

Thesis

新規ペルオキシソームタンパク質の同定とその機能解析

生物・医学研究系 ゲノム医学

水野 由美

ペルオキシソームは真核細胞に広くみられる細胞内小器官の一つで、超長鎖脂肪酸の β -酸化やコレステロールの酸化、胆汁酸合成など重要な機能を担っている。しかし、ペルオキシソームに存在するタンパク質及びその機能については不明な点が多い。そこでペルオキシソームに存在する可能性の高いタンパク質をバイオインフォマティクスを用いた手法により予測し、このうち8種類の候補タンパク質の細胞内局在を観察した。その結果、Tysnd1およびZadh2の2種類がペルオキシソームに局在していることを証明した。同定した2種類の新規ペルオキシソームタンパク質のうちTysnd1は、さらに解析を進め、超長鎖脂肪酸の β -酸化に関わる代謝酵素群を切断して活性化するペルオキシソームプロセッシングプロテアーゼであることを突き止めた。また、Tysnd1の機能が超長鎖脂肪酸の β -酸化の反応速度あるいは個体の表現型にどのような影響を与えるかを解明するために、Tysnd1欠損マウスを作製し機能解析を行った。その結果、Tysnd1の欠損はペルオキシソームにおける超長鎖脂肪酸の β -酸化活性の低下をもたらすことから、Tysnd1の存在により β -酸化反応は促進すると考えられる。さらに、Tysnd1欠損マウスでは雄性不妊を発症する事が明らかになった。これは、Tysnd1の機能不全により超長鎖脂肪酸の代謝が低下し、その代謝経路の下流にあるプラスマローゲン合成経路が影響を受けたためと強く推測される。

緒言

ペルオキシソームは細胞内小器官の一つであり、超長鎖脂肪酸の β -酸化や分岐鎖脂肪酸の α -酸化¹⁾、胆汁酸合成、プラスマローゲン合成²⁾などの重要な働きを持つ。また、ペルオキシソーム欠損症をはじめとするペルオキシソーム病では幼少期より神経症状等が現れ、予後不良な場合が多い。従って、ペルオキシソームの生体内での役割は非常に重要であることが考えられる。しかし、これまでに報告されているペルオキシソームで働くタンパク質の数は少なく、またその機能についても知られていない部分が多い。そこで本研究ではペルオキシソームに局在する新規タンパク質を同定し、その機能解析を行うことで、ペルオキシソームに関連する疾患の原因や治療に将来的に役立つような基礎的知見を得ることを目的とした。

ペルオキシソームはDNA合成能やタンパク質合成能を持っていないため、ペルオキシソームマトリクスに局在するタンパク質は細胞質あるいは小胞体よりペルオキシソームに運搬される必要がある³⁾。このため

ペルオキシソームマトリクスタンパク質は局在化シグナル (peroxisome targeting signal; PTS) を持つという特徴がある⁴⁾。PTSにはタンパク質のC末端側に共通配列があるPTS1と、N末端側に共通配列があるPTS2の2種類があることがこれまでに知られている⁴⁾。PTS1は多くのペルオキシソームタンパク質に存在し、SKLに代表されるような3つのアミノ酸配列からなる共通配列、[SAGCN]-[RKH]-[LIVMAF]で構成される^{5,6)}。PTS2を有するタンパク質はこれまでに8種類が知られており、[RK]-[LVQI]-X-X-[LVIHQ]-[LSGAK]-X-[HQ]-[LAF]という共通配列を持つ⁷⁾。本研究ではまず、このPTSと推測される配列を持つタンパク質をデータベースより抽出し、共通配列との相同性や疎水性、アノテーションの情報などからペルオキシソームに局在する可能性の高いものをペルオキシソームタンパク質候補として予測した。予測の結果は候補タンパク質の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察することで確かめた。細胞内局在の観察では、既知のペルオキシソームタンパク質と蛍光タンパク質であるDsRed2の融合タンパク質を安定発現する細胞株を作製し、ペルオキシソーム局在観察実験の高精度化と簡素化を試みた。その

結果, Tysnd1 (Trypsin domain containing 1) および, Zadh2 (Zinc containing alcohol dehydrogenase 2) の2つのタンパク質がペルオキシソームに局在することを証明した. このうち, 特にTysnd1についてさらに詳細な機能解析を行い, Tysnd1が超長鎖脂肪酸の β -酸化を行う酵素群を切断する事を哺乳類細胞を使った実験で証明した. また, Tysnd1を欠損したマウスを作製して表現型の解析を行い, ペルオキシソーム内 β -酸化活性の低下や雄性不妊症が起きる事を明らかにした.

材料と方法

ペルオキシソーム候補タンパク質の予測

PTS1タンパク質を持つ候補については2005年にKurochkinら⁸⁾が予測したデータを使用した. PTS2タンパク質の予測については, まず, GenBank(146.0)に記載されているmRNAのうち99アミノ酸以上を持つcoding sequence (CDS) より117354 CDSを抽出した. 抽出されたCDSについて, EMBOSS suite program (Regular expression;RE)⁹⁾とHMMbuild (HMM profile;HMM)¹⁰⁾の2種類を用いて, PTS2配列を持つタンパク質の絞り込みを行った. 得られた36の候補は, InterPro (release 9.0) による機能ドメインの検索, BLASTPによるアミノ酸配列の相同性の検索を行い, PSORTII¹¹⁾による細胞内局在機能予測プログラム, SOSUIやTMAPを使った疎水性や膜貫通ドメインの有無の予測を行い候補の絞り込みをした.

候補遺伝子のGFP発現ベクターへのクローニング

C57BL/J雄マウス肝臓より抽出した全RNAの逆転写産物, またはRIKEN Mouse Genome Encyclopedia DNAbank (ダナフォーム), またはHuman whole brain Marathon-Ready cDNA (BD Biosciences, Clontech) を鋳型として, 候補遺伝子のタンパク質コード領域をPCR法により増幅した. 得られたPCR産物は, PTS1候補タンパク質についてはpcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (Invitrogen) に, PTS2候補タンパク質についてはpcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen) にそれぞれクローニングした.

細胞培養

チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO-K1細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより得た. 培養はDulbecco's modified Eagle's Medium (GIBCO) 及び, 10% (v/v) 仔牛血清 (Bio West), 0.1 mM non-essential amino acid (GIBCO) を含む培地で37°C, 5% CO₂の条件で行った.

トランスフェクション

トランスフェクションの1日前に90-95%のコンフルエントとなるように細胞を6穴プレートに播き, 抗生物質を含まない培地で培養した. トランスフェクションはLipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて行った. トランスフェクション後4-6時間で抗生物質

を含まない新しい培地に交換した.

ペルオキシソームタンパク質安定発現細胞株の作製

CHO-K1細胞にペルオキシソームに局在するタンパク質とDsRed2の融合タンパク質を発現するベクターであるpDsRed2-Peroxi (BD Bioscience Clontech) をトランスフェクションし, G418にて選択を行った. 2週間後, 96穴プレートに細胞を播き, 蛍光顕微鏡による観察で赤い蛍光を発する細胞のみのウェルから細胞を継代してCHO-perRed細胞とした.

共焦点顕微鏡を用いた細胞内局在の観察

細胞はカバーガラス上で培養及びトランスフェクションを行った. トランスフェクション後24時間で生細胞を共焦点顕微鏡 (TCS SP2;Leica) で観察した. GFPとDsRed2はそれぞれ488 nmと543 nmで励起して撮影した.

Tysnd1ノックアウトマウスの作製

Tysnd1ノックアウトマウスはアルテミス社(ドイツ)に依頼し作製した. Tysnd1遺伝子のエキソン2-3部分を削除した. 遺伝子改変マウスの使用および管理に関しては, 遺伝子組換え生物等の規則による生物多様性の確保に関する法律に基づき埼玉医科大学組換えDNA委員会および実験動物使用に関する指針に従って審査され, 承認を受けて施行した. *Tysnd1*^{-/-}マウスはヘテロマウス同士の掛け合わせより得た.

抗体

Tysnd1およびAcaa1 (Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1, prethiolase) ウサギポリクローナル抗体はKurochkin et al.¹²⁾ で使用したものと同一抗体(スクラム)を使用した. Acox1 (Acyl-Coenzyme A oxidase 1) ウサギポリクローナル抗体は116-129番目のアミノ酸を抗原としたAcox1抗体1と634-645番目のアミノ酸を抗原としたAcox1抗体2を作製し(スクラム)を使用した. Scp2 (Sterol carrier protein 2) ウサギポリクローナル抗体は480-494番目のアミノ酸を抗原として作製した(スクラム). Hsd17b4 (Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4) ウサギポリクローナル抗体は259-273番目のアミノ酸を抗原とするHsd17b4抗体1と484-497番目のアミノ酸を抗原とするHsd17b4抗体2を作製した(スクラム).

ウェスタンブロッティング

肝臓をプロテアーゼ阻害剤の入ったRIPA (Radioimmunoprecipitation assay) 緩衝液中で均質化し, 超音波破碎した後遠心してタンパク質試料とした. SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後, Immobilon P メンブレン (Millipore) に転移した. 検出はECL plus Western Blotting detection reagent (Amersham) で行った.

β -酸化活性測定

¹⁴Cで標識したリグノセリン酸(1-¹⁴C rignoceric acid; 室町薬品) またはパルミチン酸(1-¹⁴C palmitic acid; 室

町薬品)を用いて β -酸化活性を測定した。10週令の雄マウスの肝臓を0.25 M sucrose, 5 mM MOPS中でポッター型ホモジナイザーにて均質化後, 3000 xg で1分間遠心し, 上清を反応に使用した。反応はWatkinsら¹³⁾及び, Erolら¹⁴⁾と同じ反応組成液中で37℃にて60分間行った後, 1N KOHを反応液の1/5量加えて停止した。その後60℃に1時間置き, 脂肪酸を加水分解し, 過塩素酸を最終濃度6%になるように加え, 氷上に1時間置いた。遠心後, 酸性水溶液となったRI標識脂肪酸代謝産物をクロロホルム:メタノール2:1溶液で精製後, シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

パラフィン包埋と組織切片

組織の固定は4%PFA/PBSにて還流後一晩以上浸透して行った。PBS (phosphate buffer saline)にて洗浄後, 70 -100%エタノールで脱水し, さらにキシレン/エタノール, キシレンにて置換後パラフィンで包埋した。切片はミクロトームで8 -10 μ mに薄切し, スライドガラスに貼付けた。

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

パラフィン切片スライドはキシレンでパラフィンを除去した後, 100 -70%エタノールとPBSで水和し, ヘマトキシリン溶液, 続いてエオジン溶液にて染色後, エタノールにて脱水し封入した。

精子の観察

精巣上体尾部より採取した精子液に1/10量のMitoFluor Red 589(Molecular Probes)を入れ, 37℃ 15分間染色した。PBSにて洗浄後スライドガラスに塗抹

しDAPI入りの封入剤で封入した。観察は蛍光顕微鏡で行った。

結果

ペルオキシソームタンパク質候補

PTS2タンパク質について予測し, 14種類のタンパク質にまで絞り込みを行った¹⁵⁾。さらにクローニング可能であった5種類のタンパク質について細胞内局在解析を行った。PTS1タンパク質についてはKurochkinら⁸⁾が予測した候補タンパク質より3種類を選び, 同様に細胞内局在の解析を行った。

ペルオキシソームタンパク質安定発現細胞株の樹立

ペルオキシソームタンパク質候補の細胞内局在を迅速に観察するため, 細胞内のペルオキシソーム部位で蛍光を発する安定細胞株(CHO-perRed 細胞)を構築した。(Figure 1 A)。このCHO-perRed細胞に既知のペルオキシソームタンパク質であるThiolaseとGFPとの融合タンパク質を発現させることによりCHO-perRed細胞は確かにペルオキシソームで蛍光を発していることを確認した(Figure 1 B)。

Tysnd1およびZadh2はペルオキシソームタンパク質である

候補としたタンパク質のうち, Galk2, Qpctl, Styl3, Fut8, Ppp3ca, KBTBD10, Tysnd1, Zadh2について細胞内局在の解析を行った。これらの遺伝子についてGFP (Green fluorescence protein) との融合タンパク質発現ベクターを作製し, CHO-perRed細胞に導入して蛍

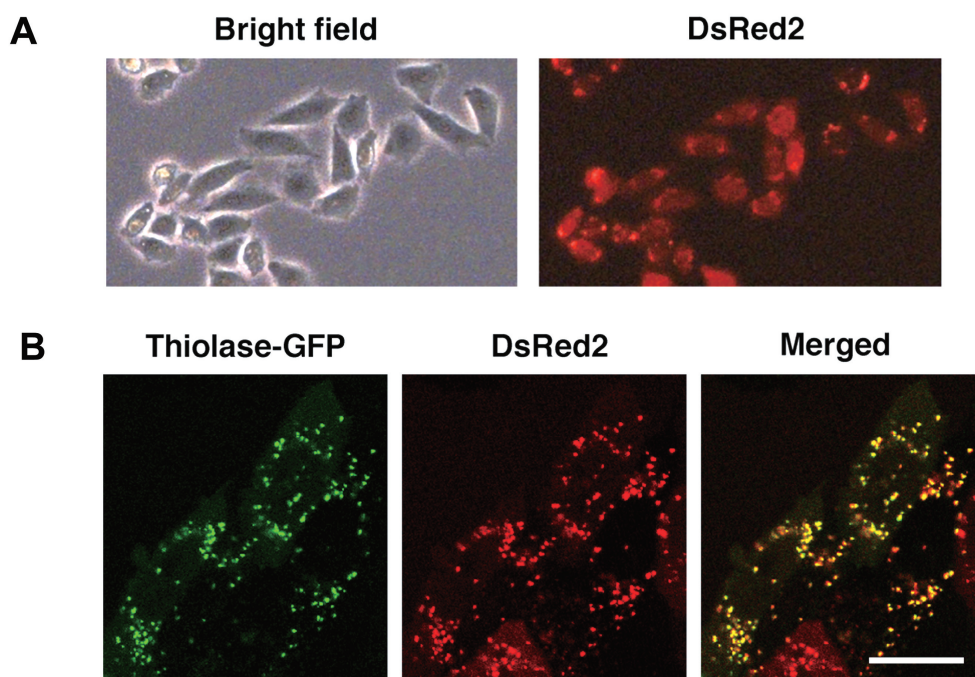


Figure 1. 樹立したペルオキシソームタンパク質安定発現細胞株 (CHO-perRed) (A) と CHO-perRed 細胞を用いた既知のペルオキシソームタンパク質であるThiolaseの細胞内局在 (B) を示した図。スケールバー (白線)は20 μ mを示す。

光部位を観察した。その結果, *Tysnd1*と*Zadh2*についてはGFPの蛍光部位がDsRed2との蛍光部位と重なることが示され, 確かにペルオキシソームに局在していることが示された (Figure 2 A). *Galk2*, *Qpct1*, *Syt13*, *KBTBD10*についてはGFPの蛍光部位が細胞質中に広がっていたことから, 細胞質に存在していることが示された (Figure 2 B). *Fut8*については核の周辺に限定して局在しており, ペルオキシソームとは共局在しなかった (Figure 2 B). *Ppp3ca*については細胞質中に凝集して存在し, ペルオキシソームに局在するかどうかの判断はできなかった (Figure 2 B). *Tysnd1*はタンパク質分解酵素であるトリプシン酵素の構造ドメインを持つことが予測されていることから, *Tysnd1*がペルオキシソームタンパク質を切断するプロテアーゼである可能性があると考え, 機能解析を進めた。

***Tysnd1*はペルオキシソームタンパク質を切断するプロテアーゼである**

COS細胞に, *Tysnd1*と, ペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化に関わる酵素群(*Acox1*, *Hsd17b4*, *Scp2*, *Acaa1*)の遺伝子の発現ベクターの一つずつをCOS細胞に共トランスフェクションし, 切断型と非切断型をウェスタンブロッティングにより観察した。その結果*Tysnd1*発現ベクターの導入量を増やしていくにつれて各遺伝子の切断型の量が増加し¹²⁾ (Figure 3), *Tysnd1*がこれらのペルオキシソームタンパク質を切

断する酵素であることが示された。

***Tysnd1*ノックアウトマウスの作製**

Tysnd1^{-/-}マウスはヘテロ同士の掛け合わせにより得た。産仔はメンデルの法則に則った比率で出生した。遺伝子型をゲノムDNAを鋳型としたPCR法で同定した上で, さらに*Tysnd1*のmRNAとタンパク質の発現量をそれぞれ定量PCR (Figure 4 A) とウェスタンブロッティング (Figure 4 B) で調べ, *Tysnd1*^{-/-}マウスは確かに*Tysnd1*を欠損していることを確認した。*Tysnd1*^{-/-}マウスと野生型では体重差は見られなかった (Figure 4 C). *Tysnd1*^{-/-}雌は妊孕性があり, 野生型と変わりなく妊娠出産したが, *Tysnd1*^{-/-}雄は不妊であった。

***Tysnd1*が欠損すると切断型の基質が生成しない**

Tysnd1^{-/-}マウスの肝臓組織を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ, *Tysnd1*の基質である, *Acox1*, *Hsd17b4*, *Scp2*, *Acaa1*の全てにおいて非切断型のみが検出され, 切断型は検出されなかった (Figure 5). 野生型のマウスの肝臓組織では, 切断型と非切断型の両方が検出された。

***Tysnd1*を欠損するとペルオキシソームにおける脂肪酸の β -酸化活性が低下する**

ペルオキシソームにおける β -酸化活性について *Tysnd1*^{-/-}マウスと野生型で差異があるかを肝臓ホモジネートを使用して測定した。ペルオキシソームの

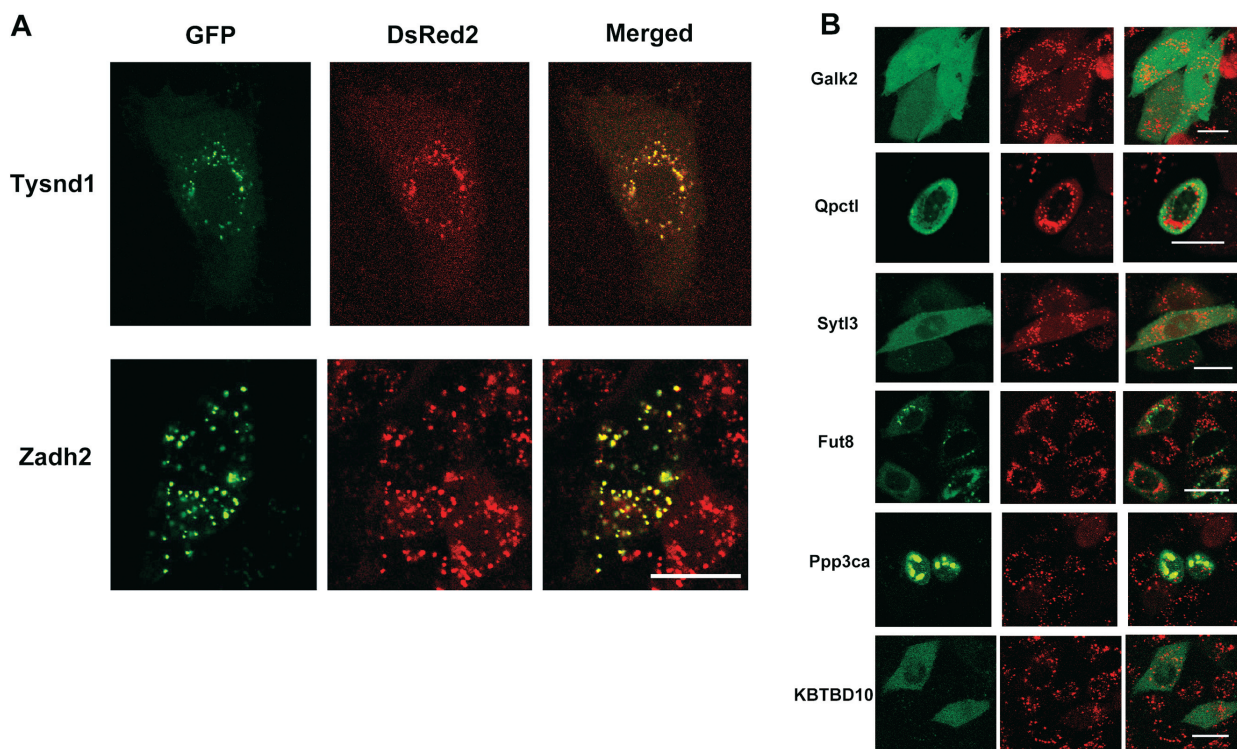


Figure 2. *Tysnd1*と*Zadh2*の細胞内局在解析 (A). ペルオキシソームマーカーであるDsRed2との共局在が確認された。*Galk2*, *Qpct1*, *Syt13*, *Fut8*, *Ppp3ca*, *KBTBD10*についてはペルオキシソームには局在しなかった (B). スケールバー (白線) は20 μ mを示す。

β -酸化活性は超長鎖脂肪酸であるリグノセリン酸を標識したものを基質とし、ミトコンドリアの β -酸化は長鎖脂肪酸であるパルミチン酸を標識したものを基質としてそれぞれ至適の反応液中で β -酸化反応を行い、その活性を定量した。その結果、*Tysnd1*^{-/-}マウスのペルオキシソーム β -酸化活性は野生型に比べて有意に低下していた(Figure 6 A)。ミトコンドリアでの β -酸化活性では有意な差は見られなかった(Figure 6 B)。これらの結果から、*Tysnd1*が欠損するとペルオキシソームにおける超長鎖脂肪酸の β -酸化活性が低下する事が確認された。

*Tysnd1*欠損マウスは雄性不妊である

Tysnd1^{+/-}及び*Tysnd1*^{-/-}マウスの妊孕性について調べた。C57BL/6 J雌と*Tysnd1*^{-/-}雄との交配実験では、プラグは確認されるものの、2ヶ月間交配しても18匹中1匹も妊娠および出産にまで至った個体は無かった(Table 1)。*Tysnd1*^{+/-}雄及び雌、*Tysnd1*^{-/-}雌には妊孕性があった(Table 1)。*Tysnd1*^{-/-}雄の精巣及び精巣上体の切片をヘマトキシリン・エオジン染色したところ、*Tysnd1*^{-/-}雄では精細管内に頭部の丸い精子が観察された(Figure 7 A)。さらに精子の状態を詳しく観察するため核と中片をそれぞれDAPIとMitoFluorRedで染色したところ、*Tysnd1*^{-/-}マウスでは頭部が丸い精子の他に、中片が頭部に巻き付くなどの奇形精子が多いことが分かった(Figure 7 B)。正常精子の数を計測したところ、野生型およびヘテロマウスでは90%以上が正常精子を持つのに対し、*Tysnd1*^{-/-}では非常に少ない数

しか正常精子を持たないことが分かった(Figure 7 C)。

考察

ペルオキシソームタンパク質を新規に同定する試みは質量分析法を用いた解析によりこれまでにも報告されているが^{16,17}、この方法で実際に同定できた新規ペルオキシソームタンパク質は少ない。従って、未知のペルオキシソームタンパク質をさらに同定するには、質量分析法以外の異なる方法を用いた探索が必要であると考えられた。そこで本研究では、まず、バイオフィンフォマティクスを用いた予測によりペルオキシソームタンパク質の検索を行った。絞り込んだ候補タンパク質のうち8種類について実際の細胞内局在を共焦点顕微鏡を使って観察したところ、*Tysnd1*と*Zadh2*の2つのタンパク質がペルオキシソームに局在していることが確かめられた(Figure 2 A)。このうち*Tysnd1*についてさらに詳細な機能解析を行った。これまでにペルオキシソームマトリクスタンパク質はペルオキシソームに運搬された後、何らかのプロセッシングプロテアーゼによる切断を受けることが報告されている¹⁸⁻²¹。しかし、このプロセッシングを行うプロテアーゼの実体についてはこれまで明らかにされていなかった。*Tysnd1*はトリプシン様のドメインを持つことがドメイン解析により予測されていることから、*Tysnd1*が、このペルオキシソームのプロセッシングプロテアーゼである可能性があると考え、さらに解析を進めた。

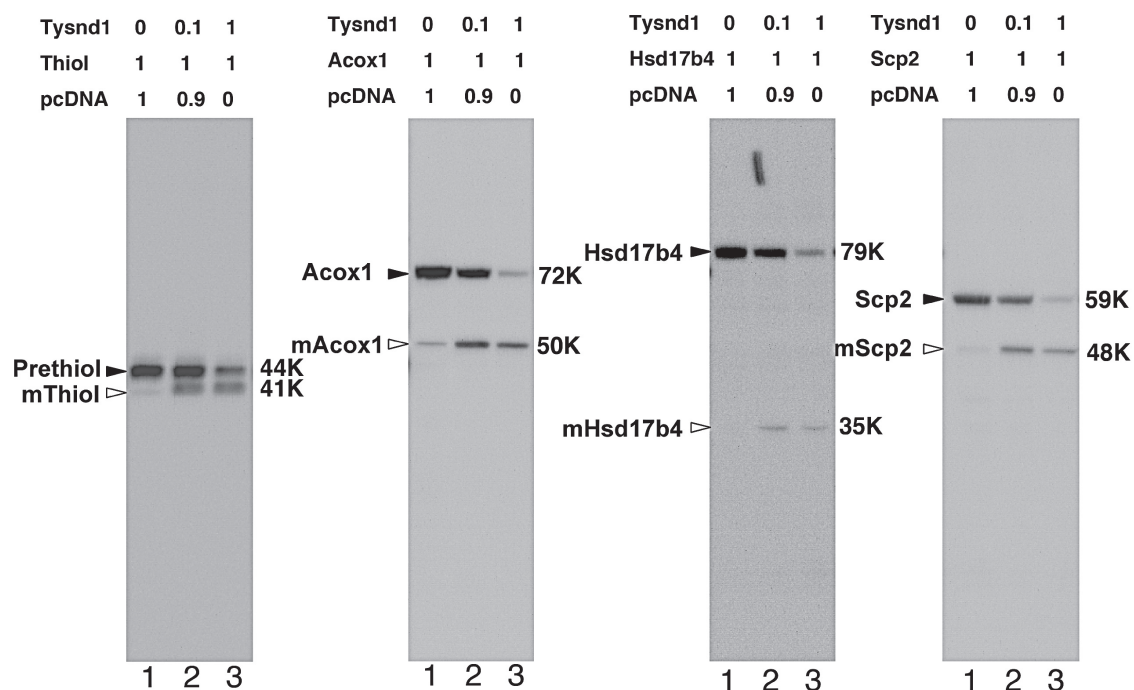


Figure 3. COS7 細胞に基質(Acaa1;Prethiolase, Acox1, Hsd17b4, Scp2)と*Tysnd1*を共発現させ、ウェスタンブロッティングを行った。*Tysnd1*の導入量の増加に伴って基質の切断型の量も増加した。

細胞にペルオキシソームマトリクスタンパク質(基質)と *Tysnd1* の両方の発現ベクターをトランスフェクションした時, *Tysnd1* の導入量を増やしていくと基質の切断型の量が増え, 非切断型の量が減っていくことがウェスタンブロッティングにより観察された (Figure 2). また, *Tysnd1* ノックアウトマウスでは切断型の基質が観察されなかった (Figure 2). 従って, *Tysnd1* がペルオキシソームにおけるプロセッシングプロテアーゼであることが証明された. 本研究で *Tysnd1* による切断が確認された基質は *Acox1*, *Hsd17b4*, *Scp2*, *Acaa1* の4つであるが, これらは全て超長鎖脂肪酸の β -酸化に関わる酵素である. *Tysnd1* による基質の切断箇所は既報¹⁸⁻²¹⁾の切断箇所と同じである事がウェスタンブロッティングの結果より示唆され, このうち *Acaa1* においては, 既報の切断箇所との一致をアミノ酸配列解析により確認した¹²⁾.

Tysnd1 が超長鎖脂肪酸の β -酸化反応を担う酵素群を切断することが証明できたことから, 次に, これらの酵素群の切断の有無による β -酸化能の差異を,

Tysnd1^{-/-}マウスと野生型マウスの肝臓試料を用いて測定した. その結果, *Tysnd1*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて超長鎖脂肪酸の β -酸化活性が有意に低下していた (Figure 6 A). *Tysnd1*^{-/-}マウスでは基質(酵素)の切断型が観察されないことと考え合わせると, β -酸化反応酵素群は *Tysnd1* により切断された切断型の方が β -酸化活性が高いといえる. ペルオキシソームにおける脂肪酸代謝では, 主に炭素数が22以上の超長鎖脂肪酸と呼ばれる長い脂肪酸が β -酸化反応の対象となっている. ペルオキシソーム病の一つであるX連鎖性副腎脳白質ジストロフィー(ALD)や, *Acox1* (ヒトではAOX) の欠損によるAOX欠損症では血中超長鎖脂肪酸の蓄積がみられる. 臨床的症状としては, ALDでは脱髄と副腎不全がみられ, また, AOX欠損症では出生, 乳児期からの筋緊張低下, けいれんを起こし, 予後不良であることが多い. これらの症状は, 超長鎖脂肪酸の代謝能が減少して体内に蓄積する事により発症するのではないかと考えられている. 今回, *Tysnd1*^{-/-}マウスにおいて超長鎖脂肪酸の β -酸化能が

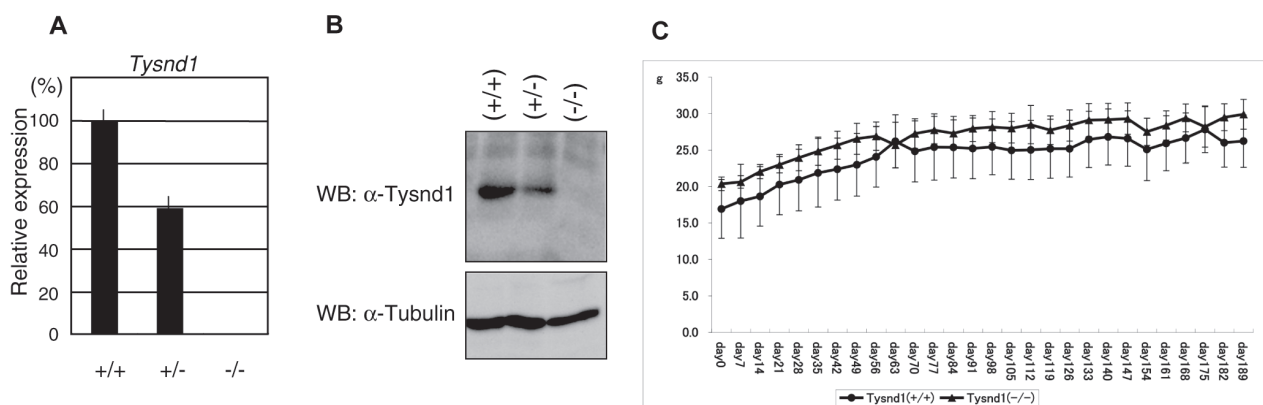


Figure 4. *Tysnd1*^{-/-}マウスのmRNAの発現 (A) とタンパク質発現 (B). *Tysnd1*^{-/-}マウスでは *Tysnd1* が発現していないことが mRNA 及び, タンパク質レベルで確認された. Cは *Tysnd1*^{-/-}マウスの体重のグラフである. 5週齢より測定し, 測定開始時を day0 とする. 野生型のマウスとの間で有意な体重差は見られなかった.

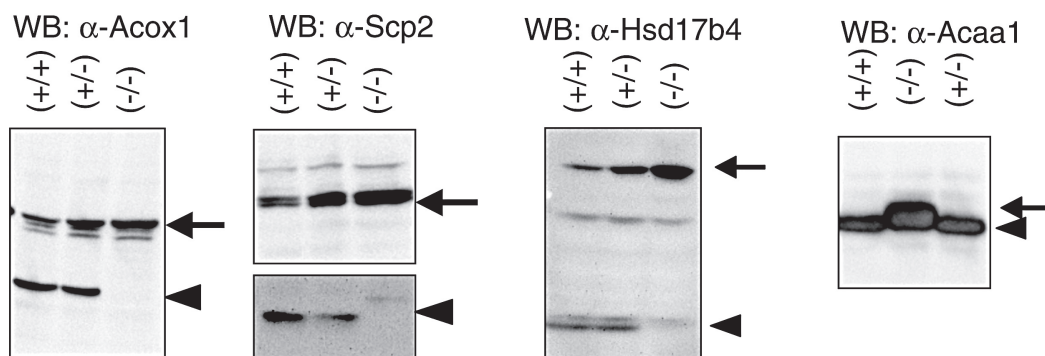


Figure 5. *Tysnd1*^{-/-}マウス肝臓タンパク質サンプルについて基質 (*Acox1*, *Scp2*, *Hsd17b4*, *Acaa1*) に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った. *Tysnd1*^{-/-}マウスでは非切断型の基質のみが存在し, 切断型は観察されなかった.

野生型に比べて有意に低下していることが示されたが (Figure 6 A), 非切断型のみでもある程度の β -酸化活性を有していることが確認された. 本研究で観察した約6ヶ月の飼育期間の範囲では, *Tysnd1*^{-/-}マウスの行動, 身長, 体重に関して野生型との差異が見られなかったのはこのためと考える. しかし, さらに長期に飼育した場合には何らかの症状が出る可能性は考えられる.

Figure 8 に *Tysnd1* によるプロセッシングと超長鎖脂肪酸 β -酸化活性の関係についての模式図を示す. *Tysnd1* による切断がなされ, 成熟型になった酵素群は互いに結合する事が可能となり, 一連の酵素反応を効率よく行う事ができるのではないかと考えられる. *Tysnd1* による切断がなされていない未成熟型の酵素群は, 個々の反応自体は行う事は可能であるが, それらの間で相互作用する事無く, 低効率で反応が進むと考えられる.

次に, ペルオキシソームの脂質代謝経路で働く酵素についてこれまでにノックアウトマウスを作製し

て解析されているものがいくつか報告されているが, 雄性不妊の形質が報告されているものがあることから, *Tysnd1*^{-/-}マウスにおいても妊孕性について調べた. その結果, *Tysnd1*^{-/-}マウスは雄性不妊であることが分かった (Figure 7 A B C). *Acox1*^{-/-22)} および *Hsd17b4*^{-/-}マウス²³⁾ も雄性不妊であることが報告されている. *Acox1*^{-/-}マウスでは無精子症を呈し, *Hsd17b4*^{-/-}マウスでは, 精細管に脂肪滴が見られ, 精巣上体には成熟した精子が観察されず, 未成熟な生殖細胞と見られる細胞のみが観察されるといった症状が報告されている. 精巣におけるペルオキシソームの機能に関しては, 2007年に Nenicuら²⁴⁾が報告している. この中で, 超長鎖脂肪酸の代謝に関わる酵素のうち *Acox1* と *Acaa1* が後期伸長精細胞及び, セルトリ細胞に強く発現しており, さらに *Acaa1* ではライディッヒ細胞でも強く発現している事が精細管の免疫染色により観察されている²⁴⁾. また, この他のペルオキシソーム酵素においても後期伸長精細胞やセルトリ細胞で発現が高い²⁴⁾. これらのことから, 精子の形成や維持にペルオキシソームが深く関わっている事が考えられる. すなわち, 超長鎖脂肪酸の代謝が精巣細胞内でも行われ, その代謝産物が精子形成, 特に精子の形態変化に関わっている可能性が強く示唆される.

超長鎖脂肪酸の代謝と精子形成についてであるが, 超長鎖脂肪酸の代謝の下流にはプラスマローゲン合成経路がある. プラスマローゲンとはエーテルリン脂質の一種であり, グリセロール骨格の sn-1 にビニルエーテル結合を持つものの総称である²⁵⁾. プラスマローゲン合成の第1, 第2過程はペルオキシソームで行われ²⁵⁾, 超長鎖脂肪酸の代謝産物であるアシルCoAがプラスマローゲンの1位のアルケニル基に取り込まれる²⁶⁾. プラスマローゲンは特に脳, 精巣, 腎臓に多いと言われている²⁵⁾. また, 多くのリン脂質があらゆる膜に存在するように, プラスマローゲンも様々な膜に存在するが, 特に精子膜に多く含まれる事が報告されている²⁷⁾. こうしたことから, *Tysnd1*^{-/-}マウスにおける雄性不妊は, *Tysnd1* 欠損によって超長鎖脂肪酸の β -酸化能が低下してアシルCoAが不足し, プラスマローゲン合成が低下して正常な精子が形成されなかったことに起因するのではないかと推測される. さらに, プラスマローゲンはその抗酸化力が注目されている. ヒト細胞に酸化ストレスを与えると, プラスマローゲン前駆体を添加していない培地では活性酸素種(ROS)が上昇して細胞が死んでいってしまうのに対し²⁸⁾, プラスマローゲン前駆体を添加した培地で培養した場合にはROSは増えず, 細胞の生存率が高いことから²⁸⁾, プラスマローゲンが酸化ストレスから細胞を守っているのではないかと考えられる. *Tysnd1*^{-/-}マウス精子には約10%の正常精子が含まれているが (Figure 7 C), それにもかかわらず交配実験で妊娠に至ったマウスがいな

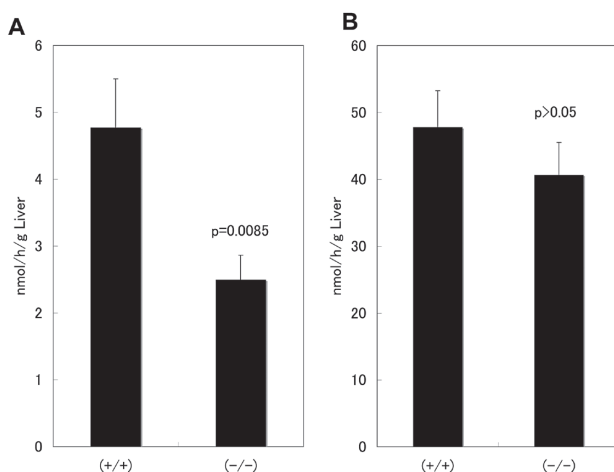


Figure 6. 肝臓ホモジネートを用いたペルオキシソームの超長鎖脂肪酸 β -酸化活性 (A; リグノセリン酸) とミトコンドリアの長鎖脂肪酸 β -酸化活性 (B; パルミチン酸) を測定した. *Tysnd1*^{-/-}マウスではペルオキシソームの β -酸化活性が野生型に比べて有意に低下した.

Table 1. それぞれ C57BL6/J (妊孕性確認済) と交配した. 妊娠を確認したあと雄雌を分け, 生まれた仔の数を数えた. 妊娠が確認できない場合は2ヶ月間雌雄を同居後, 別飼し, 3週間後に出産がない事を確認して妊孕性なしと判定した.

	<i>Tysnd1</i>	有妊孕性個体数/交配個体数	平均産仔数
♂	+/-	10/10	7
	-/-	0/18	0
♀	+/-	4/4	6
	-/-	6/6	7

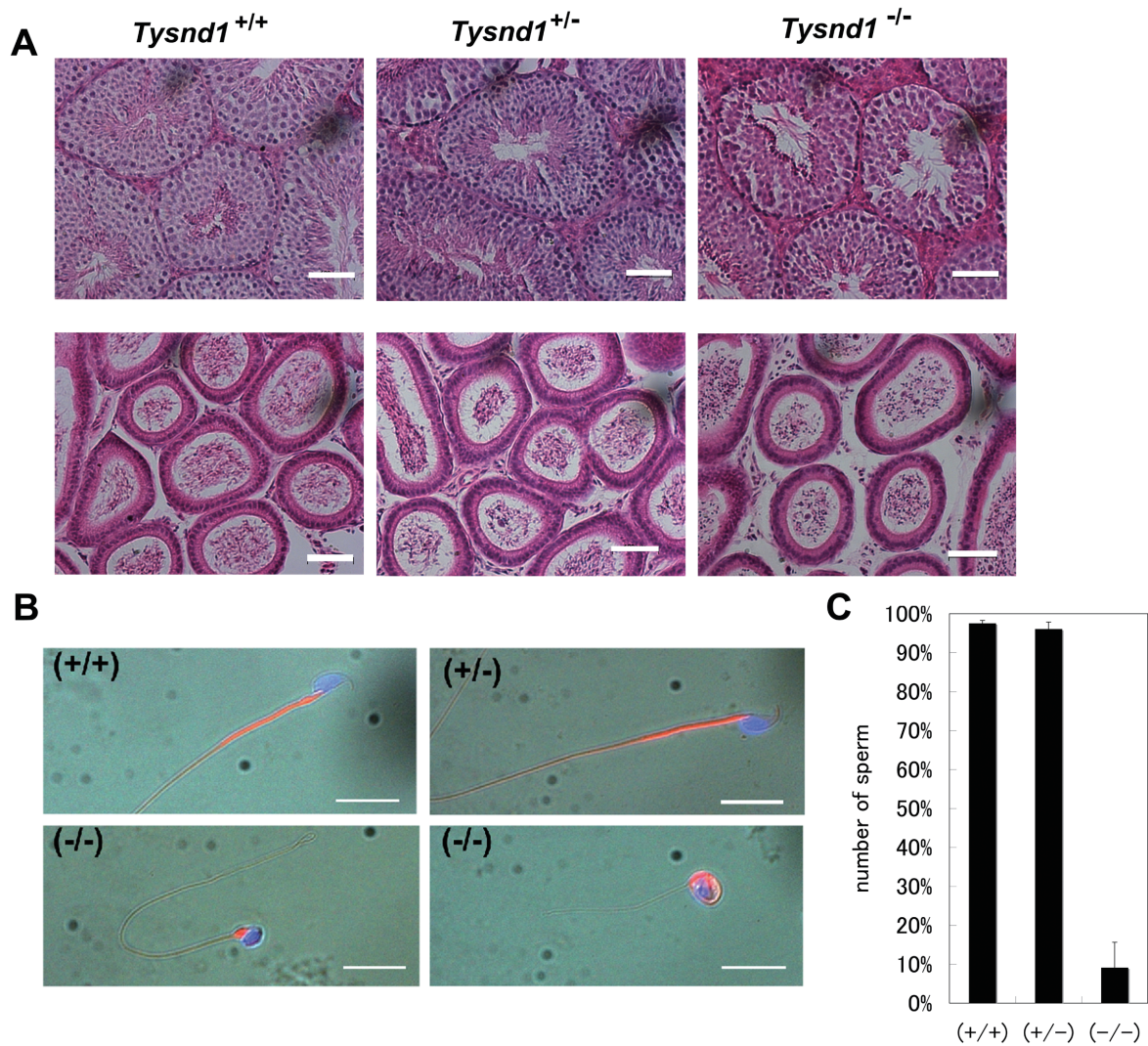


Figure 7. A, 精細管(上段)及び精巣上体(下段)組織切片のHE染色. スケールバー(白線)は100 μ m. B, 精巣上体より採取した精子の核と中片をそれぞれDAPI(青色)とMitoFluorRed(赤色)で染色した. *Tysnd1*^{-/-}マウスの精子では円形頭部精子や中片が頭部に巻き付くという奇形が見られた. スケールバー(白線)は20 μ m. C, 精巣上体より採取した精子のうち正常な形態を持つ精子の割合(%)を示したグラフ.

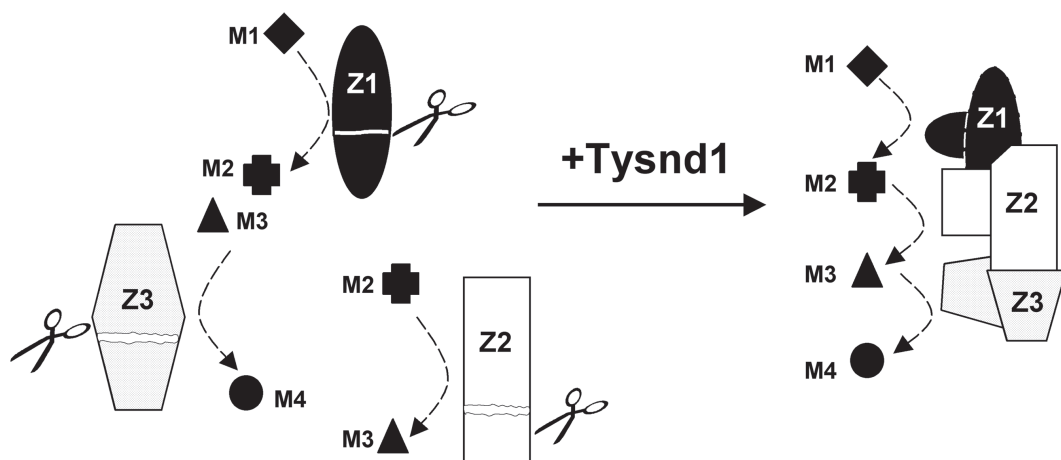


Figure 8. *Tysnd1*によるペルオキシソーム β -酸化酵素群の切断とその活性についての仮説を示した模式図. M1-4は代謝物を示す. Z1-3は*Tysnd1*の基質である代謝酵素群を示す.

かったのは、プラスマローゲン合成低下による抗酸化力の低下が原因である可能性がある。

本研究で同定した新規ペルオキシソームタンパク質である Tysnd1 はペルオキシソームの超長鎖脂肪酸 β -酸化酵素群を切断する事が分かった。この Tysnd1 の欠損によって超長鎖脂肪酸の β -酸化活性は低下する事が実験で確かめられ、また Tysnd1 を欠損したマウスでは雄性不妊が観察された。これらのことから、Tysnd1 の欠損により超長鎖脂肪酸の β -酸化活性が低下し、その下流の、精子膜の構成成分の一つであるプラスマローゲンの合成経路に影響を与えたと考えられる。

結論

新規ペルオキシソームタンパク質候補をゲノム情報データベースより絞り込み、このうち2個について今回確かにペルオキシソームに局在することを証明した。このうち Tysnd1 について機能解析を行い、Tysnd1 がペルオキシソームタンパク質を切断するプロテアーゼであることを証明した。さらに、Tysnd1 ノックアウトマウス肝臓でのペルオキシソームにおける脂肪酸の β -酸化活性を測定したところ、野生型と比較して有意に低下しており、Tysnd1 による脂肪酸代謝酵素の切断が脂肪酸代謝能に重要である事が示唆された。また、Tysnd1 ノックアウトマウスは雄性不妊であり、精子奇形を持つことが分かった。このことは、ペルオキシソームで行われる脂肪酸の代謝能が精子形成に影響を与える事を示唆する。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を頂いた埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 岡崎康司所長に深謝いたします。学術的、実験的指導を頂いた同ゲノム医学研究センターゲノム科学部門 須田立雄客員教授、同水野洋介助教、同ゲノム医学研究センター実験動物施設 津久井通講師、同トランスレーショナルリサーチセンター 二宮裕一助教、理化学研究所(ゲノム科学部門 協力研究員) イゴール・クロチキンさんに深く感謝いたします。バイオインフォマティクスの解析にご協力いただいた、理化学研究所 クリスチャン・シェンバッハ先生、同マリス・ヘルベルスさんに感謝いたします。

文献

- 1) Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR, Van Roermund CW, Van Grunsven EG. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans* 2001;29:250-67.
- 2) Sztriha L, Al-Gazali LI, Wanders RJ, Ofman R, Nork M, Lestringant GG Abnormal myelin formation in rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2 (DHAPAT-deficiency). *Dev Med Child Neurol* 2000;42:492-5.
- 3) Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 2005;122:85-95.
- 4) Mukai S, Fujiki Y. Molecular mechanisms of import of peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) proteins by PTS2 receptor Pex7p and PTS1 receptor Pex5pL. *J Biol Chem* 2006;281:37311-20.
- 5) Swinkels BW, Gould SJ, Subramani S. Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett* 1992;305:133-6.
- 6) Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A, Eisenhaber F. Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. *J Mol Biol* 2003;328:567-79.
- 7) Petriv OI, Tang L, Titorenko VI, Rachubinski RA. A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *J Mol Biol* 2004;341:119-34.
- 8) Kurochkin IV, Nagashima T, Konagaya A, Schönbach C. Sequence-based discovery of the human and rodent peroxisomal proteome. *Appl Bioinformatics* 2005;4:93-104.
- 9) Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 2000;16:276-7.
- 10) Eddy SR. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 1998;14:755-63.
- 11) Guda C, Subramaniam S. pTARGET [corrected] a new method for predicting protein subcellular localization in eukaryotes. *Bioinformatics* 2005;21:3963-9.
- 12) Kurochkin IV, Mizuno Y, Konagaya A, Sakaki Y, Schönbach C, Okazaki Y. Novel peroxisomal protease Tysnd1 processes PTS1- and PTS2-containing enzymes involved in beta-oxidation of fatty acids. *EMBO J* 2007;26:835-45.
- 13) Watkins PA, Ferrell EV Jr, Pedersen JI, Hoefler G. Peroxisomal fatty acid beta-oxidation in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys* 1991;289:329-36.
- 14) Erol E, Kumar LS, Cline GW, Shulman GI, Kelly DP, Binas B. Liver fatty acid binding protein is required for high rates of hepatic fatty acid oxidation but not for the action of PPARalpha in fasting mice. *FASEB J* 2004;18:347-9.

- 15) Mizuno Y, Kurochkin IV, Herberth M, Okazaki Y, Schönbach C. Predicted mouse peroxisome-targeted proteins and their actual subcellular locations. *BMC Bioinformatics* 2008;9(Suppl 12)(S16.):1-11.
- 16) Kikuchi M, Hatano N, Yokota S, Shimozawa N, Imanaka T, Taniguchi H. Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *J Biol Chem* 2004;279:421-8.
- 17) Islinger M, Luers GH, Li KW, Loos M, Volkl A. Rat liver peroxisomes after fibrate treatment: A survey using quantitative mass spectrometry. *J Biol Chem* 2007.
- 18) Hijikata M, Ishii N, Kagamiyama H, Osumi T, Hashimoto T. Structural analysis of cDNA for rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase. *J Biol Chem* 1987;262:8151-8.
- 19) Leenders F, Husen B, Thole HH, Adamski J. The sequence of porcine 80 kDa 17 beta-estradiol dehydrogenase reveals similarities to the short chain alcohol dehydrogenase family, to actin binding motifs and to sterol carrier protein 2. *Mol Cell Endocrinol* 1994;104:127-31.
- 20) Mori T, Tsukamoto T, Mori H, Tashiro Y, Fujiki Y. Molecular cloning and deduced amino acid sequence of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) of rat liver: a higher molecular mass (60 kDa) protein contains the primary sequence of nonspecific lipid transfer protein as its C-terminal part. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4338-42.
- 21) Miyazawa S, Hayashi H, Hijikata M, Ishii N, Furuta S, Kagamiyama H, Osumi T, Hashimoto T. Complete nucleotide sequence of cDNA and predicted amino acid sequence of rat acyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 1987;262:8131-7.
- 22) Fan C-Y, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, Singh I, Yeldandi AV, Rao MS, Maeda N, Reddy JK. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 1996;271:24698-710.
- 23) Huyghe S, Schmalbruch H, De Gendt K, Verhoeven G, Guillou F, Van Veldhoven PP, Baes M. Peroxisomal multifunctional protein 2 is essential for lipid homeostasis in Sertoli cells and male fertility in mice. *Endocrinology* 2006;147:2228-36.
- 24) Nenicu A, Lüers GH, Kovacs W, David M, Zimmer A, Bergmann M, Baumgart-Vogt E. Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod* 2007;77:1060-72.
- 25) Brites P, Waterham HR, Wanders RJ. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2004;1636:219-31.
- 26) Hayashi H, Ohashi M. Incorporation of acetyl-CoA generated from peroxisomal beta-oxidation into ethanolamine plasmalogen of rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1995;1254:319-25.
- 27) Nolan JP, Hammerstedt RH. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J* 1997;11:670-82.
- 28) Zoeller RA, Grazia TJ, LaCamera P, Park J, Gaposchkin DP, Farber HW. Increasing plasmalogen levels protects human endothelial cells during hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H671-9.