

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

藤木 幸夫

(九州大学大学院理学研究院 教授)

「オルガネラ- ホメオスタシスと代謝調節・高次細胞機能制御」

1. 研究実施の概要

生命体の基本単位は細胞であり、真核細胞は非常に緻密に分化した膜構造に基づく生命活動を行っている。代謝活動も各オルガネラが代謝を機能分担し、オルガネラ-ホメオスタシス(合成系と分解系のバランス)は、各細胞が必要とする代謝により支配されている。本課題研究は、脂質代謝等を担い生命体に必須なペルオキシソームの形成と分解の分子制御機構と、その破綻により起こる代謝障害の全貌解明により、「代謝が調節するオルガネラ-ホメオスタシスと高次細胞機能制御」の基本原理を導き出し、それに基づく細胞機能制御基盤技術を確立することを目的としている。具体的には、代謝活動が支配するペルオキシソーム動態ネットワークと遺伝子発現ネットワークの解明を目指して、以下に述べる種々の検討を行った。この課題研究の推進により、形態形成・脳中枢神経系の形成と障害の理解や食糧・有用タンパク質生産など、医学・農学の応用領域へも大きく貢献することができる。

2. 研究実施内容

本課題研究では、代謝と細胞内代謝環境がどのようにして生命現象の基本単位・細胞機能の担い手であるオルガネラのホメオスタシスを制御し、さらにオルガネラの高次細胞機能を発現しているのか、これらの分子機序について明らかにすることを目的としている。ペルオキシソームを対象に、代謝と細胞内代謝環境によるペルオキシソーム-ホメオスタシスの制御機構を時間的、空間的の両面からの追究をスタートした。

藤木グループは哺乳動物ペルオキシソーム系を主として対象とし、共同研究者阪井のグループは酵母を中心とした真核微生物系・ペルオキシソーム分解系を中心に、ペルオキシソームホメオスタシス研究を推進している。以下、具体的研究内容と成果を記す。

1) ペルオキシソーム誘導制御系の解析

ペルオキシソーム誘導制御の分子機構を明らかにすべく、抗高脂血剤などいわゆるペルオキシソーム増殖剤 (PP) 等による哺乳動物細胞におけるペルオキシソーム誘導系の確立を目指した。その結果、Fao 細胞や CHO 細胞におけるペルオキシソームの誘導・増殖を形態学的、構成タンパク質レベルで観察することに成功した。

2) メタボローム解析系の確立

ペルオキシソームでの代謝情報を網羅的に理解する一環として、ヒト健常人およびペルオキシソーム機能障害患者由来線維芽細胞を用いて脂質代謝、とくに極長鎖不飽和脂肪酸などの効果を検討している。

3) ペルオキシソーム動態制御系の解析

a) ペルオキシソーム形成因子 (*PEX* 遺伝子産物、ペルオキシシン) のオルガネラ形成過程における生化学的機能、とくにペルオキシソーム生合成初期過程 (膜形成) やペルオキシソームタンパク質輸入装置の解明を中心に解析を進めている。

- ・マトリックスタンパク質の輸送機構: AAA ATPase ファミリーの Pex1p および Pex6p とそれらの膜上結合因子 Pex26 との 3 者複合体によるペルオキシソーム局在化シグナル受容体 Pex5p のシトゾール-ペルオキシソーム間シャトリングの調節制御系を明らかにしようと取り組んでいる。

- ・ペルオキシソーム膜の形成機構: 膜形成因子 Pex19p は、新規合成膜タンパク質と細胞質中で複合体を形成、経時的に Pex3p をペルオキシソーム膜上標的として局在化させることをセミインタクト細胞系でほぼ解明した。

- ・ペルオキシソームの形態制御機構: ペルオキシソームの形態制御因子として最近 CHO 変異細胞 ZP121 を用いて見出したダイナミン様タンパク質 DLP1 の膜上レセプターとして Fis1 を同定、加えてペルオキシソームの分裂に必須な Pex11p の 3 者によりペルオキシソームの形態が制御されていることをごく最近明らかにした。

b) 動物細胞ではほとんど不明のペルオキシソーム分解系の分子機構を明らかにする目的で、CHO 細胞を通常および飢餓条件下で培養した際、ペルオキシソーム特異的な見かけ上オートファジーと思われる現象を形態学および生化学的に観察している。

4) 脳・神経形成や器官形成異常のメカニズムの解明

a) *PEX14* 欠失マウスをほぼ完成、詳細な解析を進めている。

b) エーテルリン脂質プラスマローゲンの代謝と機能を解明する目的で、プラスマローゲン欠損性を示すプラスマローゲン合成系酵素欠損変異細胞 ZPG251 の分離に成功し、解析を進めている。

5) ペルオキシソームにおけるラジカル発生と抗酸化代謝動態の解明

細胞内の生理的レベルの酸化還元ポテンシャルを検知できる蛍光分子プローブについて、酵母細胞および哺乳類培養細胞でペルオキシソームの合成・分解にともなって変動する細胞内およびオルガネラ内の酸化ストレス動態の観察のために、本年度は細胞質およびペルオキシソームで有効に機能するプローブの開発を行った。本プローブを用い、メタノール培養時あるいは様々な酸化ストレス条件下での酸化還元レベルの可視化に成功した。

6) メタノール資化性酵母系を利用したペルオキシソーム誘導制御系の解析

メタノール資化性酵母において代謝の流れと連動したペルオキシソーム酵素の遺伝子発現制御機構を明らかにするため、本年度は既に取得しているメタノール誘導性転写因子 (*Trm1*) の性状を解析した。*Trm1* が複数のメタノール誘導性プロモーターの活性化に関与し、プロモーター領域に結合し得ることを明らかにした。さらに、遺伝子タギング変異株ライブラリーから、メタノール誘導性に関わる因子の候補となる新規遺伝子を取得した。

7) メタノール資化性酵母を利用したペキシファジーを支配する代謝制御系の解析

ペキシファジーを制御する因子として、これまで、リン脂質 (PI3P, PI4P) シグナル系、細胞内アミノ酸プールを検知する GCN 系、Tor キナーゼ支配下にある Snf1 系などの関与を示している。本年度は、3種の PI4 キナーゼ (PIK11, LSB6, STT4)、及び細胞内アミノ酸代謝レベルのセンサー分子である GCN2 についてクローン化し、これらの分子のペキシファジーへの関与について解析した。

8) 植物病原菌の病原性発現におけるペルオキシソーム代謝と動態の解析

植物病原菌の感染器官形成に重要な役割を果たすペルオキシソーム代謝経路を調査するため、グリオキシル酸回路の構成酵素について機能解析を行った。その結果、グリオキシル酸回路は病原性に関与する一方、感染器官形成には必須でないことを明らかにした。また、ペルオキシソーム機能を破壊することにより、感染プロセスにおける脂肪顆粒分解が阻害されるが、この阻害がグリオキシル酸回路の破壊に依存しないことを明らかにした。

3. 研究実施体制

「藤木幸夫」(九州大学大学院理学研究院) グループ

研究項目

「代謝が支配するオルガネラ-ホメオスタシスと高次細胞機能制御」

- ・ペルオキシソーム誘導制御系の解析
- ・メタボローム解析系の確立
- ・ペルオキシソーム動態制御系の解析
- ・脳・神経形成や器官形成異常のメカニズムの解明
- ・ペルオキシソームの誘導と分解系の解析

「阪井 康能」(京都大学大学院農学研究科) グループ

研究項目

「代謝が支配するオルガネラ-ホメオスタシスと高次機能発現 (真核微生物)」

- ・ペルオキシソームにおけるラジカル発生と抗酸化代謝動態の解明
- ・メタノール資化性酵母系を利用したペルオキシソーム誘導制御系の解析
- ・メタノール資化性酵母を利用したペキシファジーを支配する代謝制御系の解析
- ・植物病原菌の病原性発現におけるペルオキシソーム代謝と動態の解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

- Yamashita, S., Oku, M., and Sakai, Y.: Function of PI4P and sterol glucoside are necessary for the synthesis of a nascent membrane structure during pexophagy. *Autophagy* **3**: 35-37 (2007).
- Sasano, Y., Yurimoto, H., and Sakai, Y.: Random mutagenesis by RALF in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *J. Biosci. Bioeng.* (in press).

- Kobayashi, S., Tanaka, A., Fujiki, Y.: Fis1, DLP1, and Pex11p coordinately regulate peroxisome morphogenesis. *Exp. Cell Res.* (in press).