哺乳類発生過程におけるペルオキシソーム機能変遷の制御機構と意義の解明

Regulatory mechanisms and significance of peroxisomal functional transitions during early mammalian development

（日本生化学会推薦）

代表研究者　　順天堂大学　杉浦　歩　　Juntendo University　Ayumu Sugiura

Peroxisomes are metabolically versatile organelles whose functions vary among species and cell types, yet the mechanisms underlying this diversity remain poorly understood. In this study, we analyzed peroxisomes in mouse early embryos to investigate developmental changes in peroxisomal dynamics and functions. Imaging analyses revealed that peroxisomes until the morula stage exhibit high uptake activity for a specific ion and form characteristic clusters, both of which disappear following peroxisomal turnover. Proteomic analyses demonstrated that peroxisomes before and after degradation possess distinct protein compositions. Immunofluorescence analyses using endogenous antibodies identified several candidate factors localized to embryonic peroxisomes that may regulate ion uptake activity. In addition, peroxisomal clusters were frequently associated with mitochondria and other organelles, suggesting coordinated regulation of local ion homeostasis and metabolism. Treatment of embryos with ion chelators reduced ion accumulation within peroxisomes and impaired embryonic development, indicating that this transient peroxisomal function is physiologically important during early embryogenesis. These findings suggest that dynamic remodeling of peroxisomal function contributes to metabolic regulation during cell fate determination and provides new insight into how functional diversity of peroxisomes is established during development.

研究目的

ペルオキシソームは、真核生物のほぼ全ての細胞に存在する脂質二重膜に囲まれた細胞内代謝オルガネラであり、脂質代謝や活性酸素代謝を中心とした多様な生命現象に関与している。ペルオキシソーム内腔の水素イオン濃度は中性付近に保たれており、さらにマトリックスタンパク質の多くはC末端側の短いシグナル配列（Ser-Lys-Leuなど）によって輸送可能であることから、比較的柔軟に新規酵素群を受け入れられる代謝環境を有している。このような特徴から、ペルオキシソームは進化や環境変化に応じて機能を変化・拡張しやすいオルガネラであると考えられている。ペルオキシソーム機能のうち、脂肪酸β酸化や過酸化水素分解といった基本的代謝機能は広く保存されている。一方で、脂質やアミノ酸の合成・分解、二次代謝産物の処理などに関わる代謝基質や酵素群は、生物種や細胞種によって大きく異なることが知られている。しかし、このようなペルオキシソーム機能の多様性が、進化過程や個体発生過程においてどのように形成されるのか、その分子基盤については未解明な点が多く残されている。特に、多細胞生物において、同一個体内の細胞種ごとに異なるペルオキシソーム機能がいつ・どのように確立されるのかについては、ほとんど理解が進んでいない。

代表研究者はこれまで、ペルオキシソーム動態や機能、他のオルガネラとの相互作用を手掛かりとして、細胞の環境応答や生物の多様性を理解することを目指し、様々な生物種および細胞種におけるペルオキシソーム解析を進めてきた。本研究課題では、マウス初期胚の発生過程におけるペルオキシソーム動態や構成タンパク質、他のオルガネラとの連関に着目し、個体レベルにおけるペルオキシソーム機能多様性がどのように形成されるのかを解明することを目指した。

研究経過

先行研究により、受精後の一細胞期から胚盤胞期にかけて、ペルオキシソームはクラスター化、分解、再増殖といった劇的な動態変化を示すことが明らかとなっている。また、ペルオキシソーム分解の前後で実施したプロテオーム解析から、構成タンパク質の性質が大きく異なることが示されている。さらに、分解前に認められるペルオキシソームのクラスター形成能および特定イオンの取り込み能は、分解後には消失していた。これらの結果から、クラスター形成やイオン取り込みを担う制御因子は、分解前のペルオキシソームに特異的に存在し、ペルオキシソームとともに分解される可能性が考えられた。本研究では、分解前のペルオキシソームに特異的に存在するタンパク質群に着目し、機能変遷に関与する分子基盤の解明を試みた。

＜イオン取り込み能＞

ペルオキシソームにおける特定イオンの取り込み機構については、これまでにいくつかの輸送体候補が報告されているものの、その生理学的役割や発生過程における機能についてはほとんど理解されていない。特に、ペルオキシソームが細胞内イオン恒常性にどの程度寄与しているのか、また他オルガネラとの間でどのような機能的連携を形成しているのかについては未解明な点が多い。本研究では、先行研究で実施した受精卵プロテオーム解析により候補として抽出された因子、および他グループから報告されている関連因子について、受精卵における局在解析を行った。

まず、本解析に先立ち、候補因子に対する各種抗体の有用性を評価するため、培養細胞を用いた予備検討を実施した。免疫蛍光染色における特異性、バックグラウンドシグナル、細胞内局在パターンを比較検証し、受精卵解析に適した抗体を選定した。受精後 0.5 日の受精卵を回収後に培養し、一細胞期から胚盤胞期に相当する 0.5 日から 4.5 日まで 1 日ごとに固定した試料に対して、候補因子に対する内在性抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。さらに、ペルオキシソームマーカーとの共染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡下で発生段階に応じた細胞内局在変化を解析した。その結果、一部の候補因子について、分解前のペルオキシソームへの局在が確認された。特に、ペルオキシソームクラスター形成が顕著な時期に一致して局在シグナルが増強する傾向が認められ、分解前特異的な機能との関連が示唆された。

細胞内イオン恒常性は、代謝、シグナル伝達、細胞周期、細胞運命決定など多様な生命現象を制御している。近年では、膜接触領域を介したオルガネラ間イオン交換機構の重要性が注目されており、オルガネラネットワーク全体として細胞内環境が調節されていることが明らかとなりつつある。そこで本研究では、ペルオキシソームと他オルガネラとの関係性を検討するため、複数のオルガネラマーカーとの共染色解析を行った。その結果、ペルオキシソームクラスター周辺には、ミトコンドリアやリソソームなど複数種のオルガネラが密接に集積していることが確認された。これらの集積は、ペルオキシソームが細胞質内に散在している時期には顕著ではなく、クラスター形成時期に一致して観察された。また、一部ではオルガネラ同士が直接接触しているような配置も認められた。これらの結果は、受精卵におけるペルオキシソームクラスターが、単なる凝集構造ではなく、他オルガネラとの相互作用を伴う機能的構造体である可能性を示している。

さらに、本研究で対象とした特定イオンは、初期胚発生において重要な役割を担うことが知られている。そこで、受精後 0.5 日の受精卵をイオンキレート剤存在下で培養し、胚発生およびペルオキシソーム動態への影響を解析した。その結果、キレート剤処理群では胚発生が 4 細胞期付近で停止し、その後の正常な発生進行が著しく阻害された。一方で、ペルオキシソーム自体の分布様式やクラスター構造には大きな変化は認められず、形成頻度や形態についても対照群との間で顕著な差異は確認されなかった。すなわち、イオン環境の変化によって胚発生は大きく影響を受ける一方、クラスター形成自体は比較的安定して維持されていることが明らかとなった。

＜クラスター化因子＞

ペルオキシソームのクラスター化は、オートファジー依存的分解経路であるペキソファジーに先立って生じる現象として知られている。培養細胞では、複数のペルオキシソームを効率的に分解するための前段階として理解されており、関連する複数の制御因子が報告されている。受精卵において観察されたペルオキシソームクラスターも、分解前の時期に形成されていたことから、同様の分子機構によって制

御されている可能性を想定した。

そこで、既知のクラスター形成関連因子について、受精後 0.5 日から 4.5 日までの受精卵を用いて局在解析を行った。候補因子に対する内在性抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、ペルオキシソームマーカーとの共局在およびクラスター領域への集積を解析した。しかし、検討した既知因子のいずれについても、ペルオキシソームへの明確な局在や顕著な集積は確認されなかった。一方、一部因子については、オートファジー過程における隔離膜マーカーLC3 との共局在が観察された。これらの結果から、受精卵におけるクラスター形成は、培養細胞で報告されている典型的なペキソファジー経路とは異なる分子機構によって制御されている可能性が考えられた。

考察

本研究により、受精卵のペルオキシソームは、一般的な培養細胞では認められない高い特定イオン取り込み能を有することが明らかとなった。また、本研究で同定した輸送体候補についても、HeLa 細胞ではペルオキシソーム局在が認められなかったことから、この機能は受精卵や初期胚発生過程などにおける特有のペルオキシソーム機能である可能性が高いと考えられる。従来、ペルオキシソームは脂肪酸 β 酸化や過酸化水素代謝を担う代謝オルガネラとして理解されてきたが、本研究結果は、発生過程においては局所的なイオン恒常性制御にも関与している可能性を示している。

特に注目すべき点として、イオン取り込み能を有するペルオキシソームが単独ではなく、大型のクラスター構造を形成していたことが挙げられる。受精卵におけるペルオキシソームは直径 500 nm にも満たない比較的小型な構造であり、単独オルガネラとして保持可能な内容積には限界がある。一方で、本研究で観察されたクラスターは 5 μm を超える規模の大型構造を形成していた。複数のペルオキシソームが集積することで、局所的なイオン取り込み・保持能力を増幅し、機能ユニットとして働いている可能性が考えられる。さらに、クラスター形成時期に一致して輸送体候補因子の局在シグナルが増強していたことは、クラスター形成とイオン制御機能が密接に関連している可能性を支持している。

また、ペルオキシソームクラスター周辺には、ミトコンドリアやリソソームなど複数種のオルガネラの集積が認められた。近年、細胞内代謝やシグナル伝達は、個々のオルガネラ単独ではなく、膜接触領域を介したオルガネラ間ネットワークによって統合的に制御されることが明らかとなっている。特にミトコンドリアは ATP 産生や代謝酵素活性制御に当該イオンを必要とすることから、本研究で観察された近接配置は、ペルオキシソームを中心とした局所的な代謝制御ユニットの形成を反映している可能性が考えられる。受精卵では急速な発生進行に伴い代謝需要も大きく変化するため、このような一過的オルガネラクラスター形成は、発生段階に応じた代謝環境再構築に寄与している可能性がある。

イオンキレート剤処理によって胚発生が著しく阻害された一方で、クラスター構造自体は維持されていた。この結果は、クラスター形成がイオン濃度変化に受動的に応答した現象ではなく、発生段階に応じてあらかじめ制御された細胞内再編成機構である可能性を示唆している。すなわち、受精卵ではまずオルガネラクラスター構造が形成され、その後にイオン取り込みなどの機能が付与される段階的制御機構が存在する可能性が考えられる。

本研究では既知のペキソファジー関連クラスター化因子について解析を行ったものの、受精卵ペルオキシソームへの明確な局在は確認されなかった。これまで培養細胞で報告されているクラスター形成は、主としてオートファジー依存的分解を効率化する前段階として理解されている。一方、本研究で観察された受精卵のクラスターは、高いイオン取り込み能や他オルガネラとの近接配置を伴っていたことから、単なる分解前凝集体ではなく、発生段階特異的な機能構造体である可能性が示唆された。特に、クラスター形成がイオン枯渇条件下でも維持されていたことは、この構造が代謝変化に対する受動的応答ではなく、発生プログラムに組み込まれた能動的な細胞内再編成機構である可能性を支持している。

さらに興味深い点として、ペルオキシソーム分解のタイミングは、初期胚における細胞運命決定開始時期とほぼ一致していた。近年、初期胚発生では代謝状態の変化がエピジェネティック制御や細胞運命決定に深く関与することが明らかとなっている。本研究で観察されたペルオキシソーム機能の変化も、単なるオルガネラ代謝変化ではなく、発生段階特異的な細胞内環境再構築の一部である可能性が考えられる。加えて、本研究では内部細胞塊と栄養外胚葉

との間で、ペルオキシソーム動態に差異が存在する可能性も見出された。特に栄養外胚葉では、内部細胞塊と比較してペルオキシソームの分解および再形成がより早期に進行する傾向が認められた。この結果は、ペルオキシソーム動態が細胞系譜ごとの代謝状態や細胞運命と連動して制御されている可能性を示唆している。

今後は、本研究で同定された候補因子に対する機能抑制実験、ライブセルイメージング解析、他オルガネラとの相互作用解析を進めることで、ペルオキシソームによる局所イオン制御機構とその発生学的意義の全体像を明らかにしたい。

研究の発表

学会口頭発表

1. 杉浦　歩、山口　隼司、谷田　以誠、内山　安男、三浦　芳樹、佐藤　裕公、佐藤　健、藤森　俊彦、岡 崎　康 司 「 Peroxisome Dynamics during Embryogenesis」 EMBO Workshop Celebrating 70 years of peroxisome research、2025 年 9 月 3 日、カタルーニャ、スペイン
2. 杉浦　歩、山口　隼司、谷田　以誠、内山　安男、三浦　芳樹、佐藤　裕公、佐藤　健、藤森　俊彦、岡崎　康司　「Peroxisome-orchestrated multimode physiology」APPW2025、2025 年 3 月 18 日、幕張
3. 杉浦　歩　「今すぐみたい！ペルオキシソーム」CVMW2024、2024 年 12 月 8 日、 東京
4. 杉浦　歩、山口　隼司、谷田　以誠、内山　安男、三浦　芳樹、佐藤　裕公、佐藤　健、藤森　俊彦、岡崎　康司「発生過程におけるオルガネラマッチング」第 97 回日本生化学会、2024 年 11 月 8 日、横浜

誌上発表

該当なし