

「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

H22 年度 実績報告

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 (九州大学大学院理学研究院、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(哺乳類)」

- ・ 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と試料解析
- ・ 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

(2)「阪井」グループ

① 研究分担グループ長:阪井康能 (京都大学大学院農学研究科、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)」

- ・ 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
- ・ 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
- ・ 酵母系を利用したペルオキシソーム誘導制御系の解析
- ・ 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
- ・ 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

§3. 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を明らかにするため、ペルオキシソームを対象に追究している。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。

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解明の一環としてペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR α)の核内移行シグナルの同定に成功した(藤木グループ論文リスト:4)。
- 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 docosaheptaenoic 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。DHA によるペルオキシソームの伸長化、顆粒状化およびペルオキシソームの増殖を発見し、論文投稿も行い、現在改訂中である。

2) メタボローム解析系の確立と試料解析

質量分析機によるリポドーム(メタボローム)解析法の確立に基づき、ツェルバーガー症候群患者由来線維芽細胞におけるプラスマローゲン型ホスファチジルエタノールアミン(pl-PE)の顕著な低下やリン脂質中へ極長鎖脂肪酸の高い蓄積など、脂質代謝異常を見出している。現在、ペルオキシソーム形態制御障害患児細胞におけるリポドーム解析を行っている。

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(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、さらにはメタボライト等によるペルオキシシンの動態、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: 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]のうち、PTS2 タンパク質輸送に関わる Pex5pL の特異的37アミノ酸配列のN-末側上流の重要性を新規 CHO 変異株 ZPEG241 により、解明した(藤木論文リスト:3)。Pex5p のペルオキシソームからのリサイクリングを活性化する新規因子 p40 を同定、単離した。この因子は Pex5p が N-末領域にユビキチン化を受け、ペルオキシソームからエクスポートされる際に必須であることも最近見出している(図1A)。また、昨年解明した Pex5p の膜上ドッキング因子 Pex14p の N-末端領域(アミノ酸配列 25-70)の Pex5p の WXXXF/Y モチーフとの結合依存的な動態解析に成功した(藤木論文リスト:2)。一方、Pex26p は Pex1p-Pex6p 複合体をリクルートする。セミインタクト細胞を用いた解析により、Pex1p は ATP 加水分解依存的に、また Pex6p は ATP 結合依存的にペルオキシソームへ局在化することを明らかにした(藤木論文リスト:5)。
- b) ペルオキシソーム膜の形成機構: Pex26p に加えて fatty acyl-CoA reductase1 (Far1;次項目 4)を参照)などペルオキシソーム C 末アンカータンパク質(C-TA)の輸送経路について検討、Pex19p と複合体を形成後、膜上 Pex3p へ標的化される経路、すなわち Class I pathway によることを見出した(図1B)。現在、小胞体局在性 C-TA に関わる GET system との関連性の有無を検証している。
- 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、DLP1、Fis1、

Pex11p、さらには Mitochondrial fission factor (Mff)など新規な因子の可能性も含めて検討している。

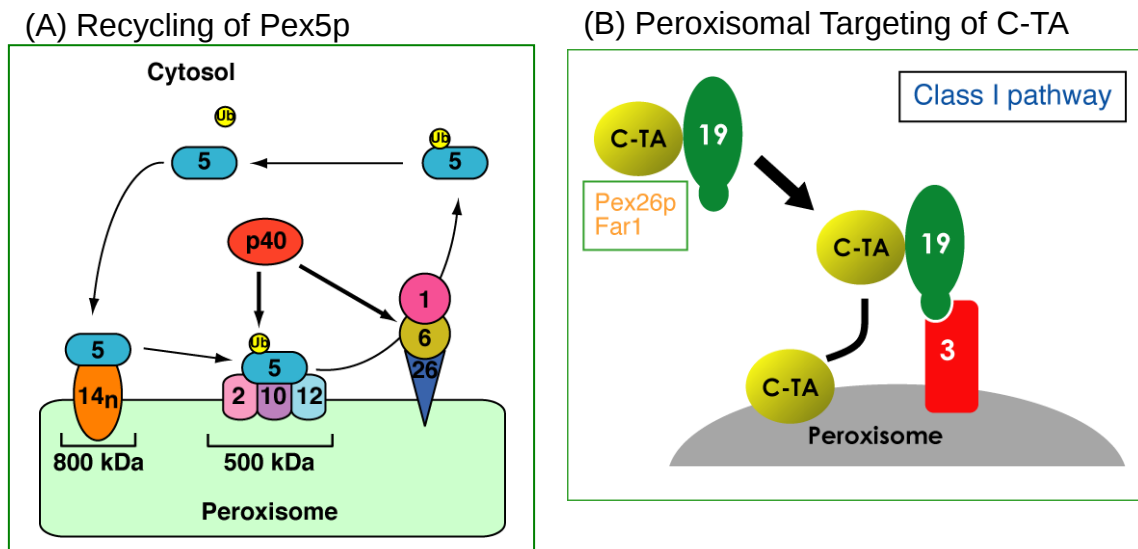


図1. ペルオキシソーム形成因子(ペルオキシン)機能の新知見

(A) AAA ATPase ペルオキシン複合体 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 のユビキチン化依存的なリサイクルを仲介する。(B) ペルオキシソーム C 末アンカータンパク質 (C-TA) は、Pex19p と複合体を形成後、膜上 Pex3p へ標的化される経路、すなわち Class I pathway により輸送・局在化されることを見出した。

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の調節に関して、ペルオキシソーム膜蛋白質 fatty acyl-CoA reductase1 (Far1) が律速酵素であり、ii) 最終産物 プラスマローゲンによって調節される； iii) その調節は、細胞内 プラスマローゲン量依存的な Far1 の安定性制御を介した活性調節によって行われている、ことを明らかにした(図2、藤木論文リスト:1)。また、プラスマローゲンの生合成調節機構の全貌解明へ向け、新規 CHO 変異細胞の分離を進めている。

b) ペルオキシソーム病において代表的な障害、脳・神経系形成異常の原因解明に向けて、ペルオキシソーム形成障害性グリオーマ細胞株の確立に成功、海馬神経初代培養細胞との共培養する

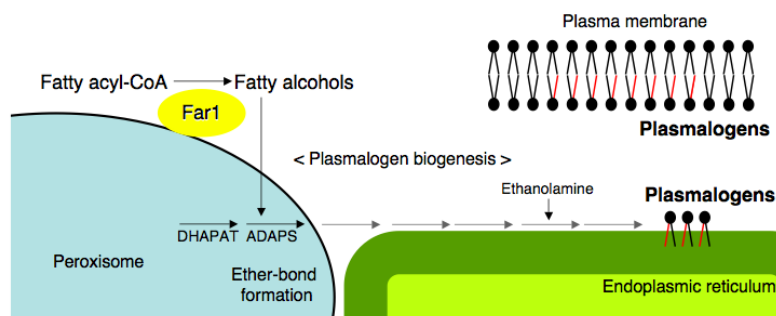


図2. プラスマローゲンの生合成と細胞内輸送

る蛍光分子プローブ(レドックスフロー)を用いて、ペルオキシソーム形成障害性・欠損性変異細胞(CHO 変異細胞)および正常細胞とのレドックス状態を検討の結果、変異細胞では細胞質が非常に還元的状態であることを見出した(両グループ共著論文リスト:1)。これは、ペルオキシソ

ることによる神経形成への影響を、メタボローム解析を含め、現在検討している。

c) 共同研究者阪井グループが開発したレドックス変化を検知できる

ーム形成障害性疾患の統合的理解に繋がるものと期待される詳細は下記項目6)を参照。

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解明を目的として、CHO 細胞における特異的分解には、LC3(Atg8)およびペルオキシソーム形成因子 Pex14p の関与を見出している(*BBA-MCR* 2008)。この過程にユビキチン結合因子 p62 の集積を見出しており、現在その詳細を検討している。

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

前年度までに成果として挙げていた、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) の開発とそれを利用したペルオキシソーム内外のレドックス状態モニタリングの結果を *Molecular and Cellular Biology* 誌において発表した (両グループ共著論文リスト: 1)。この成果は藤木グループとの共著論文としての意味合いも持つ重要なものであるが、多くの新聞媒体を通してその内容を社会に開示できた点でも有意義な成果をもたらした。現在、共同研究として、iPS 細胞や糖尿病モデル細胞におけるレドックスフロールを用いた細胞内レドックス状態変化のモニタリングを現在進行中である。

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

細胞質還元化を引き起こすメカニズムがこの脂質代謝異常に由来するものかどうか調べるため、ペルオキシソーム疾患において特に蓄積している脂質である極長鎖脂肪酸 (hexacosanoic acid) を正常細胞に添加したところ、細胞質が添加後に還元化することを、上記レドックスフロールによる解析および LC-MS によるグルタチオンの酸化還元比測定 の双方において見出した (図3)。すなわち、ペルオキシソーム機能欠損による脂質代謝異常がレドックス異常を引き起こすことが示唆される。

疾患特異的な水溶性マーカー代謝物を見出すため、LC-MS による *untargeted* メタボロミクスに取り組んでいる。その結果、*pex 1*、*pex5* 両細胞株におけるフォスフォコリンの有意な減少が見出された。

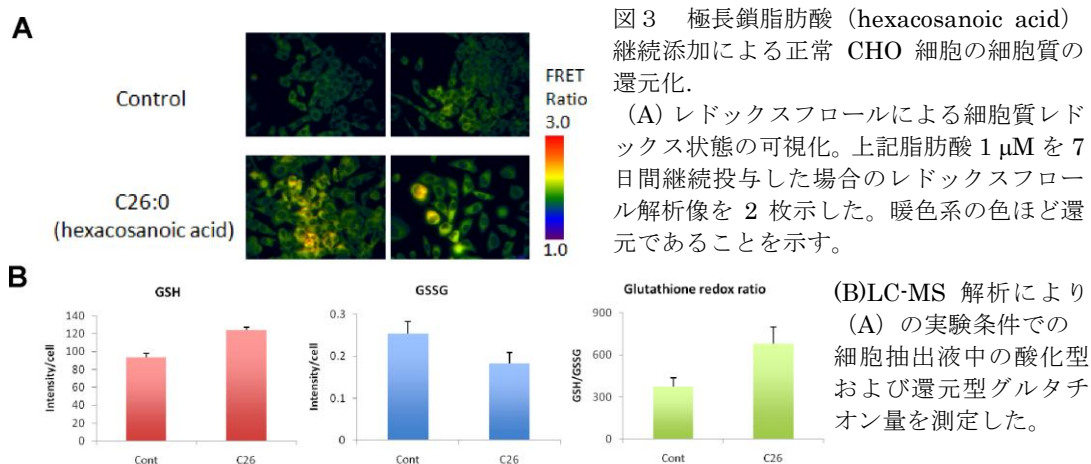


図3 極長鎖脂肪酸 (hexacosanoic acid) 継続添加による正常 CHO 細胞の細胞質の還元化。

(A) レドックスフロールによる細胞質レドックス状態の可視化。上記脂肪酸 1 μ M を 7 日間継続投与した場合のレドックスフロール解析像を 2 枚示した。暖色系の色ほど還元であることを示す。

(B) LC-MS 解析により (A) の実験条件での細胞抽出液中の酸化型および還元型グルタチオン量を測定した。

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

代謝の流れが支配する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、メタノール資化性酵母におけるペルオキシソーム酵素の発現制御 (阪井グループ論文リスト: 2, 3)、転

写制御に関わる因子の機能解析(阪井論文リスト:1)に加え、メタノール誘導時のメタボローム解析を行った。メタノール誘導初期には、まずジヒドロキシアセトンシンターゼ(DAS)遺伝子の転写活性化が起こり、細胞内にホルムアルデヒドやその同化代謝産物(グリセルアルデヒド 3-リン酸, ジヒドロキシアセトン, ジヒドロキシアセトンリン酸)が蓄積し始めた後に、アルコールオキシダーゼ(AOD)遺伝子の発現が最大に活性化されることがわかった。転写因子については、メタノール誘導性遺伝子の発現制御を、グルコース抑制→グルコース脱抑制、メタノール特異的誘導の3段階に分け、各段階に関与する転写因子として、Mig1, Trm2, Hap2 を同定した。遺伝子破壊株の表現型解析により、各転写因子がグルコース抑制、グルコース脱抑制、メタノール特異的誘導それぞれの段階で機能していることを明らかにした。

9) 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

オートファジーに必要な因子 Atg8 が代謝変換に伴って起こる細胞内のオルガネラ動態、特に液胞形態変化に必要であることを、*Pichia pastoris* において見出し報告した(阪井論文リスト:4)。この Atg8 の機能には、他のオートファジー機構に必要な本分子の脂質化が必要でないこと、また細胞の浸透圧変化に対する応答にもこの Atg8 が関与することを見出し、本分子の新たな生理学的役割を明らかにした。また、窒素源飢餓時において、酵母細胞質が還元化すること、メタボローム解析により、窒素源飢餓時にはトランスポーター Ers1 欠損株において細胞内システイン総量の増加を見出した。このことは、Ers1 依存システイン輸送の細胞質還元化への寄与を示唆する。

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、感染器官細胞(付着器)のメラニン合成を顕著に低下させる。一方、メラニン化した付着器の機能発現にはペキシファジーを必要とする。*PEX14* 遺伝子欠失株は、*PEX6* 遺伝子欠失株と異なり、付着器のメラニン化は正常であること、*PEX14* 欠失株ではペキシファジーの欠損を、今年度見出した。これらの結果は、ペキシファジーが付着器の機能発現に必要であることを再確認させ、Pex14p を目印とした、病原菌感染器官細胞における選択的ペルオキシソーム分解の実行を示している。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

「藤木」グループ

1. Honsho, M., Asaoku, S., and Fujiki, Y.: Posttranslational regulation of fatty Acyl-CoA reductase 1, Far1, controls ether glycerophospholipid synthesis. *J. Biol. Chem.* **285**: 8537-8542 (2010). (DOI: 10.1074/jbc.M109.083311)
2. Su, J.R., Takeda, K., Tamura, S., Fujiki, Y., and Miki, K.: Monomer-dimer transition of the conserved N-terminal domain of the mammalian peroxisomal matrix protein import receptor, Pex14p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**: 217-221 (2010). (DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.160)
3. Honsho, M., Hashiguchi, Y., Ghaedi, K., and Fujiki, Y.: Interaction defect of the medium isoform of PTS1-receptor Pex5p with PTS2-receptor Pex7p abrogates the PTS2 protein import into peroxisomes in mammals. *J. Biochem.* **149**: 311-319 (2011). (DOI: 10.1093/jb/mvq130)
4. Iwamoto, F., Umemoto, T., Motojima, K., and Fujiki, Y.: Nuclear transport of peroxisome- proliferator activated receptor α . *J. Biochem.* **149**: 203-210 (2011). (DOI: 10.1093/jb/mvq144)
5. Nashiro, C., Kashiwagi, A., Matsuzaki, T., Tamura, S., and Fujiki, Y.: Recruiting mechanism of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, to Pex26p on peroxisome membrane. *Traffic* (in press). (DOI: 10.1111/j.1600-0854.2011.01182.x)

「阪井」グループ

1. Sasano, Y., Yurimoto, H., Kuriyama, M., and Sakai, Y.: Trm2p-dependent derepression is essential for methanol-specific gene activation in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *FEMS Yeast Res.* **10**: 535-544 (2010). (DOI: 10.1111/j.1567-1364.2010.00640.x)
2. Nakagawa, T., Fujimura, S., Ito, T., Matsufuji, Y., Ozawa, S., Miyaji, T., Nakagawa, J., Tomizuka, N., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Hayakawa, T.: Molecular characterization of two genes with high similarity to the dihydroxyacetone synthase gene in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 1491-1493 (2010). (DOI: 10.1271/bbb.100153)
3. Nakagawa, T., Yoshida, K., Takeuchi, A., Ito, T., Fujimura, S., Matsufuji, Y., Tomizuka, N., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Hayakawa, T.: The peroxisomal catalase gene in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 1733-1735 (2010). (DOI: 10.1271/bbb.100329)
4. Tamura, N., Oku, M., and Sakai, Y.: Atg8 regulates vacuolar membrane dynamics in

a lipidation-independent manner in *Pichia pastoris*. *J. Cell Sci.* **123**: 4107-4116 (2010). (DOI: 10.1242/jcs.070045)

両グループ共著

1. Yano, T., Oku, M., Akeyama, N., Itoyama, A., Yurimoto, H., Kuge, S., Fujiki, Y., and Sakai, Y.: A novel fluorescent sensor protein for visualization of redox states in the cytoplasm and in peroxisomes.. *Mol. Cell. Biol.* **30**: 3758-3766 (2010). (DOI: 10.1128/MCB.00121-10)