財団法人病態代謝研究会　御中

海外留学補助金による研究経過・成果報告書

米国立衛生研究所(NIH) 博士研究員　田中敦

田中 敦 Atsushi Tanaka

04/03/2008

研究テーマ：

プログラム細胞死におけるオルガネラ間情報伝達の解析

共同研究者:

Dr. Richard J Youle (NINDS, NIH, Branch chief)

Dr. Mariusz Karbowski (Univ. of Maryland, Assistant professor)

研究進捗状況：

序

ペルオキシソームとミトコンドリアの形態制御機構には複数の共通タンパク質が作用していることが近年明らかにされつつある [1]。その中で、ミトコンドリアの形態維持機構、特に分裂と融合によるミトコンドリア機能のメンテナンスは、これまでに知られてきた、細胞エネルギーの産生という側面だけではなく、　一連の細胞死、アポトーシス経路の進行、抑制に重要であることが 分かりつつある[2]。 さらにごく最近、これら形態維持に関わるタンパク質の多くはそれらの機能を発現、停止するために的確な時点で翻訳後修飾がなされることも分かりつつある[3]。以上のような状況から、形態制御機構と機能の相関を解析することはここ数年のトピックでもある。一方、ペルオキシソームもまた、細胞内環境の変化に応じてその形態を変化させるオルガネラである。特にペルオキシソームでは分裂機構がその機能と密接に関係しており、さらにはミトコンドリアとも代謝経路を共有するなど、ミトコンドリアとペルオキシソーム

の形態維持と機能の相関はこれまでに明らかにされた知見が少ないが、大変興味深い領域である。

研究内容

このような背景において、現所属研究室では直近の数年間、ゲノム情報スクリーニングとそれに続く細胞学的アプローチにより「各細胞内オルガネラに局在する全ての膜貫通型RING-E3 ユビキチンリガーゼの同定」を完了させた。その中のいくつかはミトコンドリアに主に局在するリガーゼであることが分かり、さらにミトコンドリアの形態維持に必須であることが示唆された[4]。筆者はミトコンドリアとペルオキシソームの形態維持機構には共通のタンパク質が作用しているという既知の知見から、これら新たに同定されたミトコンドリア形態因子のペルオキシソームへのさらなる関与を検討した。

結果、以下に挙げる知見が得られた。

1）MARCH5 E3 ligase はミトコンドリアだけでなく、ペルオキシソームにも局在する。

現所属研究室で同定された複数のミトコンドリア局在型RING-E3 リガーゼのうち、MARCH5 (membrane-associated ring finger (C3HC4)-5) は、哺乳動物培養細胞において、ミトコンドリアのみでなく、ペルオキシソームへの局在も示すことが、細胞生物学的、及び生化学的検討から明らかとなった。

2）MARCH5 はペルオキシソーム形態維持にも必要であると考えられる。

MARCH5 の発現をRNA 干渉法により阻害すると、ミトコンドリアの分裂が阻害されるだけではなく、ペルオキシソームの分裂も阻害されることが明らかとなった。また、ミトコンドリア及びペルオキシソームの膜分裂の最終段階を担うダイナミンタンパク質（Dynamin related protein-1, DRP1) の発現阻害と、MARCH5 の一過性発現を同時に行うと、DRP1 の発現阻害に依るミトコンドリア及びペルオキシソームの分裂障害はMARCH5 の発現では補完できなかったことから、MARCH5 が分裂段階において機能する点は、DRP1 のそれよりも上流であることが示唆された。

3）MARCH5 のユビキチンリガーゼ活性を阻害すると、ペルオキシソームの正常な分裂過程が阻害される。

MARCH5 のユビキチンリガーゼ活性中心であるRING ドメインのうち、保存されたシステイン及びヒスチジン残基をそれぞれトリプトファン、およびセリンに置換したMARCH5 変異体を作製し、それらを一過性に細胞へ発現させたところ、これまでに明らかであったミトコンドリア形態維持へのドミナントネガティブ的な影響のみでなく、ペルオキシソームにおいても、正常な分裂過程が阻害されることが明らかとなった。このこともまた、MARCH5 がペルオキシソームの分裂過程にも必要であることを示唆した。

4）MARCH5 は、ペルオキシソーム及びミトコンドリアの分裂を引き起こすダイナミンタンパク質の細胞質ーオルガネラ膜間のシャトルを制御している可能性がある。

MARCH5 がペルオキシソームの分裂過程にどのように寄与しているかを検討するため、ペルオキシソーム分裂装置におけるMARCH5 の影響を検討した。結果、MARCH5 は通常細胞質中に局在するDRP1 がペルオキシソーム分裂時にペルオキシソーム膜上に局在するステップを制御していることが明らかとなった。MARCH5 の発現阻害、ならびに機能障害を引き起こすと、DRP1 の正常な細胞質ーペルオキシソーム間のシャトルが阻害され、それによりペルオキシソームの形態維持、特に分裂過程に障害を来すことが示唆された。

進行中の研究内容

これらの結果をもって、これまでに明らかにされていなかった新規のペルオキシソーム形態因子の同定が完了した。

現在、これら複数の形態因子を適宜機能阻害することで、アポトーシス経路を活性化させた場合の、ペルオキシソーム及びミトコンドリアの形態、機能への影響、ならびに細胞内環境の変化に対応するペルオキシソーム形態変化のスクリーニングを行っている。

研究発表状況：

新規ペルオキシソーム形態因子の同定までを纏め、現在学術誌に投稿中である。また、同様の内容を今夏に行われるGordon Research Conferences[5] において発表予定である。

参考文献：

1: Schrader M, Fahimi HD. *Histochem Cell Biol. 2008 Apr;129(4):421-40. The peroxisome: still a mysterious organelle.*

2: Youle RJ, Karbowski M. *Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Aug;6(8):657-63. Mitochondrial fission in apoptosis.*

3: Nakamura N, Hirose S. *Mol Biol Cell. 2008 Feb 20. Regulation of Mitochondrial Morphology by Usp30, a Deubiquitinating Enzyme Present in the Mitochondrial Outer Membrane.*

4: Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ. *J Cell Biol. 2007 Jul 2;178(1):71-84. The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division.*

5: *http://www.grc.org/*

研究室風景：

（前列向かって左端、田中）