

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

生体に必須なオルガネラであるペルオキシソームは細胞内の多くの重要な代謝機能を担っている。カタラーゼは、細胞内で発生する活性酸素種の一つである過酸化水素を無毒化する酵素の一つである。カタラーゼは原核生物からヒトまで広く存在する古典的酵素であるが、哺乳類においてはおもに細胞内小器官ペルオキシソームの内部に局在する。カタラーゼは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を介して内腔へと輸送されるが、細胞の環境や状況に応じたその輸送の制御機構はほとんど不明であった。

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（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、および細胞周期分裂期特異的な内在性Pex14pのリン酸化部位をそれぞれ同定した。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った新たな酸化ストレス応答機構として機能することを明らかにした（Okumoto et al. *eLife* (2020)、Yamashita et al. *J. Cell Biol.* (2020) : 2019、2020年度共同研究成果）。

2021年度共同研究では、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の全体像を明らかにすることを目的として、小迫英尊教授の技術支援（プロテオーム解析）を受け、酸化ストレス依存的にPex14pをリン酸化するキナーゼ（Pex14pキナーゼと記載）の同定を目指した。そのために、高活性型改良ビオチンリガーゼTurboIDを用いた近接依存性ビオチン標識法をPex14pキナーゼの同定に適用した。TurboIDをPex14pのリン酸化部位の近傍であるC末端側に付加した融合タンパク質（Pex14p-TurboID）を作製し、過酸化水素処理依存的にPex14pと相互作用すると推測されるPex14pキナーゼをビオチン化標識タンパク質の網羅的プロテオーム解析から同定するものである。

[1-2]研究の方法・経過

ラット肝臓由来培養細胞であるFao細胞を用いてTurboID融合型Pex14pの安定発現株を樹立し材料とした。過酸化水素処理からPex14pのリン酸化がピークに達するまでの1時間に限定してビオチン標識を行う近接依存性標識実験系を構築した。さらに、未処理および過酸化水素処理時においてPex14p近傍に存在してビオチン標識されたタンパク質を、トリプシン消化後にTamavidin2-REVを用いて高効率に回収し、質量分析計により網羅的に同定した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

樹立したPex14p-TurboIDの安定発現Fao細胞株に過酸化水素を処理すると、Pex14p-TurboIDのリン酸化が内在性のPex14pと同様に誘導されることが観察された。さらに過酸化水素処理からPex14pのリン酸化が亢進する1時

間のみ限定したビオチン標識の条件最適化を行い、ビオチン標識タンパク質の精製・濃縮が可能であることを確認した。

このように構築した近接依存性標識法と質量分析によるビオチン化タンパク質の網羅的解析により、未処理および過酸化水素処理時合わせて 1800 種程度のビオチン化ペプチドを同定した。これらの中には、カタラーゼのペルオキシソーム輸送に参与する Pex5p や Pex13p などの既知の Pex14p 結合タンパク質も含まれていたことから、Pex14p 近傍タンパク質のビオチン標識・精製が想定通りに実施できたものと考えられた。複数のキナーゼもこれら Pex14p 結合因子候補群として同定されており、酸化ストレス依存的な Pex14p リン酸化誘導に参与するかを検討する予定である。

また、これまで Pex14p との関連が示されていない他オルガネラ局在性タンパク質なども多数同定されており、新たな Pex14p の相互作用因子である可能性が示された。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これまでの研究で、Pex14p のリン酸化を介してカタラーゼの細胞内局在を制御することが、細胞の新たな抗酸化ストレス応答機構として機能することを明らかにした。本共同研究では Pex14p キナーゼの同定を目指し、過酸化水素の感知から Pex14p のリン酸化に至るシグナル伝達経路を明らかにすることを目的としている。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明らかになることが期待され、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

1. Kim Y.J., Abe, Y., Kim, Y.J., *Fujiki, Y., and *Kim, J.W.: Identification of a homozygous *PEX26* mutation in a Heimler syndrome patient. *Genes* 12: 646 (2021).
2. Yagita, Y., Abe, Y., and *Fujiki, Y.: *De novo* formation and maintenance of mammalian peroxisomes in the absence of PEX16. *J. Cell Sci.*, in revision (2022)
3. Abe, Y., Wanders, R.J.A., Waterham, Mandel, H, Falik-Zaccari, T.C., Ishihara, N., and *Fujiki, Y.: Genetic defects in peroxisome morphogenesis exert major effects on phospholipid metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.*, in revision (2022)

[3-2] 学会発表

1. 藤木幸夫. ペルオキシソームによる酸化ストレス下の細胞応答戦略. 第 94 回日本生化学会大会. 2021 年 11 月 3 日～5 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機構: 膜タンパク質の局在化と品質管理機構. 第 44 回日本分子生物学会年会. 2021 年 12 月 1 日～3 日 (オンサイト & オンライン)
3. 藤木幸夫. 細胞小器官ペルオキシソームの形成機構と欠損症研究: オルガネラ病概念の確立. 第 44 回日本分子生物学会年会. 2021 年 12 月 1 日～3 日 (オンサイト & オンライン)
4. 奥本寛治, 藤木幸夫. Pex14 リン酸化を介したカタラーゼの細胞内局在制御による新規酸化ストレス応答機構. 第 44 回日本分子生物学会年会. 2021 年 12 月 1 日～3 日 (オンサイト & オンライン)

[3-3] 成果資料等

なし

【4】 今後の課題等

Pex14p-TurboID に近接した多数のビオチン化タンパク質が同定できているものの、未処理および過酸化水素処理の比較で同定数に明確な差があるタンパク質が想定より少ないことが課題である。よりタンパク質同定率を高めるために、細胞株をヒト由来のものに替えること、さらなるリン酸化誘導とビオチン標識の条件最適化などで改善する。一方で、膜タンパク質である Pex14p に融合した TurboID はペルオキシソーム膜上で細胞質側に面しており、様々なペルオキシソーム膜タンパク質の細胞質に露出した部分を特異的にビオチン標識可能であることが分かった。Pex14p そのものを含めてペルオキシソーム膜タンパク質の配向性は不明な点が多く、本共同研究の成果をペルオキシソーム膜タンパク質の配向性の網羅的解析に発展できると考えている。