

## 研究題目 リン酸化修飾による細胞内小器官ペルオキシソームの機能制御

### 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極長鎖脂肪酸のβ酸化など多くの重要な代謝機能を担う細胞内小器官であり、その内部には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代謝機能を担う多様なタンパク質が局在している。Pex14pはペルオキシソーム膜上に存在するタンパク質輸送装置の主要構成因子であり、ペルオキシソーム内部へのタンパク質輸送において中心的な役割を果たす。私達は動物培養細胞において、1) 過酸化水素等による酸化ストレス刺激時に Pex14p のリン酸化が大きく亢進する、2) 細胞周期の分裂期において Pex14p が高度にリン酸化されることを見出した。さらに、恒常的リン酸化型 Pex14p 変異体の発現はカタラーゼのサイトゾル局在化をもたらす、という結果を得ていた（未発表）。すなわち、Pex14p のリン酸化はカタラーゼのペルオキシソームへの輸送を抑制的に制御すること、さらには細胞内外の環境変化に応じたペルオキシソームへのタンパク質輸送の調節機構の存在を示唆するものである。

本共同研究では、徳島大学先端酵素学研究所・小迫英尊教授との共同研究により、酸化ストレスおよび細胞周期に応答した Pex14p のリン酸化部位を質量分析計を用いたプロテオーム解析により同定し、リン酸化修飾を介したペルオキシソームのタンパク質輸送制御機構および機能調節機構を明らかにすることを目的とした。

#### [1-2] 研究の方法・経過

以下の 2 項目を計画し、実施した。

A) ラット肝臓由来 Fao 細胞を用いて未処理および過酸化水素存在下 30 分培養後、細胞ライゼートを調製し、抗 Pex14p 抗体による免疫沈降により内在性 Pex14p を精製する。これをトリプシン消化後に質量分析に供してリン酸化修飾部位の同定と定量を行う。

B) 細胞分裂期および間期に同調させた HeLa 細胞から 1) と同様の手法でライゼートの調製、ついで免疫沈降を行い、質量分析により内在性 Pex14p のリン酸化部位の同定と定量を行う。

これらの解析により同定された Pex14p のリン酸化部位の情報に基づき、非リン酸化型および恒常的リン酸化模倣型 Pex14p を作製し、ペルオキシソームのタンパク質輸送制御における Pex14p リン酸化の意義をさらに解析した。

### 【2】研究成果

#### [2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

本共同研究により、Fao細胞に対する過酸化水素処理30分で誘導される内在性Pex14pにおけるリン酸化セリン残基を3箇所同定することに成功した。これら3箇所のセリン残基をアラニン残基に置換したPex14p変異体を作製、Fao細胞に一過的に発現させることで、同定されたセリン残基が過酸化水素依存的なPex14pのリン酸化部位であることを確認した。

また、細胞周期分裂期のHeLa細胞で高度にリン酸化される内在性Pex14pのリン酸化セリン残基を1箇所同定することにも成功した。これらの知見も含め、Pex14pリン酸化によるペルオキシソームタンパク質輸送調節機構についての成果を 2 報の論文として発表予定である（*eLife*: 審査中、*J. Cell Biol.*: 改訂中）。

## [2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究の成果は、酸化ストレス依存的なPex14pのリン酸化部位を同定し、Pex14pのリン酸化がカタラーゼの輸送を抑制することでサイトゾル局在性カタラーゼ量を増加させ、細胞の酸化ストレス抵抗性を高めるという新たな抗酸化ストレス応答機構の発見に至った。また、細胞周期依存的なPex14pのリン酸化がペルオキシソーム機能を制御するという知見とも合わせ、本共同研究による研究成果は細胞内恒常性を維持するための分子メカニズム解明へ向けたさらなる発展が期待できる。一方、ペルオキシソームへのタンパク質輸送がリン酸化修飾により制御されるという知見はこれまで酵母から哺乳類を通じて世界初のものであり、細胞内タンパク質選別輸送のあらたな制御機構としても他分野への大きな波及効果を有する。さらに、他の抗酸化ストレス応答やミトコンドリアを介した細胞死誘導経路との関連性も想定され、医学的な見地からも発展性が高い。

## 【3】主な発表論文等

### [3-1] 論文発表

- 1) Dubreuil M.M., Morgens D.W., Okumoto K., Honsho M., Contrepois K., Lee-McMullen B., Traber G. M., Sood R.S., Dixon S.J., Snyder M.P., Fujiki Y.\*, and Bassik M.C.\*. (\*, Corresponding authors) Systematic identification of regulators of oxidative stress reveals non-canonical roles for peroxisomal import and the pentose phosphate pathway. *Cell Rep.* 30, 1417-1433 (2020)
- 2) Abe Y., Honsho M., Kawaguchi R., Matsuzaki T., Ichiki Y., Fujitani M., Fujiwara K., Hirokane M., Oku M., Sakai Y., Yamashita T., Fujiki Y. A peroxisome deficiency-induced reductive cytosol state up-regulates the brain-derived neurotrophic factor pathway. *J. Biol. Chem.* in press.

### [3-2] 学会発表

- 1) Y. Fujiki. Peroxisome homeostasis: Physiology, Biogenesis and disorders. 2nd International Symposium on Current Advances in Peroxisome Biology, Haus der bayerischen Landwirtschaft, Herrsching am Ammersee, Germany (September 17-19), September 17, 2019.
- 2) 山下 昂一郎、田村 茂彦、藤木 幸夫. ペルオキシソーム形成因子 Pex14p の細胞分裂期特異的なリン酸化による機能制御機構. 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会

合同年次大会(6月24日~26日), 神戸国際会議場, 6月25日, 2019年.

3) 藤木幸夫、奥本寛治、宮田暖、Emily Cheng. 過酸化水素分解酵素カタラーゼの細胞内局在制御による酸化ストレス応答の分子機構. 第14回日本臨床ストレス応答学会(11月2日~3日), 大阪市立大学, 11月3日, 2019年.

4) Kanji Okumoto, Hidetaka Kosako, and Yukio Fujiki.  $H_2O_2$ -induced phosphorylation of Pex14p suppresses peroxisomal import of catalase to counteract oxidative stress. 第42回日本分子生物学会年会(12月3日~6日), 福岡国際会議場, 12月4日, 2019年.

5) Koichiro Yamashita, Shigehiko Tamura, Yuichi Yagita, Hidetaka Kosako and Yukio Fujiki. Regulation of peroxisomal import by mitotic phosphorylation of Pex14p. 第42回日本分子生物学会年会(12月3日~6日), 福岡国際会議場, 12月4日, 2019年.

### [3-3] 成果資料等 なし

## 【4】今後の課題等

酸化ストレスに応答してPex14pをリン酸化するキナーゼ、およびその上流リン酸化シグナル経路はいまだ不明であり、これらを明らかにすることが今後の最大の課題である。具体的には、セリンリン酸化キナーゼの阻害剤等を用いた検討、近接依存性ビオチン標識法を用いたプロテオーム解析により、過酸化水素依存的にPex14pをリン酸化するキナーゼの同定を行う。さらに、カタラーゼを介した細胞の抗酸化ストレス応答を制御するシグナル経路、および細胞周期異存的なPex14pのリン酸化の生理的意義の解明を目指す。