

細胞内小器官ペルオキシソーム：エーテルリン脂質の生合成と 酸素ラジカルスカベンジャー機能及び欠損症

九州大学 理学部

藤 木 幸 夫

We have isolated peroxisome biogenesis mutants from Chinese hamster ovary (CHO) cells by the 9- (1'-pyrene) nonanol/ultraviolet (P9OH/UV) method, using the wild-type CHO-K1 cells that had been stably transfected with cDNA encoding peroxisome assembly factor-1 (PAF-1). Nine P9OH/UV-resistant cell clones, ZP104, ZP105, ZP106, ZP107, ZP108, ZP109, ZP110, ZP111, and ZP114, were isolated and examined for intracellular location of catalase, a peroxisomal matrix enzyme, by immunofluorescence microscopy using anti-catalase antibody. These mutant cell clones showed cytosolic localization of catalase, apparently indicating the defect of peroxisome biogenesis. Mutants lacking morphologically recognizable peroxisomes also showed typical peroxisome assembly-defective phenotype such as severe loss of catalase latency and resistance to 12- (1'-pyrene) dodecanoic acid (P12) /UV treatment. By transfection of cDNAs for PAF-1 and PAF-2 and cell fusion analysis between the CHO cell mutants including previously isolated Z24, Z65, and ZP92, six mutants, ZP105, ZP104 and ZP109, ZP110 and ZP111, and ZP114 were found to belong to four novel complementation groups, respectively. Complementation analysis with fibroblasts from patients with peroxisome biogenesis disorders such as Zellweger syndrome revealed that ZP105 and ZP104/ZP109 were found to be in the same complementation group as human groups II and III, respectively. Furthermore, ZP110/ZP111 and ZP114 were not classified to any of ten human complementation groups, indicating that these two groups of mutants are in the 11th and 12th complementation groups in mammals. Thus, the newly isolated CHO cell mutants defective in peroxisome biogenesis would be very useful for not only isolating peroxisome biogenesis factors but also delineating pathogenic genes responsible for peroxisome biogenesis disorders.

1 緒 言

ペルオキシソーム (peroxisome) は、真核細胞に広く分布する一重の単位膜で囲まれた球状ないし楕円形の直径0.3から1 μ mの細胞内小器官 (オルガネラ) である。その生理的機能は過酸化水素の生成を伴う酸化反応 (呼吸反応) の他、脂肪酸の β 酸化、特に最近注目されている極長鎖脂肪酸 (炭素鎖C₂₂以上) の短鎖化、プラスマローゲンなどエーテルリン脂質の合成、胆汁酸の生合成など多岐にわたる¹⁾。一方、ペルオキシソーム機能の障害は遺伝性の致死的疾患をもたらすことが判明し、このオルガネラは生体機能に不可欠と考えられるに至っている。先天性代謝異常症ペルオキシ

ソーム病には、副腎白質ジストロフィー (ALD) などの単一酵素欠損症、rhizomelic chondrodysplasia punctataなどの複数酵素異常症およびペルオキシソーム欠損症がある。そのうち最も重篤なものはZellweger症候群や新生児型ALDなどいわゆるペルオキシソーム欠損症であり、平均寿命も1年未滿と非常に短く、常染色体劣性遺伝病として現在までに10の相補性群が報告されている^{2), 3)}。ペルオキシソームの形成機構については、細胞質の遊離型ポリソームで合成された構成タンパク質が翻訳後すでに細胞内に存在しているペルオキシソームに移送された後、成長、分裂により増殖していくというモデルが現在受け入れられている⁴⁾。また我々は、一群のペルオキシソームタンパク質の共通C末端3アミノ酸配列Ser/Ala-Lys/Arg/His-Ser-COOH (SKLモチーフ) がペルオキシソーム局在化シグナルであることもin vitroタンパク質輸送系、遺伝子工学的手法を用いて見出した^{3), 5)}。その他、ペルオキシソームの生合成機構やヒト欠損症病因解明を目的として、我々はヒト



Peroxisome : biogenesis of phospholipids, oxygen radical scavenger, and peroxisome biogenesis disorders

Yukio Fujiki,

Kyushu University Faculty of Science

ペルオキシソーム欠損症患児由来細胞と同じ表現型を示す3つの相補性群に属するペルオキシソーム欠損性 CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞株、Z24、Z65およびZP92を現在までに分離している^{6),7)}(図1)。その1つ、Z65細胞に対しペルオキシソームの形成を回復させる cDNA を遺伝学的相補活性を指標にしてクローニングし、その遺伝子産物を Peroxisome Assembly Factor-1 (PAF-1、ペルオキシソーム形成因子-1) と名付けた⁸⁾。また、この CHO 変異細胞と同じ相補性群 (日本 F 群、アメリカ X 群、ヨーロッパ 5 群) の Zellweger 症候群の患児由来線維芽細胞に対し、PAF-1 cDNA はペルオキシソームの形成を相補した。つぎに、この患者細胞由来の PAF-1 遺伝子を解析したところ、119Arg (CGA) が stop codon (TGA) に点突然変異したいわゆる homozygous nonsense mutation のためペルオキシソーム形成能を有しないことが判明した⁹⁾。すなわち、世界で初めてこの病態の原因遺伝子が解明されたことになる³⁾。さらに両親は共に同じ部位に変異をもつ heterozygous mutation であることも明らかにし、Zellweger 症候群が劣性遺伝病であることも分子レベルで証明した⁹⁾。また、変異細

胞 ZP92 に対しては、最近、相補活性を有する PAF-2 cDNA のクローニングに成功している¹⁰⁾。

本研究では、以下の項目を研究目的とした。

- 1.1 ペルオキシソームの形成機構と病因遺伝子の解明における CHO 変異細胞の有効性が実証されたことから、さらにより多くの新しい相補性群に属するペルオキシソーム欠損性 CHO 変異細胞の分離を試みる。
- 1.2 新しく分離された CHO 変異細胞に対し、CHO 細胞間およびヒトペルオキシソーム欠損症患者由来線維芽細胞との間で細胞融合法などにより相補性群を明らかにする。
- 1.3 CHO 変異細胞の異常を正常化する相補遺伝子を単離するとともに、正常細胞との比較によりペルオキシソームの機能とくにプラスマローゲンの生合成とその機能について追究する。

2 実験

上記目的解明へ向けて、以下の手法を用いた。

- 2.1 新たなペルオキシソーム欠損性 CHO 細胞株の分離：ヒトの先天性ペルオキシソーム欠損症には現在少なくとも約 10 種類の相補性

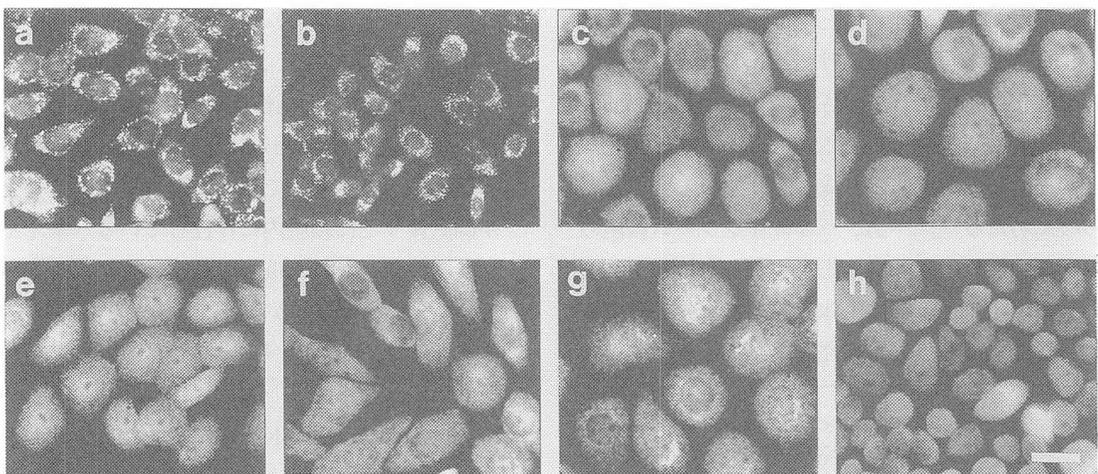


図1 CHO 細胞野生株とペルオキシソーム欠損性変異細胞の表現型

ペルオキシソームマトリック酵素、カタラーゼは変異細胞ではサイトゾールに局在し、ペルオキシソームが認められない。a, CHO-K1 野生株； b, PAF-1 安定表現型野生株； c, 変異細胞 ZP104； d, ZP105； e, ZP109； f, ZP110； g, ZP111； h, ZP114

群が知られているので、すでに分離している3つの相補性群CHO変異細胞に加えて、多くのペルオキシソーム欠損性変異細胞株を得るため、先に有用性を示した9-(1'-pyrene)nonanol (P9OH)/UV法などいわゆる変異株選択法を用いて変異細胞株の分離を試みた。但し、PAF-1cDNAのクローニングに用いたCHO変異細胞Z65と同じ相補性群に属する変異細胞の高頻度な分離を避けるため、CHO細胞(野生株)に予めペルオキシソーム形成因子-1 (PAF-1) cDNAを導入しておき変異原処理に供した。

2.2 ペルオキシソーム欠損性CHO変異細胞の相補群解析:新たに分離されたペルオキシソーム欠損性CHO変異細胞株について、CHO変異細胞間にみならず、ペルオキシソーム欠損症患者由来線維芽細胞との間ですべての組み合わせについて相補性群分類を行った。その方法としては、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法および現在すでにクローニングされているPAF-1、PAF-2のcDNA導入トランスフェクション法を併用した。

3 結果と考察

3.1 ペルオキシソーム欠損性CHO変異細胞株の分離と生化学解析^{11,12)}

P9OH/UV耐性細胞の中からペルオキシソームのマトリクスタンパク質であるカタラーゼに対する抗体を用いた蛍光抗体染色でペルオキシソームの有無を顕微鏡下で確認したところ、明らかにペルオキシソームを欠損シカタラーゼがサイトゾールに局在した9つの変異細胞、ZP104、ZP105、ZP106、ZP107、ZP108、ZP109、ZP110、ZP111およびZP114を得ることができた。さらにこれらの変異細胞について、細胞生化学的諸性質を検討したところ、ペルオキシソーム β -酸化系酵素のプロセッシング異常や12-(1'-pyrene) dodecanoic acid (P12)/UV処理に対する高い感受性など生化学的にも先に分離した変異細胞Z24、Z65お

びZP92と同様の表現型を示し、ペルオキシソーム欠損性変異細胞と推定された。

3.2 相補性群分類^{11,12)}

つぎに、これらの新たに分離したCHO変異細胞および先に分離したZ24、Z65、ZP92を含めた細胞間相補性群解析を相補遺伝子導入法および細胞融合法により検討した。ZP92相補遺伝子であるPAF-2 cDNAのトランスフェクションではZP106に対してのみペルオキシソームの形成が観察されたことから、ZP106はZP92と同じ相補性群に属することが明らかになった。またPAF-1 cDNAのトランスフェクションではいずれの細胞もその異常が相補されなかったことから、Z65と同一相補性群の変異細胞は期待通り分離されなかったことになる。一方、細胞融合法による検討では、ZP107およびZP108はZ24との融合ではペルオキシソーム形成は認められず、Z24と同じ相補性群であることが明らかとなった。ZP104とZP109およびZP110とZP111はそれぞれ融合により相補できず同一相補性群であると判定した。ZP105およびZP114はいずれの細胞との融合によってもペルオキシソームが形成されたことから、それらいずれの細胞とも異なる相補性群に属することが判明した(表1)。

さらに患者由来細胞との融合試験から、ZP105はヒト相補性群II群(アメリカ)と、ZP104およびZP109はIII群とそれぞれ同じ相補性群に属することも明らかになった。ついで、ZP110とZP111およびZP114については、先に報告されているCHOおよびヒトのいずれの相補性群にも属さない、哺乳動物細胞における第11番目、第12番目の相補性群変異細胞であることも判明した。

以上の結果から、分離法の改良により新たなペルオキシソーム欠損性CHO変異細胞が効率よく得られることが実証されたことになり、この系を用いたさらに多くのペルオキシソーム欠損性CHO変異細胞の分離が期待される。ヒト相補性

表1 ペルオキシソーム欠損症相補性群と CHO 変異細胞および相補遺伝子

ヒト			相補性群臨床型	CHO変異細胞	相補遺伝子
日本	アメリカ	オランダ			
A	VIII		ZS, NALD, IRD		
B	VII		ZS, NALD		
C	IV	3	ZS	ZP92	PAF-2
D	IX		ZS		
E	I	2	ZS, NALD, IRD	Z24	
F	X	5	ZS	Z65	PAF-1
	II	4	ZS, NALD	(ZP105)	PTS1R
	III		ZS	(ZP104,ZP109)	
	VI		IRD		
G			ZS		
				(ZP110,ZP111)	
				(ZP114)	

ZS: Zellweger 症候群 NALD: 新生児型副腎白質ジストロフィー IRD: 乳児型 Refsum 病

群に属する2種の変異細胞 ZP105 および ZP104/ ZP109 を用いた病因解析や ZP110/ ZP111 細胞並びに ZP114 は2つの新しい哺乳動物細胞相補性群に属するペルオキシソーム欠損性 CHO 変異細胞であることが証明されたことからこれらを相補する新たなペルオキシソーム形成因子の単離につながると考えられる。さらにこれら動物細胞はプラズマローゲンの合成とその機能などまだ不明なペルオキシソームの生化学的研究にも有用であり、今後これらの点についても追究したい。

4 総括

本研究では新たな相補性群に属するペルオキシソーム欠損性 CHO 変異細胞の分離を、9-(1'-pyrene) nonanol (P9OH) /UV法を用いて試みた。その結果、多くの P9OH/UV耐性細胞からカタラーゼ抗体染色検定法により9つ (ZP104 ~ ZP114) の典型的なペルオキシソーム欠損性変異細胞を同定、分離した。これらの変異細胞について、既存の3種を含め CHO 変異細胞間およびペルオキシソーム欠損症患者由来線維芽細胞との細胞融合法等による相補性群解析の結果、ZP105、ZP104とZP109はそれぞれヒト相補性群II群、III

群と同じ相補性群に属すること、ZP110とZP111 および ZP114 はヒトを含む哺乳動物細胞における新たな2つ (第11、12番目) の相補性群変異細胞であることが明らかとなった。今後これらの変異細胞は相補遺伝子の単離など、ペルオキシソーム形成機構やプラズマローゲン等のラジカルスカベンジャー機能の解明への有用性が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、御援助を頂いた財団法人コストロロジー研究振興財団に謝意を表します。

引用文献

- 1) 藤木幸夫: ペルオキシソームの形成機構とペルオキシソーム病. 生化学 67:204 - 223 (1995).
- 2) 藤木幸夫: ペルオキシソーム病の遺伝子診断「遺伝子診断—その現状と展望」. 医学のあゆみ 174: 477 - 483 (1995).
- 3) Fujiki, Y.: Peroxisomal topogenic signals and the etiology of peroxisome - deficient disease. In Membrane Protein Transport (Rothman, S., ed.) JAI Press, Greenwich, 1996, vol. 3, 213 -

- 229.
- 4) Lazarow, P. B. and Fujiki, Y.: Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 489-530 (1985).
 - 5) Miura, S., Kasuya - Arai, I., Mori, H., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., and Fujiki, Y.: C - Terminal consensus Ser - Lys - Leu - related tripeptide of peroxisomal proteins functions in vitro as a minimal peroxisome - targeting signal. *J. Biol. Chem.* 267, 14405 - 14411 (1992).
 - 6) Tsukamoto, T., Yokota, S. and Fujiki, Y.: Isolation and characterization of Chinese hamster ovary cell mutants defective in assembly of peroxisomes. *J. Cell. Biol.* 110, 651 - 660 (1990).
 - 7) Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Suzuki, Y., Orii, T., and Fujiki, Y.: Animal cell mutants represent two complementation groups of peroxisome - defective Zellweger syndrome. *J. Clin. Invest.* 90: 1864 - 1870 (1992).
 - 8) Tsukamoto, T., Miura, S. and Fujiki, Y.: Restoration by a 35K membrane protein of peroxisome assembly in a peroxisome - deficient mammalian cell mutant. *Nature* 350, 77 - 81 (1991).
 - 9) Simozawa, N., Tsukamoto, T., Suzuki, Y., Orii, T., Shirayoshi, Y., Mori, T., and Fujiki, Y.: A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly. *Science*, 255, 1132 - 1134 (1992).
 - 10) Tsukamoto, T. Miura, S., Nakai, T., Yokota, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Orii, T., Fujiki, Y., Sakai, F., Bogaki, A., Yasumo, H., and Osumi, T.: Peroxisome assembly factor - 2, a putative ATPase cloned by functional complementation on a peroxisome - deficient mammalian cell mutant. *Nature Genet.* 11, 395 - 401 (1995).
 - 11) Okumoto, K., Bogaki, A., Tateishi, K., Tsukamoto, T., Osumi, T., Shimozawa N., Suzuki, Y., Orii, T. and Fujiki, Y.: Isolation and characterization of peroxisome - deficient Chinese hamster ovary cell mutants representing human complementation group III. *Exp. Cell Res.* 233, in press (1997).
 - 12) Tateishi, K., Okumoto, K., Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Osumi, T., Suzuki, Y., Kondo, N., Okano, I. and Fujiki, Y.: Newly identified Chinese hamster ovary cell mutants defective in peroxisome biogenesis represent two novel complementation groups in mammals. *Eur. J. Cell Biol.*, in press (1997).