

博士論文（要約）

ペルオキシソームによる
ミトコンドリアの動態及び機能制御の解明

田中 秀明

【序論】

ペルオキシソームはほぼ全ての細胞が持つ一重膜に包まれたオルガネラであり、過酸化水素の代謝や脂肪酸の酸化など主に細胞内の代謝経路の調節機能を持つことが知られている。興味深いことに、ペルオキシソームの形成異常は **Zellweger 症候群 (ZS)**をはじめとする多様で重篤な疾患を引き起こす。**ZS** 患者は脳や肝臓、筋肉など多臓器の機能不全を患い、出生1年以内に死亡してしまう。このことから、ペルオキシソームの生体における重要性は明らかである。しかし、ペルオキシソーム欠損がどのようなメカニズムで **ZS** の症状を引き起こすかについてはほとんどわかっておらず、その機能には未だに謎が多い。

私は本研究で、「ペルオキシソームがミトコンドリアの形態を伸長方向へと制御し、その機能を通じてカスパーゼ活性化および細胞死への感受性を制御している」という新しいオルガネラ間相互作用の存在を明らかにした。以下にその結果を示す。

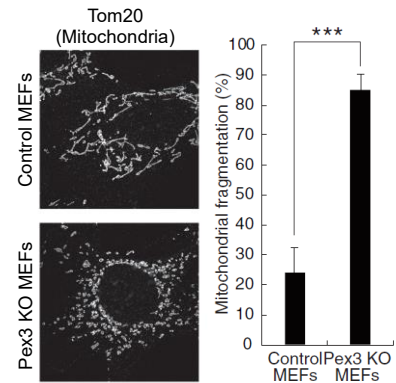


図 1: Pex3 遺伝子破壊によりミトコンドリアが断片化した

【実験方法・結果】

➤ ペルオキシソーム欠損によりミトコンドリアが断片化した

ペルオキシソームが担う未知の細胞機能を探索するために、私はペルオキシソーム生合成に必須な **Peroxin** 遺伝子の 1 つである **Pex3** の **KO** マウスからマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を樹立し観察した。ミトコンドリア外膜タンパク質 **Tom20** の細胞染色によってミトコンドリア形態を染色したところ、コントロール MEF においては **Tom20** シグナルがミトコンドリアに特徴的な細長い網目状であったのに対し、**Pex3 KO MEF** においては短く

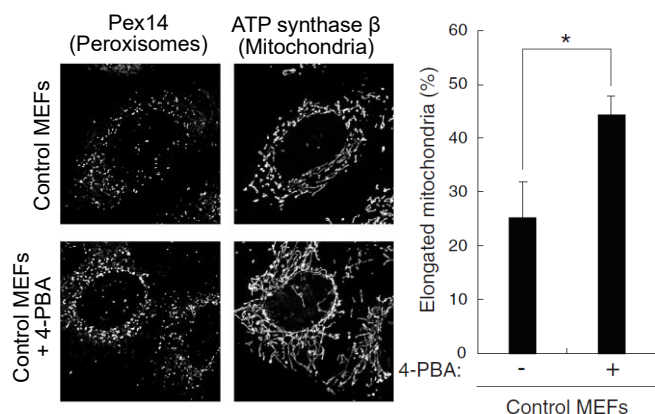


図 2: ペルオキシソーム増加薬剤(4-PBA)の添加によりミトコンドリアが伸長した

粒状であった (図 1)。他の **Peroxin** 遺伝子である **Pex5** や **Pex16** を **CRISPR/Cas9** によって **KO** した場合にもこれと同様の結果が得られた。以上より、ペルオキシソームの機能欠損によってミトコンドリアが断片化することが示された。

➤ ペルオキシソーム増加薬剤 4-PBA によりミトコンドリアが伸長した

次に、ペルオキシソームを増加させる薬剤である **4-PBA** を細胞に添加したところミトコンドリアが伸長している様子が観察された (図 2)。**4-PBA** によるミトコンドリアの伸長はペルオキシソーム欠損細胞では観察されなかったため、このミトコンドリア伸長は確かにペルオキシソーム依存的事であることが分かった。この結果から、ペルオキシソームが積極的にミトコンドリアの動態を伸長方向へと制御していることが示唆された。

➤ ペルオキシソーム-ミトコンドリアの強制接触によりミトコンドリアが伸長した

私はペルオキシソームがミトコンドリアの融合を促進するメカニズム候補として、ペルオキシソーム-ミトコンドリアの接触に注目した。その可能性を検証するため、ペルオキシソームとミトコンドリアの人工繫留分子として、**Pex13** の膜貫通ドメインと **AKAP1** のミトコンドリア移行ドメインを持つ **EGFP** たんぱく質(**PM tether** と称する)を細胞に発現させた。すると、実際にミトコンドリアとペルオキシソームの接触が増加した上に、ミトコンドリアの伸長がみられた (図 3)。以上の結果から、ペルオキシソームはミトコンドリアと接触することでその動態を伸長方向に制御する可能性が示唆された。

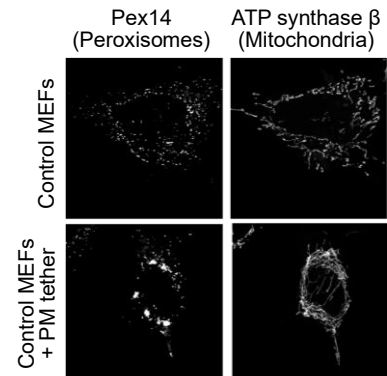


図 3: Peroxisome-Mitochondria 人工繫留分子 (PM tether) の強制発現によりミトコンドリアが伸長した

➤ ペルオキシソーム欠損細胞におけるミトコンドリア上の **Drp1** 量の増加がミトコンドリア断片化に寄与していた

次に私は、ペルオキシソームによるミトコンドリア伸長のメカニズムの候補として、**Drp1** 分子を介した分裂抑制の可能性を検討した。**Drp1** はミトコンドリアの分裂因子として知られているが、他にペルオキシソームにも局在し、その分裂も担っている。そのため、通常の細胞ではペルオキシソームがミトコンドリアに接触することでミトコンドリア上の **Drp1** を競合的に阻害する可能性を考えた。もしそうだとすれば、ペルオキシソーム欠損細胞では **Drp1** はミトコンドリア上に局在を増加させることが考えられる。そこで

Drp1 の局在を調べたところ、**Pex3 KO MEF** ではミトコンドリアと **Drp1** の共局在が有意に増加していた (図 4 左)。このことから、ペルオキシソーム欠損によりミトコンドリア上に **Drp1** が増加することが示唆された。更に **Drp1** をノックダウンすると、**Pex3 KO** によるミトコンドリア断片化は抑制される (図 4 右) ことが分かった。以上より、ペルオキシソームは **Drp1** 依存的にミトコンドリアの形態を制御する可能性が示唆された。

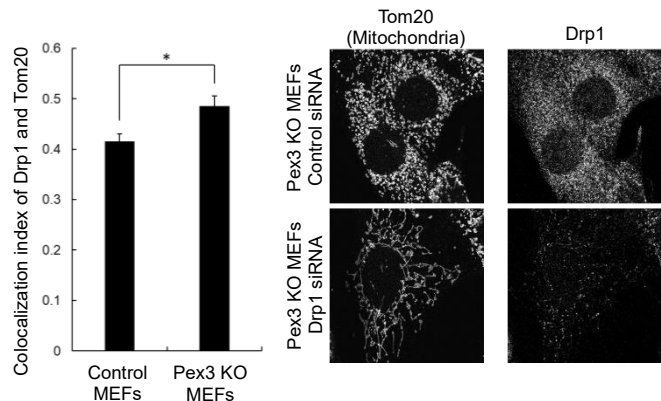


図 4: Pex3 KO MEF におけるミトコンドリア上の **Drp1** 量の増加がミトコンドリア断片化に寄与していた

➤ ペルオキシソーム欠損により **Cytochrome C** が細胞質に拡散した

ミトコンドリアの断片化は、**Cytochrome C** (**CytC**)をはじめとするミトコンドリア膜間腔たんぱく質の細胞質への放出と、それに続く細胞死経路の活性化と関連付けられている。ペルオキシソ

ーム欠損によりミトコンドリアが断片化していたため、同様に **CytC** の局在を調べたところ、**Pex3 KO MEF** において **CytC** のシグナルはミトコンドリアの他、細胞質にも観察されることが分かった（図 5）。この結果を他の **Pex** 遺伝子欠損細胞で検証すると、**Pex5**, **Pex16 KO** 細胞でも同様に **CytC** の細胞質への漏出が観察された。以上より、ペルオキシソームが **CytC** のミトコンドリア局在に重要であることが示唆された。

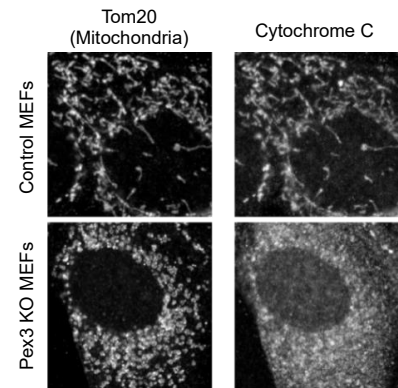


図 5: **Pex3 KO** により **CytC** が細胞質に拡散した

➤ ペルオキシソーム欠損によりカスパーゼが活性化した細胞質への **CytC** 放出はカスパーゼを活性化し、アポトーシスを誘導することが知られている。興味深いことに、**Pex3 KO MEF** ではコントロール **MEF** に比べてアポトーシスの割合は変化していなかったものの、カスパーゼ 9、3 が活性化していた（図 6）。そこで次に **Pex3 KO MEF** における低レベルのカスパーゼの活性化が、アポトーシスシグナルへの感受性を上げている可能性について検討した。実際に、DNA 損傷試薬であるエトポシドを添加すると、**Pex3 KO MEF** ではコントロール **MEF** に比べアポトーシス細胞が著しく増加することが観察された。このことから、ペルオキシソームの欠損はそれ自身がアポトーシスを誘導することは無いが、細胞のストレスに対する感受性を亢進させる可能性が示唆された。

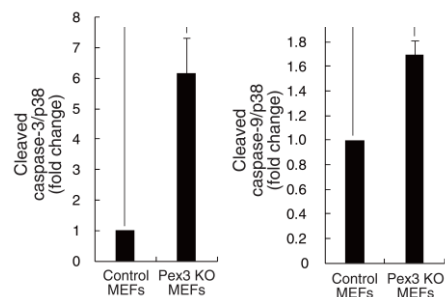


図 6: **Pex3 KO** により活性化型カスパーゼの量が増加した

➤ プルキンエ細胞特異的 **Pex3** の欠損によりプルキンエ細胞の変性・ミトコンドリアの細胞内局在の異常が観察された

今までの結果から、マウス線維芽細胞においてペルオキシソームがミトコンドリアの形態を制御していることが示唆されている。では、この機能は生体内でどのような役割を果たしているのだろうか。私はペルオキシソーム欠損モデルマウスで異常が観察されている小脳プルキンエ細胞に注目し、プルキンエ細胞特異的 **Cre** ドライバーの **Glud2-Cre** を用いて、**Pex3** をプルキンエ細胞特異的にノックアウトした。実際、このマウ

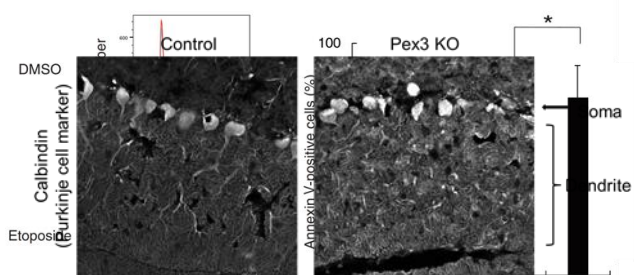


図 8: プルキンエ細胞での **Pex3 KO** により樹状突起・細胞体に異常が生じた

図 7: **Pex3 KO** により DNA 損傷刺激によるアポトーシスが増加した

スの小脳を観察するとペルオキシソームはプルキンエ細胞では消失しているが、その他の細胞では特に変化が見られなかったため、実際にこのマウスでは **Pex3** がプルキンエ細胞特異的に欠損していることが示唆された。このマウスにおいてプルキンエ細胞の形態を観察すると、**Control** マウスのプルキンエ細胞では細胞体や樹状突起が整然と秩序だって並んでいる一方で、**Pex3** 欠損マ

ウスのプルキンエ細胞では細胞体の並びや樹状突起の配向性における整然さが失われ、無秩序に並んでいる様子が観察された（図 8）。この結果から、プルキンエ細胞の持つペルオキシソームが、正常なプルキンエ細胞の発達や樹状突起の生育に必要であることが示唆された。次に、ミトコンドリアの形態に異常が生じるとことで、神経細胞の樹状突起や軸索にミトコンドリアが正しく輸送できなくなることが知られているため、プルキンエ細胞におけるミトコンドリアの細胞内局在を観察した。すると、ミトコンドリア局在を細胞体と樹状突起で比較すると、**Control** マウスと比較して **Pex3** 欠損マウスのプルキンエ細胞では細胞体のミトコンドリアが増加傾向、樹状突起のミトコンドリアが減少傾向にあった（図 9）。これらの結果から、ペルオキシソームは小脳プルキンエ細胞においてもミトコンドリアの動態を制御し、プルキンエ細胞の正常な発達に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【本研究のまとめと展望】

本研究により、ペルオキシソームはミトコンドリアの動態を伸長方向に制御し、カスパーゼ活性化機能を抑制するのに必須であり、ペルオキシソーム欠損がミトコンドリア断片化及びストレス脆弱性の原因となることが示唆された（図 10）。

ZS では神経系において特に重篤な機能不全が生じることが知られているが、そのメカニズムは明らかになっていない。私は「ペルオキシソームによるミトコンドリアの動態・機能制御」が破綻することで、神経細胞におけるミトコンドリア形態異常及び不要なアポトーシスが亢進し、それらが **ZS** の神経症状に寄与する可能性を考えている。実際 **Pex3 KO** マウスの小脳プルキンエ細胞において樹状突起の形態異常や、ミトコンドリアの局在異常、小脳形態の異常が観察されている。この可能性をさらに検証し **ZS** の発症メカニズムに迫ることによって、**ZS** の治療法開発の一助になると期待している。

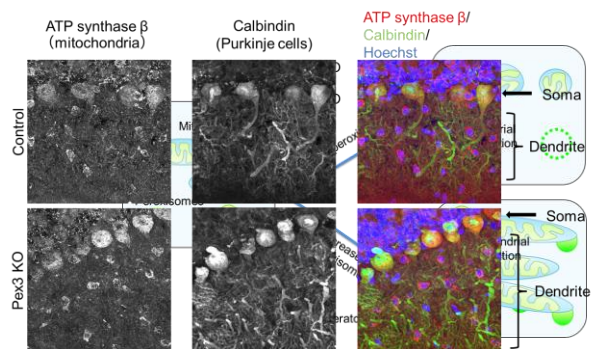


図 9: プルキンエ細胞での **Pex3 KO** によりミトコンドリアの細胞内局在に異常が生じた

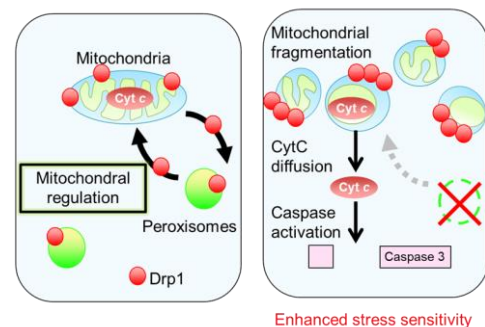


図 10: 本研究のまとめ