

研究題目 細胞内小器官ペルオキシソームへのタンパク質輸送の分子機構 解明

研究組織

研究代表者：藤木幸夫（九州大学 基幹教育院）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学 先端酵素学研究所）

研究分担者：田村茂彦（九州大学 基幹教育院）

奥本寛治（九州大学 理学研究院）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

ペルオキシソームは生体に必須な細胞内小器官（オルガネラ）である。過酸化水素分解酵素カタラーゼをはじめとするペルオキシソームの機能を担うタンパク質（酵素）の大部分は、分子内C末端に存在するペルオキシソーム移行シグナル1型（PTS1）に依存してペルオキシソーム内腔に局在化される。近年のペルオキシソーム形成に必須な哺乳動物 *PEX* 遺伝子群の同定が端緒となり、PTS1 レセプターである *Pex5*、およびそのペルオキシソーム膜上受容体である *Pex14* を中心としたペルオキシソーム内腔タンパク質の輸送局在化機構の分子基盤が明らかとなってきた。私達は 2019、2020 年度共同利用（小迫英尊教授の技術支援）により、過酸化水素誘導性、および細胞周期分裂期特異的な *Pex14* リン酸化部位の同定に成功し、新たな抗酸化ストレス応答機構を発見した（Okumoto et al. *eLife* (2020)、Yamashita et al. *J. Cell Biol.* (2020)）。

ペルオキシソームタンパク質の輸送局在化の大枠が明らかになる一方で、輸送基質である PTS1 タンパク質がどのようにしてペルオキシソーム膜を透過するのか、その分子実態は未解明な点が多い。ペルオキシソーム内腔へのタンパク質輸送では、多量体を形成した *Pex14* を中心とする膜透過装置を PTS1 タンパク質が通過すると推測されている。しかし、ペルオキシソームタンパク質の輸送は高次構造を維持した状態で多量体タンパク質や巨大な基質を膜透

過可能という特徴を持つ。そのため小胞体やミトコンドリアへのタンパク質輸送の解析で汎用される方法が適用できず、膜透過中間体を得ることが困難であることから、膜透過機構の実態解明が遅れている。そこで 2021 年度共同利用に引き続いて、高活性型改良ビオチンリガーゼ TurboID を用いた近接依存性標識法の導入により、ペルオキシソーム膜上のタンパク質膜透過装置の詳細な解析を行い、PTS1 タンパク質の膜透過の過程を明らかにすることを目的とする。

[1-2]研究の方法・経過

膜透過装置の中心因子である *Pex14* のサイトゾル側に配向した C 末側に TurboID を融合した *Pex14-TurboID*、および TurboID の C 末端に PTS1 シグナルを付加したペルオキシソーム内腔局在性の TurboID-PTS1 を動物培養細胞にそれぞれ安定発現させた株を樹立する。短時間のビオチン標識を実施し、*Pex14* および PTS1 タンパク質の近傍に位置するタンパク質を質量分析計により網羅的に同定する。ビオチン化修飾部位の決定により、膜透過装置の配向性や基質 PTS1 タンパク質が膜透過中に近接するタンパク質およびその領域を見出す。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

Pex14-TurboID はペルオキシソームに局在しており、質量分析による網羅的解析により多数のビオチン化ペプチドを同定できた。これらの

中には、PTS1 タンパク質のペルオキシソーム輸送に参与する Pex5 や Pex13 などの既知の Pex14 結合タンパク質やカタラーゼを含む基質 PTS1 タンパク質が複数含まれていた。また同定されたタンパク質のビオチン化修飾部位も決定できており、TurboID が付加された Pex14 の C 末領域がどのように近傍タンパク質と相互作用するのかについて解析を進めている。

一方で、TurboID-PTS1 はペルオキシソームへほとんど局在化しなかった。PTS1 配列の長さや配列を検討したがペルオキシソーム局在化効率は変化しなかった。さらに安定発現細胞の樹立を試みたが、TurboID-PTS1 の発現が認められる薬剤耐性株は得られなかった。TurboID によるビオチン化修飾が TurboID-PTS1 自身のペルオキシソーム輸送に対して阻害的に作用したものと推察された。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究では、ペルオキシソームタンパク質の膜透過過程を TurboID を用いた近傍タンパク質のビオチン化標識により明らかにするという新しい解析系を構築している。このような動的な現象の一過的な相互作用をビオチン化標識による“軌跡”として検出することは、他のオルガネラタンパク質輸送過程などに幅広く応用可能である。また、高次構造を維持したまま膜透過可能という独特なペルオキシソームタンパク質輸送の分子メカニズムの解明は、親水性タンパク質が脂質二重膜を膜透過する方法について新たな知見をもたらす。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

1. Honsho, M., Mawatari, S., Fujiki, Y.: ATP8B2-mediated asymmetric distribution of plasmalogens regulates plasmalogen homeostasis and plays a role in intracellular signaling. *Front. Mol. Biosci.* 9: 915457 (2022).
2. Yagita, Y., Abe, Y., Fujiki, Y.; *De novo* formation and maintenance of mammalian peroxisomes in cultured *PEX16*-knockout cells generated by CRISPR/Cas9. *J. Cell Sci.* 135: jcs258377 (2022).
3. Fujiki, Y., Okumoto, K., Honsho M., Abe, Y.: Molecular insights into peroxisome homeostasis and peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1869: 119330 (2022).
4. Abe, Y., Wanders, R.J.A., Waterham, H.R., Mandel, H., Falik-Zaccai, T.C., Ishihara, N., Fujiki,

Y.: Genetic defects in peroxisome morphogenesis (Pex11 β , dynamin-like protein 1, and nucleoside diphosphate kinase 3) affect docosaehaenoic acid-phospholipid metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 46: 273- 285 (2023).

5. Lackner, K., Sailer, S., Klinken, J., Wever, E., Pras-Raves, M.L., Dane, A.D., Honsho, M., Abe, Y., Keller, M.A., Golderer, G., Werner-Felmayer, G., Fujiki, Y., Vaz, F.M., Werner, E.R., Watschinger, K.: Alterations in ether lipid metabolism and the consequences for the mouse lipidome. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* 1868: 159285 (2023).

6. Honsho, M., Fujiki, Y.: Regulation of plasmalogen biosynthesis in mammalian cells and tissues. *Brain Res. Bullet.* 194: 118-123 (2023).

[3-2] 学会発表

1. 藤木幸夫、奥本寛治、田村茂彦. ペルオキシソームの恒常性と酸化ストレス応答戦略. 第 16 回日本臨床ストレス応答学会大会. 2022 年 11 月 5 日~6 日 オンライン発表
2. 藤木幸夫、奥本寛治. ペルオキシソームの恒常性維持とサーベイランス機構. 第 95 回日本生化学会大会. 2022 年 11 月 9 日~11 日 名古屋国際会議場
3. 奥本寛治、藤木幸夫. カタラーゼの局在制御を介したストレス応答機構を調節するリン酸化シグナル伝達経路. 第 95 回日本生化学会大会. 2022 年 11 月 9 日~11 日 名古屋国際会議場

[3-3] 成果資料等 なし

【4】今後の課題等

膜透過装置 (Pex14) に近接するタンパク質は同定できたが、基質タンパク質 (PTS1) については TurboID-PTS1 のペルオキシソーム局在そのものを達成できていない。TurboID と PTS1 の間に別のタンパク質を挿入するなどしてペルオキシソーム内腔に輸送される TurboID-PTS1 を作製する必要がある。また、Pex14 を含めて膜透過装置の配向性は不明な点が多い。Pex14-TurboID と TurboID-PTS1 それぞれの相互作用因子とビオチン化修飾部位を比較することで、膜透過装置の細胞質側と内腔側の決定にも発展できると考えられる。