



ペルオキシソームの多様性と動態から見た微生物の生存戦略

1. はじめに

ペルオキシソームは、1954年 Rhodin によりマウス腎臓の尿細管上皮細胞で発見された。当初ペルオキシソームはミクロボディと呼ばれたが、de Duve により、この顆粒が過酸化水素を生成する酸化酵素と、それを分解するカタラーゼを含むことよりペルオキシソームと命名された。ペルオキシソームは一重膜に囲まれた球形のオルガネラで、酵母からヒトまでほぼすべての真核生物に存在している。ペルオキシソームは、その前駆体が小胞体から出芽し、遊離型ポリソームで生合成されたペルオキシソームマトリックスタンパク質や膜タンパク質が翻訳後に輸送されて形成されると考えられている。その形成には *PEX* 遺伝子群にコードされるペルオキシシンが関わっており、*PEX* 遺伝子は現在までに 34 種類見つかった。

哺乳動物のペルオキシソームは、極長鎖脂肪酸や分岐脂肪酸の β 酸化、コレステロールの胆汁酸への異化、エーテル型リン脂質の生合成など脂質代謝において重要な役割を担っている。よって、ペルオキシソームの機能不全は重篤な疾患の原因となる^{1,2)}。植物や真核微生物では、ペルオキシソームは脂肪酸の β 酸化の他に、グリオキシリ酸代謝、メタノール代謝、糖代謝、生理活性物質の産生等に関わり、生物の環境への適応と生存戦略において重要な役割を担っている。

ペルオキシソームは、細胞が環境に適応するためにその数や大きさ、構成タンパク質が顕著に変化する動的なオルガネラである。また共通する形成機構を持つが、機能の多様性によりペルオキシソーム類似のオルガネラとして、原虫のグリコソーム、糸状菌のウォロニンボディ、植物のグリオキシソームが知られている。これらは、進化の過程に

おいて生物が獲得したものである。

本稿ではペルオキシソームの多様性と動態に着目した微生物の生存戦略について紹介するとともに、その多様性の有効利用について話題を提供する。

2. メタノール資化性酵母のペルオキシソーム

1970 年前後に、酵母やカビなどの糸状菌にもペルオキシソームが存在することが明らかにされた。その後、*n*-アルカンやメタノールを唯一の炭素源として生育させた酵母ではペルオキシソームが顕著に誘導されることが見いだされた。メタノール代謝の際には毒性の強いホルムアルデヒドと過酸化水素が生じるが、メタノール資化性酵母では、メタノールからホルムアルデヒドへの酸化を触媒し過酸化水素を産生するアルコール酸化酵素 (alcohol oxidase : AOD)、ホルムアルデヒドをキシロース 5-リン酸に固定化するジヒドロキシアセトンシンターゼ (dihydroxyacetone synthase : DAS)、過酸化水素を分解するカタラーゼをペルオキシソームに局在化させることにより、メタノール代謝による細胞毒性を回避している³⁾。また、AOD や DAS 遺伝子はメタノールによって強力に転写誘導され、大量の酵素が合成される。一方、生育炭素源をメタノールからグルコースやエタノールに置き換えると、大きく発達したペルオキシソームは不要になり、ベキソファジーと呼ばれる機構によって選択的に液胞へと輸送され分解される⁴⁾。

このようなメタノール資化性酵母の特性は合成培地での実験で詳細に調べられてきた。メタノール資化性酵母はしばしば果皮や花などの植物体から分離されるが、このような自然環境におけるメタノール資化性酵母の生育に、ペルオキシソームはどのように関与するのであろうか？

まず、植物表層での生育を追跡するために、メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* に蛍光タンパク質遺伝子を導入し、シロイヌナズナの葉上に接種して蛍光顕微鏡で観察した。その結果、接種後 2 週間でも葉上で酵母細胞は生存し、細胞数も増加していた⁵⁾。植物葉上から酵母のゲノムを抽出して、蛍光タンパク質の遺伝子を標的に定量 PCR を行ったところ、酵母が 3~4 回分裂し菌体数を増加させていることがわかった (図 1A)。ペルオキシソームに局在するメタノール代謝酵素遺伝子 (*AOD1*, *DAS1*) の破壊株では、野生株に比べて葉上での増殖が顕著に低下していたことから、これらの酵素が葉上での増殖に必要であることがわかった (図 1A)。

植物葉上でメタノール資化性酵母がメタノールを代謝して生きていることが確認できたが、植物表層に局所的に存

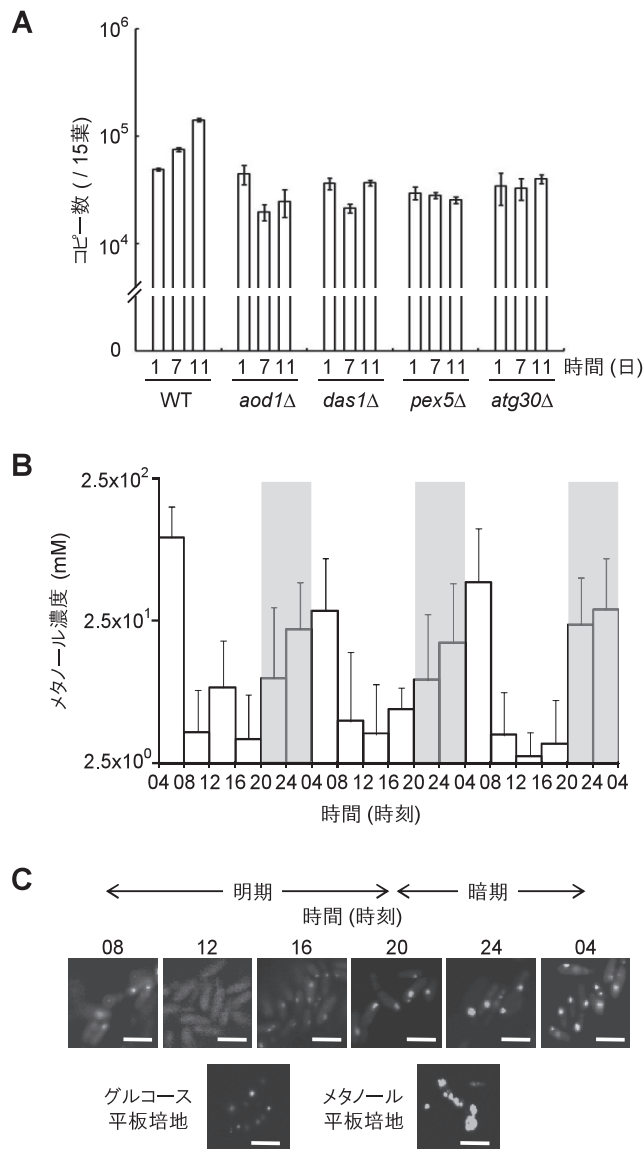


図1 シロイヌナズナ葉上でのメタノール資化性酵母 *C. boidinii* の生育

(A) *C. boidinii* をシロイヌナズナ葉上に接種し、1, 7, 11日後の野生株 (WT) と遺伝子破壊株の菌体数を定量した。(B) シロイヌナズナ葉上に局所的に存在するメタノール濃度。発芽後2~3週間のシロイヌナズナ葉上に *DAS1* プロモーター支配下で蛍光タンパク質を発現する *C. boidinii* を接種し、定期的に蛍光強度よりメタノール濃度を算出した。(C) PTS1を持つ蛍光タンパク質を安定発現する *C. boidinii* を用い、日周期における蛍光タンパク質の細胞内局在性を蛍光顕微鏡観察で観察した (上段)。対照として炭素源がグルコースもしくはメタノールの平板培地で生育させた *C. boidinii* の蛍光顕微鏡写真 (下段) を示す。スケールバー、5 μ m。文献5より改変引用。

在するメタノールの濃度は不明である。そこで、メタノール資化性酵母のメタノール誘導性プロモーターを用いて、葉上での局所的メタノール量を推定することにした。*C. boidinii* のメタノール誘導性プロモーターの中で、*DAS1* 遺伝子プロモーターは最も強力にかつ特異的にメタノールによって誘導される。この *DAS1* プロモーター支配下で蛍光タンパク質を発現する株を用い、蛍光タンパク質の輝度を調べたところ、培地に含まれるメタノール濃度と蛍光輝度の間に相関性が認められた。実際に植物表層に存在するメタノールの濃度を見積もったところ、4~64 mMのメタノールが検出できた。興味深いことに、その濃度は日周期に従って変動しており、暗期に高く、明期では低いこともわかった (図1B)。

次に、このようにメタノール濃度が変動する環境におけるペルオキシソームの役割や動態を調べた。ペルオキシソーム局在化シグナル1 (PTS1) を付加した蛍光タンパク質を安定発現する株を用い、植物葉上でのペルオキシソームの動態を追跡した。すると、ペルオキシソーム合成はメタノール濃度の変化とリンクして、濃度の高い暗期に行われていることがわかった (図1C)。また、明期では蛍光タンパク質のドットが見られなくなることから、ペルオキシソームが分解されていることも示唆された。ペルオキシソーム形成不能な *PEX5* 遺伝子破壊株、ペルオキシソームの分解を担うペキソファジー経路に必須な遺伝子である *ATG30* 遺伝子破壊株を用い、植物葉上での酵母の増殖を調べた。するとこれらの遺伝子破壊株は野生株に比べて葉上での増殖が減衰していたことから、ペルオキシソームの形成・分解の両方が葉上での増殖に必要であることがわかった (図1A)。

このように、自然環境中においてもメタノール資化性酵母は環境の変化に応じてペルオキシソームの合成・分解を繰り返しており、さらにその動的サイクルが酵母の増殖に必須であることが明らかになった。

3. 原虫グリコソーム

原虫は単細胞の原生動物であり、核、ミトコンドリアなどのオルガネラが存在する。原虫のうち鞭毛中類に分類されるトリパノソーマやリーシュマニアは、ペルオキシソーム局在化シグナルをもつ解糖系諸酵素が局在化したグリコソームをもつ。これら原虫においても多数の *PEX* 遺伝子が同定され、グリコキシソームは哺乳動物ペルオキシソームと似た仕組みで形成される。なお原虫において、ペルオキシソーム膜形成に必須である *PEX3* 遺伝子が見つから

ないのは驚きであるが、哺乳動物や酵母の *PEX3* 遺伝子と比較して、極端にホモロジーが低いのではないかと推測される。トリパノソーマはツェツェバエによってヒトに感染する病原虫で、その生活環にはツェツェバエの体内にいる時のプロサイクリック型と哺乳動物の体内にいる時の血流型とがある。興味深いことに、プロサイクリック型では、ミトコンドリアで行われる TCA 回路で必要な ATP を得ている一方、血流型では、ATP の供給を解糖系に依存しており、血液からグルコースを取り込み、ピルビン酸まで変換している⁶⁾。血流型のトリパノソーマにおいては、細胞の高い移動性や細胞表面の変異表面糖タンパク質のターンオーバーを高頻度で行うために十分な ATP の産生を行うことが必要であるため、細胞内におけるグリコソームの数も多くなり、グリコソーム内における全タンパク質の 90% 以上が解糖系に関わる酵素で占められるようになる⁷⁾。トリパノソーマは、グリコソーム内に高濃度の解糖系酵素と、グリセロール代謝に関わる二つの酵素、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素とグリセロールキナーゼを有することにより、嫌気条件下で ATP を産生するための特殊な反応条件を作り出している (図 2)。この条件下では、グリセロールキナーゼが熱力学的には好ましくない逆反応の方向に進むことによって、グリコソーム内において ATP/ADP の比が低い状態とグリセロール 3-リン酸が蓄積した状態を引き起こしている。様々な生合成反応のためには ATP/ADP の比が高い状態が必要となる細胞質では、このような条件は生み出しにくい。

トリパノソーマの生存にとって、グリコソーム内で解糖

系の反応が行われることが非常に重要であり、解糖系反応の一部がグリコソーム内に正しく局在しなかったり、新規に合成されたグリコソームマトリックスタンパク質の輸送が阻害されたりすると、トリパノソーマはグルコース存在下で死に至る。また、トリパノソーマが血流型からプロサイクリック型へと形態変化する際には、オートファジーを含むグリコソームのターンオーバーが活発に起こる⁸⁾。その過程はプロサイクリック型の形成過程において非常に重要で素早く起こる。

このように、トリパノソーマは生存する環境に適応してエネルギー獲得方法やオルガネラの構成を変化させており、その中でもグリコソームは非常に重要な役割を担っている。

4. 糸状菌ウォロニンボディ

ウォロニンボディは 19 世紀に Woronin によって発見されたオルガネラであり、アカパンカビやコウジ菌などの糸状菌に存在する。多細胞生物である糸状菌は、隣接する細胞と隔壁にいた小さな穴である隔壁孔を通して細胞間の連絡を行っている。ウォロニンボディは隔壁孔に局在し、菌糸が損傷した際に、隔壁孔をふさぎ隣接する細胞の細胞質が流出しないようにする機能を持っている (図 3)⁹⁾。

ウォロニンボディはアカパンカビで最初に精製され、主要な構成タンパク質として HEX1 が同定された。HEX1 は C 末端に PTS1 を持ち、細胞質でオリゴマーを形成することによって効率的にペルオキシソームへと輸送される。HEX1 のオリゴマーは二つのペルオキシソーム膜タンパク

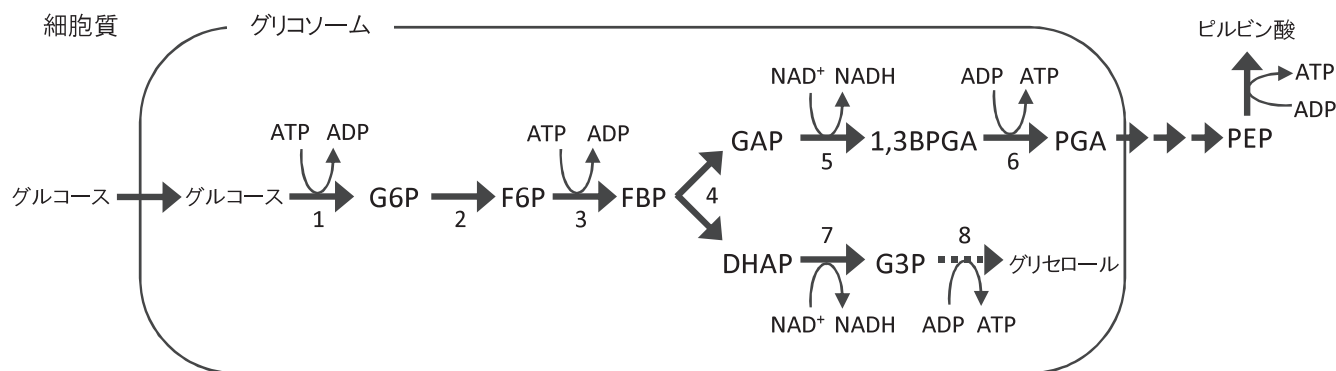


図 2 血流型トリパノソーマのグリコソーム内解糖系

G6P: グルコース 6-リン酸, F6P: フルクトース 6-リン酸, FBP: フルクトース 1,6-ビスリン酸, GAP: グリセルアルデヒド 3-リン酸, 1,3 BPGA: 1,3-ビスホスホグリセリン酸, PGA: ホスホグリセリン酸, PEP: ホスホエノールピルビン酸, DHAP: ジヒドロキシアセトンリン酸, G3P: グルコース 3-リン酸. 酵素 1: ヘキソキナーゼ, 2: 6-ホスホグルコースイソメラーゼ, 3: ホスホフルクトキナーゼ, 4: アルドラーゼ, 5: グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素, 6: ホスホグリセリン酸キナーゼ, 7: グリセロール-3-リン酸脱水素酵素, 8: グリセロールキナーゼ.

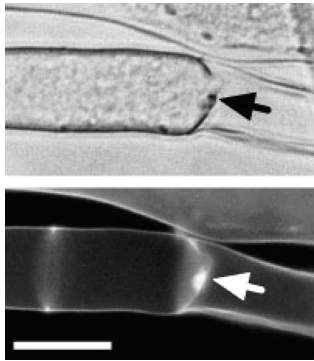


図3 アカパンカビのウォロニンボディ

菌糸が傷ついた直後のアカパンカビの細胞。隔膜孔を塞いだウォロニンボディがキチン質に囲まれた様子。矢印は隔膜孔を塞いだウォロニンボディを示す。(上段)位相差顕微鏡の写真(下段)キチン染色した写真。スケールバー、10 μ m。文献9より引用。

質 Pex26p, Woronin body specific membrane protein (WSC, 別名 PMP22/MPV-related membrane protein) と直接相互作用し、これらのペルオキシソーム膜への局在にも関与している。ペルオキシソームに輸送された HEX1 のオリゴマーはさらに重合し、ペルオキシソーム膜上へと輸送されていた WSC に囲み込まれてウォロニンボディとして分離することが明らかになった¹⁰⁾。またコウジ菌において、ペルオキシソームの分裂や増殖に関与する *PEX11* 遺伝子破壊株では、ウォロニンボディがペルオキシソームに留まったまま分化できない様子が観察され、ウォロニンボディがペルオキシソームの分裂・増殖機構を利用してペルオキシソームから独立し、隔壁へと運ばれることがわかった¹¹⁾。

5. ペルオキシソームでの二次代謝産物の生合成

ペルオキシソームは、植物や糸状菌などにおける特有の二次代謝産物の生合成においても重要な役割を果たしている。糸状菌には β ラクタム系の抗生物質やマイコトキシンを産生する菌があり、ペルオキシソームがそれらの生合成経路の一部を行っている¹²⁾。 *Penicillium chrysogenum* のペルオキシソームには、ペニシリンの生合成を担うフェニル酢酸 CoA リガーゼやイソペニシリン N アシルトランスフェラーゼが局在し、 *Acremonium chrysogenum* のペルオキシソームには、セファロスポリンの生合成を担うイソペニシリン N の活性化と異性化に必要な酵素が局在する。またマイコトキシン生合成に関わる酵素がペルオキシソームに局在していることも知られている。これらの物質は多くの場合、細胞質に対して毒性を有しているが、生合成の

過程が細胞質から区切られているペルオキシソーム内部で進むことにより、その生物にとっての細胞毒性を抑制することができる。このことは、ある種の生物にとっては、その生存のために（あるいは生存を妨げる他生物の排除に）必要な物質の原料を細胞内の特定のコンパートメントに取り込み、最終産物を排出すること、またその輸送を担うトランスポーターをもつことは、進化の上で獲得した重要な仕組みであると思われる。

6. ペルオキシソームの多様性と有効利用

ペルオキシソームは、微生物の生育環境においてその数と構成タンパク質がダイナミックに変化するとともに、二次代謝産物生合成のコンパートメントを提供している。さらに、ある種の微生物では、別名がつけられているように特殊に分化した構成タンパク質をもつ。一方、その形成機構と局在化シグナルには酵母からヒトまで共通性があるが、ペルオキシソーム形成に関わる PEX タンパク質には種間で構造的な多様性がある。

異種タンパク質や有用化合物を生産する際に、ペルオキシソーム内をその生産の場とすれば、細胞に与える毒性などの理由でこれまで発現が困難であった有用タンパク質や新規抗生物質などの有用化合物の生産も可能となる。特にメタノール資化性酵母のペルオキシソームは、メタノール培養の際には細胞内の約 80% を占めるようになり、有効なタンパク質生産の場として期待できる。

一方、ペルオキシソームをターゲットとした選択性の高い農薬や病原微生物治療薬の開発も考えられる。原虫トリパノソーマは、睡眠病と呼ばれる重篤な病気を引き起こし、アフリカなどの熱帯諸国で大きな被害を及ぼしている¹³⁾。治療薬としては化学療法剤があるが、費用・治療に要する期間・副作用など多くの問題を抱えている。しかし、睡眠病は「見捨てられた病気」で、治療薬を必要とする患者が多く存在するにもかかわらず、研究開発がほとんど行われておらず、新薬が開発されていない。グリコソームの形成や機能を持異的に阻害することができれば、睡眠病の効果的な治療薬開発に結びつけることが可能である。

ペルオキシソームならびに関連オルガネラの共通性と多様性の詳細を解析することは、生物の自然環境への適応におけるオルガネラの役割を理解する上で重要であろう。またその多様性は、有用物質の生産や病原微生物に対する治療薬の開発などの応用につながっていくと考えられる。

- 1) Baes, M. & Van Veldhoven, P.P. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10. 1016/j. bbadis. 2012. 03. 003
- 2) Morita, M. & Imanaka, T. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10. 1016/j. bbadis. 2012. 02. 009
- 3) van der Klei, I.J., Yurimoto, H., Sakai, Y., & Veenhuis, M. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 1453–1462.
- 4) Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I.J., & Kiel, J.A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 1767–1775.
- 5) Kawaguchi, K., Yurimoto, H., Oku, M., & Sakai, Y. (2011) *PLoS ONE*, 6, e25257.
- 6) Gualdrón-López, M., Brennand, A., Hannaert, V., Quinones, W., Cáceres, A.J., Bringaud, F., Concepción, J.L., & Michels, P.A. (2012) *Int. J. Parasitol.*, 42, 1–20.
- 7) Misset, O., Bos, O.J., & Opperdoes, F.R. (1986) *Eur. J. Biochem.*, 157, 441–453.
- 8) Herman, M., Pérez-Morga, D., Schtickzelle, N., & Michels, P. A. (2008) *Autophagy*, 4, 294–308.
- 9) Jedd, G. & Chua, N.H. (2000) *Nat. Cell Biol.*, 2, 226–231.
- 10) Liu, F., Lu, Y., Pieuchot, L., Dhavale, T., & Jedd, G. (2011) *Dev. Cell*, 21, 457–468.
- 11) Escaño, C.S., Juvvadi, P.R., Jin, F.J., Takahashi, T., Koyama, Y., Yamashita, S., Maruyama, J., & Kitamoto, K. (2009) *Eukaryot. Cell*, 8, 296–305.
- 12) Martín, J.F., Ullán, R.V., & García-Estrada, C. (2012) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 367–382.
- 13) 山内一也, 北 潔 (2008) 〈眠り病〉は眠らない (岩波科学ライブラリー 140). pp. 1–97, 岩波書店, 東京.

川口 甲介, 今中 常雄

(富山大学大学院医学薬学研究部分子細胞機能学研究室)

Survival strategies of microbes from the point of view of peroxisome with diversity and dynamics

Kosuke Kawaguchi and Tsuneo Imanaka (Department of Biological Chemistry, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan)

細胞内ホスファチジルセリン (PS) が制御する膜輸送経路

1. はじめに

ホスファチジルセリン (phosphatidylserine, 以下 PS と略) は極性頭部にセリン残基を持つグリセリン脂質である (図 1A). 真核細胞の膜の 5~10% を構成し, 特に細胞膜の細胞質側に濃縮して存在することが知られている. 細胞膜における PS の機能として, (1) カルシウムイオン, ジアシルグリセロールと協調してプロテインキナーゼ C

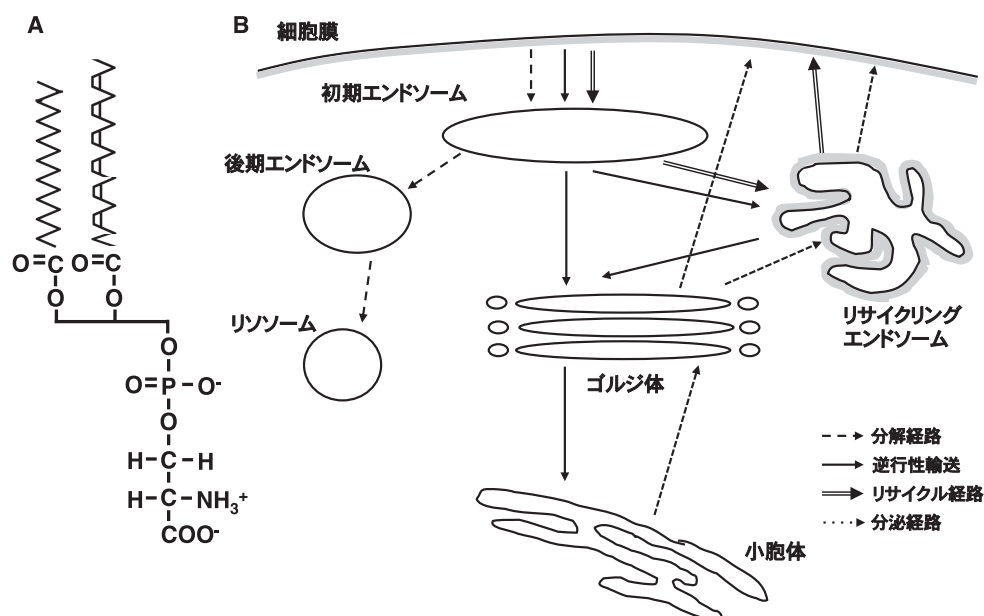


図 1 PS の細胞内分布

(A) PS の構造. グリセロ骨格を持つリン脂質であり, 極性頭部にセリン残基を持つ.

(B) 細胞内物質輸送経路の概念図. PS は, リサイクリングエンドソームと細胞膜の細胞質側に強く濃縮して存在する (灰色で示す).