

Molecular insights into peroxisomal matrix protein import and peroxisome-deficient diseases: a system to quantify the import of peroxisomal matrix proteins by fluorescence intensity and identification of defects in alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase in two patients with rhizomelic chondrodysplasia punctata

野口, 雅史

<https://hdl.handle.net/2324/1398276>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（4）

氏 名：野口 雅史

論文題目：Molecular insights into peroxisomal matrix protein import and peroxisome-deficient diseases: a system to quantify the import of peroxisomal matrix proteins by fluorescence intensity and identification of defects in alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase in two patients with rhizomelic chondrodysplasia punctata

(ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送とペルオキシソーム欠損症の分子生物学的研究：蛍光強度測定によるペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送効率測定法の確立と斑状軟骨形成不全症患者の変異解析)

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞の内膜構造である細胞内小器官は、特定のタンパク質が局在することで各々が特有の機能を発揮する。ペルオキシソームは真核細胞に広く分布する直径約 $1\mu\text{m}$ の楕円状の細胞内小器官であり、極長鎖脂肪酸の β 酸化や種々の物質の酸化など多くの代謝経路に関わる。ペルオキシソーム局在性のタンパク質はサイトゾル中の遊離リボソームで翻訳された後、特異的レセプターとの結合を介してペルオキシソームへ輸送される。このペルオキシソームのタンパク質輸送様式はミトコンドリアや葉緑体と同じ翻訳後輸送に分類されるが、移行シグナルや輸送に関与する分子群は全く異なる。

これまでにペルオキシソーム形成に必須なタンパク質群ペルオキシシンが同定され、うち9種が協調しマトリクスタンパク質輸送機構として機能すると報告されている。ヒトにおいてペルオキシシンの欠損はペルオキシソーム局在型酵素の輸送不全とその酵素群が担う代謝生理機能の障害をもたらす。これに伴い出生時からの筋緊張低下、精神運動発達遅滞、肝腫大等の症状を呈する先天性代謝異常症 Zellweger 症候群等の致死性の疾患を引き起こす。従って、ペルオキシソームへのタンパク質輸送機構の解明は、医学領域への貢献につながる重要な課題である。

ペルオキシシン群によるペルオキシソームマトリクスタンパク質の質的、量的な輸送制御がペルオキシソームの生理的機能を調節すると推測されるが、輸送機構制御の分子基盤は不明のままである。これは、輸送機構制御のアウトプットであるマトリクスタンパク質の輸送効率について、定量的に測定するための方法が乏しいことが原因であった。そこで、従来のラジオアイソトープによるパルスチェイス法や蛍光抗体染色法に替わる新しいペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送効率測定法を考案、実用化した。

プロテアソーム分解の標的プローブ(destruction domain ;DD)および合成リガンド Shield1 を利用して、DD 融合タンパク質を可逆的に分解制御するシステムが他のグループにより報告された。Shield1 非存在下では、生細胞に発現させた DD 融合タンパク質はサイトゾル中のプロテアソームによって分解される。一方、Shield1 存在下では、DD が Shield1 と直接結合し構造変化することで、DD 融合タンパク質がプロテアソームによる分解から免れ、安定的に発現する。さらに Shield1 を除去すると Shield1 が可逆的に DD から解離し、融合タンパク質はプロテアソームによって速やかに分解される。

DD-Shield1 システムの可逆性および、ペルオキシソームマトリクスタンパク質が翻訳後、サイ

トゾルを経由してからペルオキシソームへ輸送されることを考慮して新たな輸送効率測定法を構築した。DD にペルオキシソーム輸送シグナル 1 型(PTS1; peroxisome targeting signal 1)を付加した蛍光タンパク質(EGFP)を融合し、ペルオキシソーム局在性レポーターDD-EGFP-PTS1 を作成した。輸送効率測定法は以下の 3 段階の手順からなる。

step1(Shield1 非添加);細胞に発現させたレポーターは、Shield1 非存在下では、サイトゾルで合成され、ペルオキシソームに到達するまでの間にプロテアソームによって分解される。

step2(Shield1 添加);Shield1 存在下ではレポーターはプロテアソーム分解を免れ、ペルオキシソームへと輸送される。

step3(Shield1 除去);次に Shield1 を除去すると、ペルオキシソームに輸送されずサイトゾルに残存したレポーターは、Shield1 の解離により DD が再度構造変化しプロテアソームに分解される。一方、既にペルオキシソームマトリクスへと局在化したレポーターは、ペルオキシソーム膜によりプロテアソームから隔離されるため分解されない。

従って、最終的な Shield1 除去処理後の細胞全体の蛍光強度をフローサイトメーター等で測定することで、ペルオキシソームのみに蓄積したレポーター量が測定できる。つまり、Shield1 添加時間あたりの細胞の蛍光強度増加量=ペルオキシソームへとレポーターが輸送される効率となる。

実際にレポーターの安定発現株を樹立し、24 時間の Shield1 添加及び 6 時間の除去処理を行ったところ、ペルオキシソーム局在型 DD-EGFP-PTS1 発現細胞の蛍光強度は高く、サイトゾル局在型 DD-EGFP 発現細胞では蛍光がほとんど観察できないという結果が得られ、本システムが機能することが示された。またレポーターの輸送シグナル部に変異を導入し、PTS1 付加タンパク質のサイトゾル受容体である Pex5p との相互作用を弱めた変異型レポーター発現細胞の蛍光強度を測定すると、Pex5p とレポーターの結合強度の低下に伴って蛍光強度が減少した。またウエスタンブロッティングによる検証でも同様の結果が得られたことから、本測定系によりマトリクスタンパク質輸送を定量的に測定できることが示された。

ペルオキシソームの一種である Pex2p の RING finger ドメイン に点突然変異が導入された変異細胞(ZPDD9)と *PEX2* の mRNA が完全に発現していない変異細胞(ZPDD8)について本測定系を用いて解析を行った。ZPDD9 は ZPDD8 と野生型の中間の蛍光強度値を示し、中程度にペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送が欠損していると示唆された。過去に、変異細胞における軽度の輸送低下を定量的に捉えた例はなく本測定法の有用性が示された。また、Pex2p RING finger ドメインの変異については、Zellweger 症候群の患者でも報告されており、本研究の結果と併せて同ドメインの重要性が示唆された。本測定法は、蛍光強度を指標として従来法よりも高い感度で生細胞におけるマトリクスタンパク質輸送を測定できる。そのため、セルソーターを用いて従来法では取得できない輸送制御機構の欠損細胞分離や輸送効率を変動させる薬剤の大規模スクリーニングに利用でき、輸送制御機構の解明に貢献すると期待される。

ペルオキシソーム関連疾患については、ペルオキシソーム欠損の他にペルオキシソームの担う代謝経路の一部が欠損する単一酵素欠損症が報告されている。その一種である肢根型点状軟骨異形成症 III 型患者 2 名の変異解析について記載する。肢根型点状軟骨異形成症 III 型患者 2 名は、ペルオキシソームに局在するエーテル型リン脂質合成酵素 alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase (ADAPS)の欠損によって生じる致死性の常染色体性劣性疾患である。特徴は四肢短縮、重度の軟骨異形成、精神遅滞である。1 患者については *ADAPS* mRNA が完全に欠損しており、他者では *ADAPS*(I511M)のミスセンス変異が同定された。I511 位は *ADAPS* の基質である長鎖アルコールの通過トンネル上の α -helix に位置する。この変異によって、同患者由来線維芽細胞のエーテル型リン脂質であるプラズマローゲン合成が中程度に低下することが判明した。