

ペルオキシソームの形成と機能発現制御を司るPEX遺伝子システムの解明

●藤木 幸夫 ◆田村 茂彦 ◆原野 友之

九州大学大学院理学研究院

〈研究の目的と進め方〉

ペルオキシソーム形成機構の全体像を明らかにするためには、必須な全てのペルオキシソーム形成因子(peroxin)の同定だけでなく、個々の因子の機能と発現制御を時間的・空間的に分子レベルで明らかにすることが必要不可欠である。本領域研究では、以下の研究項目を設定した。

- 1) ペルオキシソーム形成機構の解明：我々が同定した哺乳動物細胞系に存在する16相補性群の相補遺伝子PEXのすべてを明らかにする。
- 2) ヒト先天性ペルオキシソーム欠損症の病因解明：上記の成果に基づき、遺伝性難病であるZellweger症候群に代表されるペルオキシソーム欠損症のうち未解明の2つの相補性群の病因遺伝子を解明し、その病態を明らかにする。
- 3) peroxinのオルガネラ形成過程における生化学的機能を解析する。
- 4) さらに新規なCHO変異細胞の分離を試みる。
- 5) PEX遺伝子およびペルオキシソーム酵素遺伝子を遺伝子ネットワークとして捉えた新しい切り口かつ包括的な解明を試みる。

〈研究開始時の研究計画〉

以下の項目を研究計画とした。

- 1) 新規CHO変異細胞の分離：現在までに得られている13種のペルオキシソーム欠損性変異株に加えて、さらに多くの異なる相補性群の変異細胞を分離する。
- 2) PEX遺伝子の単離：既存および新しく分離された変異細胞に対し、ペルオキシソーム形成を相補するペルオキシソーム形成因子(PEX) cDNAをクローン化するとともに、形成因子の性状や細胞内局在性など細胞生化学的諸性質を明らかにする。
- 3) 病因遺伝子の解明：上述の成果あるいは酵母系相補遺伝子のヒトホモログをEST法を用いてクローニングし、ペルオキシソーム欠損症のうち未解決の病因遺伝子を明らかにする。
- 4) ラット肝臓などにおけるペルオキシソームの誘導と増殖過程における遺伝子の発現プロファイルを検討する。

〈研究期間の成果〉

2000年度

- 1) 私たち独自に分離したCHO変異細胞 ZPG208 に対しラットcDNA libraryを用いた機能相補活性スクリーニング法によりペルオキシソームの形成異常を相補するPEX3遺伝子のクローニングに成功、さらにはこれがペルオキシソーム欠損症相補性群G群の病因遺伝子であることも患者由来細胞遺伝子解析により明らかにした(論文リスト No. 3,6,7)。PEX3 遺伝子変異細胞ではペルオキシソームの膜形成にも異常を有することから、ZPG208細胞は膜形成の分子機構を解明するうえでも非常に有用である(No. 5,13)。
- 2) 私たちは、ペルオキシソーム局在化シグナル

1(PTS1)レセプターであるPex5pには哺乳動物系ではアイソフォーム、Pex5pSおよびPex5pL(S型内部に37アミノ酸配列の挿入が認められる)が存在することを先に見出している。両者の機能に関し、新たに分離した特異的表現型(PTS2タンパク質の輸送のみに異常を示すが変異遺伝子はPTS1レセプターをコードするPEX5であった)を示すCHO変異細胞ZPG231の分子細胞生物学解析から、PTS1タンパク質輸送に関わる一方、Pex5pLはPTS2タンパク質の輸送をPTS2レセプターPex7pと結合することにより担っていることを見出した(No. 1,2,8)。また、これらのカーゴ・レセプター複合体はHsp70, ATP依存的に形成、輸送されPex14p, Pex13pを主体とした膜透過装置を経てペルオキシソーム内へ局在化されることも見出した(No. 1,11)。今後これら諸因子を用いることにより膜透過過程の詳細な解析が可能になると考えられる。

- 3) ペルオキシソーム膜透過装置の構成因子の一つと考えられるPex12pについて、まずPEX12異常CHO変異細胞ZP104およびZP109の変異部位を決定、ついでPex12pの構造と機能に関し検討した結果、C-末端部に存在する亜鉛フィンガーRINGはPex12pの機能に必須であることを明らかにした(No. 4)。またPex12pは他のペルオキシソームPex5p, Pex10pなどと相互作用することも見出した(No. 4)。今後、カーゴタンパク質のオルガネラマトリックス側での解離機構や両レセプターの細胞質へのシャトル機構などの解明が待たれる。

- 4) ペルオキシソーム膜タンパク質のトポロジー形成機構を明らかにするため、PMP34をモデルタンパク質としてその膜局在化領域を見出した(No. 9)。

2001年度

- 1) PTS2-あるいはPex3p(1-40)-付加型緑色蛍光タンパク質(EGFP)のCHO-K1の安定発現株(TKaEG2)を用いたP9OH/UV法によるペルオキシソーム生合成異常変異細胞の分離を試みた結果、以前に分離していた唯一のpex7変異細胞株ZPG207に加えてZPEG227およびZPEG231、および新規表現型pex2変異細胞株の分離に成功した(No. 17,18)。

- 2) 私たちは、PTS1レセプターであるPex5pには哺乳動物系ではPex5pSおよびPex5pL(S型内部215-216の間に37アミノ酸の挿入配列)が存在すること、Pex5pLはPTS2タンパク質の輸送をPTS2レセプターPex7pと結合することにより担っていることを見出している(No. 1,2)。2001年度はこれらのカーゴ・レセプター複合体のPex14p, Pex13pを主体とした膜透過装置を介したペルオキシソーム内への輸送過程を解析した。Pex5pLのPex14pおよびPex13pとの結合にはN末端側(1-243)に存在する7個のWxxxY motifsが必須であること、Pex7pとはPex5pL特異的挿入配列のN末端側約半分とさらに上流側27アミノ酸領域で結合することを明らかにした(No. 14)。さらにPex5p-PTS1カーゴ複合体はPex14pとPex13pとの4者複合体を形成すること、Pex14p-Pex5p-PTS1およびPex13p-Pex5pは形成されるが、Pex13p-Pex5p-PTS1は存在しないことから、PTS1カーゴはPex14pを通過したのちPex13p

に至る前で解離するものと結論した (No. 14)。

3) 長年不明であった相補性群 6 群の Zellweger 症候群患者由来線維芽細胞の相補性群を再検証した結果、相補性群 C 群 (PEX6, 欧米 4 群) と同一相補性群であること、PEX6 の発現によりペルオキシソームの形成不全が相補されかつ PEX6 変異を見出した (No. 10)。この結果、ペルオキシソーム形成異常症は現在のところ 12 種の相補性群に分類されることになる。また、数人の相補性群 E 群 (欧米 1 群) 患者の PEX1 変異部位解析の結果、遺伝子型-表現型の関係は、Pex1p-Pex6p の相互作用度によって説明されることを見出した (No. 12)。相補性群 D 群 (欧米 9 群) であるペルオキシソーム膜形成異常性 PEX16 障害の患者解析の結果、新規変異部位を同定した (No. 16)。

4) PTS2 レセプター Pex7p の機能、機能不全、細胞内局在について、独自に分離した pex7 CHO 変異細胞 ZPG207 および PEX7 障害性斑状軟骨形成不全症 II 型 (RCDP) 患者由来線維芽細胞を用いて検討した。PTS2 および Pex5pL との結合にはほぼ全長が必要であること、RCDP において現在までに報告されている 3 種の変異 (L292ter, G217R, A218V) および ZPG207 由来 Pex7p-W221ter はいずれも PTS2 および Pex5pL との結合活性を有しないことを見出した (No. 15)。さらに Pex7p は細胞質に大半は存在するが、一部は Pex5pL 依存的にペルオキシソームマトリックス内に局在化することから、Pex5p と同様に shuttling receptor として機能しているものと結論した。ラットへのペルオキシソーム増殖剤 (peroxisome proliferator) の投与では PTS1- および PTS2-タンパク質は顕著に誘導されペルオキシソーム数も増加する。PEX7 の転写レベルは同時に著しく上昇するのに対し、PEX5 mRNA 量にはほとんど変化が認められなかった (No. 15)。

5) ペルオキシシン Pex16p のペルオキシソーム膜局在化シグナル領域を明らかにした (No. 19)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ペルオキシソームの形成機構の解明を目的として、世界の多くの研究室で精力的な研究が展開されている。そのなかで本研究の成果とくにマトリックスタンパク質輸送機構に関し、Pex5p の分子解剖による知見、Pex7p の機能、機能不全、細胞内局在などは最新の重要な貢献として評価された。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

PEX 遺伝子の単離：既存の 3 種の CHO 変異細胞に対する相補遺伝子のクローニング、およびそのうちの 1 つ相補性群 A 群 (欧米 8 群) の病因遺伝子の解明については、未解決の課題として残された。

〈今後の課題〉

ペルオキシソームの生合成やその障害、機能発現制御解明へ向けたすべてのペルオキシシンの同定とその機能の解明、ヒトペルオキシソーム欠損症の全病因遺伝子の解明、さらには PEX 遺伝子およびペルオキシソーム酵素遺伝子を遺伝子ネットワークとして捉えた発現とその制御機構の包括的な解明が待ち望まれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

原著論文

1. Otera, H., Harano, H., Honsho, M., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N., and Fujiki, Y.: Pex5pL, the longer isoform of mobile PTS1-receptor, functions in a novel and pivotal, Pex7p-mediated PTS2 import pathway via its initial docking

site Pex14p. *J. Biol. Chem.* 275, 21703-21714 (2000).

2. Matsumura, T., Otera, H., and Fujiki, Y.: Disruption of interaction of the longer isoform of Pex5p, Pex5pL, with Pex7p abolishes the PTS2 protein import in mammals. Study with a novel PEX5-impaired Chinese hamster ovary cell mutant. *J. Biol. Chem.* 275, 21715-21721 (2000).

3. Ghaedi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Matsuzono, Y., and Fujiki, Y.: The peroxin Pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 11, 2085-2102 (2000).

4. Okumoto, K., Abe, I., and Fujiki, Y.: Molecular anatomy of the Peroxin Pex12p: RING finger domain is essential for the Pex12p function and interacts with the peroxisome targeting signal type1-receptor Pex5p and a RING peroxin, Pex10p. *J. Biol. Chem.* 275, 25700-25710 (2000).

5. Fujiki, Y.: Review: Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *FEBS Lett.* 476, 42-46 (2000).

6. Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Imamura, A., Ghaedi, K., Fujiki, Y., and Kondo, N.: Identification of PEX3 as the gene mutated in a Zellweger syndrome patient lacking peroxisomal remnant structures. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1995-1999 (2000).

7. Ghaedi, K., Honsho, M., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y.: PEX3 is the causal gene responsible for peroxisome membrane assembly-defective Zellweger syndrome of complementation group G. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 976-981 (2000).

8. Otera, H., Nishimura, M., Setoguchi, K., Mori, T., and Fujiki, Y.: Biogenesis of nonspecific lipid transfer protein and sterol carrier protein x: STUDIES USING PEROXISOME ASSEMBLY-DEFECTIVE pex CELL MUTANTS. *J. Biol. Chem.* 276, 2858-2864 (2001).

9. Honsho, M., and Fujiki, Y.: Topogenesis of peroxisomal membrane protein requires a short, positively charged intervening-loop sequence and flanking hydrophobic segments: STUDY USING HUMAN MEMBRANE PROTEIN PMP34. *J. Biol. Chem.* 276, 9375-9382 (2001).

10. Matsumoto, N., Tamura, S., Moser, A., Moser, H.W., Braverman, N., Suzuki, Y., Shimozawa, N., Kondo, N., and Fujiki, Y.: The peroxin Pex6p gene is impaired in peroxisome biogenesis disorders of complementation group 6. *J. Hum. Genet.* 46, 273-277 (2001).

11. Harano, T., Nose, S., Uezu, R., Shimizu, N., and Fujiki, Y.: Hsp70 regulates interaction of the peroxisome targeting signal type 1 (PTS1)-receptor Pex5p and PTS1. *Biochem. J.* 357, 157-165 (2001).

12. Tamura, S., Matsumoto, N., Imamura, A., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y.: Phenotype-genotype relationships in peroxisome biogenesis disorders of PEX1-defective complementation group 1 are defined by Pex1p-Pex6p interaction. *Biochem. J.* 357, 417-426 (2001).

13. Suzuki, Y., Shimozawa, N., Orii, T., Tsukamoto, T., Osumi, T., Fujiki, Y., and Kondo, N.: Genetic and molecular bases of peroxisome biogenesis disorders. *Genet. Med.* 3, 372-376 (2001).

14. Otera, H., Setoguchi, K., Hamasaki, M., Kumashiro, T., Shimizu, N., and Fujiki, Y.: Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WxxxY motifs are critical for

matrix protein import. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1639-1655 (2002).

15. Mukai, S., Ghaedi, K., and Fujiki, Y.: Intracellular localization, function, and dysfunction of the peroxisome-targeting signal type 2 receptor, Pex7p, in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 277, 9548-9561 (2002).

16. Shimozawa, N., Nagase, T., Takemoto, Y., Suzuki, Y., Fujiki, Y., Wanders, R.J., and Kondo, N.: A novel splicing mutation of the PEX16 gene in two patients with Zellweger syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 109-112 (2002).

17. Yanago, E., Hiromasa, T., Matsumura, T., Kinoshita, N., and Fujiki, Y.: Isolation of Chinese hamster ovary cell pex mutants: one with a novel PEX7 mutation site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 225-230 (2002).

18. Akiyama, N., Ghaedi, K., and Fujiki, Y.: A novel pex2 mutant: catalase-deficient but temperature-sensitive PTS1 and PTS2 import. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1523-1529 (2002).

19. Honscho, M., Hiroshige, T., and Fujiki, Y.: The membrane biogenesis peroxin Pex16p: topogenesis and functional roles in peroxisomal membrane assembly. *J. Biol. Chem.* 277, 44513-44524 (2002).