

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

真核生物に広く存在するペルオキシソームは生体に必須なオルガネラである。ペルオキシソームが有する多様な機能は、代謝酵素を含む種々のタンパク質がペルオキシソームに正確に輸送、局在化することで担保されている。ペルオキシソーム局在性の可溶性タンパク質（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）を介して輸送される。遊離型リボソームで翻訳された PTS1 を持つタンパク質（PTS1 タンパク質）は、サイトゾルで PTS1 レセプターである Pex5 と結合し、ペルオキシソーム膜タンパク質 Pex14 を中心とする膜透過複合体によってペルオキシソーム内へ移行する。

これまでの研究によりペルオキシソームタンパク質輸送の大枠は明らかとなってきたが、PTS1 タンパク質の輸送におけるペルオキシソーム膜の透過過程の実態は未だ未解明である。ペルオキシソームへのタンパク質輸送では、基質である PTS1 タンパク質がフォールディングおよび高次構造を維持し、多量体を形成した状態で膜透過可能である。この点で、膜透過に基質タンパク質のアンフォールディングが不可欠な小胞体やミトコンドリアへのタンパク質輸送とは明らかに異なる。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、膜透過中間体の解析の困難さもあるところから、膜透過機構の実態解明が遅れている。

そこで 2021、2022 年度共同利用に引き続き、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を導入し、ペルオキシソームタンパク質の膜透過過程を明らかにすることを目的とした。TurboID の C 末端に PTS1 シグナルを付加した TurboID-PTS1 を作製し、PTS1 タンパク質が膜透過中に近接してビオチン標識するタンパク質をペプチドレベルで同定し、膜透過過程を解析する。

[1-2]研究の方法・経過

ペルオキシソーム内腔に局在性を有する TurboID-PTS1 に加えて、膜透過装置の中心因子 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、およびコントロールとしての TurboID-NES（サイトゾル局在）を作製する。ヒト骨髄腫由来 U2OS 細胞を用いてそれぞれを安定発現する株を分離し、本解析に適した株を選別する。これらの安定発現株に対して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。さらにビオチン化修飾部位の決定により、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

当初作製した TurboID-PTS1 はペルオキシソームへの局在化が観察できなかった。TurboID のビオチン化活性が 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可能性を考え、PTS1 配列の長さや配列の条件検討を行った。その結果、ペルオキシソームに効率よく輸送される TurboID-PTS1 が得られ、安定発現株の樹立にも成功した。

2022 年度共同利用において Pex14-TurboID を使ったビオチン標識ペプチドの同定系を確立していた。さらにビオチン化標識ペプチドの同定効率を高めるため、U2OS 細胞を用いて Pex14-TurboID 安定発現株の樹立を試みた。しかし、Pex14-TurboID の発現が確認された安定発現株候補のほとんどにおいて、高発現した Pex14-TurboID の大部分あるいは一部がミトコンドリアに誤局在しており、さらに PTS1 タンパク質のペルオキシソーム輸送が阻害されていた。多数の候補株のスクリーニングにより、低発現の Pex14-TurboID がペルオキシソームに局在し、かつ PTS1 タンパク質が野生型同様にペルオキシソームへ輸送された安定発現株の樹立に成功した。サイトゾル局在性の TurboID-NES の安定発現株も樹立しており、現在質量分析計を用いたプロテオーム解析を実施している。ビオチン標識タンパク質の濃縮とウェスタンブロットによる予備実験では、既知の PTS1 タンパク質および Pex14 結合タンパク質が選択的に検出できており、PTS1 タンパク質の膜透過過程を詳細に解析することが可能となったと判断している。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

ごく最近、PTS1 タンパク質のペルオキシソーム膜透過に、タンパク質の相分離性が関与するという新たなモデルが提唱された (Gao et al. *Science* 2022, Ravindran et al. *Nature* 2023)。本共同研究では、TurboID を用いた近接依存性標識法により、PTS1 タンパク質の近傍タンパク質を標識することで膜透過中間複合体を含めた輸送過程を明らかにすべく新しい解析系を構築している。相分離のような動的な現象や、膜透過過程における一過的な相互作用の検出に対して、TurboID によるビオチン化標識は他の解析系より有利であり、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脂質二重膜の膜透過を可能とするペルオキシソームタンパク質輸送の分子機構の解明は、親水性タンパク質の細胞内選別輸送システムの理解に極めて重要な新たな知見をもたらす。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

Honsho, M. and Fujiki, Y.: Plasmalogen homeostasis and its role in brain of mammals. *Brain Res. Bull.* 194: 118-123 (2023).

[3-2] 学会発表

1. 奥本寛治、藤木幸夫. ペルオキシソームを介した細胞の酸化ストレス応答機構. 第 96 回日本生化学会大会. 2023 年 10 月 31 日～11 月 2 日 福岡国際会議場

2. 安光起彦、田村茂彦、藤木幸夫. ペルオキシソーム形成因子 Pex14 の膜配向性変化が担う膜透過輸送メカニズム解析. 第 95 回日本生化学会大会. 2023 年 10 月 31 日～11 月 2 日 福岡国際会議場

[3-3] 成果資料等 なし

【4】今後の課題等

サイトゾル局在性の TurboID-NES との差分をとることで、基質タンパク質 (PTS1) および膜透過装置 (Pex14) により特異的なビオチン化ペプチドの同定が可能である。ビオチン化部位の比較により PTS1 タンパク質の膜透過経路を推定し、それに基づく変異導入実験などにより検証する。また、ペルオキシソーム膜の低分子物質に対する透過性が高いという性質がゆえに、その配向性は不明なものが多い。ペルオキシソーム膜タンパク質の配向性自身も不明な点が多い。TurboID がペルオキシソーム膜のサイトゾル側に位置する Pex14-TurboID、ペルオキシソーム内腔に局在化する TurboID-PTS1、およびサイトゾル局在性の TurboID-NES の近接タンパク質のビオチン標識部位を比較し、とくにペルオキシソームタンパク質膜透過装置を構築する膜タンパク質の配向性の理解に光を投げると考えられる。