ペルオキシソームはどのようにしてできるのか？

酵母ペルオキシシンとペルオキシソーム膜タンパク質

阪井 康能*

長い間、不毛の化石オルガネラと考えられてきたペルオキシソーム。今、酵母をモデル生物として、ペルオキシソームの形成を司るタンパク質因子ペルオキシシンとその遺伝子が続々と神秘のベールを脱ぎ始め、細胞生物学のシンデレラとして再登場しつつある。金コロイドを含む巨大タンパク質ですら、そのまま通してしまうユニークなタンパク質膜透過機構の存在が明らかとなり、ヒト・ペルオキシシン遺伝子もクローニングされ、遺伝病の特効薬としても期待されている。オルガネラの形成に関わるペルオキシシンとペルオキシソーム膜タンパク質機能の最新像を概説する。

近年、分子細胞生物学の発展には目覚ましいものがある。酵母細胞は遺伝学・分子生物学的手法が使える単細胞真核生物であり、その多細胞生物のモデル系として果たしている役割は大きい。それは、酵母と多細胞高等生物との間で、分子レベルにおける構造・機能面での共通項が明らかにされるにつれ、酵母モデル系の利用価値がますます大きくなってきたからである。

細胞内オルガネラの一つであるペルオキシソームの形成に関する研究では、*Pichia pastoris*, *Candida boidinii*

Molecular Mechanism of Peroxisome Assembly

*Yasuyoshi SAKAI, 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

表 1 ■ ペルオキシシンとその遺伝子

遺伝子	ペルオキシシンの特徴
<i>PEX1</i>	AAA ファミリーに属する ATPase, 117~127 kDa
<i>PEX2</i>	C ₃ HC ₄ Zn-結合型ペルオキシソーム膜タンパク質, 35~52 kDa, Zellweger 症候群(CG 10)
<i>PEX3</i>	ペルオキシソーム膜タンパク質, 51~52 kDa
<i>PEX4</i>	ユビキチン結合酵素
<i>PEX5</i>	PTS1 レセプター, 64~69 kDa, 7~8 回の TPR 繰り返し構造, Zellweger 症候群(CG 2)
<i>PEX6</i>	AAA ファミリーに属する ATPase, 112~127 KDa, Zellweger 症候群(CG 4)
<i>PEX7</i>	PTS2 レセプター, 37~42 kDa, 6 回の WD40 繰り返し構造, 斑状軟骨形成不全症 II 型(RCDP/CG 11)
<i>PEX8</i>	PTS1 をもつペルオキシソームタンパク質, 71~81 KDa
<i>PEX9</i>	ペルオキシソーム膜タンパク質, 42 kDa
<i>PEX10</i>	C ₃ HC ₄ Zn-結合型ペルオキシソーム膜タンパク質, 34~48 kDa
<i>PEX11</i>	ペルオキシソームの分裂に関与する膜タンパク質, 27~32 kDa
<i>PEX12</i>	C ₃ HC ₄ Zn-結合型ペルオキシソーム膜タンパク質, 40~48 kDa, Zellweger 症候群(CG 3)
<i>PEX13</i>	Pex5p に結合する SH3 ドメインをもつタンパク質, 40~43 kDa
<i>PEX14</i>	Pex5p, Pex7p, Pex13p に結合するペルオキシソーム膜タンパク質, 38~39 kDa

特に必要な場合、遺伝子名の前に、遺伝子が由来する生物種の学名の種族名より 1 字ずつとって、イタリックで加える(例: *Saccharomyces cerevisiae* の場合は *ScPEX1*, ヒト *Homo sapiens* の場合は *HsPEX2* など)。また、特に酵母の場合、その一般表記法に従って、遺伝子産物であるタンパク質については、たとえば *ScPEX1* の遺伝子産物は *ScPex1p* と表現する。C₃HC₄: 3 残基のシステイン, ヒスチジン, 4 残基のシステイン。

などのメタノール資化性酵母が、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と並んでモデル生物として用いられている。特に酵母遺伝子をベースにしたデータベース検索により、ペルオキシソーム遺伝病遺伝子のクローニングが行なわれたことは、このような研究における酵母実験系の妥当性を強調することとなった⁽¹⁾。以上のようなことと相まって、ペルオキシソーム形成や維持に関わるタンパク質因子の命名法を全生物について統一することになり、タンパク質因子をペルオキシシン(peroxine)、コードしている遺伝子を *PEX* 遺伝子と呼ぶこととなった(表1)⁽²⁾。

本稿では、ペルオキシソーム形成・分裂の分子メカニズムについて、主に酵母実験系より得られたこれまでの成果を概括し、筆者らが行なったメタノール資化性酵母のペルオキシソーム膜タンパク質(peroxisome membrane protein; Pmp)の機能との関連性について考察したい。

酵母ペルオキシソームの代謝系と誘導炭素源

ペルオキシソームは、酵母から高等動植物に普遍的に存在する単膜オルガネラである。オルガネラ内には過酸化水素を発生するオキシダーゼと過酸化水素を分解するカタラーゼが局在しており、主に脂肪酸 β -酸化などの酸化系代謝を司っている。

S. cerevisiae ではオレイン酸生育時にペルオキシソームが形成され、この際、オルガネラ内には脂肪酸 β -酸化に必要な酵素が誘導される。一方、メタノール資化性酵母をメタノールで生育させると、アルコールオキシダーゼ(AOD)、ジヒドロキシアセトンシンターゼ(DHAS)およびカタラーゼ(CTA)がマトリクスタンパク質として誘導され、ペルオキシソームはその細胞内に占める体積の割合が80%近くになるまでに大きく発達する。メタノール資化性酵母である *P. pastoris* および *C. boidinii* では、このようなメタノール代謝系だけでなく、 β -酸化代謝系も併せてもっているため、オレイン酸を単一の炭素源としても生育することができる。さらに *C. boidinii* は、D-アラニンも炭素源として生育し、D-アミノ酸オキシダーゼをもつペルオキシソームを誘導する。ペルオキシソーム形成を行なうことができない *pex* 変異株は、*P. pastoris* では2つの炭素源に、*C. boidinii* では3つのペルオキシソーム誘導炭素源に生育することができない変異株の中から分離された^(3,4)。ペルオキシソームを誘導し、かつ代謝系としてはあまり関係のない複数の炭素源に生育できるというメタノール資化性酵母の生

育特性は、代謝系変異株を排除して *pex* 突然変異株の取得のためのスクリーニング効率を高めることとなった。

ターゲティングシグナルとタンパク輸送

1. ターゲティングシグナル(PTS1, PTS2, mPTS)⁽⁵⁻⁷⁾

ペルオキシソームへ輸送されるタンパクは、ミトコンドリアなど他のオルガネラと同様に、遊離のリボソーム上で合成され、そのタンパク質配列中にあるペルオキシソームターゲティングシグナル(peroxisome targeting signal; PTS)の働きにより、ペルオキシソームへ輸送される。ペルオキシソームに局在するマトリクスタンパク質のほとんどは、PTS1と呼ばれるカルボキシル末端にある3つのアミノ酸配列SKLを基本モチーフとする配列をもっている(図1)。PTS2は、N末端付近に存在する9つのアミノ酸配列(R/K)(L/V/I)(X)₅(H/Q)(L/A)であり、チオラーゼ、アミノオキシダーゼなどのいくつかのタンパク質で知られている。膜タンパク質のソーティングシグナルであるmPTSに関しては、数種類のタンパク質で明らかにされつつあるが、最も研究の進んでいるのは、後でその機能について考察する *C. boidinii* Pmp47である⁽⁶⁾。そのmPTSは、ペルオキシソームマトリクス内にループ構造をとっている20アミノ酸に限定されている。同様に、*PpPex3p*では、N末端40までのアミノ酸配列内にmPTSがある。いずれのmPTSに

図1 ■ ペルオキシソームターゲティングシグナル (PTS)

おいても、モチーフははっきりしないが、いくつかの塩基性アミノ酸が連なったペプチドの部分構造（ストレッチ）があり、mPTSは膜貫通領域でなくオルガネラ・マトリクス内にある。mPTSは輸送シグナルとして機能するが、疎水性の高い膜貫通領域により捕捉される輸送停止機構によって起こるのではないかと考えられており、これは翻訳後にペルオキシソームへ輸送されるというモデルとも矛盾しない。

以上のPTSは、いずれもペルオキシソームへのタンパク質輸送に必要かつ十分な配列である。すなわち、PTSをペルオキシソームタンパク質から除くと、ペルオキシソームへ輸送されず細胞質に留まり（必要性）、またレポータータンパク質にPTSを付加するとレポータータンパク質はペルオキシソームへ輸送される（十分性）。

ごく最近、小胞体(ER)を経てペルオキシソームへ輸送される膜タンパク質であるScPex15pが明らかにされた⁽⁷⁾。ScPex15pの過剰発現はER膜の異常増殖を誘導する。384アミノ酸のうち、C末端から55アミノ酸を除去すると、ScPex15pはERへ運ばれ、12アミノ酸を残しておくペルオキシソームへ輸送される。ERを介して輸送されるPmpが発見されたことは、ペルオキシソーム膜の由来や分泌系小胞輸送との関連を考察する上で興味深い。

2. PTS1, PTS2 レセプター(Pex5p, Pex7p)およびこれらと相互作用する Pex13p, Pex14p

PEX 遺伝子がクローニングされ始めた当初から、PTSを直接認識するPTSレセプターの存在は予想されていた。酵母 *pex* 突然変異株の解析が進むにつれ、その性質が明らかになっていった。すなわち、ほとんどの *pex* 変異株においては、PTS1 酵素および PTS2 酵素の両者とも細胞質に局在してペルオキシソームに輸送されていないのに対し、*pex5* 変異株では、PTS1 酵素のみがペルオキシソームへ輸送されず PTS2 酵素の輸送は正常であり、これとは逆に *pex7* 変異株では、PTS1 酵素の輸送は正常で PTS2 酵素のみが輸送されていない⁽⁸⁾。

P. pastoris pex5 突然変異を相補する（変異した性質が回復する）ことにより *PpPEX5* 遺伝子がクローニング・構造決定され、その配列をもとにデータベース検索することにより、ヒト *PEX5* 遺伝子もクローニングされた⁽⁸⁾。*PEX5* 遺伝子は *S. cerevisiae*, *C. boidinii* など数種の酵母からもクローニングされている。いずれも Pex5p は 64~69 kDa のタンパク質で、TPR モチーフ構造を 7~8 回もつ。Pex5p の PTS1 ペプチドに対する結合活性も生化学的に確認され、PTS1 レセプターである

用語解説

TPR (tetratricopeptide repeat) : どちらのモチーフも機能は特定されていない

が、アミノ酸配列の類似性に基づいて規定されているモチーフ構造で、重要な機能をもつ様々なタンパク質によってファミリーを形成している。TPR モチーフは 34 アミノ酸の繰り返しからなり、snap helix 構造をとっている。このファミリーは DNA に結合するものが多いが、PTS1 レセプターである Pex5p と同様に、ミトコンドリアタンパク質のレセプターである Mas70p も TPR モチーフをもっている。一方、WD40 モチーフ配列は、Trp-Asp 配列が特徴的な 40 アミノ酸からなるモチーフ構造で、A および B の保存された配列部分がある。Pas7p では 5 回の B 構造の繰り返しがあるが、A 構造はない。G タンパク質の β サブユニットなどにみられ、シグナル伝達、スプライシング、転写制御など、多くの生物機能に関与したタンパク質が知られている。TPR モチーフ構造をもつタンパク質と WD40 モチーフ構造をもつタンパク質が直接相互作用している例も知られているが、Pex5p と Pex7p の相互作用は Pex14p を介して行なわれており、直接の相互作用はない。

ことが証明された⁽⁸⁾。TPR モチーフ繰り返し部分に PTS1 結合活性がある。Pex5p の局在性については生物種によって、細胞質、ペルオキシソーム膜、マトリクスとまちまちであるが、これは Pex5p が細胞質とマトリクス間を行き来している (shuttling) ためと考えられている⁽⁹⁾。ヒト *PEX5* は Zellweger 症候群 (CG 2) の病因遺伝子であることもわかった⁽⁸⁾。

Pex5p と相互作用するペルオキシソーム膜タンパク質として、Pex13p が同定された^(9~11)。Pex5p のペルオキシソーム膜におけるレセプターであると考えられている (図 2)。

PTS2 レセプターである Pex7p も、PTS1 レセプターと同じ手法により、酵母、ヒト、マウスからクローニングされた。Pex7p は WD 40 繰り返し構造をもつタンパク質であり、two-hybrid システムにより PTS2 配列との特異的結合が示された^(12,13)。ヒト *PEX7* は, Rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP; 斑状軟骨形成不全症 II 型) の病因遺伝子であった⁽¹⁾。ScPex7p の局在性については、マトリクスあるいは細胞質のどちらにあるかで 2 つのグループの論争点となっている^(5,12)。

ヒト *pex5* 欠損培養細胞株では、酵母 *pex5* 変異株と異なり、PTS1, PTS2 両経路が欠損していた。さらに、ヒト Pex5p には同じ遺伝子によってコードされ、スプライ

図 2 ■ 酵母ペルオキシソームへのタンパク質輸送 (PTS1, PTS2 経路) と各ペルオキシシンおよび Pmp47 の作用を示した概念図 (本文参照)

PTS1 または PTS2 をもつマトリクスタンパク質は、それぞれのレセプターである Pex5p または Pex7p に結合してペルオキシソームへ輸送される。Pex5p はペルオキシソーム膜にある Pex13p に結合する。Pex14p は Pex5p, Pex7p の両者と相互作用している。PTS をもたないタンパク質でも、PTS をもつタンパク質とオリゴマーを形成してペルオキシソームへ輸送されうる。一方、ペルオキシソームのタンパク質輸送には、Pmp47 の輸送する低分子化合物を要求するものとそうでないものがある。ペルオキシソーム内へ輸送されてからフォールディングされるタンパク質もあるのかもしれない。一方、Pex11p はモノマーとしてペルオキシソームの分裂を促進し、ペルオキシソームの成熟に伴いダイマーとなり不活化する。Pex16p はこの過程を活性化して分裂を調節しているのかもしれない。

シングの段階で 2 種類の長さの異なる mRNA によりコードされる long form (l-Pex5p) と short form (s-Pex5p) がある。興味深いことに、l-Pex5p は PTS1, PTS2 両経路を相補できるのに対し、s-Pex5p は PTS1 輸送経路を相補できるが、PTS2 経路を相補できない。以上のことから、PTS1 経路と PTS2 経路の間の相互作用が予測されていた⁽⁶⁾。最近、酵母で Pex5p および Pex7p の両者に相互作用する因子として Pex14p が同定された⁽¹⁴⁾。他の *PEX* 遺伝子とは異なり、*PEX14* の過剰発現はペルオキシソーム欠損の表現系を示し、細胞質で Pex3p, Pex14p をもつ小胞が観察される⁽¹⁵⁾。Pex14p の量がペルオキシソームの形成に重要な意味をもっているのかもしれない。

ペルオキシソームへの膜透過にタンパク質のアンフォールディングは必ずしも必要ではない^(5,6)

ER やミトコンドリアへのタンパク質輸送は、膜を透過し始めてからタンパク質が正しくフォールディングされて活性型になる。そのために Hsp70/Hsp60 などのシャペロン分子が必要である。このような背景から、ペルオキシソーム内にあるシャペロン分子が検索されてきた。

しかし、① PTS をもたないサブユニットタンパク質でも、PTS をもつ他のサブユニットとオリゴマーとなった後、ペルオキシソームへのタンパク質輸送が起こる⁽⁶⁾、② 化学架橋剤、S-S 結合により安定化され、9 nm の金コロイド粒子をもつフォールディングされた巨大なタンパク質分子でも、アンフォールディングされずその

ままペルオキシソームへ輸送される⁽⁶⁾、という驚くべき実験結果が報告された。これは、ペルオキシソームへのタンパク質輸送には必ずしもアンフォールディングは必要でなく、タンパク質がオリゴマー化してからでもペルオキシソームへ輸送されることを示唆している(図2)。ペルオキシソーム膜でのタンパク質の膜透過は、他のオルガネラでの場合とは大きく異なるまったく新しいタイプの機構が関与すると予想される。

C. boidinii ペルオキシソーム膜タンパク質と 逆遺伝学を利用した機能解析

1. ペルオキシソーム膜タンパク質と発現制御⁽¹⁶⁾

現在まで *PEX* 遺伝子のクローニングは、主に酵母、CHO 培養細胞における *pex* 変異株の相補性を利用して行なわれている。これとは異なったアプローチにより、Goodman らと筆者らは、新たな Pmp がペルオキシソーム形成に関与していることを明らかにすることができた。

ペルオキシソーム膜が、タンパク質輸送に関する重要な機能を担っていることは想像に難くない。が、酵母 Pmp に関する研究は、Goodman らにより *C. boidinii* を用いて始められるまで皆無だった。*C. boidinii* は、ペルオキシソームの生化学的解析には優れたモデルである。その理由の一つは、高純度の Pmp を精製できることである。図3は、メタノール培養菌体から Pmp を調製した際の結果を示したものである。マトリクスタンパク質である AOD、DHAS の他に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)上にはそれぞれその分子量(kDa)に応じて、Pmp47、CbPex11p (*C. boidinii* では Pmp30、*S. cerevisiae* では Pmp27 と命名されていた)、Pmp20 が見いだされた。

次に、これらの Pmp を以下のような基準によって分類した。*C. boidinii* は先にも述べたように、代謝的にまったく異なる3つのペルオキシソームを誘導する炭素源、すなわちメタノール、オレイン酸、D-アラニンを利用でき、各炭素源で誘導したときのペルオキシソームのタンパク質構成は異なっている。すなわち、ペルオキシソームの構成タンパク質には、AOD のようにメタノール生育時のみ見いだされる代謝特異的なものと、代謝には依存せず構成的に見いだされるものとに分類できる。ペルオキシソームの形成や維持のように、オルガネラの基本的な機能に関わる分子は後者に属するものであることが予想された。このような基準によって Pmp の分類をしてみると、Pmp20 はメタノール培養時のみ見いだされるが、オレイン酸、D-アラニン培養時にはみ

図3 ■ *C. boidinii* メタノール生育菌体より精製したペルオキシソーム膜タンパク質

ペルオキシソーム精製画分を 30 mM Tris-HCl, pH 8.0 の温和な条件で破碎した後、浮遊密度勾配超遠心により膜画分とマトリクス画分に分け、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて、クーマシー染色を行なった。メタノールで誘導したペルオキシソームの主なタンパク質は AOD と DHAS であり、CTA はマイナータンパク質で、バンドとしては認められない。膜画分にはこれらの AOD および DHAS とともに、3 種類の Pmp が観察される。ちなみに、こうして得られた膜画分を 100 mM 重炭酸ソーダで洗浄すると、AOD は解離するが、他の Pmp と DHAS は膜画分に残る。

られない。それに対して、Pmp47 および CbPex11p (Pmp30) は上の3つの炭素源いずれで培養したときにもペルオキシソームに見いだされた。したがって、Pmp20 はメタノールに代謝特異的な分子で、Pmp47 と CbPex11p はより基本的な機能をもった分子であることが予測された⁽¹⁶⁾。

ちょうどそのようなことが明らかになってきた頃、筆者らは *C. boidinii* の分子育種系を構築し、遺伝子破壊や異種遺伝子を発現させることに成功した⁽¹⁷⁾。そこでまず、これらの *Pmp* 遺伝子を宿主株である S2 株より再クローニングし、遺伝子破壊を行なって、遺伝子破壊株における生育特性をベースに機能を探ろうとする“逆遺伝学 (reversed genetics)”によるアプローチをとることにした。

2. ペルオキシソームの分裂を促進する Pex11p^(18~21)

Pex11p はペルオキシソームの中で、唯一タンパク質の部分アミノ酸配列をもとに遺伝子がクローニングされ、遺伝子破壊株が作製されるという過程を経た、いわゆる逆遺伝学によってその機能が解析されたものである。

C. boidinii の *PEX11* 遺伝子破壊株である *pex11Δ* 株では、オレイン酸およびメタノールを炭素源としたときに生育阻害が認められたが、特にメタノールのときに顕著な生育阻害が認められた⁽¹⁸⁾。他の *pex* 変異株とは異

図 4 ■ *C. boidinii pex11Δ* 株 (遺伝子破壊株) と野生株の電顕写真 (本文参照)⁽¹⁸⁾

A: 野生株のオレイン酸生育菌体, B: *pex11Δ* 株のオレイン酸誘導菌体, C: 野生株のメタノール生育菌体, D: *pex11Δ* 株のメタノール誘導菌体, E: *pex11Δ* 株で *ScPEX11* を過剰発現させた。

野生株では、用いた炭素源によって特徴的な形態が観察され、分裂中のペルオキシソームなどがみられる (A および C)。一方、*pex11Δ* 株では巨大なペルオキシソームが細胞内に 1~2 個観察される (B および D)。一方、*PEX11* 過剰発現株ではペルオキシソームの分裂が促進されて、小型化したペルオキシソームが多数観察される (E)。

P: ペルオキシソーム, M: ミトコンドリア, N: 核, V: 液胞

なって、ペルオキシソームへのタンパク質輸送に異常はみられない。しかし、ペルオキシソームの形態には著しい変化が認められた。オレイン酸で培養した *C. boidinii* 野生株では、メタノール培養菌体に比較して小型のペルオキシソームが、細胞当たり平均 5~10 個程度観察される (図 4-A)。それに比較して、*pex11Δ* 株では大きな球形のペルオキシソームが細胞当たり 1~2 個し

かみられないのが特徴である (図 4-B)。メタノール培養菌体においても、野生株に比べて (図 4-C), *pex11Δ* 株では分裂中のペルオキシソームはほとんどみられず、球形のペルオキシソームが細胞当たり 1~2 個見いだされた (図 4-D)。このようなペルオキシソームの形態は *S. cerevisiae pex11Δ* 株でも同様であった^(19,20)。

C. boidinii および *S. cerevisiae* においては、それぞ

れの *pex11Δ* 変異を異種の *PEX11* 遺伝子で、相互に相補することができた⁽¹⁸⁾。これは *PEX* 遺伝子の中で、異種間の相補性が確認された初めての例である。この場合の相補性とは、生育の回復とペルオキシソームの小型化を意味する。図 4-E には *ScPEX11* を *Cbpex11Δ* 株で過剰発現させたときのものを示している。このようにメタノール培養菌体では、本来もっと大きなペルオキシソームが存在するが(図 4-C)、過剰発現株ではさらにペルオキシソームが分裂して小型化しているのがわかる(このような過剰発現株でも生育阻害は回復している)。ここで重要なのは、*S. cerevisiae* はメタノールの代謝系をもっていないにもかかわらず、*ScPEX11* が *Cbpex11Δ* 株のメタノールでの生育阻害を回復できたことである。つまり Pex11p は代謝とは関係なく、基本的なペルオキシソーム機能に関係していることが示された。

さて Pex11p の生産量とペルオキシソームの形態の関係は何を意味しているのだろうか？ 筆者らは Pex11p をペルオキシソームの分裂を促進する分子として捉えている。たとえば、免疫電顕による観察では Pex11p はペルオキシソームが分裂する際にみられるくびれ(neck)部分に観察されている⁽¹⁹⁾。また Pex11p は、その Cys 残基による S-S 結合を介してホモダイマーとしても存在していることがわかった。モノマーは、未熟なペルオキシソーム(密度勾配超遠心で軽い画分)に多く存在し、逆にホモダイマーは成熟した(重たい)画分のペルオキシソームに多かった。さらにホモダイマー形成に必要な Cys 残基を Ala に遺伝子工学的に変換すると、Pex11p の過剰発現株と似て軽くて未熟なペルオキシソームが多数できた⁽²¹⁾。Pex11p はペルオキシソームが成熟するまでの間はモノマーとしてオルガネラの分裂に寄与し、ペルオキシソームが成熟してしまうとホモダイマー化して不活性化しているのかもしれない。

最近、このような Pex11p の機能の調節に関与している可能性のある分子として、Pex16p が明らかになった⁽²²⁾。Pex16p は Pex11p の逆の表現系を示す。すなわち、Pex16p 過剰生産は巨大なペルオキシソームの形成をひき起こす。今後、Pex11p との相互作用の解明が興味深い。Pex16p は Pex11p のホモダイマー化を促進しているのかもしれない。

3. Pmp47 のトランスポーターとしての機能とペルオキシソームへのタンパク質輸送の生化学的多様性⁽²³⁾

Pmp47 の推定アミノ酸配列が発表された後、このタンパク質がミトコンドリア ATP/ADP 交換輸送体など、低分子化合物のトランスポーターと高い類似性をも

つ分子であることが明らかになった。

PMP47 遺伝子を破壊した *pmp47Δ* 株では、メタノールにおける生育は完全に抑制され、オレイン酸でもかなり生育阻害がかかっていた。電顕観察を行なうと、ペルオキシソームは存在していたが、メタノール培養菌体、オレイン酸培養菌体ともに、細胞質中に電子密度の高いタンパク質の凝集体と考えられる構造が見いだされた。

メタノール培養時のマトリクス酵素は AOD, DHAS, CTA の 3 種類であり、そのタンパク質構成は単純である。そこでメタノール誘導菌体を用いて、*PMP47* 遺伝子の破壊と酵素活性の関連から解析を始めることにした。すると *pmp47Δ* 株では、AOD, CTA 活性は通常レベルで認められたものの、DHAS 活性はまったく消失していた。しかも DHAS タンパク質はフォールディングした形では細胞内にはまったく存在しておらず、凝集体となって存在していることがわかった。次に、このような凝集体となった DHAS タンパク質の細胞内局在性を検討した。免疫電顕、ショ糖密度勾配分画による結果から、AOD, CTA はペルオキシソームへ正常に輸送されていたが、DHAS はフォールディングされていない凝集体として細胞質にとどまっていることが明らかになった。このように、Pmp47 が DHAS のペルオキシソームへのタンパク質輸送とフォールディング、活性発現に深く関与していた。

トランスポーターは膜で仕切られている環境ではじめて機能する分子である。では、もしそのような仕切りを取り除いてやれば、DHAS は Pmp47 がなくても活性発現できるようになるのだろうか？ それとも、Pmp47 はトランスポーターとしての機能以外にシャペロン機能ももっていて DHAS のフォールディングに直接関与しており、DHAS の活性発現には必ず必要な分子なのであるだろうか？ この疑問に答えるため、*PMP47* 遺伝子破壊をもともとペルオキシソームを形成できない *pex* 変異株で行なった。このような *pex/pmp47Δ* 二重変異株では DHAS 活性は正常レベルで認められ、AOD, DHAS タンパク質は細胞質に存在した。以上の結果から、Pmp47 分子は DHAS の活性発現にとって必ずしも必要でないことがわかった。

AOD, DHAS は、ともに PTS1 経路により輸送されるタンパク質である。しかし、DHAS の輸送には、細胞質からペルオキシソーム内へ Pmp47 によって輸送される低分子化合物を要求するが、AOD はそれを要求しない。筆者らの結果は、PTS 以外にペルオキシソームへのタンパク質輸送における生化学的要求性の多様性を初めて示唆したものである。

では、なぜ *pmp47Δ* 株では、フォールディングできなかった DHAS 凝集体が細胞質にみられたのだろうか？さらに、この表現型は *pex* 変異によって打ち消されて（抑圧されて）いた。*pex/pmp47Δ* 二重変異株では DHAS が正しくフォールディングされており、DHAS は Pmp47 がなく、必ずしも膜を透過しなくても、細胞質において活性型になり得る。これらの結果からは、DHAS がフォールディングされてからペルオキシソームへ輸送されているとは非常に考えにくい。DHAS の凝集不活化はペルオキシソーム膜による仕切りが存在したことによって起こった。また、Pmp47 によって輸送される化合物は、他のトランスポーターとの類似性から考えて ATP などの低分子物質であることが予想される。この低分子物質をオルガネラ内で受け取るシャペロンのようなタンパク質性因子はペルオキシソームには存在しないのだろうか？

pex5 変異株においても、DHAS は活性型で細胞質に存在した（未発表データ）。*pex5* 変異株ではペルオキシソームは存在し、かつ Pmp47 はペルオキシソーム膜へ輸送されているようである。もし、ペルオキシソーム内タンパク質因子が PTS1 に依存して輸送されているのなら、*pex5* 変異株ではそのタンパク質因子は細胞質に DHAS と共存していることになり、DHAS 活性をもてるようになったと考えることはできないだろうか？ 本当にすべてのタンパク質はペルオキシソームへ到達する前にフォールディングされ、オルガネラ内にはシャペロン分子はないのであろうか？そして Pmp47 の輸送する低分子化合物とは何であろうか？現在、これらの問題を解決すべく研究を進めている。

以上のように DHAS のペルオキシソームへの輸送と Pmp47 の関係は、ペルオキシソームへのタンパク質輸送に新たな問題を提起している。

*

現在、酵母を用いたオルガネラ形成の分子細胞生物学は大きく花を開いている。ここで紹介したペルオキシソーム形成の分子機構の解明もその例外ではない。予想以上に多くの遺伝子がペルオキシソーム形成に関与している。ヒトのペルオキシシン遺伝子は将来は遺伝子治療に利用されることが期待され、もしそうなれば、10 歳までに命を終えてしまう多くの子供達の生命を救う素晴らしい成果となるであろう。しかし遺伝子のクローニングでこの物語は終わらない。ペルオキシシンの生化学的機能を追求するのが次のステップである。ペルオキシソームへのタンパク質輸送は他のオルガネラとは大きく異なってい

るようである。はたしてペルオキシソーム形成の分子機構は我々に新しいパラダイムを与えてくれるのだろうか？

ここでは紹介できなかったが、メタノール資化性酵母はペルオキシソーム形成のモデル生物として利用されているばかりでなく、異種遺伝子発現系としても大変優れたものである⁽¹⁷⁾。筆者らは、メタノール資化性酵母のペルオキシソームへタンパク質を詰め込んで、効率的なタンパク質生産を行なうことを目標とした研究を進めている。このために、分子細胞生物学を応用分野へ取り込むことも積極的に行ないたいし、逆に応用的な解釈で分子細胞生物学を見直す視点があってもよいのではないだろうか。

謝辞：共同研究者であるテキサス大学サウスウェスタン医学センターの Joel M. Goodman 教授には多くの研究材料ならびに貴重な示唆をいただきました。また筆者が現在滞在しているカリフォルニア州立大学サンディエゴ校 S. Subramani 教授には図表の原図ならびに最新の資料についてお教えいただきました。この場を借りて両教授に深く感謝いたします。誌面上の制約で紹介できませんでしたが、メタノール資化性酵母は故緒方浩一京都大学教授により、またそのペルオキシソームは福井三郎京都大学名誉教授らにより発見され、初めての哺乳類からのペルオキシシン遺伝子は藤木幸夫九州大学教授によりクローニングされていたことを特に記しておきたいと思います。日本におけるこのような独創的な研究なくして、筆者らの研究は不可能でした。また、本稿執筆の機会をお与えいただきました本誌元企画理事大山莞爾先生に感謝いたします。最後になりましたが、本研究を開始した当初ご指導いただきました谷吉樹 奈良先端科学技術大学院大学教授、現在ご指導いただいております加藤暢夫京都大学教授ならびに共同研究者である由里本博也氏ほか制御発酵学研究室の新旧メンバー全員に感謝いたします。

文献

- 1) S. Subramani : *Nature Genet.*, **15**, 331 (1997).
- 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. Tabak, T. Tsukamoto, D. Valle, I. van der Klei, P.P. van Veldhoven & M. Veenhuis : *J. Cell Biol.*, **135**, 1 (1996).
- 3) S. Subramani : *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 445 (1993).
- 4) Y. Sakai, H. Matsuo, K.-Z. He, A. Saiganji, H. Yurimoto, K. Takabe, H. Saiki & N. Kato : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 869 (1995).
- 5) R.A. Rachubinski & S. Subramani : *Cell*, **83**, 525 (1995).
- 6) J.A. McNew & J.M. Goodman : *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 54 (1996).
- 7) S. Subramani : *J. Biol. Chem.*, **271**, 32483 (1996).
- 8) E.A.C. Wiemer, S.R. Terlecky, W.M. Nuttley & S. Subramani : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **60**, 637 (1995).
- 9) S.J. Gould, J. Kalish, J.C. Morrell, J. Bjorkman, A.J. Urquhart & D.I. Crane : *J. Cell Biol.*, **135**, 85 (1996).
- 10) Y. Elgersma, L. Kwast, A. Klein, T. Voorn-Brouwer, M. van den Berg, B. Metzger, T. America, H. Tabak & B. Distel : *J. Cell Biol.*, **135**, 97 (1996).
- 11) R. Erdmann & G. Blobel : *J. Cell Biol.*, **135**, 111 (1996).

- 12) B. Huhse & W. Kunau : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **60**, 657 (1995).
- 13) P. Rehling, M. Marzioch, F. Niesen, E. Wittke, M. Veenhuis & W. Kunau : *EMBO J.*, **15**, 2901 (1996).
- 14) M. Albertini, P. Rehling, R. Erdmann, W. Girzalsky, J.A. K.W. Kiel, M. Veenhuis & W. Kunau : *Cell*, **89**, 83 (1997).
- 15) M. Komori, S.W. Rasmussen, J.A.K.W. Kiel, R.J.S. Baerends, J.M. Cregg, I.J. van der Klei & M. Veenhuis : *EMBO J.*, **16**, 44 (1997).
- 16) J.M. Goodman, S.B. Trapp, H. Hwang & M. Veenhuis : *J. Cell Sci.*, **97**, 193 (1990).
- 17) 阪井康能：“遺伝子発現実験マニュアル—高発現システムによる有用タンパク質の生産”，講談社サイエンティフィク，1994，p. 100.
- 18) Y. Sakai, P.A. Marshall, A. Saiganji, K. Takabe, H. Saiki, N. Kato & J.M. Goodman : *J. Bacteriol.*, **177**, 6773 (1995).
- 19) R. Erdmann & G. Blobel : *J. Cell Biol.*, **128**, 509 (1995).
- 20) P.A. Marshall, Y.I. Krimkevich, R.H. Lark, J. Dyer, M. Veenhuis & J.M. Goodman : *J. Cell Biol.*, **129**, 345 (1995).
- 21) P.A. Marshall, J.M. Dyer, M.E. Quick & J.M. Goodman : *J. Cell Biol.*, **135**, 123 (1996).
- 22) G.A. Eitzen, R.K. Szilard & R.A. Rachubinski : *J. Cell Biol.*, **137**, 1265 (1997).
- 23) Y. Sakai, A. Saiganji, H. Yurimoto, K. Takabe, H. Saiki & N. Kato : *J. Cell Biol.*, **134**, 37 (1996).

プロフィール

荒井 修亮 (Nobuaki Arai) 昭和32年1月30日生<略歴>昭和55年京都大学農学部水産学科卒業／同年農林水産省入省／63年科学技術庁勤務／平成2年農林水産省勤務／4年京都大学農学部助手，現在にいたる．平成9年第39次南極地域観測隊隊員<研究テーマと抱負>海洋生物の硬組織の解析．海洋生物の行動生態と海洋環境の解析を行なうための計測方法<趣味>テニス

井上 國世 (Kuniyo Inouye) Vol. 31, No. 9, p. 577 参照

江島 大輔 (Daisuke Ejima) 昭和33年7月16日生<略歴>1983年東京大学農学部水産学科卒業後，味の素(株)中央研究所勤務，現在にいたる<研究テーマと抱負>遺伝子組換え技術を用いたタンパク質の製造技術開発<趣味>動物園めぐり

小川 宏蔵 (Kozo Ogawa) 昭和14年7月31日生<略歴>昭和40年大阪府立大学大学院農学研究科修士課程修了／同年大阪府立放射線中央研究所勤務／平成2年大阪府立大学附属研究所助教授／7年同大学先端科学研究所教授，現在にいたる．この間，昭和50～51年カナダ・モントリオール大学化学部博士研究員(R.H. Marchessault 研)．昭和49年農

博(大阪府立大学)<研究テーマと抱負>組織状生体高分子の構造と機能．合成高分子の優れた機能をもつ生体高分子あるいは(生分解性を損わない)誘導体を見つけ，その構造と機能の相関を明らかにすること<趣味>音楽鑑賞

小幡 斉 (Hitoshi Obata) 昭和14年5月8日生<略歴>昭和38年関西大学工学部化学工学科卒業／41年同工学部助手／52年同専任講師／56年同助教授／63年同教授，現在にいたる．この間，昭和56年および59年カナダ・アルバータ州立研究所留学<研究テーマと抱負>微生物由来の水を凍りやすくするタンパク質と水を凍りにくくするタンパク質の構造と機能，その応用<趣味>化石収集，ドライブ

越智 幸三 (Kozo Ochi) Vol. 31, No. 3, p. 162 参照

越智 宏倫 (Hiroto Ochi) 昭和9年7月1日生<略歴>昭和34年大阪府立大学農学部農芸化学科卒業／39年日研フーズ(株)代表取締役就任／60年日本老化制御研究所所長兼任，現在にいたる．この間，昭和63年米国ホノルル大学よりPh.D.取得，平成元年農博(東北大学)<研究テーマと抱負>老化制御に関する研究および商品開発<趣味>読書，

園芸

川上 秀史 (Hideshi Kawakami) 昭和34年7月11日生<略歴>昭和59年広島大学医学部医学科卒業／63年京都大学大学院医学研究科単位取得後退学／平成元年国立療養所宇多野病院神経内科レジデント／5年広島大学医学部医学科内科学第三講座助手，現在にいたる<研究テーマと抱負>神経疾患の分子生物学的研究(グルタミン酸トランスポーター，ドーパミントランスポーター，triplet repeats disease など)

河原 秀久 (Hidehisa Kawahara) 昭和37年6月15日生<略歴>昭和61年岡山大学農学部農芸化学科卒業／平成3年同大学大学院自然科学研究科博士課程修了／同年関西大学工学部助手／6年同専任講師／9年同助教授，現在にいたる<研究テーマと抱負>様々な環境に生育している細菌の新機能開発とその応用研究<趣味>スポーツ観戦

佐竹 真幸 (Masayuki Satake) 昭和39年4月17日生<略歴>平成元年東北大学農学部食糧化学科卒業／6年同大学大学院農学研究科博士課程修了／同年同農学部助手，現在にいたる<研究テーマと抱負>海洋天然物化学<趣味>スポーツ，読書