

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っており、生体に必須なオルガネラである。活性酸素種の一つである過酸化水素を無毒化する古典的酵素カタラーゼは原核生物からヒトまで広く存在するが、哺乳類においてはおもにペルオキシソーム内部に局在する。その輸送は、Pex14pを中心とするペルオキシソーム膜上のタンパク質膜透過装置が担っている。

私達は動物培養細胞において、過酸化水素等による酸化ストレス刺激、および細胞周期の分裂期においてPex14pがリン酸化されること、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を見出していた。これらの結果は、細胞内外の環境変化に応答したリン酸化によるペルオキシソームタンパク質輸送の調節機構の存在を示唆するものと考えていた。

そこで、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のリン酸化部位の同定を試みた。質量分析計によるプロテオーム解析により、過酸化水素依存的にリン酸化誘導される内在性Pex14p中の3箇所（S232、S233、S234）のセリン残基、および細胞周期分裂期特異的にリン酸化される内在性Pex14pのセリン残基を1箇所同定した。これらのPex14pリン酸化部位の情報をもとに様々な生化学的、細胞生物学的解析を行い、酸化ストレスおよび細胞分裂期依存的なPex14pリン酸化によるカタラーゼの輸送抑制機構を明らかにした。Pex14pリン酸化は結果としてサイトゾル局在性のカタラーゼを増加さ

せることで細胞の酸化ストレス抵抗性を高めることが判明した。

[1-2]研究の方法・経過

2019年度共同利用から引き続き、A) 未処理および過酸化水素処理を施したラット肝臓由来Fao細胞の内在性Pex14p、およびB) 細胞分裂期および間期に同調させたHeLa細胞の内在性Pex14p、を免疫沈降により精製し、質量分析計によりリン酸化部位の同定・定量を行った。同定したセリン残基に変異を導入した非リン酸化変異体および恒常的リン酸化変異体を作製し、カタラーゼのペルオキシソームへの輸送や酸化ストレス抵抗性への影響を解析した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

質量分析計によるPex14pリン酸化部位の解析により、過酸化水素処理30分で高度にリン酸化誘導されるFao細胞の内在性Pex14pのセリン残基を3箇所同定した。また、細胞周期分裂期のHeLa細胞でリン酸化される内在性Pex14pのセリン残基を1箇所同定できた。

これらの知見から作製した非リン酸化型および恒常的リン酸化型Pex14p変異体を作製し、PEX14欠損性CHO変異細胞に各々発現させた安定発現株を分離した。形態学的および生化学的解析の結果、恒常的リン酸化型Pex14p安定発現株ではカタラーゼの輸送が選択的に抑制されており、とくに232番目のセリン残基（S232）のリン酸化が重要であることが判明した。

カタラーゼはPTS1レセプターであるPex5pに認識され結合し、Pex5pを介してPex14pと3者複合体を形成することが知られている。リコン

ビナントタンパク質を用いた*in vitro*結合実験により、Pex14pのリン酸化はPex5pとの結合には影響しないが、Pex14p-Pex5p-カタラーゼ複合体の形成を選択的に著減させる、すなわちPex5p-カタラーゼ間の結合を間接的に減弱させることが判明した。

さらに、恒常的リン酸化型Pex14p発現細胞は野生型細胞に比べて有意に高い酸化ストレス耐性を示した。種々の解析結果と併せて、Pex14pリン酸化の一過的な誘導が、1) カタラーゼのペルオキシソームへの輸送の選択的な抑制、2) サイトゾル局在性のカタラーゼ量の増加、を介して細胞の生存率を高めるという新たな酸化ストレス応答機構として機能することを見出した。以上の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を新たな発見として、2報の原著論文として公表した (Okumoto et al. *eLife* (2020)、Yamashita et al. *J. Cell Biol.* (2020))。

[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、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、質量分析により同定に成功した。この成果により、カタラーゼの細胞内局在を調節することで細胞が環境変化に応答するという、カタラーゼとペルオキシソームの新規機能が明らかとなった。これは、リン酸化修飾によるペルオキシソームへのタンパク質輸送の制御という世界初の知見となっただけでなく、細胞の新たな抗酸化ストレス応答機構の発見であり、細胞内タンパク質選別輸送の新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。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表 (*, Corresponding author)

- 1) 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.* 295:5321-5334 (2020)
- 2) Okumoto, K., El Shermely, M., Natsui, M., Kosako, H., Natsuyama, R., Marutani, T., and *Fujiki, Y.: The peroxisome counteracts oxidative stresses by suppressing catalase import via phosphorylation of Pex14 in the import machinery. *eLife* 9: e55896 (2020)

- 3) Yamashita, K., Tamura, S., Honsho, M., Yada, H., Yagita, Y., Kosako, H., and *Fujiki, Y.: Mitotic phosphorylation of Pex14p regulates peroxisomal import machinery. *J. Cell Biol.* 219: e202001003 (2020)

- 4) *Fujiki, Y. and Bassik, M.C. A new paradigm in catalase research (Forum). *Trends Cell Biol.* 31: 148-151 (2021)

[3-2]学会発表

- 1) 藤木幸夫, 奥本寛治, 山下昂一郎, 田村茂彦, 小迫英尊, Emily H. Cheng. ペルオキシソーム形成因子 Pex14 リン酸化による酸化ストレス応答および細胞周期特異的機能制御の分子機構. 第 72 回日本細胞生物学会大会. 2020 年 6 月 9 日 ~ 11 日 (オンライン)
- 2) 藤木幸夫 ペルオキシソームの恒常性維持とその破綻. 第 93 回日本生化学会大会. 2020 年 9 月 14 日 ~ 16 日 (オンライン)
- 3) Fujiki, Y. Peroxisome Biogenesis and Human Disorders. 2020 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology: October 5-7, 2020 (Jeju, Korea) (Online).
- 4) 藤木幸夫 ペルオキシソームの恒常性維持機構: 過酸化水素分解酵素カタラーゼの細胞内局在制御. 第 43 回日本分子生物学会年会. 2020 年 12 月 2 日 ~ 4 日 (オンライン)
- 5) 奥本寛治, 小迫英尊, 藤木幸夫. Pex14 のリン酸化を介したペルオキシソームへのカタラーゼ輸送の抑制と細胞の酸化ストレス耐性応答. 第 43 回日本分子生物学会年会. 2020 年 12 月 2 日 ~ 4 日 (オンライン)

[3-3]成果資料等

九州大学プレスリリース「世界初、細胞内外の環境変化・酸化ストレスへの生体防御応答システムはペルオキシソーム形成因子 Pex14 のリン酸化が担うことを発見」
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/493>

【4】今後の課題等

細胞周期依存的なPex14pリン酸化はCdk1キナーゼが担うことを明らかにしたが、酸化ストレス時にPex14pをリン酸化するキナーゼは不明である。現在、近接依存性ピオチン標識法と質量分析を利用した解析系を構築し、Pex14pキナーゼの同定へ向けて進めている。これらの解析から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などが解明されることが期待される。

