

## 寄附研究部門・その他

# 悪性腫瘍に対する新規免疫・遺伝子治療薬開発研究部門

Division of Translational Cancer Research

准 教 授：高橋 淳

Associate Professor : Atsushi Takahashi, M.D., Ph.D.

寄附研究部門の終了する 2016 年 3 月末まで、橋渡し研究 (translational research) として、腫瘍促進因子 FEAT を分子標的とした癌の早期発見と癌予防を目指し、基礎研究として、FEAT の正常組織と癌細胞での発現制御と機能を解析した。

2015 年度も、2013-4 年度に引き続き、株式会社新日本製薬・総合開発研究室からの共同研究員 1 名と、中国人と日本人の大学院博士課程の学生 2 名との 3 人態勢で研究を進めた。英語での週一回のジャーナルクラブと、週一回の Molecular Biology of the Cell の問題集の勉強会を、ゲノム病態学分野からの参加希望者を交えて行った。

## A. FEAT 検出による癌の早期発見

血液中の FEAT タンパクを定量することで、癌化を早期発見することを目標としている。免疫沈降法で、癌患者の血漿に FEAT タンパクが存在し、自作のポリクローナル抗体により捕捉可能であることがわかった。そこでポリクローナル抗体を捕捉用抗体とし、業者と共同研究で作出したモノクローナル抗体を検出用抗体に用いたサンドイッチ法により血漿中の FEAT を検出する固相酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) キットを、IBL 社に受託して作製した。

九州大学病院 先端分子・細胞治療科において行われた臨床試験で凍結保存した癌患者の血漿を測定した。検討症例数は、健常人 8 例と癌患者 134 例、うち非小細胞肺癌 17 例、小細胞肺癌 5 例、乳癌 4 例、食道癌 14 例、胃癌 22 例、大腸癌 43 例、膵癌 14 例、胆嚢癌 1 例、胆管癌 2 例、卵巣癌 4 例、子宮体癌 2 例、子宮頸癌 4 例、悪性中皮腫 4 例、咽喉頭癌 2 例、尿管癌 2 例、悪性黒色腫 2 例、原発不明癌 2 例である。

血中 FEAT 濃度は癌患者において、健常人に比べ有意に上昇していた。癌種別のノンパラメトリック多重比較では、Kruskal-Wallis 検定で有意差があり、Steel 検定で卵巣癌と非小細胞肺癌に健常人との有意差を認めた。免疫電子顕微鏡観察では FEAT は HeLa 細胞の細胞質、核、ミトコンドリアに局在していた。細胞質内の FEAT がエクソソーム内に入った状態で分泌され、エクソソームが破裂して FEAT が血漿内に遊離する可能性を調べるために、患者血漿中のエクソソームを単離し、FEAT の存在をウェスタンブロッティングで調べた。健常人 8 例と癌患者 40 例の血漿エクソソームからは、FEAT は検出されなかった。炎症反応で形質膜が破壊されて FEAT が遊離する可能性を検討するために、血漿中の CRP 濃度と FEAT 濃度を比較したが、相関は認めなかった。FEAT が細胞外に遊離する機

序は未だ不明である。

今後、自動化 ELISA キットを作成して千例以上の癌患者、他疾患の患者、健常人の検討を行うため、臨床検査関係の企業との共同研究の交渉を行っていく。

## B. FEAT を分子標的とする癌予防

### a. FEAT 阻害剤による癌予防

HeLa 細胞から FEAT と共に免疫沈降するタンパクを見出し、15 個のタンパクの cDNA をクローニングし、GST 融合タンパクとして大腸菌に発現、精製した。精製した His タグ融合 FEAT と精製した GST 融合タンパクの結合を調べ、4 個のタンパクが FEAT と直接結合することがわかった。今後この 4 タンパクを基質の候補としてメチル基転移酵素活性のアッセイ系を確立する。この酵素反応系を用いて化合物ライブラリーをスクリーニングし、FEAT 阻害剤を見出したい。

## C. FEAT の正常組織、癌細胞での機能

### a. FEAT ノックアウト ES 細胞の解析

FEAT ノックアウト (*Mettl13<sup>-/-</sup>*) マウス ES 細胞に胚様体 (embryoid body, EB) を形成させ、レチノイン酸で神経系へ分化誘導してメタボローム解析を行い、神経分化時に複数の解糖系酵素の異常を見出した。細胞破碎物の酵素活性の検討、細胞質内酵素量のウェスタンブロッティングによる比較、酵素の細胞内分布の蛍光免疫染色による検討を行った。

### b. FEAT の癌細胞内機能

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集で、FEAT を欠失した HeLa 細胞は得られなかつた。FEAT を欠失した HeLa 細胞は継代不能になると考えられた。

RNA 干渉実験で、FEAT は様々なタンパクとの相互作用を通じて、形質膜と酵素や細胞内小器官を結び付け、細胞の極性、纖毛形成、細胞運動を制御していることが示唆された。

shRNA をコードするレンチウイルスで Lewis 肺癌 (LLC) 細胞と B16-F10 メラノーマ細胞の FEAT をノックダウンし、C57BL/6 マウスの尾静脈に注射し、肺への転移に対する影響を調べた。

### c. FEAT 発現の制御機構

ヒト FEAT タンパクをコードする *METTL13* 遺伝子のプロモーター領域で駆動されるルシフ

エラーゼプラスミドに、欠失および部位特異的変異を導入し、HeLa 細胞でプロモーター活性を制御する領域を明らかにした。ゲルシフトアッセイで同領域へのタンパク結合を確認した。この領域に結合しうる転写因子を siRNA でノックダウンし、プロモーター活性を制御していることを見出した。今後、正常組織で FEAT 発現が抑制される機序を、プロモーター解析から明らかにしたい。

## 業績目録

### 学会発表

1. Y. Li, K. Kobayashi, C. Satomi, K. Tani, A. Takahashi (2015, 10/8).  
Biochemical and intracellular function of FEAT protein.  
第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋.
2. C. Satomi, M.M. Mona, K. Kobayashi, Y. Li, K. Tani, A. Takahashi (2015, 10/10).  
Regulation of human FEAT gene promoter.  
第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋.

## オルガネラホメオスタシス研究室

Division of Organelle Homeostasis

特任教授：藤木 幸夫

Professor : Yukio Fujiki, Ph.D.

2015年度から生体防御医学研究所特任教授として新規採用されオルガネラホメオスタシス研究室を立ち上げました。オルガネラホメオスタシス研究室は、藤木幸夫特任教授、本庄雅則特任准教授を中心に、阿部雄一（学術研究員）、井元祐太（学振特別研究員SPD）、大学院生2名、テクニカルスタッフ3名の体制で研究を進めている（2016年3月31日現在）。また、2016年3月に大学院博士課程のLiu Yuqiong（引き続き学術研究員として雇用予定）が学位を取得し卒業した。

本年度の成果等を研究の概要を述べながら報告致します。

真核生物の細胞内には膜で仕切られた細胞小器官（オルガネラ）が形成され、そこに特定のタンパク質が局在化することにより、高度な空間的秩序に基づく生命活動が営まれている。こうしたタンパク質の細胞内輸送およびオルガネラの形成・分化に関わるタンパク質群は、当然遺伝情報の支配下にあるが、細胞は細胞からのみ複製でき、オルガネラの多くは*de novo*には形成されず、遺伝情報とは独立に既存の構造が拡大・分裂することで娘細胞に伝えられる。したがってこれらのメカニズムの解明は、ゲノムに書き込まれた遺伝情報と、細胞構造というゲノムに書き込まれていない情報が協調して細胞の機能発現とその秩序維持を実現するという、生命現象の根幹に迫るきわめて重要な課題である。

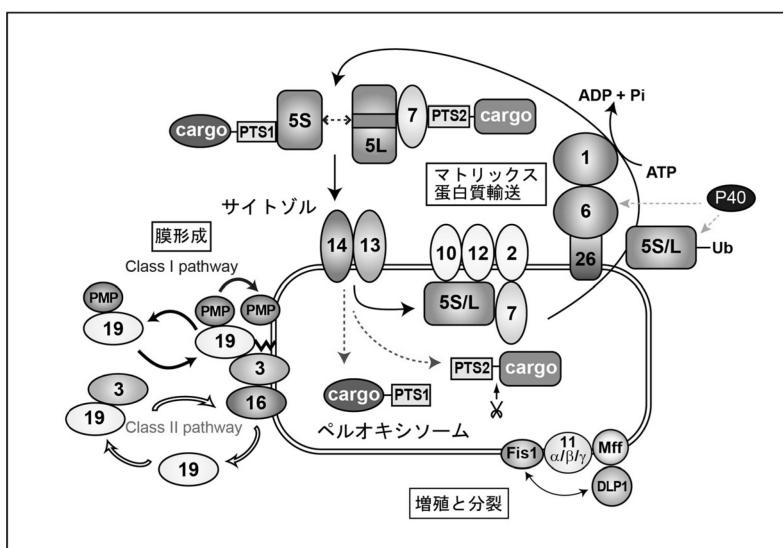
高等動物のペルオキシソームは過酸化水素の生成を伴う種々の物質酸化や極長鎖脂肪酸のβ酸化、エーテルリン脂質プラスマローゲンの生合成など、多くの代謝機能を有し生体に必須な細胞小器官（オルガネラ）である。ヒトにおいては、ペルオキシソームの形成不全は致死性の先天性代謝異常症であるZellweger症候群などのペルオキシソーム欠損症を引き起こし、中枢神経系の機能異常を含む多様かつ重篤な症状を呈する。近年、ペルオキシソーム形成に必須な多くのペルオキシン遺伝子(*PEX*)のクローニングと解析が飛躍的に進み、ペルオキシソーム欠損症の病因*PEX*遺伝子の全容解明に至った(*J. Cell Biol.* 1990; *Nature* 1991; *Science* 1992; *Nat. Genet.* 1995; *Nat. Genet.* 1997; *Nat. Cell Biol.* 2003など)（表1）。最近、ペルオキシソーム形成機構の概要が明らかになりつつある(*Nat. Cell Biol.* 2003; *J. Cell Biol.* 2008; *J. Cell Biol.* 2013など)（図1）。

表1 ペルオキシソーム形成異常症相補性群と相補(病因)遺伝子

相補遺伝子	ヒト相補性群		臨床型	遺伝子産物の特徴
	日本	欧米		
<i>PEX1</i>	E	1	ZS, NALD, IRD	AAA ファミリー
<i>PEX2 (PAFI)</i>	F	10	ZS, IRD	PMP, RING フィンガー
<i>PEX3</i>	G	12	ZS	PMP, PMP-DP
<i>PEX5</i>		2	ZS, NALD	PTS1受容体, TPR
<i>PEX6</i>	C	4(6)	ZS, NALD	AAA ファミリー
<i>PEX7</i>	R	11	RCDP	PTS2受容体, WD
<i>PEX10</i>	B	7(5)	ZS, NALD	PMP, RING フィンガー
<i>PEX11β</i>		16	ZS	PMP
<i>PEX12</i>		3	ZS, NALD, IRD	PMP, RING フィンガー
<i>PEX13</i>	H	13	ZS, NALD	PMP, PTS1-DP, SH3
<i>PEX14</i>	K	15	ZS	PMP, PTS1-DP, PTS2-DP
<i>PEX16</i>	D	9	ZS	PMP, PMP-DP
<i>PEX19</i>	J	14	ZS	PMP 受容体
<i>PEX26</i>	A	8	ZS, NALD, IRD	PMP, Pex1p-Pex6p 結合因子

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; RCDP, 斑状軟骨形成不全症 II 型 ; PMP, peroxisome membrane protein; DP, docking protein; TPR, tetratricopeptide repeat.

図1. 哺乳類ペルオキシンの細胞内局在と機能.



ペルオキシン中の数字は  
PEX 遺伝子産物固有の番号  
(発見順) を示す。PTS1 タンパク質は PTS1 受容体である Pex5p [2種のアイソフォーム、S型と L型(S型内部に 37 アミノ酸の挿入配列)が存在]により運ばれるが、PTS2 タンパク質は Pex5pL-Pex7p-PTS2 カーボ複合体として輸送され、膜透過装置を経てペルオキソーム内へ局在化される。Pex5pS/L

は PTS カーゴを遊離したのち、N 末端領域のシステイン残基にモノユビキチン化修飾を受け、AAA ファミリータンパク質 Pex1p、Pex6p および ATP 加水分解活性依存的にサイトゾルにエクスポートされる。Awp1/ZFAND6 (P40 と略)はユビキチン化修飾型 Pex5p と Pex6p に結合し、Pex5p のエクスポートを正の方向に制御していると考えられる。Pex3p, Pex16p, Pex19p はペルオキソーム膜アセンブリーに必須である。Pex3p を除くペルオキソーム膜タンパク質は Class I 経路を介して Pex19p 依存的に Pex3p へ標的化される。一方、Pex3p は Class II 経路により Pex19p 依存的に Pex16p へ標的化される。3 種の Pex11p アイソフォーム、ダイナミン様タンパク質 1(DLP1)および Fis1、Mff はペルオキソームの増殖・分裂制御に関わる。

## A. ペルオキシソーム形成因子（ペルオキシン）の機能

ペルオキシソームの形成機構については、サイトゾルの遊離型ポリソームで新規合成された構成タンパク質が既存のペルオキシソームに局在化し、その結果ペルオキシソームが成長、分裂して増殖していくという“growth and division model”が一般的に受け入れている(*Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 489–530, 1985). また、近年ペルオキシソーム特異的オートファジー（ペキソファジー）を介した分解機構 (*Autophagy* 10: 1549–1564, 2014)を含め、これらの統合的制御によりペルオキシソームのホメオスタシスが維持されていると考えられている。

ペルオキシソーム形成異常症の病因 PEX遺伝子の同定と並行してペルオキシン群の機能解析も大きく進展し、ペルオキシンの機能は、1) マトリクスタンパク質輸送、2) 膜タンパク質輸送と初期膜形成、3) 分裂と形態制御、の3つに大別されることが明らかとなつた(*Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1763: 1374–1381, 2006; *Front. Physiol.* 5: article 367, 2014)（表1；図1）。

### a-1. マトリクスタンパク質輸送に必須なペルオキシン

遊離型リボソームで合成されたペルオキシソーム移行シグナル-1 (PTS1) タンパク質は、1) サイトゾルでPex5pと結合、2) Pex5pとペルオキシソーム膜上のPex14pとの結合を介してペルオキシソームに標的化、3) Pex14pを含む複数の膜局在性ペルオキシンからなる膜透過複合体による膜透過、という過程を経てマトリクスへ移行する(*Front. Physiol.* 5: article 367, 2014)（図1）。

ペルオキシソーム膜透過輸送の分子メカニズム解明を目的として、その輸送装置複合体の同定、動的な構造変化およびペルオキシソーム移行シグナル受容体であるPex5pとの機能的な相互作用と膜透過輸送活性について解析を行つた。

哺乳動物細胞由来のPex14pを含む膜透過装置複合体をBlue Native-PAGEにより複合体I, II, IIIと名付けた3種の複合体として分離・同定し、それぞれ約600kD, 800kD, 1100kDの分子量であることを見いだした。複合体IにはPex26pが含まれており、AAAペルオキシンであるPex1pおよびPex6pがPex26pを介して複合体IIへ作用してPex5pが解離した後、複合体Iが形成されることも示唆された。Pex26pとPex14pの相互作用およびその解離の分子機構にはAAAペルオキシンが重要な役割を果たしていることを報告しており(*J. Biol. Chem.* 289: 24336–24346, 2014)，すなわちペルオキシソーム膜透過輸送におけるPex14p複合体のダイナミックな構造変化と輸送機序に関する新たな知見を得ることができた。Pex5pはサイトゾル-ペルオキシソーム間をシャトルするレセプターであり、サイトゾルへのエクスポートに必須はN末端領域システィン残基のモノUb化修飾(Cys-Ub化)はRINGフィンガー膜局在性ペルオキシンPex10p/Pex12p複合体により触媒される。一方、Pex5pのLys残基のマルチモノUb化およびRINGペルオキシン非依存的な

Lys520のモノUb化修飾によりマトリクスタンパク質輸送を調節している (*J. Biol. Chem.* 289, 14089–14108, 2014).

### a-2. 膜タンパク質の輸送・挿入に必須なペルオキシン

ペルオキシソーム膜局在性の Pex3p と Pex16p および主にサイトゾルに局在する Pex19p は、ペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)輸送に必須な因子である (*Front. Physiol.* 5: article 367, 2014) (図 1). これらいずれの因子の変異や欠損はマトリクスタンパク質の輸送障害に加えてペルオキシソーム膜の形成にも異常を呈し、ペルオキシソームが形態的に全く認められない (*Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1763: 1374–1381, 2006).

Pex19p は PMP とサイトゾル中で複合体を形成、安定化させ、膜上の Pex3p を標的として輸送局在化させる(Class I)経路を通る。ほとんどの PMP はこの Class I 経路で輸送される (*Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 1822: 1337–1342, 2012) (図 1). 一方、Pex3p は Pex19p とサイトゾルで複合体を形成後、ペルオキシソーム膜上の Pex16p へ局在化される経路 (Class II) を使う (*J. Cell Biol.* 183: 1275–1286, 2008) (図 1). PMP の輸送経路については、哺乳動物細胞または酵母を用いた実験系で統一された見解がまだ得られていない。

今年度、哺乳動物細胞における様々な PMP は、どの経路で局在化されるのか、複数の膜貫通領域を有するものも含めて代表的な PMP の膜局在化機構について詳細な解析を行った。その結果、新規に合成された哺乳動物由来の PMP はサイトゾルで Pex19p と結合した後、Pex19p による Pex3p との結合を介してペルオキシソームへ直接運ばれること (Class I 経路) を明らかにした。

### a-3. ペルオキシソームの分裂・形態制御に関わるペルオキシン

ペルオキシソームの分裂は、ペルオキシソーム膜の「伸張」「狭窄」、そして「切断」の 3 段階からなると考えられている (14). 哺乳類細胞におけるペルオキシソーム分裂の中心因子として Pex11p $\beta$ 、GTPase である dynamin-like protein 1 (Dlp1) は、ミトコンドリアとペルオキシソームに局在する fission1 (Fis1) や mitochondrial fission factor (Mff) 依存的にペルオキシソームにもリクルートされ、ペルオキシソームの分裂・形態を制御する (*Front. Physiol.* 5: article 367, 2014) (図 1).

近年、ペルオキシソームの分裂はリング構造の超分子ナノマシン peroxisome-dividing (POD) machinery によって行われることが明らかになってきている。この装置の形成と収縮機構を解明すべく解析系として、单一かつ分裂を同調化可能なペルオキシソームを含む単細胞紅藻シゾンを用いて、無傷な分裂期ペルオキシソーム単離分画法を開発した。プロテオーム解析の結果、この画分には GTPase Dnm1

が含まれており、分裂面で直径約 500 nm のリング構造を形成することを免疫蛍光・電子顕微鏡解析により明らかにした。さらに、このリングの単離に成功し、免疫電子顕微鏡解析によってリングの正体が、Dnm1 を含む糸状構造 Dynamin-based (DB) ring と、その内側に形成される纖維束 Filamentous (F) ring の 2 重構造から成る超分子ナノマシン peroxisome-dividing (POD) machinery であることを解明した。

## B. ペルオキシソーム欠損による障害

個体におけるペルオキシソーム形成障害は、とくに胎生期における脳・神経形成や器官形成異常として症状が顕在化するが、その発症機構は不明な点が多い (*Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 1822: 1337–1342, 2012).

### b-1. LC-MS/MS によるメタボローム解析系の確立と解析

我々は、LC-MS/MS を用いた脂質解析系を確立後、ZS患者由来の細胞において多価不飽和極長鎖脂肪酸のリン脂質中の蓄積およびDHA (C22: ドコサヘキサエン酸) 含有リン脂質の低下を明らかにし、これら代謝産物の異常が病態悪化に関連することを提唱している (*Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids* 1841: 610–619, 2014). また、軽度のプラスマローゲン減少であっても病態発症を引き起こすことを報告している (*J. Hum. Genet.* 59: 387–392, 2014). しかしながら、これら異常代謝産物が何れの細胞機能に障害を与えているか、その詳細は明らかとなっていない。脳形態形成に必須な高次細胞機能発現におけるペルオキシソーム代謝産物の機能解析は、ZS 発症機構解明において重要な課題であるといえる。

### b-2. エーテルリン脂質プラスマローゲンのホメオスタシス

プラスマローゲンの生合成不全は斑状軟骨形成不全症II型(RCDP)等の重篤な神経疾患を呈し、患児は生後早期に死に至るなど、プラスマローゲンは機能的に非常に重要なリン脂質である。プラスマローゲンは全 7 段階の反応を経て小胞体で合成が完了されるが、ペルオキシソームはそのうち初期 2 段階反応を、dihydroxyacetonephosphate acyltransferase (DHAPAT) およびalkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase (ADAPS) により担う。プラスマローゲンの生合成は細胞内プラスマローゲン量依存的なペルオキシソーム局在性C末アンカー蛋白質fatty acyl-CoA reductase 1 (Far1) の安定性制御により調節される (*J. Biol. Chem.* 285: 8537–8542, 2010; *J. Biol. Chem.* 288: 34588–34598, 2013).

今年度は、プラスマローゲン恒常性の生理的意義を明らかにすることを目的として細胞内プラスマローゲン量の増減による脂質合成への影響を検討した結果、プラスマローゲンの増加あるいは欠損によってコレステロールの新規合成が抑制されることを見出

した。さらに、プラスマローゲンの恒常性は、コレステロール生合成の第2律速酵素である squalene monooxygenase (SQLE) の小胞体局在性E3 ligase MARCH6 (membrane-associated ring finger 6) 依存的な分解を制御することを見出した。これらの知見は、小胞体におけるプラスマローゲンの機能を初めて明らかにした成果である。

なお、これら研究成果のうち、一部は田村茂彦教授（基幹教育院）および奥本寛治助教（理学研究院）との共同研究によるものである。

## 業績目録

### 原著論文

1. Yoshida, Y., Niwa, H., Honsho, M., Itoyama, A., and Fujiki, Y. 2015.  
Pex11p mediates peroxisomal proliferation by promoting deformation of the lipid membrane.  
**Biology Open** 4, 710-721.
2. Honsho, M., Abe, Y., and Fujiki, Y. 2015.  
Dysregulation of plasmalogen homeostasis impairs cholesterol biosynthesis.  
**J. Biol. Chem.** 290, 28822-28833.
3. Honsho, M., Yamashita, S., and Fujiki, Y. 2015.  
Peroxisome homeostasis: mechanisms of division and selective degradation of peroxisomes in mammals.  
**Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.** 1863, 984-991.
4. Liu, Y., Yagita, Y., and Fujiki, Y. 2015.  
The Pex19p- and Pex3p-dependent direct pathway imports divergent membrane proteins to peroxisomes.  
**Traffic** 17, 433-455.
5. Kuroiwa, T., Ohnuma, M., Nozaki, H., Imoto, Y., Misumi, O., and Kuroiwa, H. 2015.  
Cytological evidence of cell-nuclear genome size of a new ultra-small unicellular freshwater green alga, “*Medakamo hakoo*” strain M-hakoo 311 I. Comparison with *Cyanidioschyzon merolae* and *Ostreococcus tauri*.  
**Cytologia** 80, 143-150.
6. Kuroiwa, T., Ohnuma, M., Imoto, Y., Misumi, O., Nagata, N., Miyakawa, I., Fujishima, M., Yagisawa, F., and Kuroiwa, H. 2016.  
Genome size of the ultrasmall unicellular freshwater green alga, *Medakamo hakoo* 311 as

determined by staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole after microwave oven treatments: II. Comparison with *Cyanidioschyzon merolae*, *Saccharomyces cerevisiae* (n, 2n) and *Chlorella variabilis*.

**Cytologia** 81, 69-76.

## 総説

1. 藤木幸夫, 奥本寛治, 本庄雅則. 2015.  
ペルオキシソーム形成異常と疾患.  
医学のあゆみ, 254, 397-401.
2. 藤木幸夫, 本庄雅則. 2016.  
エーテルリン脂質プラスマローゲンの生合成とその障害.  
機能性食品と薬理栄養 19, 322-327.
3. 藤木幸夫. 2016.  
小児の症候群: Zellweger 症候群 (Zellweger syndrome).  
小児科診療, 第 79 卷増刊号, in press.

## 著書

1. Fujiki, Y., Okumoto, K., and Honsho, M. 2015.  
Protein import into peroxisomes: the principles and methods of studying (version 2.0).  
Encyclopedia of Life Sciences, Published Online, 14<sup>th</sup> April, 2015. pp. 1-7.  
DOI: 10.1002/9780470015902.a0002618.pub2  
John Wiley & Sons, Chichester, UK.
2. Honsho, M., and Fujiki, Y. 2016. (in press).  
Analysis of plasmalogen synthesis in cultured cells.  
In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (Series Ed.: Walker, J.M.),  
Springer, Humana Press, New York, USA
3. Yamashita, S., Oku, M., Sakai, Y., and Fujiki, Y. 2016. (in press).  
Experimental systems to study yeast pexophagy.  
In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (Series Ed.: Walker, J.M.),  
Springer, Humana Press, New York, USA
4. Liu, Y., Honsho, M., and Fujiki, Y. 2016. (in press).  
*In vitro* PMP import analysis using cell-free synthesized PMP and isolated peroxisomes.

- In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (Series Ed.: Walker, J.M.),  
 Springer, Humana Press, New York, USA
5. Okumoto, K., and Fujiki, Y. 2016. (in press).  
 Generation of peroxisome-deficient somatic animal cell mutants.  
 In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (Series Ed.: Walker, J.M.),  
 Springer, Humana Press, New York, USA
6. Okumoto, K., Honsho, M., Liu, Y., and Fujiki, Y. 2016. (in press).  
 Peroxisomal membrane and matrix protein import using a semi-intact mammalian cell system.  
 In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (Series Ed.: Walker, J.M.),  
 Springer, Humana Press, New York, USA
7. Yamashita, S., and Fujiki, Y. 2016. (in press).  
 Assessing pexophagy in mammalian cells.  
 In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (Series Ed.: Walker, J.M.),  
 Springer, Humana Press, New York, USA
8. Okumoto, K., Tamura, S., and Fujiki, Y. 2016. (in press).  
 Blue-Native PAGE: Applications to study on peroxisome biogenesis.  
 In: Schrader, M. (ed.) Peroxisomes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (Series Ed.: Walker, J.M.),  
 Springer, Humana Press, New York, USA

## 学会発表（口頭発表）

- 井元祐太, 黒岩常祥, 藤木幸夫 (2015.5.16-17).  
 ペルオキシソーム分裂装置(POD machinery)の同定と微細構造の解析  
 H27 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡.
- Liu, Y., Yagita, Y., and Fujiki, Y. (2015.5.16-17).  
 Direct targeting of membrane proteins to mammalian peroxisomes.  
 H27 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡.
- 本庄 雅則, 阿部 雄一, 藤木 幸夫 (2015.6.28-29).  
 エーテルリン脂質プラスマローゲン依存的なコレステロールの生合成制御  
 第 57 回日本脂質生化学会, 東京.

4. 井元祐太, 本庄雅則, 奥本寛治, 大沼みお, 黒岩晴子, 黒岩常祥, 藤木幸夫 (2015.6.30-7.2).  
ミトコンドリアとペルオキシソーム分裂リングの収縮機構解明に挑む—原始紅藻シゾン  
のポストゲノム情報を基盤として  
第 67 回日本細胞生物学会大会, 東京.
5. 阿部彰子, 永井友朗, 藤木幸夫, 水野健作 (2015.6.30-7.2).  
一次纖毛形成制御キナーゼ N D R 2 は C 末端 G K L モチーフを解してペルオキシソームに  
局在化する  
第 67 回日本細胞生物学会大会, 東京.
6. 外山隆介, 小野立晃, 下村紋子, 奥本寛治, 藤木幸夫 (2015.6.30-7.2).  
精巣に高発現するペルオキシソーム局在型 Miro1 バリアントの機能  
第 67 回日本細胞生物学会大会, 東京.
7. Fujiki, Y., Abe, Y., and Honsho, M. (2015.7.15-17). 招待講演  
Plasmalogen homeostasis and peroxisomal disorders.  
2015 GFPD & ULF International Peroxisome and Leukodystrophy Meeting, Omaha, USA
8. 藤木幸夫 (2015.10.29). 招待講演  
プラスマローゲンの恒常性維持とその破綻  
プラズマローゲン研究会主催 第 2 回シンポジウム, 東京.
9. Imoto, Y., Kuroiwa, .T, and Fujiki, Y. (2015.11.14).  
Ultrastructure of ring-shaped supramolecular nanomachinery for the division of Peroxisome and  
Mitochondrion revealed by EM-Based single organelle analysis.  
The 25th Hot Spring Harbor International Symposium: Cutting Edge of Technical Innovations in  
Structural and Systems Biology, 福岡.
10. 細井謙一郎, 宮田暖, 向井悟, 古木聰美, Emily H. Cheng, 藤木幸夫 (2015.12.1-4).  
Bcl-2 ファミリータンパク質を介したペルオキシソーム形成制御  
BMB2015, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸.
11. 本庄 雅則, 阿部雄一, 藤木幸夫 (2015.12.1-4).  
エーテルリン脂質プラスマローゲンの恒常性の生理的意義  
BMB2015, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸.
12. Imoto, Y., Abe, Y., Honsho, M., Okumoto, K., Yoshida, M., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and Fujiki,  
Y. (2015.12.1-4).  
Analysis of ultrastructure and molecular mechanism of the mitochondrion and peroxisome dividing  
machineries.  
BMB2015, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸.
13. Liu, Y., Yagita, Y., and Fujiki, Y. (2015.12.1-4).  
Direct targeting of membrane proteins to peroxisomes in mammals.

- BMB2015, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸.
14. 奥本寛治, 永田愛子, 藤木幸夫 (2015.12.1-4).  
ペルオキシソーム局在性テイルアンカータンパク質 Pex26 の品質管理と膜局在化機構  
BMB2015, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸.
15. Miyata, N., Mukai, S., Cheng, E. H., and Fujiki, Y. (2015.12.12-16).  
Regulation of peroxisome biogenesis by mitochondrial proteins.  
2015 ASCB Annual Meeting, San Diego, USA.
16. Imoto, Y., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and Fujiki, Y. (2015.12.12-16).  
Analysis of ultrastructure and molecular mechanism of the peroxisome-dividing (POD) machinery.  
2015 ASCB Annual Meeting, San Diego, USA.
17. Imoto, Y., Kuroiwa, T., and Fujiki, Y. (2016.2.8-9).  
Discovery of ring-shaped supramolecular nanomachinery for organelle division by single-organelle  
EM analysis.  
Progress 100 International Symposium: Protein trafficking and intracellular signaling of plant and  
fungal cells, 福岡
18. Fujiki, Y., Liu, Y., Imoto, Y., and Honsho, M. (2016.2.22-25) 招待講演  
Homeostasis of peroxisome biogenesis and functions.  
PEROXISYSTEM: Understanding peroxisomes as a complete biological system, Rehovot, Israel.