

分子細胞遺伝学的手法によるペルオキシソーム形成過程の解析

Molecular and genetic approach to mechanisms of peroxisome biogenesis

代表研究者 兵庫県立姫路工業大学・理学部・生命科学科・助手 塚本利朗

Research Assistant, Himeji Institute of Technology,

Toshiro TSUKAMOTO

Peroxisome is a ubiquitous organelle present in a wide variety of eukaryotic cells from yeast to humans. This organelle contains at least one H_2O_2 -producing oxidase and catalase, an H_2O_2 -degrading enzyme. For the study of mechanism of peroxisome biogenesis, we attempted to isolate CHO cell mutants deficient in peroxisome biogenesis. Using these new mutants, we have cloned a new gene, PEX12, essential for peroxisome biogenesis. We also found that mild type peroxisome-deficient diseases are caused by temperature-sensitive mutation.

研究目的

ペルオキシソームは真核細胞生物に広く存在する細胞小器官であり、脂肪酸の β 酸化系をはじめ種々の機能を有している。また、先天性の遺伝病であるペルオキシソーム欠損症が知られており、臨床的に最重症型のZellweger症候群(ZS)、比較的軽症型の新生児型副腎白質ジストロフィー(NALD)、軽症型の乳児型Refsum病(IRD)などに区別される。その一次的な病因はペルオキシソーム形成過程の障害によると考えられているもののその詳細については不明な点が多い。ペルオキシソーム形成は多くのタンパク質因子を必要とする複雑な過程であり、実際ペルオキシソーム欠損症において多くの相補性群が知られている。我々はこれまでCHO細胞より3つの異なった相補性群に属するペルオキシソーム欠損変異細胞を単離、解析してきた。このうちの1つZ65細胞については、cDNA発現ライブラリーを導入し、変異を相補する活性を指標としたスクリーニングにより、ペルオキシソーム形成因子-1(PAF-1、現在は

PEX2と名称変更) cDNAのクローニングを行ってきた。さらにこの遺伝子の突然変異が病因であった症例も報告してきた。また最近、スクリーニング系の改善を行うことにより、別の変異細胞ZP92を相補する新たな遺伝子PAF-2(PEX6)の単離にも成功した。

本研究では、CHO細胞より単離したペルオキシソーム欠損変異細胞をもちいたペルオキシソーム形成因子cDNAの機能相補クローニング、酵母でペルオキシソーム形成に関与するPEX遺伝子群とのホモロジーを利用したヒトの相同遺伝子の同定、既知のペルオキシソーム形成因子群と相互作用する未知の因子の酵母のTwo-hybrid系による同定を行うことにより、先天性ペルオキシソーム欠損症の病因を明らかにする。さらに、形成因子間の相互作用の有無の検討し、個々の形成因子のペルオキシソーム形成における役割を明らかにすることを目的とした。また、臨床症状の重篤度に差が生じる原因についても検討を行った。

研究経過

①新たなペルオキシソーム欠損変異細胞の分離と新規ヒトPEX遺伝子の単離

新しいPEX遺伝子を単離するために必要となる異なった相補性群に属する変異細胞を分離のために、すでに我々がクロニングしたラットPEX2 cDNAを導入しコピー数を増加させた細胞株(CHO TKa)をまず単離した。この細胞をペルオキシソーム欠損変異細胞分離のための親株とし、新たな変異細胞の単離を行った。

②既知のペルオキシソーム形成因子群と相互作用する未知の因子の酵母のTwo-hybrid系による同定

現在までに、我々が単離したラットPEX2、ラットPEX6に加え、他のグループが報告したヒトPEX5、マウスPEX7、ラットPEX13、ヒトPEX14と相互作用する未知の遺伝子をクロニングするために、これらをpGBT9ベクターにサブクロニングし、pGAD424ベクターにて作成したラット肝臓cDNAライブラリーを酵母Hf7c株を使ったTwo-Hybrid法によりスクリーニングした。

③酵母PEX遺伝子群とのホモロジーを利用したヒトの相同遺伝子の同定

これまでに酵母でクロニングされたPEX遺伝子のうち、ほ乳類の相同遺伝子が知られていないものについて、インターネットを利用しESTデータベースを中心にホモロジー検索を行った。ホモロジーの認められたESTクローンについては、全長をクロニングすると共に、動物細胞発現ベクターにサブクロニングし、各種動物変異細胞、またはヒトペルオキシソーム欠損症患者由来変異細胞に導入しその相補活性を検討した。

④既知の形成因子間の相互作用の検討

上記のPEX遺伝子に加え、それらが相

相互作用する可能性のあるペルオキシソーム局在化シグナル(PTS1およびPTS2)をpGBT9およびpGAD424ベクターにサブクロニングし、酵母SFY526株を使ったTwo-Hybrid法により相互作用の有無を検討した。

⑤軽症型ペルオキシソーム欠損症の病因の解析

先天性ペルオキシソーム欠損症には10以上の相補性群が存在し、いくつかの相補性群では、対応するPEX遺伝子の変異も同定されている。しかし、重症度の異なる臨床病型が同一のPEX遺伝子の異常で起きるなど、両者の関係は不明であった。軽症患者の変異はleakyであると思われるものの、軽症型の患者由来の培養細胞の多くは通常の培養条件下において完全にペルオキシソームが欠損しており、臨床症状の重症度と細胞レベルでの異常との相関は認められなかった。我々は、軽症型ペルオキシソーム欠損症が温度感受性変異によるのではないかと考え、多くの患者由来の細胞を30℃で培養し、ペルオキシソームの出現が認められるかどうかを検討した。

研究成果

①新たなペルオキシソーム欠損変異細胞の分離と新規ヒトPEX遺伝子の単離

ラットPEX2 cDNAを導入しコピー数を増加させたCHO細胞株(CHO TKa)をペルオキシソーム欠損変異細胞分離のための親株とすることにより、従来問題となっていたZ65細胞と同じ相補性群に属する変異細胞ばかりがとれるという問題は回避され、新たな変異細胞を得ることができた。さらに、これら変異細胞の中の一つを用い新たにラットPEX12遺伝子をクロニングし、ヒト先天性ペルオキシソーム欠損症(相補性群3)患者で変異を同定し、病因遺伝子であることを明らかにし

た。

②既知のペルオキシソーム形成因子群と相互作用する未知の因子の酵母のTwo-hybrid系による同定

現在のところ相互作用するクローンの単離には成功していない。今後さらにスクリーニングを継続する予定である。

③酵母 P E X 遺伝子群とのホモロジーを利用したヒトの相同遺伝子の同定

これまでに酵母でクローニングされた P E X 遺伝子のうち、ほ乳類の相同遺伝子が知られていないものについて、インターネットを利用し E S T データベースを中心にホモロジー検索を行った。その結果、ヒト及びマウス P E X 7 ホモログがデータベース検索により同定された。このうちマウスのものは全長と考えられたため動物細胞発現ベクターにサブクローニングし、斑状軟骨形成不全症(RCDP)患者由来線維芽細胞に導入したところ P T S 2 依存性のペルオキシソームタンパク質輸送活性の欠損が相補されることを確認した。その後外国の3グループより、この遺伝子が病因であるとの報告がなされ、この方法による病因遺伝子の単離が有効であることが明らかとなった。現在までに、同様の方法により、P E X 1、P E X 1 3、P E X 1 4 のヒトホモログが見いだされており、現在これらが病因遺伝子であるか、またどのような機能を持ったものであるかについての検討を進めている。

④既知の形成因子間の相互作用の検討

ほ乳類のいくつかの P E X 遺伝子とペルオキシソーム局在化シグナル (P T S 1 および P T S 2) を T w o - H y b r i d 法により相互作用の有無を検討した結果、P T S 1 と P E X 5、P E X 5 と 1 4 の相互作用が確認された。しかし、酵母 P E X 遺伝子産物間で相互作用があると報告されている組み合わせの中で、ほ乳類 P E X 間で

は相互作用が検出されなかったものが多く認められた。この原因については、今後検討する予定である。

⑤軽症型ペルオキシソーム欠損症の病因の解析

複数の相補性群に属する IRD 及び一部の NALD 患者皮膚線維芽細胞を 30℃ で 72 時間培養下で培養すると 50% 以上の細胞にペルオキシソームが形成され、生化学的な異常も改善した。さらに、温度感受性(ts)を示した IRD の一症例で P E X 2 遺伝子のクローニングを行い、ts 性を引き起こす変異(E55K)を同定した。

ペルオキシソーム形成過程や形成機構の解析に、温度感受性株を利用することはきわめて有用であると考えられる。そこで、P E X 2 欠損 CHO 細胞(Z65)に ts 変異 P E X 2 を導入したステーブルトランスフォーマントを単離し、温度シフト後の経時変化を観察した。細胞を 39℃ の非許容温度に移すと、24 時間後にはカタラーゼが細胞質に蓄積することが蛍光抗体法により明らかとなった。しかし、4 日間の培養後も、一部の細胞にはカタラーゼを含むペルオキシソームが残存していた。現在、非許容温度下で完全に P E X 2 の活性を消失させるために、弱いプロモーターにより ts P E X 2 を発現させることを試みるとともに、ペルオキシソーム局在型 GFP (green fluorescent protein) を用いた解析を行っている。

今後の課題と発展

本研究により、新たなペルオキシソーム形成に必要な遺伝子が同定された。このことにより、臨床的には本疾患の診断(特に出生前診断)への応用がすくに可能であり、実際 P E X 2 の異常によるペルオキシソーム欠損症の患者についてはすでに実施されている。また遺伝子破壊による疾患モデルマウスの作成と、病態の解明、治療法

の開発への応用も期待される。また将来、遺伝子治療が実用化された際には、直接的な治療も考えられる。

オルガネラ形成機構についての研究という観点からは、本研究を含めた最近の成果によりペルオキシソーム形成に必須な遺伝子が多く単離されてきている。今後は個々の因子の機能を明確にしていくことが重要と考えられる。従来、ペルオキシソームを含めてオルガネラは一般に、既存のオルガネラに新たに合成されたタンパク質が膜を通して輸送されることによって形成されると考えられてきた。しかし、このことを *in vivo* で実証した例はない。我々の分離したペルオキシソーム欠損細胞に PEX 遺伝子を導入すると、ペルオキシソームが形成される。現在、この過程を生きた細胞において連続的に追跡するため、発光クラゲ由来の蛍光蛋白質である GFP の C 末端にペルオキシソーム局在化シグナル配列 SKL を付加したキメラ遺伝子 (GFP/SKL) を作成したものを用い、ペルオキシソームの可視化を行っている。さらに変異細胞に GFP/SKL を発現させておき、次に PEX 遺伝子を導入することにより、生きたままで連続的にペルオキシソーム形成の初期過程の観察を試みている。今後、研究を進展させることにより、ペルオキシソーム形成機構、特のその動的な過程についての理解を進展させることができるものと考えている。

発表論文リスト

1. S. Fukuda, N. Shimosawa, Y. Suzuki, Z. Zhang, S. Tomatsu, T. Tsukamoto, N. Hashiguchi, T. Osumi, M. Masuno, K. Imaizumi, Y. Kuroki, Y. Fujiki, T. Orii, and N. Kondo: Human peroxisome assembly factor-2 (human PAF-2): a gene responsible for group C peroxisome biogenesis disorder in humans, *Am. J. Hum. Genet.* 59, 1210-1220 (1996).

2. B. Distel, R. Erdmann, S. J. Gould, G. Blobel, D. I. Crane, J. M. Cregg, G. Dodt, Y. Fujiki, J. M. Goodman, W. W. Just, J. A. K. W. Kiel, W. -H. Kunau, P. B. Lazarow, G. P. Mannaerts, H. W. Moser, T. Osumi, R. A. Rachubinski, A. Roscher, S. Subramani, H. F. Tabak, T. Tsukamoto, D. Valle, I. van der Klei, P. P. van Veldhoven and M. Veenhuis: Unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors, *J. Cell Biol.* 135, 1-3 (1996).
3. T. Tsukamoto, A. Bogaki, K. Okumoto, K. Tateishi, Y. Fujiki, N. Shimosawa, Y. Suzuki, N. Kondo and T. Osumi: Isolation of a peroxisome deficient CHO cell mutant defective in peroxisome targeting signal-1 receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 402-406 (1997).
4. K. Okumoto, A. Bogaki, K. Tateishi, T. Tsukamoto, T. Osumi, N. Shimosawa, Y. Suzuki, T. Orii, Y. Fujiki: Isolation and characterization of peroxisome-deficient Chinese hamster ovary (CHO) cell mutants representing human complementation group III, *Exp. Cell Res.*, 233, 11-20 (1997)
5. K. Tateishi, K. Okumoto, N. Shimosawa, T. Tsukamoto, T. Osumi, Y. Suzuki, N. Kondo, I. Okano and Y. Fujiki: Newly identified Chinese hamster ovary cell mutants defective in peroxisome biogenesis represent two novel complementation groups in mammals, *Eur. J. Cell Biol.*, in press.