

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(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

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している。

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

- a) 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をいくつかの

細胞株において確立した。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、ペルオキシシン Pex11pa など被誘導性構成タンパク質レベルで観察することに成功、さらには誘導機序の解明も含め誘導阻害剤のスクリーニング系の検討も始めている。

b) ペルオキシソームマトリクスに局在する acyl-CoA oxidase (AOx) ならびに D-bifunctional protein (D-BP) は、極長鎖脂肪酸の β -酸化、とくに docosahexaenoic acid (DHA, C22; Δ 6) 合成の最終段階においてその反応の中心的役割を担う。AOx または D-BP 単独酵素欠損症患者由来の線維芽細胞では、極長鎖脂肪酸の蓄積、DHA 合成量の低下とともに、ペルオキシソーム数の減少、肥大化等の形態異常が認められる。そこで、DHA 存在下これら患者線維芽細胞を培養したところ、正常細胞と同様に顆粒状で形態的に正常かつペルオキシソーム数の回復が観察された。以上の結果から、DHA はペルオキシソームの分裂に重要な役割を果たしているものと推察された。現在、詳細な検討を進めている。

2) メタボローム解析系の確立と試料解析

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能について検討し、ツェルバーガー症候群 *PEX10* 障害患者細胞では極長鎖脂肪酸の著しい上昇と DHA (docosahexaenoic acid) などの低下が認められることを先に報告している。これらの網羅的解析を目的として、質量分析機によるリポドーム(メタボローム)解析法を確立すべく、本 CREST 研究代表者、田口 良教授との共同研究として進めている。

a) CHO 細胞における Phosphatidyl choline (PC) の LC/MS 解析

pex2 Z65 変異細胞および Alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase (ADAPS) 欠損性 ZPEG251 変異細胞(項目4参照; 藤木論文リスト:2)において、野生株 CHO-K1 細胞に比して、エーテル型(alkylacyl 型および alkenylacyl 型)PC の顕著な低下が観察された。ZPEG251 に ADAPS を安定発現させた ZPEG251/ADAPS 株では、alkylacyl 型およびプラスマローゲン型 PC 量は CHO-K1 程度にまでの回復が認められた。また、*pex2* Z65 細胞において極長鎖脂肪酸を有する PC が増加していた。

b) CHO 細胞における Phosphatidyl ethanolamine (PE) の LC/MS 解析: 変異細胞 Z65 および ZPEG251 においてはプラスマローゲン PE が著しく低下していることが見出された。一方、ZPEG251/ADAPS 細胞では、プラスマローゲン PE 量の CHO-K1 程度までの回復がみられた。なお、最近になって同様の解析系を当該研究室でほぼ確立することができた。

3) ペルオキシソーム動態制御系の解析

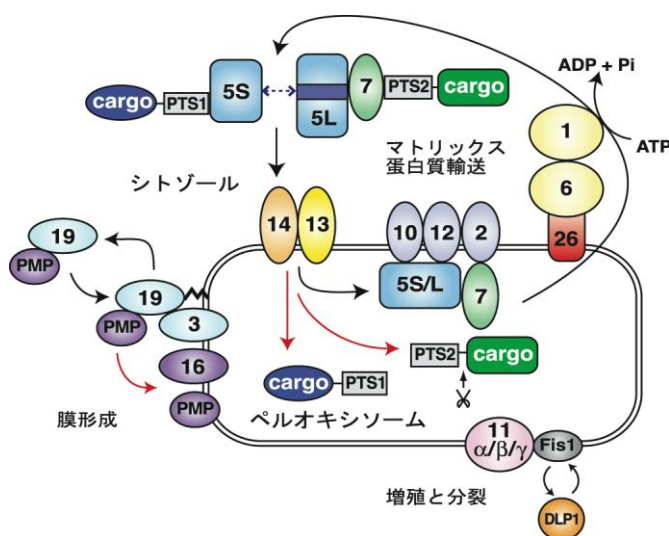
ペルオキシソーム形成因子(*PEX* 遺伝子産物、ペルオキシシン)のオルガネラ形成過程における生化学的機能、とくにペルオキシソーム生合成初期過程(膜形成)やペルオキシソームタンパク質輸入装置を明らかにし、さらにはこれら装置のメタボライト等による動態、機能調節機構の解明を目指している。

a) マトリックスタンパク質の輸送機構: ペルオキシソーム局在化シグナル PTS2 タンパク質の PTS2 受容体 Pex7p を介したペルオキシソームへの無細胞輸送系の確立に成功、PTS1 受容体 Pex5p および Pex7p は ATP 非依存的にインポートされること、Pex5p と Pex7p は化学量論的にそれぞれ異なった様式でペルオキシソーム膜上タンパク質輸送装置複合体間を遷移すること

など、その基本的分子機構をほぼ明らかにした(藤木論文リスト:7)。Pex5p の膜上ドッキング因子 Pex14p の構造と機能制御機構の解明へ向けた取り組みとして、N-末端領域(アミノ酸配列 25-70)の結晶構造、とくに Pex5p の WXXXF/Y モチーフとの結合部位を明らかにした(藤木論文リスト:6)。これらの系を活用し、ペルオキシソームの動態制御機構について検討している。

b) ペルオキシソーム膜の形成機構: 膜形成因子 Pex19p は、新規合成されたペルオキシソーム膜タンパク質と細胞質中で複合体を形成、経時的にペルオキシソーム膜上に標的化すること、その標的分子が Pex3p であることが、我々を含め独立に見出されている(Class I: Pex19p- and Pex3p-dependent membrane protein import pathway)(図1参照)。一方、Pex3p の膜形成時における生合成機構は、諸説あり不明な点が多い。本年度、Pex3p の輸送機構をセミインタクト細胞系、無細胞輸送系などを確立し検討したところ、上記 PMP と同様にシトゾールで翻訳後 Pex19p と複合体を形成、膜上 Pex16p を標的として局在化することを明らかにした (Class II: Pex19p- and Pex16p-dependent membrane protein import pathway を提唱した:図2)(藤木論文リスト:5)。

図1. ほ乳類ペルオキシソームの細胞内局在と機能



PTS1 タンパク質は PTS1 受容体, Pex5p[2種のアイソフォーム, S 型と L 型(S 型内部に37アミノ酸の挿入配列)が存在]により運ばれるが、PTS2 タンパク質は Pex5pL-Pex7p-PTS2 カargo 複合体として輸送され、膜透過装置を経てペルオキシソーム内へ局在化される。一方、AAA ATPase ペルオキシソーム複合体 Pex1p-Pex6p は Pex26p によりペルオキシソーム膜へリクルートされ、Pex5p のリサイクルを仲介する。Pex3p, Pex16p, Pex19p はペルオキシソーム膜アセンブリーに必須である(図3参照)。3種の Pex11p アイソフォーム、ダイナミン様タンパク質 1(DLP1)および Fis1 はペルオキシソームの増殖・分裂制御に関わる。

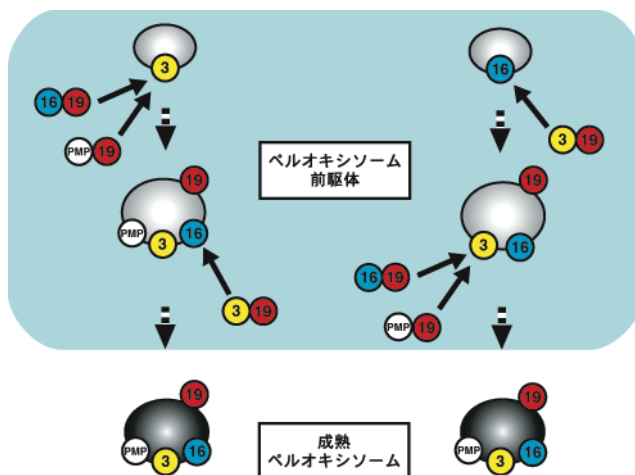


図2. ペルオキシソーム形成の初期過程と成熟モデル

Pex19p は新規合成膜タンパク質(PMP; Pex16p を含む)とシトゾール中で複合体を形成、安定化し、次いで膜上の Pex3p をレセプターとして輸送、局在化させ、ペルオキシソーム膜を形成する(Class I pathway)。一方、新規に合成された Pex3p は Pex19p とシトゾール中で複合体を形成、膜上の Pex16p をレセプターとして輸送、局在化され、ペルオキシソーム膜を形成する(Class II pathway)。Class I、Class II のいずれの過程を経ても成熟ペルオキシソームが生成される。

c) 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、ダイナミン様タンパク質 DLP1、その膜上レセプターFis1、加えてペルオキシソームの分裂に必須な Pex11p との3者複合体の協奏的作用によりペルオキシソームの形態・伸長分裂が制御されていることを、最近明らかにしている。現在、これらの複合体と相互作用する調節因子の同定と機能・動態の解明へ向けて推進している。

d) ペルオキシソームの形成・動態制御機構解明へ向けた新規変異細胞の分離：今回、DNA 変異剤としてICR191を用いて新規な表現型を呈する数種のCHO 変異細胞株の分離に成功した(藤木論文リスト:1)。現在、遺伝子型-表現型の相関を含めた解析を進めている。

4) 脳・神経形成や器官形成異常のメカニズムの解明

a) エーテルリン脂質プラスマローゲンの生合成不全は神経疾患を呈し、患児は生後早期に死に至るなど、プラスマローゲンは機能的に非常に重要なリン脂質である。ペルオキシソームは、プラスマローゲン生合成経路のうち初期 2 段階反応を、dihydroxyacetonephosphate acyltransferase (DHAPAT) および alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase (ADAPS) により担う。プラスマローゲンの代謝と機能の解明を目的とし、ADAPS 障害性 CHO 変異細胞株 ZPEG251 の分離に成功、諸性質を検討し、その有用性を明らかにした。プラスマローゲンのペルオキシソーム-小胞体での生合成終了後の膜への輸送経路を検討した結果、post-Golgi compartments に局在化し、その輸送は ATP 依存性を示すものの、微小管形成や小胞輸送の阻害剤の影響は受けない経路をたどることも見出した(藤木論文リスト:2)。

b) ペルオキシソーム病での代表的障害、神経疾患の直接的原因解明への一ステップとして、グリオーマ細胞株に PTS1 receptor Pex5p のドミナントネガティブ体を発現させたところ、ペルオキシソームの形成障害を起こし、細胞自身の形態異常も観察された。現在、その詳細な細胞生物学的検討と並行して、上記手法によるメタボローム(リボドーム)解析を進めている。

5) ペルオキシソームの誘導と分解系の解析

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べく種々の検討のなかで、CHO 細胞を飢餓条件下で培養後、再度通常培地に戻した際、速やかなペルオキシソーム特異的なオートファジーと思われる現象(リソゾームでの分解)が起きることを、初めて形態学および生化学的に見出した。その特異的分解には、LC3(Atg8)およびペルオキシソーム形成因子 Pex14p の関与を見出した(図3; 藤木論文リスト:3)。この過程は、ほ乳動物細胞におけるペルオキシソームのホメオスタシス維持の一機構と推察される。またペルオキシソーム誘導条件は、広くはストレス下における応答という観点から遺伝子転写物への影響等を探りを入れるべく、ストレスグラニュルを対象とした系の確立を共同研究した(藤木論文リスト:4)。

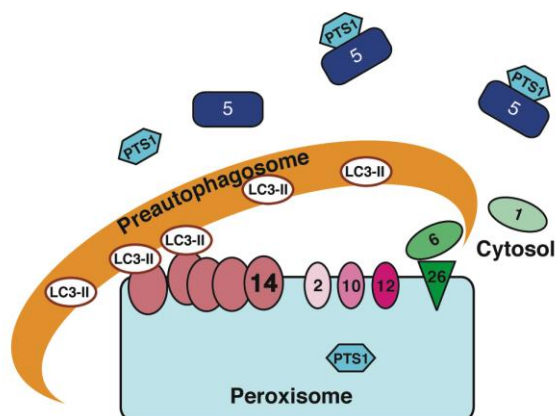


図3. ほ乳類ペルオキシソームの分解機構

PTS1 レセプターPex5p のペルオキシソーム膜上ドッキング複合体とトランスロケーション複合体の解離が起こり、ついでLC3とPex14pの直接相互作用によりプレオートファゴソームの形成が誘導される。

6) オルガネラ形成障害とペルオキシソーム内外におけるレドックス動態の解明

前年度までに生理的レベルでのレドックス変化を検知できる蛍光分子プローブ(レドックスフロール)を開発し、それを用いた解析により、ペルオキシソーム形成不全株の細胞質が野生株と比較して還元状態に偏ることをすでに見出していた。本年度はこのレドックスフロールの蛍光を指標とした薬剤スクリーニング実験を行った結果、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の阻害剤であるトリコスタチンAがペルオキシソーム形成不全株の細胞質をより野生株に近づける、すなわちより酸化的にする効果を持つことを見出した(Yano et al, 論文投稿中)。この結果はレドックスフロールによる解析が創薬スクリーニングにも応用可能であることを示している。

7) ペルオキシソーム形成障害細胞におけるメタボローム解析

メタノール資化性酵母におけるペルオキシソーム形成時のメタボリックフローを考える上で重要な因子として、3つのアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALD)のホモログタンパク質を見出した。このうちで出芽酵母Ald6に最も近い発現制御を受けている因子(PpAld6)がペルオキシソーム形成誘導に伴ってオートファジー経路で液胞へ輸送されることを見出した(9に詳細記述)。また、見出した他のALDのホモログ因子の一つはペルオキシソーム形成時の細胞増殖に必須であることも見出している(Yamashita et al, 論文投稿中)。これらの実験結果は来年度から導入される質量分析装置を用いたメタボローム解析のための予備実験として大きな意味を持つ。すなわちペルオキシソーム形成時のメタボローム解析のターゲット分子群として各種アルデヒド、有機酸に着目することが有益であるという知見を与えている。

8) 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について、新奇転写因子Trm1pとTrm2が関与するメタノール誘導性遺伝子発現制御機構を明らかにしてきた。本年度はこれらの転写因子と相互作用する因子の探索のための、two-hybrid用cDNAライブラリーあるいはゲノムDNAライブラリーの構築を行った。今後これらのライブラリーを用い、転写因子間の相互作用やシグナル伝達に必要な因子を同定する。またペルオキシソーム酵素のメタノール誘導性発現に関わる因子のスクリーニングを継続しており、ストレス応答や炭素源応答に関わる複数の因子を取得した(阪井論文リスト:2)。さらに、メタノール誘導性プロモーター領域のクロマチン構造変換が代謝変換に応答して起こっている可能性が示唆された。異種遺伝子発現のための新規プロモーター・宿主の開発も進めており、本年度はヒト由来のペルオキシソーム膜タンパク質の発現に成功した(阪井論文リスト:1)。

9) 酵母を利用したペキソファジー・オートファジーを支配する代謝レドックス制御系の解析

前年度までにペルオキシソーム形成誘導時にオートファジーが誘導されることを明らかにしていたが、本年度はそのオートファジーにより輸送される分子として、アミノペプチダーゼ(PpApeI)とアルデヒドデヒドロゲナーゼ(PpAld6)を同定した。PpApeIはPpAtg11に依存したオートファジー、PpAld6はPpAtg17に依存したオートファジー経路で液胞へ輸送されていることを明らかにした。さらにPpAtg17に依存したオートファジーがペルオキシソーム形成誘導時の細胞の増殖停止期間(ラグフェイズ)を調節していることが分かり、その生理学的役割が明らかとなった(Yamashita et al, 論文投稿中)。興味深いことにこのオートファジーが誘導されると細胞内のGcn2の活性が上昇す

る。このことから、来年度より着手するペルオキシソーム形成時のメタボローム解析においてアミノ酸プールの変動をモニターすることが有益であるという知見に達している。

10) 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

植物病原菌の感染プロセスにおいて、ペルオキシソーム代謝機能の欠損は、同プロセスにおいて急速に進行する脂肪顆粒分解を阻害するが、この脂肪顆粒分解と感染器官細胞の機能発現において重要な役割を果たす二次代謝経路(メラニン合成経路)がリンクすることを発見した。また、ATG26 遺伝子が、本菌の病原性発現およびペキシファジーに関与していることを明らかにしているが、Atg26 のドメイン解析により、本因子の触媒ドメインに加えて、リン脂質結合ドメインがペキシファジーと病原性発現の双方に必要であることを明らかにした(Asakura et al, 論文投稿中)。

3. 研究実施体制

(1)「藤木」グループ

①研究分担グループ長： 藤木 幸夫(九州大学、教授)

②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」

1. ペルオキシソーム誘導制御系の解析
2. メタボローム解析系の確立と試料解析
3. ペルオキシソーム動態制御系の解析
4. 脳・神経形成や器官形成異常のメカニズムの解明
5. ペルオキシソーム分解系の解析

(2)「阪井」グループ

①研究分担グループ長： 阪井 康能(京都大学、教授)

②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)」

1. オルガネラ形成障害とペルオキシソーム内外におけるレドックス動態の解明
2. ペルオキシソーム形成障害細胞におけるメタボローム解析
3. 酵母系を利用したペルオキシソーム誘導制御系の解析
4. 酵母を利用したペキシファジー・オートファジーを支配する代謝レドックス制御系の解析
5. 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)

「藤木」グループ

1. Ghaedi, K., and Fujiki, Y.: Isolation and characterization of novel phenotype CHO cell mutants defective in peroxisome assembly, using ICR191 as a potent mutagenic agent. **Cell Biochem. Funct.** **26**: 684-691 (2008).
2. Honsho, M., Yagita, Y., Kinoshita, K., and Fujiki, Y.: Isolation and characterization of mutant animal cell line defective in alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase: Localization and transport of plasmalogens to post-Golgi compartments. **Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.** **1783**: 1857-1865 (2008).
3. Hara-Kuge, S., and Fujiki, Y.: The peroxin Pex14p is involved in LC3-dependent degradation of mammalian peroxisomes. **Exp. Cell Res.** **314**: 3531-3541 (2008).
4. Chalupnikova, K., Lattmann, S., Selak, N., Iwamoto, F., Fujiki, Y., and Nagamine, Y.: Recruitment of the RNA helicase RHAU to stress granules via a unique RNA-binding domain. **J. Biol. Chem.** **283**: 35186-35198 (2008).
5. Matsuzaki, T., and Fujiki, Y.: The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway. **J. Cell Biol.** **183**: 1275-1286 (2008).
6. Su, J.-R., Takeda, K., Tamura, S., Fujiki, Y., and Miki, K.: Crystal structure of the conserved N-terminal domain of the peroxisomal matrix protein import receptor, Pex14p. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **106**: 417-421 (2009)..
7. Miyata, N., Mukai, S., and Fujiki, Y.: In vitro import of peroxisome targeting signal type 2 (PTS2) receptor Pex7p into peroxisomes. **Biochim. Biophys. Acta- Mol. Cell Res.**, in press (2009).

「阪井」グループ

1. Egawa, K., Shibata, H., Yamashita, S., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Kato, H.: Overexpression and purification of rat peroxisomal membrane protein 22, PMP22, in *Pichia pastoris*. **Protein Expr. Purif.** **64**: 47-54 (2009).
2. Yano, T, Takigami, E., Yurimoto, H., and Sakai, Y.: The Yap1-regulated glutathione redox system curtails the accumulation of formaldehyde and reactive oxygen species in methanol metabolism of *Pichia pastoris*. **Eukaryotic Cell** **8**: 540-549 (2009).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)