のレセプターであるPex5pを中心としたペルオキシソームマトリクスタンパク質の輸送局在機構であり、10種のペルオキシソーム形成因子が関与することが判明していた(図1)。これまでの研究代表者らおよび外国グループによる多くの研究結果から、遊離リボソームで合成されたPTS1タンパク質と細胞質で結合したPex5pは、ペルオキシソームへPTS1タンパク質を輸送した後、再び細胞質へ戻るといふ、細胞質-ペルオキシソーム間を行き来するシャトルレセプターとして機能することが明らかにされていた(図2)。

図1. ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送に関与する哺乳動物ペルオキシソーム形成因子(ペルオキシシン)

ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送	Pex10p, 12p, 2p (RINGフィンガー) Pex5p (PTS1レセプター) Pex14p, 13p (Pex5p結合タンパク質) Pex1p, 6p, 26p (Pex5pシャトルリング)
----------------------	---

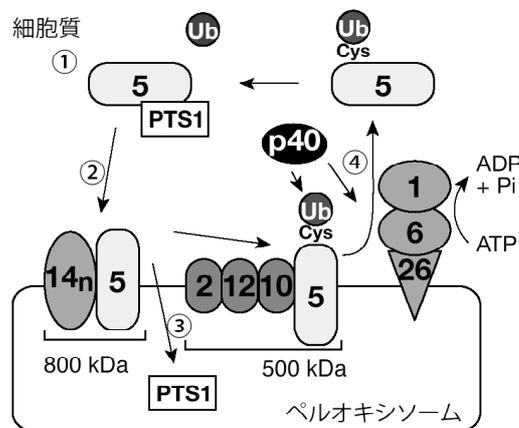


図2. Pex5pを介したペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送の概略

- ① PTS1タンパク質との結合
- ② ペルオキシソーム膜への標的化
- ③ PTS1タンパク質の膜透過
- ④ Ub化および細胞質へのエクスポート

さらに研究代表者は研究開始前に、哺乳動物Pex5pのN末11番目に存在する保存されたシステイン残基がペルオキシソーム膜上でチオエステル結合を介したモノUb化修飾される(Cys-Ub化と略)ことを見出し、この修飾がPex5pのペルオキシソーム膜から細胞質へのエクスポートに必須であることを見出していた(Okumoto et al., *Traffic* (2011), Miyata et al., *Traffic* (2012), 図2)。このように、Pex5pのCys-Ub化という独特の翻訳後修飾がPex5pのシャトルリングおよびペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送を制御する機構が明らかとなり、さらなる研究の展開が必要となっていた。

2. 研究の目的

Pex5pのCys-Ub化修飾の分子基盤、およびCys-Ub化型Pex5pを介したペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送の制御機構の解明を目的とした。また、Pex5pのUb化修飾がリシン残基ではなくシステイン残基を標的とする生理的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 不明な点が多いCys-Ub化機構について、Pex5p特異的E2、E3の同定を含めその分子基盤を解明する。Ub化活性を持つことが示唆されているRINGペルオキシシン3種(Pex2p, Pex10p, Pex12p)を用いたPex5pの*in vitro* Ub化反応系を構築し、Pex5pのCys-Ub化を担うE2、E3を同定する。また、HEK細胞やCHO変異細胞を用いて*in vivo*におけるPex5pのUb化修飾を検討する。

(2) 哺乳動物Pex5pのCys<sup>11</sup>に相当するシステイン残基は酵母からヒトまで完全に保存されており、酵母でもPex5pのCys-Ub化修飾が観察される。従って、システイン残基を特異的に標的とするUb化がPex5pの機能に不可欠であると推定される。Cys<sup>11</sup>変異を含む種々のPex5p変異体を作製し、RNAi法によるノックダウンや*In vitro* Pex5p輸送実験系、*In vitro* Ub化反応系、およびペルオキシソーム欠損性CHO細胞を用いた*in vivo*の実験を駆使し、どのような分子機構でPex5pシャトルリングやマトリクスタンパク質輸送が制御されるのかを統合的に検討する。

4. 研究成果

(1) RINGペルオキシシンを用いたPex5pの*in vitro* Ub化反応系の構築

① 大腸菌から精製した組換えRINGペルオキシシンと種々のE2を用いて、自己Ub化活性を指標とした各RINGペルオキシシンのUb化活性を検討した。その結果、UbcH4およびUbcH5Cとの組み合わせでPex10pのRINGフィンガーがUb化活性を示すことが明らかとなった。Pex2pは上記2種のE2存在下でわずかにUb化活性を示したが、Pex12pは全く活性が見られなかった。さらに、Pex12pは

Pex10p の Ub 化活性を相互作用依存的に顕著に活性化した。

② E2 として UbcH5C を用いた上記 *in vitro* Ub 化反応系により、Pex10p-Pex12p 複合体が Pex5p を基質として特異的に Ub 化することを見出した。Ub 変異体を用いた解析により、Pex10p-Pex12p 複合体による Pex5p のユビキチン化は複数箇所のリシン残基がモノ Ub 化修飾されるマルチモノ Ub 化の様式でなされることが判明した。一方、3 種 RING ペルオキシシンおよび種々の E2 を組み合わせて Pex5p の Cys-Ub 化を再構築しようと試みたが成功しなかった。その原因として、Pex5p の Cys-Ub 化はペルオキシソーム膜に局在化した状態の Pex5p のみが基質として認識され、溶液中で反応が進行する本 *in vitro* Ub 化反応系では再現できなかつたと考えられた。

③ Pex10p-Pex12p 複合体による Pex5p のユビキチン化は Pex14p により阻害された一方で、Pex13p との結合では弱いながらも促進された。また、Pex13p は Ub 化修飾型 Pex5p とほとんど結合しなかった。従って、*in vivo* において Pex5p は Pex14p との結合によりペルオキシソーム膜上に標的化した時点においては Ub 化を受けず、PTS1 タンパク質をペルオキシソーム内腔に放出して Pex13p と結合した段階で Ub 化され、その後 Pex13p から解離することが示唆された。

## (2) *In vivo* における Pex5p の Ub 化修飾

① 野生型およびペルオキシソーム欠損性 CHO 変異細胞を脱 Ub 化阻害剤 N-エチルマレイミド存在下で細胞分画し、ペルオキシソームを含む濃縮オルガネラ画分中の Cys-Ub 化 Pex5p を検出した。Pex5p のエクスポートに障害を示す *PEX1*、*PEX6* および *PEX26* 欠損 CHO 変異細胞では顕著な Cys-Ub 化 Pex5p の蓄積が観察されたのに対し、RING ペルオキシシンをコードする *PEX2* および *PEX12* の欠損 CHO 変異細胞においては Pex5p がペルオキシソームへ顕著に蓄積していたものの、Cys-Ub 化修飾は全く見られなかった。*PEX10* 欠損性患者由来線維芽細胞においても Cys-Ub 化 Pex5p は検出できなかったことから、*in vivo* における Pex5p の Cys-Ub 化修飾には RING ペルオキシシン 3 種が必須であることが明らかとなった。

② *In vivo* における Pex5p の Ub 化修飾を検討する過程で、プラスミド DNA の導入により一過的に発現させた Pex5p が共有結合を介した顕著なモノ Ub 化を受けることを見出した。Pex5p 分子内に存在する 18 カ所のリシン残基をアルギニン残基に置換した多数の KR 変異体を用いた Ub 化標的リシン残基の探索を行った結果、520 番目のリシン残基が特異的にモノ Ub 化されることが判明した。この Lys520 のモノ Ub 化は RING ペルオキシシンおよびペルオキシソーム非依存的であり、細胞質の未知の E3 によって触媒されることが強く示唆された。

③ HEK 細胞および CHO 細胞の細胞分画による詳細な解析により、内在性 Pex5p についても Cys-Ub 化 Pex5p に加えてリシン残基を標的としたモノ Ub 化修飾型 Pex5p が存在することを明らかにした。従って、哺乳動物において Pex5p は少なくとも 2 種の異なる Ub 化修飾を受けることが判明した。

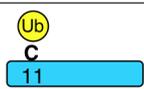
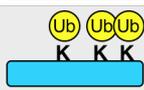
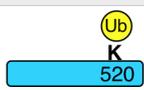
## (3) 異なる Ub 化修飾による Pex5p の機能制御機構

① KR 変異型 Pex5p を用いた *in vitro* Pex5p 輸送実験系および相補活性検討により、Lys520 以外のリシン残基のマルチモノ Ub 化は Pex5p のマトリクスタンプク質輸送活性に必須ではないものの、Pex5p のペルオキシソーム膜から細胞質への効率的なエクスポートに必要であることが分かった。Cys11 に関しては既に論文発表しているように、Pex5p のエクスポートおよび相補活性に必須である。

② Lys520 は Pex5p の C 末 TPR モチーフ内に存在しており、PTS1 との結合部位のごく近傍に位置していた。予想通り、Lys520 が Ub 化修飾された Pex5p は PTS1 と全く結合しなかった。従って、細胞質における Pex5p の Lys520 を標的としたモノ Ub 化は、基質である PTS1 タンパク質との結合を阻害することで自身のマトリクスタンプク質輸送活性を自己抑制する可能性が示唆された。

以上の結果をまとめると、1) マトリクスタンプク質輸送に必須な Pex5p の Cys11 のモノ Ub 化に加え、2) 内在性 Pex5p の Lys 残基のマルチモノ Ub 化、および 3) 一過性に発現させた Pex5p がペルオキシソーム非依存的に細胞質において Lys520 のモノ Ub 化修飾を受けること、を見出した。これら Pex5p の異なる 3 種の様式による Ub 化修飾は、それぞれ異なる作用機序でペルオキシソームマトリクスタンプク質輸送を制御することを明らかにした (図 3)。これらの成果を国際誌 *J. Biol. Chem.* に発表した (Okumoto et al, *J. Biol. Chem.* **289**, 14089-14108 (2014))。

図 3. Pex5p の Ub 化修飾とその機能制御

Ub 化様式	機能制御
	Cys11, モノ Ub 化 Pex5p エクスポート必須
	リシン-マルチモノ Ub 化 Pex5p エクスポート効率性に関与
	Lys520, モノ Ub 化 Pex5p-PTS1 の結合を阻害

関連する研究成果として、新規に分離した *PEX5* 欠損性 CHO 変異細胞を用いた解析により Pex5p の新たな機能を見出し、国際誌 *Biochemical Journal* に発表した (Natsuyama et

al., *Biochem. J.* **449**, 195-207 (2013)。また、新規蛍光タンパク質融合型レポーターを用いたペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送の定量的解析方法を樹立し、国際誌 *Genes to Cells* に発表した (Noguchi M. et al., *Genes Cells* **18**, 476-492 (2013))。

#### 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)

① Okumoto, K., Noda, H., and Fujiki, Y.: Distinct modes of ubiquitination of peroxisome-targeting signal type 1 (PTS1)-receptor Pex5p regulate PTS1 protein import. *J. Biol. Chem.* **289**, 14089-14108 (2014)  
doi:10.1074/jbc.M113.527937 査読有り

② Noguchi M., Okumoto K., and Fujiki Y.: System to quantify the import of peroxisomal matrix proteins by fluorescence intensity. *Genes Cells* **18**, 476-492 (2013)  
doi: 10.1111/gtc.12051 査読有り

③ Natsuyama R., Okumoto K., and Fujiki Y.: Pex5p stabilizes Pex14p: a study using a newly isolated *pex5* CHO cell mutant, ZPEG101. *Biochem. J.* **449**, 195-207 (2013)  
doi: 10.1042/BJ20120911 査読有り

④ 藤木 幸夫, 宮田 暖, 奥本 寛治, 田村 茂彦, 糸山 彰徳, 本庄 雅則  
ペルオキシソームの形成・制御とその障害生体の科学 (医学書院) **63**, 448-451 (2012)  
URL:  
<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=34660>  
査読無し

[学会発表] (計 4 件)

① K. Okumoto, H. Noda, Y. Fujiki  
RING peroxin complexes comprising Pex10p and Pex12p ubiquitinate the PTS1 receptor Pex5p and regulate its shuttling between peroxisomes and the cytosol.  
PerFuMe Kick-off Conference  
2013年12月3日  
Hampshire Hotel Plaza Groningen (グローニンゲン・オランダ)

② 奥本寛治, 白濱友里, 藤木幸夫  
ペルオキシソーム移行シグナル1型 (PTS1) レセプターPex5p の新規結合因子、P5BP1 の同定  
第86回日本生化学会大会  
2013年9月13日  
パシフィコ横浜 (横浜市)

③ 奥本寛治, 藤木幸夫

PTS1 レセプターPex5p は複数種のユビキチン化修飾を受け、ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送を制御する  
第35回日本分子生物学会年会  
2012年12月14日 福岡国際会議場

④ 奥本寛治, 亀谷紫, 藤木幸夫

Two proteases, trypsin domain-containing 1 (Tysnd1) and peroxisomal Lon protease (PsLon), cooperatively regulate fatty acid  $\beta$ -oxidation in peroxisomal matrix.  
第45回日本発生生物学会、第64回日本細胞生物学会合同年会  
2012年05月30日 神戸国際会議場

[図書] (計 1 件)

① Fujiki, Y., Okumoto, K., Mukai, S., and Tamura, S.: Molecular basis for peroxisome biogenesis disorders. In: Brocard, C. and Hartig, A. (eds) *Molecular machines involved in peroxisomes maintenance*, in press. Berlin, Springer-Verlag (2014)

[その他]

ホームページ等

<http://seibutsu.biology.kyushu-u.ac.jp/~ikenouchi/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

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 : 20363319