

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440032

研究課題名(和文)リン酸化シグナル伝達によるペルオキシソーム形成調節機構

研究課題名(英文) Regulation of peroxisome biogenesis by protein phosphorylation and signal transduction

研究代表者

奥本 寛治 (Okumoto, Kanji)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：20363319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソームマトリクスタンパク質の輸送局在化において中心的分子として機能するPex14pが、酸化ストレス刺激によりリン酸化修飾を受けることを見出した。酸化ストレスによるPex14pのリン酸化修飾はマトリクスタンパク質輸送を制御しており、酸化ストレスに対抗する応答機構の一つとして機能することが示唆された。また、一次繊毛形成に関与するNDR2キナーゼが、そのC末端3アミノ酸配列Gly-Lys-Leuを局在化シグナルとしてペルオキシソームに一部局在化することを見出した。ペルオキシソームが一次繊毛形成や繊毛形成不全に由来する繊毛病に関与する可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：A peroxisomal membrane protein Pex14p plays a pivotal role in peroxisomal matrix protein import. In this study, we found that Pex14p is phosphorylated upon oxidative stresses. Phosphorylation of Pex14p regulates import of peroxisomal matrix proteins, which can counteract cellular oxidative stresses. We also found that NDR2, a protein kinase involved in primary cilium formation, partially localized to peroxisomes in a manner dependent on its peroxisome-targeting signal-1-like sequence, Gly-Lys-Leu, at the C-terminus. Novel peroxisomal function is implicated in ciliogenesis and pathogenesis of ciliopathies.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ペルオキシソーム リン酸化 タンパク質輸送 一次繊毛 繊毛病

1. 研究開始当初の背景

細胞内小器官ペルオキシソームは極長鎖脂肪酸のβ酸化や胆汁酸の合成、種々の物質の酸化など生体に必須な多くの重要な代謝機能を有し、その形成障害はヒトにおいて Zellweger 症候群等の致死性の先天性代謝異常症を導く。申請者らは諸外国グループとの競争の下、ペルオキシソーム形成に必須な一連のペルオキシソーム形成因子 (PEX 遺伝子、その遺伝子産物をペルオキシシンと呼ぶ) 14 種の同定に成功した。この成果は既知の 13 相補性群に対する全てのヒトペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子解明に至り、医学的にも顕著な貢献となった。

PEX 遺伝子群の同定は、タンパク質の細胞内選別輸送機構解明という学術的な重要命題においても大きな進展をもたらした。ペルオキシソームの生理機能を担うタンパク質の大部分は、輸送シグナルとしてペルオキシソーム移行シグナル 1 型 (PTS1) を有する (PTS1 タンパク質と略)。申請者らは、PTS1 レセプターである Pex5p、およびそのペルオキシソーム膜上受容体である Pex14p 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の分子基盤を明らかにしてきた。一方で、ペルオキシソームの多くの代謝機能は細胞内外の環境変化にตอบสนองして調節を受けることが推察されるが、それらを担うと予想される質的、量的な調節を含めた PTS1 タンパク質輸送の制御機構は全く不明であった。

研究開始当初までに申請者は、動物培養細胞において Pex14p がある種の酸化ストレス刺激によりリン酸化修飾され、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ことを示唆する結果を得ていた。すなわち、細胞に課せられた要求にตอบสนองするペルオキシソームの機能適応機構が、リン酸化修飾を介した細胞内シグナル伝達経路により制御されるという新しい作業仮説を立て、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内外の環境変化や刺激にตอบสนองしたリン酸化修飾による、ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送およびペルオキシソーム機能の制御機構の解明を目的とし、さらには Pex14p リン酸化修飾の上流シグナル伝達経路の同定を含めたオルガネラ恒常性維持機構の解明を目指した。大きく以下の 2 課題を設定した。

(1) Pex14p リン酸化修飾によるペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送、およびペルオキシソーム機能の制御機構の解明

Pex14p のリン酸化部位を特定した上で、どのような分子機構で Pex14p のリン酸化修飾がマトリクスタンパク質輸送を制御するのか、Pex14p を中心とするタンパク質輸送装置複合体の形成における役割を含め、その分子機構を解明する。

(2) Pex14p リン酸化修飾の上流シグナル伝達経路の解明

細胞に課せられた要求に応じてペルオキシソームが有する代謝機能の活性調節がなされるという作業仮説の中で、Pex14p は一連の細胞内シグナル伝達経路の最下流に位置し、機能変換の実行因子として機能すると予想された。よって、細胞内外の環境変化を感知し、Pex14p のリン酸化修飾に至る上流シグナル伝達経路を解明する。

3. 研究の方法

(1) Pex14p リン酸化修飾によるペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送の制御：刺激にตอบสนองした Pex14p のリン酸化部位を特定し、Ala あるいは Asp 置換型 Pex14p リン酸化修飾変異体を作製する。Pex14p 欠損性 CHO 変異細胞への発現等により、リン酸化および非リン酸化型 Pex14p の機能の違いを解析し、リン酸化修飾による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を解明する。

(2) Pex14p リン酸化修飾の上流シグナル伝達経路の解明：各種キナーゼ変異体や特異的キナーゼ阻害剤、RNA 干渉法等の使用により Pex14p のリン酸化に関与するリン酸化シグナル伝達経路を解析する。また、(1)、(2) による知見に基づき Pex14p リン酸化シグナル経路を操作することで、Pex14p リン酸化が調節するペルオキシソーム機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Pex14p リン酸化修飾によるペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送の制御

① 質量分析計による解析、リン酸化候補残基に対するアミノ酸置換導入変異体の作製、およびそれら変異体を用いた解析により、ストレス刺激にตอบสนองした Pex14p の主要なリン酸化残基の 1 つを同定した。

② これらの知見を活用して非リン酸化型および恒常的リン酸化型 Pex14p 変異体を作製し、これらを PEX14 欠損性 CHO 変異細胞に発現させた安定発現株を分離した。野生型 Pex14p を入れ戻した安定発現株との比較により、Pex14p のリン酸化修飾が過酸化水素分解酵素であるカタラーゼを含むマトリクスタンパク質輸送の効率を低下させる方向に作用することを見出した。

③ Pex14p 変異体安定発現株を用いた免疫沈降実験により、Pex14p とペルオキシソーム膜上のマトリクスタンパク質輸送装置複合体との結合が、Pex14p のリン酸化修飾により調節されることを示唆する結果を得た。

④ 上記 Pex14p リン酸化部位を特異的に認識するウサギポリクローナル抗体を作製し、内在性 Pex14p のリン酸化を高感度かつ簡便に

検出できる、解析に不可欠なツールとして確立することができた。

(2) Pex14p リン酸化修飾の上流シグナル伝達経路の解明:

① 種々のキナーゼ阻害剤を用いた解析により、Pex14p のリン酸化に関わると考えられる複数のキナーゼカスケード候補を見出した。

② 一方で、酸化ストレスの種類により Pex14p のリン酸化はその程度や上流キナーゼカスケードが異なることが示唆され、想定より複雑かつ精巧な制御を受ける可能性が示された。

まとめると、酸化ストレスによる Pex14p のリン酸化修飾はペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送を負に制御することが明らかとなった。これまで酵母から哺乳動物を含め細胞外刺激によるペルオキシソームタンパク質輸送制御の分子機構は全く未知であり、得られた成果は新規かつ重要な知見といえる。これとは別に私達は、アポトーシス促進因子の1つである BAK が一部ペルオキシソームにも局在しており、ミトコンドリア膜上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を見出した (*J. Cell Biol.* 216: 709-721, 2017: 発表論文3)。この成果は、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新たなアポトーシス制御機構を明らかにした。Pex14p リン酸化修飾によるペルオキシソームマトリクスタンパク質の輸送効率低下は、上記ペルオキシソーム局在性 BAK 活性化と同様に酸化ストレスに対抗する応答機構の一つとして機能する可能性があり、さらなる研究進展の必要性が高まった。

上記に関連して、セリン/スレオニンキナーゼの1つである NDR2 (核 Dbf2 関連タンパク質 2) を介したリン酸化修飾によるペルオキシソームの新たな機能制御に関わる成果を得た。多くの動物細胞は細胞表面に一次繊毛と呼ばれる突起構造を有しており、細胞外からの様々なシグナルを感受するアンテナとして重要な機能を担っている。一次繊毛の形成異常や機能不全は、嚢胞性腎疾患や網膜変性症、肥満など多様な症状を呈する繊毛症と呼称される疾患の原因となることが知られている。NDR2 は細胞の恒常性維持や増殖・分化の調節などに重要な役割を果たす一次繊毛形成に関与するタンパク質キナーゼである。

今回、NDR2 がその C 末端 3 アミノ酸配列 Gly-Lys-Leu を局在化シグナルとして、PTS1 レセプター Pex5p 依存的にペルオキシソームの一部局在化することを明らかにした。

NDR2 のペルオキシソーム局在化は一次繊毛形成に必須であったことから、ペルオキシソームが一次繊毛形成に必要なシグナル分子を係留する場としての新たな機能を有することが示唆され、一次繊毛形成および一次繊毛形成不全に由来する繊毛病にペルオキシソームが関与する可能性が示された (*J. Biol. Chem.* 292: 4089-4098, 2017: 発表論文2)。

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 20 件)

1. *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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
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. 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
8. 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

9. Fujiki, Y.: Peroxisome biogenesis and human peroxisome-deficiency disorders. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **92**: 463-477 (2016). doi: 10.2183/pjab.92.463
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. Jiang, L., Hara-Kuge, S., Yamashita, S., and *Fujiki, Y.: The peroxin Pex14p is the key component for coordinated autophagic degradation of mammalian peroxisomes by direct binding to LC3-II. *Genes Cells* **20**: 36-49 (2015). doi: 10.1111/gtc.12198
15. Tamura, S., Matsumoto, N., Takeba, R., and *Fujiki, Y.: AAA peroxins and their recruiter Pex26p modulate the interactions of peroxins involved in peroxisomal protein import. *J. Biol. Chem.* **289**: 24336-24346 (2014). doi: 10.1074/jbc.M114.588038
16. Miyauchi-Nanri, Y., Mukai, S., Kuroda, K., and *Fujiki, Y.: Cul4A-DDB1-Rbx1 E3 ligase controls the quality of the PTS2 receptor Pex7p. *Biochem. J.* **463**: 65-74 (2014). doi: 10.1042/BJ20130861
17. *Fujiki, Y., Okumoto, K., Mukai, S., Honsho, M., and Tamura, S.: Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Front. Physiol.* **5**: article 307 (2014). doi: 10.3389/fphys.2014.00307
18. Yamashita, S., Abe, K., Tatemichi, Y., and *Fujiki, Y.: The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked peroxophagy. *Autophagy* **10**: 1549-1564 (2014). doi: 10.4161/auto.29329
19. Noguchi, M., Honsho, M., Abe, Y., Toyama, R., Niwa, H., Sato, Y., Ghaedi, K., Rahmanifar, A., Shafeghati, Y., and *Fujiki, Y.: Mild reduction of plasmalogens causes rhizomelic chondrodysplasia punctata: Functional characterization of a novel mutation. *J. Hum. Genet.* **59**: 387-392 (2014). doi: 10.1038/jhg.2014.39
20. 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

[学会発表] (計 50 件) : 主要を下記に記載。

1. 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).
2. Liu, Y., Tamura, S., Okumoto, K., Yagita, Y., Kawamura, Y., Nagata, A., and Fujiki, Y. (2016.11.30-12.2). Peroxisome biogenesis: Import of nascent membrane and matrix proteins. 第 39 回日本分子生物学会. 横浜パシフィコ (横浜市)
3. 奥本寛治, 小野立晃, 下村紋子, 外山隆介, 藤木幸夫. ペルオキシソーム局在型 Miro1 バリエーションによるペルオキシソームの細胞内移動制御. (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).
4. 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 Pex26p 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).
5. 阿部彰子, 永井友朗, 藤木幸夫, 水野健作. 一次繊毛形成制御キナーゼ NDR2 は C 末端 GKL モチーフを介してペルオキシソームに局在化する. (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).
6. 八木田悠一, 劉玉瓊, 奥本寛治, 藤木幸夫. 新生鎖テイルアンカー型タンパク質の運命決定・膜局在化機構. (2014.10.15-18). 第 87 回日本生化学会大会. 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都市).
7. 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 の結合因子、P5BP1 の機能解析. (2014.6.11-13). 第 66 回日本細胞生物学会大会. 奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター (奈良市).

[図書] (計 12 件)

< 英文図書 >

1. 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. pp. 197-205 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_18
2. 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. pp. 213-219 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_20
3. 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. pp. 319-327 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_29
4. 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. pp. 55-61 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_6
 5. 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. pp. 207-212 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_19
 6. 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. pp. 243-248 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_23
 7. 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. pp. 249-255 (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6937-1_24
 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. 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「ペルオキシソーム形成異常と疾患」. 2016. pp. 75-79.
2. 藤木幸夫. 診断と治療社. 小児科診療「Zellweger 症候群」. 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. 機能性食品と薬理栄養. 2016. Vol.19, pp. 322-327.
4. 藤木幸夫, 奥本寛治, 本庄雅則. 医歯薬出版. 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「ペルオキシソーム形成異常と疾患」. 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]
ホームページ等
<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/ikelab/>

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: 20303319
 - (2) 研究分担者 なし
 - (3) 連携研究者
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
 - (4) 研究協力者 なし