

「生命活動のプログラム」
平成7年度採択研究代表者

藤木 幸夫

(九州大学大学院理学研究科 教授)

「オルガネラ構築と細胞機能発現制御の分子機構」

1. 研究実施の概要

複雑な内部構造をもつ真核細胞の諸々の生命活動は細胞オルガネラの構造と機能に大きく依存している。これら細胞内構造並びに細胞構造は、遺伝情報の翻訳産物であるタンパク質が細胞内で空間的に特定の秩序をもって配置されることにより構築されている。すなわち遺伝子が生体膜を隔てた場をも支配できる基本原理である。従って、そのメカニズムを解明することは遺伝子発現から細胞機能の発現と制御という一連の生命活動を理解するうえで極めて重要な研究課題である。本戦略的基礎研究推進事業ではペルオキシソーム、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソームなど細胞内オルガネラの動的存在状態とその制御機構、並びに種々の病態をもたらす障害機構をペルオキシソーム系を主体として明らかにし、それらの成果を総合的に考察することにより「オルガネラ構築と細胞機能発現制御」の基本原理を導き出すことを目的として研究を行っている。

本研究課題は真核細胞におけるオルガネラの膜系という巨大かつ複雑な構造体を研究対象とし、しかも扱う現象はタンパク質の生合成に伴う細胞内での移動という時間的にも空間的にも極めてダイナミックな現象である。従って、今年度は *in vivo*, *in vitro* の両系を駆使してタンパク質の細胞内選別輸送・局在化およびペルオキシソーム系を中心にオルガネラ形成にかかわるより多くの細胞内因子の同定とそれらの機能解明に主力を注いだ。

本課題研究は遺伝情報発現ステップの全貌の理解という生命科学研究における極めて重要な命題解明に分子的基盤を与えるだけでなく、その成果として、将来有用物質の分泌生産、オルガネラを利用したバイオテクノロジーや人工細胞の開発など応用への道も開くことが期待される。

2. 研究実施内容

Aグループ

1. ペルオキシソームの形成機構とその障害の分子機構

本研究代表者の研究対象としている細胞内細胞内小器官ペルオキシソームは近年

多くの重要な代謝機能が見出される一方、その障害は Zellweger 症候群など遺伝性の致死的疾患をもたらすことが判明し、生体にとって不可欠な細胞内小器官と考えられている。従って、本研究課題解決へ向けてペルオキシソームは非常に適したモデル小器官系といえる。本年度は昨年度同様、主として多くのペルオキシソーム欠損性動物変異細胞の分離と相補遺伝子の単離を中心に展開した。

1) 新たなペルオキシソーム欠損性 CHO 細胞株の分離

ヒトの先天性ペルオキシソーム欠損症には現在少なくとも約 10 種類の相補性群が知られているので、多くのペルオキシソーム欠損性変異細胞株の分離を昨年度試みた結果、5つの異なる相補性群に属する変異細胞、それぞれ ZP105/ZP139 (ヒト相補性群 II 群), ZP109 (ヒト相補性群 III 群), ZP110, ZP114, および ZP119 を得た。新規な相補性群, J 群に属すると判定された Zellweger 症候群患者由来線維芽細胞に対し、ZP119 は細胞融合により相補しないことから同一相補性群であることが判明した。一方、ZP110 および ZP114 は既存の CHO およびヒトのいずれの相補性群にも属さない、哺乳動物細胞におけるそれぞれ第 14, 15 番目の相補性群変異細胞であることも明らかになった(表1)。つぎに、従来の P9OH/UV ペルオキシソーム欠損性 CHO 細胞変異株選択法に加えて GFP をモニタータンパク質として変異細胞スクリーニングをより迅速化するなどの改良を加え、さらに変異細胞の分離を試み結果、5つの異なる相補性群に属する CHO 変異細胞の分離に成功した。つぎにこれら変異細胞を用いて新たなペルオキシソーム形成因子の単離を検討した。

2) ペルオキシソーム形成因子 (peroxin) のクローニングとペルオキシソーム病患者異常遺伝子解析

2-1) 機能相補活性スクリーニング法:

変異細胞 ZP107 に対し相補活性を有する *PEX1* 遺伝子のクローニングに成功、もっとも患者数の多い E 群 (第 I 群) Zellweger 症候群患者細胞において *PEX1* 遺伝子の異常が見られたことから病因遺伝子であると結論した。さらに IRD など軽症型ペルオキシソーム欠損症患者 *PEX1* 部位変異 (Gly843Asp) と温度感受性細胞表現型 (30°C でペルオキシソーム形成が回復) に強い関連性があること、すなわち臨床的にも高く評価される知見を得ることが出来た。ヒト cDNA library を用いた変異細胞 ZP119 に対する機能相補活性スクリーニング法によりファルネシル化タンパク質をコードする *PEX19* cDNA のクローニングに成功、RT-PCR 法による J 群 Zellweger 症候群患者遺伝子変異解析の結果、1塩基挿入によるフレームシフトがホモ接合体変異として見いだされ、原因遺伝子として同定した。この相補性群変異細胞においては、他と異なり膜生合成も異常であることから Pex19p が膜形成にかかわっていることが示唆された。

2-2) EST :

もう一つのアプローチ法として、最近ペルオキシソーム形成異常酵母変異株の相補 *PEX* 遺伝子を用いたヒト cDNA データベース上でのホモログ検索法 (expressed sequence tag search, EST 法) によるヒト *PEX* のクローニングが展開されている。私たちはこの手法によりヒト *PEX10* (RING ペルオキシソーム膜タンパク質をコード)、*PEX16* (ペルオキシソーム膜タンパク質をコード) をクローニングしそれぞれ相補性群 B 群 (アメリカ VII 群)、相補性群 D 群 (アメリカ IX 群) の病因遺伝子であることを明らかにした。

表1 ペルオキシソーム欠損症相補性群と CHO 変異細胞および相補遺伝子

ヒト			相補性群臨床型	CHO変異細胞	相補遺伝子
日本	アメリカ	オランダ			
A	VIII		ZS, NALD, IRD	(ZP124)	
B	VII		ZS, NALD		<u>PEX10</u>
C	IV	3	ZS, NALD	ZP92	<u>PEX6</u>
D	IX		ZS		<u>PEX16</u>
E	I	2	ZS, NALD, IRD	Z24, ZP107	<u>PEX1</u>
F	X	5	ZS, IRD	Z65	<u>PEX2 (PAF-1)</u>
	II	4	ZS, NALD	ZP105, ZP139	<u>PEX5</u>
	III		ZS	ZP109	<u>PEX12</u>
	VI		ZS; NALD		
G			ZS		
				ZP110	(<u>PEX14</u>)
				ZP114	
J			ZS	ZP119	<u>PEX19</u>
				(ZP126)	
H				(ZP128)	
R	XI	1	RCDP	(ZPG207)	(<u>PEX7</u>)
				(ZPG208)	

ZS: Zellweger 症候群. NALD: 新生児型 adrenoleukodystrophy. IRD: 乳児型 Refsum 病. RCDP: rhizomelic chondrodysplasia punctata (斑状軟骨形成不全症 II 型)

2. 核タンパク質の細胞質-核間輸送の分子機構

HIV 遺伝子発現調節蛋白質 Tat および Rev をモデル核タンパク質として、その細胞内選別輸送とその制御機構をそれぞれに関与する細胞質因子の同定・遺伝子クローニングなどにより分子レベルで解明するため、本年度は、Rev の核内輸送機構を解析する細胞系の樹立を試みた。

HIV 遺伝子発現調節タンパク質 Rev をモデル核移行性タンパク質として、細胞内選別輸送とその制御機構を、分子レベルで詳細に解明することを目的として、gpt(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 遺伝子発現をマーカーとした Rev 依存性薬剤感受性細胞株の確立を目指した検討を行っている。

Bグループ

1. ミトコンドリアへのタンパク質のターゲッティング膜透過および小胞体膜形成の分子機構

- i) ミトコンドリア外膜と内膜とはそれぞれ独立した透過装置を持つ。界面活性剤による内・外膜の解体、人工膜への再構成、化学架橋法などを用いて透過装置を構成する因子の同定と精製を行った。
- ii) 小胞体 (ER) 膜タンパク質のトポロジー形成に関わるシグナルの系統的な特性解析を行った。

2. ミトコンドリアおよび小胞体へのターゲッティングシグナルの分子認識機構

- i) ミトコンドリアのターゲッティングシグナル受容体とプロセッシングペプチダーゼ上のシグナル認識に係わる構造を遺伝子工学および親和性標識等を用いて同定を試みた。
- ii) 小胞体の C 末端膜挿入シグナルを持つタンパク質のシグナル基本構造の同定を試みた。

研究者 B 1

『ミトコンドリア蛋白質輸送』

ラット肝ミトコンドリアへの前駆体蛋白質の輸送過程を解析し、さらにミトコンドリア輸送促進因子 MSF と前駆体蛋白質の相互作用の解析を行った。

1. 哺乳類ミトコンドリアの新規な受容体 OM37 の解析：ラットミトコンドリア外膜の 37kDa 蛋白質 (OM37) の抗体は MSF に依存した前駆体蛋白質の外膜受容体への結合を強く阻害することから、ラットミトコンドリアにおける前駆体蛋白質受容体の一つであると考えられる。cDNA クローニング、抗体作成を行い次の事柄を明らかにした。(1) N-末端の疎水領域で外膜に結合し分子の大半を細胞質側に向けている。(2) 輸送途中の前駆体蛋白質と相互作用がある。(3) 膜透過チャネルを構成する Tom40 複合体には含まれない。Tom70 に類似した機能を持つ受容体であると考えられる。

2. N-末端シグナル・アンカーを持つ外膜蛋白質のターゲティング機構：Tom20, Tom70, OM37 は分子の N-末端に疎水性に富む膜結合領域を持ち、この領域は「小胞体ターゲティング・シグナル」に類似していることから、小胞体とミトコンドリアへの膜蛋白質の仕分けの調節機構に興味もたれる。今回は Tom20 を用いてそのターゲティングシグナルの特性を *in vivo* と *in vitro* で解析した。そ

の結果、N-末端の疎水性領域の長さとその直後の塩基性アミノ酸の量のバランスによって小胞体とミトコンドリアへの仕分けが決定されることを明らかにした。現在、このシグナルの認識機構を解析している。

3. ミトコンドリア膜間スペースからのシトクロム c の輸出機構：細胞が「死」のシグナルを受けるとミトコンドリアは「アポトーシス因子（シトクロム c、AIF、プロカスペーゼ9など）」を放出しこれによってアポトーシスのカスケードが誘発される。今回はシトクロム c の輸出反応を *in vitro* で再構成し、その反応に関する細胞質因子を明らかにした。

『小胞体膜形成機構』

1. 小胞体 (ER) に於ける膜蛋白質のトポロジー形成に関わるシグナル (I 型シグナルアンカー SAI, II 型シグナルアンカー SAII, ストップトランスファーシグナル) の系統的な特性解析を行ってきたが、今回は推定 14 回の膜貫通領域 (TM) を持つ赤血球のバンド 3 について、個々の TM のトポロジー形成シグナルの評価を *in vitro* の測定系を用いて行った。その結果、いくつかの分子内 SA I はその前に存在する疎水性の弱い領域を膜内に引き込み、強制的に膜貫通領域を形成させる活性があること見いだした。このことは、膜透過装置が「蛋白質合成に伴って N-末端側のシグナルから順に解読し、それらを順次小胞体膜内へ挿入する」という従来の機構に加え、シグナル解読系から無視された分子内の領域がその下流に存在する SAI の働きによってポストトランスレーショナルに膜に挿入されて TM を形成する機構が存在することを初めて示したものである。膜蛋白質のトポロジーのファインチューニング機構であろうと思われる。さらに、ST の機能がその直前に存在する SAII によって増強される現象を明らかにした。

研究者 B 2

1. シトクロム b5 と外膜シトクロム b5 のターゲティングシグナルの解析から、少なくともこのタンパク質に関しては、小胞体とミトコンドリアへの局在化は二者択一的なものではなく両膜に対して競争的に起こることが分かった。このことが外膜に小胞体のタンパク質と類似したタンパク質が存在する理由と思われる。
2. ミトコンドリアターゲティングシグナルなどオルガネラへのターゲティングシグナルの多くは、「共通性の少ない構造にもかかわらず特定のタンパク質を厳密に見分けて認識している」すなわち、「あいまいな情報を正確に伝達している」。ミトコンドリアでのプロセシング反応も同様な機構で行われていると考えられる。シグナル (前駆体) と受容体 (プロセシングペプチダーゼ) の解析が進んでいる。この系を用いて上記のタイプの情報の授受の機構を調べた。

ペプチダーゼは認識部位を多数用意している。前駆体はそのうちのいくつかを持っている。さらに両者とも高次構造に柔軟性がある。これらのことにより一見違った情報が同じ情報として認識されているのであろう。また、複数の認識部位を持つことにより特異性を増している。

Cグループ

1. ゴルジ装置の形成機構

ゴルジ装置の形態形成に関与するタンパク質の同定とその機能の解析ならびに形態形成に影響を及ぼす薬剤の作用機構について検討した。

2. リソソーム・エンドソームの形成機構

リソソームとエンドソームの融合に拘わる細胞質因子、エンドソーム膜タンパク質およびリソソーム膜タンパク質をそれぞれ同定、精製、cDNA クローニングを試みた。

研究者C1

1. Giantin (GCP364/372)と特異的に結合する新規タンパク質 (Gip60) の同定：

Giantin (GCP364/372) はC末端に膜貫通領域を持ち、その隣接する細胞質領域がゴルジへの局在化を決定する。このゴルジ局在化領域を用いて two-hybrid 法により、giantin と特異的に相互作用するタンパク質を検索した。その結果、アミノ酸 544 残基から成る分子量 60kDa の新しいタンパク質 (Gip60) を同定した。

Gip60 は膜貫通領域を持たず、N末端側に Proline-rich domain (25 残基)、中央部に coiled-coil domain (85 残基) を持っている。蛍光抗体法で観察すると、核周辺にゴルジ装置に特徴的な染色像を示すと同時に、細胞質も diffuse に染色された。ゴルジマーカー mannosidase II との二重染色や brefeldin A および nocodazole に対する挙動からも核周辺の染色像はゴルジ装置特異的であると結論された。現在、giantin との結合様式およびゴルジ装置の形態形成における Gip60 の役割について検討を進めている。

2. GCP170 の精子形成能への関与：GCP170 にはリン酸化型と非リン酸化型の2種類が存在し、非リン酸化型がゴルジ膜に強固に結合し、リン酸化されると細胞質に容易に遊離されることを明らかにした。さらに、GCP170 は微小管存在下にゴルジ重槽構造の維持に機能していることを報告した。最近、精子形成不全マウスの解析からその原因遺伝子として Mea2 (male-enhanced antigen-2) 遺伝子が同定され、その遺伝子産物が GCP170 であることがわかった。精子形成不全マウスでは GCP170 の N 末端領域が欠失しており、この領域はリン酸化部位に相当することがわかった。現在、精子形成における GCP170 の役割についてさ

らに詳細な検討を進めている。

3. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)の小胞体／ゴルジ中間体 (ERGIC) に及ぼす影響の解析：これまでの研究で、NDGA はまずゴルジ重槽構造を凝集化した状態で解体し、次いでゴルジ膜蛋白質を小胞体に再分布させる効果をもつことを明らかにした。今回さらに、小胞体とゴルジ間のタンパク質の選別輸送に重要な役割を果たす ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) に対する NDGA の効果をそのマーカーである ERGIC53 を指標として調べた。その結果、ERGIC53 は NDGA 処理後速やかにゴルジに集積し、次いでゴルジ膜タンパク質とともに小胞体に移行することがわかった。NDGA 存在下には特徴的な ERGIC の構造は観察されなくなる。これらの結果から、NDGA は基本的に ERGIC の機能を阻害することによってゴルジ装置の解体を惹き起こすことが示唆された。

研究者C2

1. In vitro での lysosome と endosome の fusion 系を確立し、N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) がこの fusion には働かないことを明らかにした。
2. Cathepsin B あるいは H は mannose-6-phosphate receptor に非依存的に lysosome に移行することを明らかにした。
3. ラット肝より調製した clathrin coated vesicles (CCVs)画分から抽出したアダプター複合体 (AP-1, AP-2) とリソソーム膜蛋白質 (LGP85:LI-motif, LAP(lysosomal acid phosphatase): GY-motif) の細胞質ドメインとの相互作用について、アフィニティービーズおよび SPR (surface plasmon resonance)法を用いて検討した。リソソーム膜蛋白質の細胞質ドメインは GST との融合蛋白質あるいは合成ペプチドを用いた。その結果、in vitro において LAP 細胞質ドメインは AP-2 と、LGP85 細胞質ドメインは LI-motif 依存的に AP-1 とそれぞれ特異的に相互作用していることが明かにした。
4. メラニン細胞におけるメラノソームの形成機構の解明
メラノソームは形態学・生化学的性質がリソソームと非常に類似していることが知られている。しかしながら最近我々はメラノソーム膜蛋白質の一つである TRP-1 と、リソソーム膜蛋白質である lamp1 がマウスメラノサイトにおいて異なる局在を示していることを蛍光抗体法で明らかにした。
5. 「AAA 型 ATPase ファミリーに属するマウス SKD1 と相互作用する新規蛋白質の同定」

マウス SKD1 は AAA 型 ATPase ファミリーの一員であり、エンドソームを介

した膜輸送システムの機能分子として働いている可能性がある。Yeast two-hybrid 法によるマウス脳 cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、SKD1 と相互作用する新規蛋白質 SBP1 (SKD1 Binding Protein) を同定した。SBP1 は 309 個のアミノ酸からなる分子量約 33.9kD の蛋白質であり、他の蛋白質とのホモロジーはなかった。Yeast two-hybrid 法による解析の結果、SBP1 の SKD1 との相互作用は C 末側部分を介しており、また 98~129 残基中に結合阻害領域が存在することが示唆された。SBP1 と SKD1 の相互作用はこの結合阻害領域によって何らかの調節を受けているものと予想される。

6. ヒトグリア細胞は H-ras (V12) の発現に伴い多数の液胞を形成した後にアポトーシス・ネクローシスとは異なるメカニズム (caspase independent, PI3kinase dependent) により細胞死へと移行する。このような細胞死におけるリソソームの役割について細胞分画・蛍光抗体法等による解析を行った。その結果、H-ras (V12) の発現に伴い形成される液胞の膜成分は初期・後期エンドソーム由来でありリソソームは関与していない可能性が示唆された。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○Matsuzono, Y., Kinoshita, N., Tamura, S., Shimozawa, N., Hamasaki, M., Ghaedi, K., Wanders, R. J. A., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y.: Human *PEX19*: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome and potential role in peroxisomal membrane assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 2116-2121 (1999).

○Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Imamura, A., Kondo, N., Kinoshita, N., Fujiki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T., Imanaka, T., Orii, T., Beemer, F., Mooijer, P., Dekker, C., and Wanders, R.J.A.: Genetic basis of peroxisome assembly mutants of humans, CHO cells and yeast: identification of a new complementation group of peroxisome biogenesis disorders, absent from peroxisomal membrane ghosts. Am. J. Hum. Genet. 63: 1898-1902 (1998).

○Honsho, M., Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y.: Mutation in *PEX16* is causal in the peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group D. Am. J. Hum. Genet. 63: 1622-1630 (1998).

○Imamura, A., Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Tsukamoto, T., Orii, T., Kondo, N., Osumi, T., and Fujiki, Y.: Temperature-sensitive mutation in *PEX1* moderates the phenotypes of peroxisome deficiency disorders. Hum. Mol. Genet. 7: 2089-2094 (1998).

○Abe, I., and Fujiki, Y.: cDNA cloning and characterization of a constitutively

- expressed isoform of the human peroxin Pex11p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252: 529-533 (1998).
- Abe, I., Okumoto, K., Tamura, S., and Fujiki, Y.: Clofibrate-inducible, 28-kDa peroxisomal integral membrane protein is encoded by *PEX11*. *FEBS Lett.* 431: 468-472 (1998).
- Okumoto, K., Itoh, R., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Tamura, S., Kondo, N., and Fujiki, Y.: Mutation in *PEX10* is the cause of Zellweger peroxisome-deficiency syndrome of complementation group B. *Hum. Mol. Genet.* 7: 1399-1405 (1998).
- Kinoshita, N., Ghaedi, K., Shimozawa, N., Wanders, R. J. A., Matsuzono, Y., Imanaka, T., Okumoto, K., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y.: Newly identified Chinese hamster ovary cell mutants are defective in biogenesis of peroxisomal membrane vesicles (peroxisomal ghosts), representing a novel complementation group in mammals. *J. Biol. Chem.* 273: 24122-24130 (1998).
- Okumoto, K., Shimozawa, N., Kawai, A., Tamura, S., Tsukamoto, T., Osumi, T., Moser, H., Wanders, R.J.A., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y.: *PEX12*, the pathogenic gene of group III Zellweger syndrome: cDNA cloning by functional complementation on a CHO cell mutant, patient analysis, and characterization of Pex12p. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4324-4336 (1998).
- Imamura, A., Tsumamoto, T., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Imanaka, T., Fujiki, Y., Orii, T., Kondo, N., and Osumi, T.: Temperature-sensitive phenotypes of peroxisome assembly processes represent the milder forms of human peroxisome biogenesis disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1539-1543 (1998).
- Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T., and Fujiki, Y.: A cytoplasmic AAA family peroxin, Pex1p, interacts with Pex6p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 883-886 (1998).
- Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Imamura, A., Tsukamoto, T., Osumi, T., Tateishi, K., Fujiki, Y., Orii, T., Barth, P.G., Wanders, R.J.A., and Kondo, N.: Peroxisome biogenesis disorders: Identification of a new complementation group distinct from peroxisome-deficient CHO mutants and not complemented by human *PEX 13*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243: 368-371 (1998).
- Tamura, S., Okumoto, K., Toyama, R., Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Suzuki, Y., Osumi, T., Kondo, N., and Fujiki, Y.: Human *PEX1* cloned by functional complementation on a CHO cell mutant is responsible for peroxisome-deficient Zellweger syndrome of complementation group I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

95: 4350-4355 (1998).

- Shimozawa, N., Suzuki, Y., Tomatsu, S., Nakamura, H., Kono, T., Takada, H., Tsukamoto, T., Fujiki, Y., et al.: A novel mutation, R125X in peroxisome assembly factor-1 responsible for Zellweger syndrome. Hum. Mut. Suppl.1: S134-S136 (1998).
- Otera, T., Okumoto, K., Tateishi, K., Ikoma, Y., Matsuda, E., Nishimura, M., Tsukamoto, T., Osumi, T., Ohashi, K., Higuchi, O., and Fujiki, Y.: Peroxisome targeting signal type 1 (PTS1)- receptor is involved in import of both PTS1- and PTS2-protein: Studies with PEX5-defective CHO cell mutants. Mol. Cell. Biol. 18: 388-399 (1998).
- 今中常雄、藤木幸夫: ABC タンパク質とペルオキシソーム病「特集 ATP 結合カセット (ABC) タンパク質の分子医学」、最新医学 : 54: 434-440 (1999).
- 藤木幸夫: ペルオキシソームの形成とその障害の分子機構「小特集 膜タンパク質」、臨床化学 : 27: 1-11 (1998).

他 30 件