

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：オルガネラ・ホメオスタシスと代謝調節・高次細胞機能制御
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

藤木 幸夫 (九州大学大学院理学研究院 教授)

主たる共同研究者

阪井 康能 (京都大学大学院農学研究科 教授)

### 3. 研究実施概要

生命体の基本単位は細胞であり、真核細胞は非常に緻密に分化した膜構造に基づく生命活動を行っている。代謝活動も各オルガネラが代謝を機能分担し、オルガネラ・ホメオスタシス(合成系と分解系のバランス)は、各細胞が必要とする代謝により支配されている。本課題研究は、脂質代謝等を担い生命体に必須なペルオキシソームの形成と分解の分子制御機構と、その破綻により起こる代謝障害の全貌解明により、「代謝が調節するオルガネラ・ホメオスタシスと高次細胞機能制御」の基本原理を導き出し、それに基づく細胞機能制御基盤技術を確立することを目的として、代謝活動が支配するペルオキシソーム動態ネットワークと遺伝子発現ネットワークの解明へ向け、種々検討を行った。

藤木グループは、課題解明への研究実施項目において非常に重要な知見を得ることができた。1)ペルオキシソーム誘導制御系の解明:極長鎖不飽和脂肪酸(DHA)が、ペルオキシソーム分裂因子Pex11p $\beta$ の複合体形成の調節を介してペルオキシソーム分裂を制御することを示し、代謝とペルオキシソームの形態・増殖を関連付けた。2)メタボローム解析系の確立と試料解析:ペルオキシソーム欠損・機能障害患者線維芽細胞やCHO変異細胞株を用いた脂質代謝能のメタボローム解析系を確立し、ペルオキシソーム欠損による脂質動態の変化をはじめとする多くの新規知見を得た。3)ペルオキシソーム動態制御系の解析:ペルオキシソーム膜タンパク質の輸送には、ほとんど全ての膜タンパク質の輸送に関与するPex19p-Pex3p依存的なClass I経路と、Pex3pに特異的なPex19p-Pex16p依存的Class II経路の二つが存在する。一方、マトリックスタンパク質の輸送にはPTS1レセプターPex5pの独特なユビキチン化修飾とAAA-ATPaseペルオキシシンであるPex1pおよびPex6pに依存したペルオキシソームからサイトゾルへのエクスポートが必要であること、等を明らかにした。すなわち、ペルオキシソーム生合成初期過程(膜形成)およびタンパク質膜透過機構と輸入装置やその動態と機能調節機構の解明に大きな進展を得た。4)脳・神経形成や器官形成異常のメカニズムの解明:ペルオキシソーム病の一つ、エーテルリン脂質プラスマローゲンの生合成不全症は致死性の神経疾患を呈することが知られているが、同表現型を有するCHO変異細胞株の分離とその解析に加えて、プラスマローゲン合成中間産物であるalkyl-DHAP産生に必須な長鎖アルコールを産生するペルオキシソーム膜局在性酵素タンパク質fatty acyl-CoA reductase1 (Far1)の同定に成功し、プラスマローゲン生合成調節機構の解明に大きく貢献した。5)ペルオキシソームの誘導と分解系の解明:動物細胞におけるペルオキシソームのホメオスタシス維持の一機構と考えられるペルオキシソーム特異的な分解系を見出した。すなわちペルオキシソーム膜ペルオキシシンPex14pとオートファジー関連因子LC3-IIが直接相互作用を持つ機構を見出した。

阪井グループでは、「代謝が支配するオルガネラホメオスタシス」、特にレドックス物質の代謝という観点を中心として、実時間で細胞内レドックスを検知するFRETプローブ”レドックスフロー”の開発と応用を絡めた研究を行った。その成果として、1)ROSを発生するオルガネラであるペルオキシソーム内とペルオキシソーム欠損細胞内におけるレドックスが、予想に反して、還元的になっていることを藤木グループと共同研究により発見し、その代謝的基盤を明らかにするとともに、細胞内レドックスを正常に回復する薬剤の探索に本プローブが

適用できることを明らかにした。2)このような細胞内酸化還元状態の可視化技術と代謝産物の解析を進める過程で、例えばグルタチオンを中心とするレドックス代謝が、遺伝子発現レベルで、ペルオキシソームの合成と分解を制御していることや、メタノール代謝産物動態がメタノール誘導性遺伝子発現制御に深く関わることを明らかにした。また、3)微生物の高次細胞機能におけるペルオキシソームホメオスタシスの重要性を示す事例として、植物病原性カビを用いた解析から、ペルオキシソーム合成のみならず、ペルオキシソーム分解が、カビの植物病原性発現という高次機能に必要なことを明らかにした。さらに、4)植物表層における日周性を伴ったメタノール変動と植物表層でメタノール酵母が増殖することを発見し、増殖のために、ペルオキシソーム合成・分解に関わる*PEX/ATG*両遺伝子群が重要な役割を果たすこと、メタノール酵母ペルオキシソームの高次機能として、老化あるいは枯葉上など、栄養分枯渇した環境で、タンパク質集積オルガネラとしての機能を示した。

加えて、5)両グループの共同研究で得られた、酵母細胞、CHO細胞のいずれにおいてもペルオキシソーム欠損変異株では還元的レドックス(redox)異常を呈する、という知見は、両者に共通あるいはそれぞれに特有な原因を特定するに至り、科学的・技術的にもインパクトが強い成果に繋がった。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

本研究チームは、ペルオキシソーム研究において世界のトップランナーとして優れた研究成果を挙げ、その実績に基づき、本クレスト研究においては、ペルオキシソームの形成と分解の分子制御機構とその異常により引き起こされる代謝障害などの解明に向け、さらに大きな成果を数多く積み上げてきた。

藤木グループは、動物細胞におけるペルオキシソームの形成や動態の制御に関わる研究で、極長鎖不飽和脂肪酸(DHA)がペルオキシソーム分裂を制御すること、プラスマローゲン生合成がFar1により制御されること、ペルオキシソーム特異的分解系がPex14pとLC3-IIの直接相互作用を介して行われることなど、極めて優れた研究成果を数多く挙げた。これらの研究は、種々のペルオキシソーム変異細胞の樹立を基軸として行われ、代謝物の解析は本クレスト研究領域の戦略に合致するようメタボローム解析系を確立して行われた。一方、阪井グループも、メタノール資化性酵母を用いた研究により、細胞内のレドックス状態を検知する新規プローブの開発とペルオキシソーム内が細胞質以上に還元状態にあること、グルタチオン代謝を介したペルオキシソーム合成・分解の制御、植物病原菌の病原性発現におけるペルオキシソームの関与等、ペルオキシソームの新しい機能の解明となる優れた成果を挙げた。藤木グループはヒトを含めた動物細胞のメタボローム解析系を確立し多くの新規知見を得、阪井グループは酵母細胞のメタボローム研究に積極的に取り組むなど、両グループともに大きな貢献をした。

研究成果は多数の論文に発表され、国際会議での招待講演も数多く行われ、国際的にも高く評価されていることが判る。レドックスフローを用いた創薬技術開発や新規食品機能性成分の探索が民間企業との共同研究で行われているが、本研究課題に関する特許出願は行われていない。

##### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

世界トップレベルのペルオキシソーム構築の研究を背景に、メタボローム解析手法を取り入れて代謝の面からペルオキシソームの形成・分解(ホメオスタシス)と機能の分子機構に向けて新しい道を開拓したことは、学術的に質の高いインパクトある成果であり、戦略目標への貢献も大きいものと言える。蛍光色素を用いて細胞内の酸化還元状態を実時間で観測するレドックスフローの開発は、今後、応用範囲が広がる可能性があり、技術的インパクトのある成果である。

##### 4-3. 総合的評価

ペルオキシソームの形成・分解(ホメオスタシス)と機能の分子機構に向け、動物、酵母、植物を対象として代謝の視点を軸として広範に研究を展開し、独創性の高い多数の成果を挙げたものとして高く評価できる。低分子代謝動態とオルガネラホメオスタシスの関連性に着目した点、方法論としては種々のペルオキシソーム変異株細胞の樹立、メタボローム解析の導入、レドックスフローの開発を行った点でオリジナリティーが高い。一方、研究対象が広範になったため、それぞれの研究はオリジナリティーが高いものの、さらに踏み込んだ解析が待たれる部分も多数残されている。今後、これらを解決し、新しい概念の提案などを含む成果を、さらに質の高いジャーナルで発表されることを期待する。藤木グループと阪井グループは、メタボローム解析とレドックスフローによる細胞内酸化還元の測定を通じて研究協力を推進し、酵母細胞と動物細胞がペルオキシソーム欠損により共に還元的異常を呈することを解明することに成功した点も評価できる。