

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）

論文審査の結果の要旨

ペルオキシソームはほぼ全ての真核生物に存在する細胞小器官であり、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種が協調シマトリクスタンパク質輸送因子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に障害が生じると、ペルオキシソームへの酵素の輸送が滞り、ペルオキシソーム内での酵素を介した脂質代謝等に破綻を生じる。これらの障害により、出生時からの筋緊張低下、顔貌異常、精神運動発達遅滞、肝腫大を呈する先天性代謝異常疾患Zellweger症候群等の重篤な疾患が引き起こされる。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も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、本研究の第1章では、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、確立した。すなわち、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によるDD融合タンパク質の可逆的分解制御システムを利用し、マトリクスタンパク質のペルオキシソームへの新たな輸送効率測定法を開発した。具体的には、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)を融合した、ペルオキシソーム局在性レポーターDD-EGFP-PTS1を構築した。

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、すで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、Shield1除去処理後の細胞全体の最終的な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を測れることになる。すなわち、Shield1添加時間あたりの細胞蛍光強度増加量=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。本測定系の応用法の一例として、ペルオキシソーム欠損性CHO細胞の評価を行った。2つの*pex2*変異細胞、ペルオキシシンの一種である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)を新たに分離し、解析を行った結果、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に障害を有しているものと示唆された。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、本測定法の有用性を示した。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

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の測定を可能にした。その結果、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への応用、また個体の発生段階の細胞別のペルオキシソーム輸送制御の検出が可能と考えられ、今後、同分野の研究発展に大きく貢献するものと期待される。

ペルオキシソームマトリクスタンパク質輸送経路はPTS1経路とPTS2経路に大別される。ペルオキシソーム関連疾患について、PTS1経路の欠損はZellweger症候群を引き起こすが、PTS2経路の欠損は斑状軟骨不全症(RCDP)を引き起こす。第2章では、四肢短縮、重度の軟骨異形性等の臨床的特徴からRCDPと診断された患者2名の変異解析を行った。同患者2名(患者1、患者2)はいずれも、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)に変異を有するRCDP type 3であることが判明した。患者1ではADAPS(I511M)のミスセンス変異が同定され、患者2についてはADAPS mRNAが完全に欠損していることを明らかにした。つぎに、すでに報告のあるテンジクネズミADAPSのX線結晶構造からヒトADAPSの立体構造をコンピューターシミュレーションにより予測した。その結果、I511位はADAPS V型トンネル内表面の α -helixに位置し、基質である長鎖アルコールの近傍に位置することが判明した。I511M変異によって、側鎖と基質との距離が離れることからトンネルと基質との親和性の低下が予想された。また、同患者由来線維芽細胞において同代謝経路の最終産物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。また、LC-MS/MS解析によりC16:0, 18:0, 18:1それぞれのアルケニル鎖をもつ、いずれのプラズマローゲン種においても合成量が一律に低下しており、I511M変異によるトンネル構造の変化がそれぞれの基質に特異的な不適合性を生み出すわけではないものと推察した。

以上の研究はともに、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解明に貢献する重要な知見であると考えられ、生命科学、分子細胞生物学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士(理学)の学位を受ける資格があるものと認められる。