

## 博士論文

論文題目      ミトコンドリア局在ホスファターゼ PGAM5 の  
切断制御因子の同定と解析

氏      名      金丸   雄祐

## 目次

2. 序論	3
3. 方法	7
4. 結果	22
5. 考察	33
6. 総括	41
7. 参考文献	42
8. 図表	52
9. 謝辞	89

## 序論

ミトコンドリアは、細胞内で ATP 産生によるエネルギー供給の場としてのみならず、細胞死制御をはじめとする様々な生命機能を担い、細胞・個体の機能維持に重要な役割を持つ細胞小器官の一つである。しかしながら、活発な酸素呼吸の過程で発生する活性酸素は、不良タンパク質の蓄積や、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の変異、膜脂質の酸化など、ミトコンドリア内に様々なストレスを負荷し、ミトコンドリアの機能不全を誘導する [1]。特に、これらのストレスに起因する電子伝達系の機能傷害は、さらなる活性酸素の増加を誘導し、ミトコンドリア内でストレスの悪循環が生じることが知られている。こうしたストレス環境の中で、ミトコンドリアが多様な生命機能を発揮し、細胞・個体の機能を支えるためには、ミトコンドリアが自身内部の異常を感知し、適切なストレス応答を誘導する機構が必須であると考えられる。

近年、ミトコンドリア局在分子の切断がミトコンドリアの膜電位低下依存的に制御されていること、またこれらの制御がミトコンドリアのストレス応答に重要な役割を担っていることが明らかになってきている (序論図. 1) [1, 2]。

例えば、ミトコンドリア融合分子 Optic atrophy 1 (OPA1) や、パーキンソン病原因遺伝子 PTEN induced putative kinase 1 (PINK1) はミトコンドリア膜電位低下に伴ってその切断が制御される分子として知られている。ミトコンドリア融合因子 OPA1 は OMA1 というプロテアーゼによって切断されることで融合促進活性が失われることが示唆されており (序論図. 1A) [3, 4]、この機構はミトコンドリアストレスにより膜電位が低下したミトコンドリアが他の正常ミトコンドリアと再融合することを防ぐ目的があると考えられている [1]。また、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物として知られる PINK1 は定常状態では presenilin associated, rhomboid-like (PARL) というプロテアーゼによって切断されているが、ミトコンドリア膜電位低下を誘導すると、切断を免れ、外膜で安定化することが報告されている [2]。外膜で安定化した PINK1 は、膜電位低下を起こした機能不全ミトコンドリアの目印として機能し、ダメージを受けたミトコンドリアを特異的にオートファジーに誘導する機構「Mitophagy」を誘導することがわかっている (序論図. 1B) [5, 6]。これらの例はいずれも、ミトコンドリア膜電位低下により機能不全となったミトコンドリアを健康なミトコンドリアのネットワークか

ら隔離させ、積極的に排除してミトコンドリアの品質管理をすることがその生理的意義として考えられている [7]。

PGAM5 (Phosphoglycerate mutase 5) は、当研究室において、ストレス応答性 Mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路の最上流に位置する MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) の 1 つ、Apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 の新規活性化因子として同定された [8]。PGAM5 は線虫から哺乳類にいたるまで種を超えて保存されたタンパク質であり、一次構造上の相同性から、Phosphoglycerate mutase (PGAM) ファミリーに属する [9]。このファミリーに属する分子のいくつかは解糖系においてホスホグリセリン酸の分子内リン酸基転移反応を触媒するムターゼ活性を持つことが知られる。PGAM5 においても、ムターゼ活性に必須の酵素活性中心のアミノ酸が保存されているが、当研究室の解析により、PGAM5 はムターゼ活性を持たないこと、その一方で、PGAM5 はセリン・スレオニン特異的プロテインホスファターゼ活性を有することが明らかとなった [8]。PGAM ファミリーに属する分子の中でも、PGAM5 は細胞内局在についても特徴を有し、PGAM5 は、N 末端の膜貫通ドメインを介しミトコンドリア内膜に局在する [10]。

当研究室におけるこれまでの解析により、PGAM5 もまたミトコンドリア膜電位低下依存的に切断を受けることが分かっている(序論図. 2) [10]。エドマン分解の結果から、切断型 PGAM5 の N 末端アミノ酸配列は、AVAV という配列であることが確認されており、この配列は PGAM5 の Transmembrane domain 内に存在することから PGAM5 は膜内切断を受けていることがわかる (序論図. 2) [10]。

PGAM5 の切断の生理的意義として、最近、他の研究室からアポトーシスへの関与が報告されている (序論図. 3) [11]。切断型 PGAM5 はアポトーシス誘導時にミトコンドリアから細胞質へと放出され、AVAV を含む断端配列を用いてカスパーゼ阻害因子である X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) に結合し、その機能の阻害を介し、アポトーシスの促進因子としてはたらくことが報告されている(序論図. 3) [11]。これらの結果から、PGAM5 の切断もまたストレス応答機構の一つとして機能していることが推察される。

当研究室のこれまでの解析から、PGAM5 の切断は先述した 2 つのプロテアーゼ、PARL と OMA1 が協調的にはたらくことによって起こる事が分かっている (序論図.

4) [10]。脱共役剤である carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) を用いてミトコンドリア膜電位を低下させると、PGAM5 は切断され、Western Blot 上の PGAM5 のバンドは切断型である下一本に収束する (序論図. 4A レーン 1-3)。PARL 欠損マウス由来マウス胚性線維芽細胞 (MEF) において、この PGAM5 の切断は抑制されるが、完全ではない (序論図. 4A レーン 7-9)。同様に、OMA1 を発現抑制においても PGAM5 の切断は部分的に抑制される (序論図. 4A レーン 4-6)。一方で、PARL 欠損マウス由来 MEF に OMA1 の発現抑制を行うと、PGAM5 の切断はほぼ完全に抑制される (序論図. 4A レーン 10-12)。これらの結果から、PGAM5 の切断は PARL と OMA1 という2つのプロテアーゼによって担われていることが示唆される。しかしながら、これらのプロテアーゼがどのようにミトコンドリア膜電位低下によって制御されているか、その詳細なメカニズムについては不明な点が多く残されている。そこで私はミトコンドリア膜電位低下依存的な PGAM5 の切断をモデルとして、PGAM5 の切断を制御する因子を探索することで、ミトコンドリア膜電位を感知し応答している分子やプロテアーゼ活性の制御因子を同定しようと考えた (序論図. 5)。

本研究において、私は PGAM5 の新規切断制御因子として Phosphatidylserine decarboxylase (PISD) から合成されるホスファチジルエタノールアミン (PE) を同定し、PE が PARL の酵素活性を制御していることを明らかにした。

PISD はホスファチジルセリン (PS) から PE を合成するリン脂質代謝酵素である [12]。PE の合成はミトコンドリア内膜に存在する PISD による PSD 経路と ER に存在する choline/ethanolamine phosphotransferase 1 (CEPT1) による CDP-Etn 経路が存在するが、リン脂質輸送によるミトコンドリアへの PE の輸送経路は限定的であり、PISD の酵素活性による PS から PE の合成がミトコンドリア PE の供給に重要であることが知られている [12]。そのため、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞における PISD の発現抑制や、Yeast における PISD オルソログである Psd1 の欠損株において PE 量が減少することが報告されている [13, 14]。

PE はミトコンドリア内膜において全リン脂質のうち約 30% を占めており、他のオルガネラの平均 (約 20%) に比べて多く存在している [15]。ミトコンドリア PE はミトコンドリアの呼吸鎖複合体の活性に重要であるといわれている一方で [13]、PISD の

発現抑制によりミトコンドリア PE が減少した場合においても、ミトコンドリアの膜電位は低下しないことが知られている [13]。しかしながら、PISD の欠損マウスは胎生致死になることから [16]、ミトコンドリア PE が生存において必須であることが予想されるが、その機能に関しては不明な点が多い。

PARL はミトコンドリアに局在する唯一のロンボイドプロテアーゼファミリータンパク質である。ロンボイドプロテアーゼファミリーは、Intramembrane-cleaving proteases (I-Clips) ファミリーの 1 つで、セリンを酵素活性中心とする膜内切断酵素群である [17, 18]。ロンボイドプロテアーゼの基質に共通して見られるコンセンサス配列も同定されており [19]、PGAM5 の切断部位周辺のアミノ酸配列は、報告されているコンセンサス配列とほぼ一致する。したがって、PARL が PGAM5 を直接切断している可能性が高いと考えられる。しかしながら、生化学的実験による直接の証明は行われていない。

また、PARL によって切断制御される PGAM5 と PINK1 は共に内膜に存在しながら、PINK1 は定常状態で切断される一方で、PGAM5 は膜電位低下依存的に切断される [2, 10]。このことから、PARL の基質がミトコンドリア膜電位低下に伴い、PINK1 から PGAM5 へ入れ替わっていることが予想されるが、このようなロンボイドプロテアーゼの刺激依存的な基質変化や活性制御の分子メカニズムに関しては、全く明らかとなっていない。

本研究において私は、PGAM5 の切断効率を定量的に評価できる実験系を構築し、Image-based のゲノムワイド siRNA スクリーニングを行うことで、新規 PGAM5 切断制御因子として、PISD を同定し、この PISD によって合成されるホスファチジルエタノールアミン (PE) が PARL による PGAM5 の切断に必要であることを見いだした。また、PARL による PGAM5 の切断を *in vitro* で再構成する系を構築することで、PGAM5 が PARL の直接の基質であることを証明し、PE が PARL の酵素活性を制御している可能性を見出した。

## 方法

### 細胞培養

HeLa 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS ; Biowest), 100 units/ml ペニシリン G カリウム (PG ; 明治製菓) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma) High Glucose で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

hPGAM5-Flag stable HeLa 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS ; Biowest), 100 units/ml ペニシリン G カリウム (PG ; 明治製菓), puromycin (Gibco) 5 µg/ml を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Sigma) High Glucose で、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

PLAT-E 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS ; Biowest), 100 units/ml ペニシリン G カリウム (PG ; 明治製菓), puromycin (Gibco) 1 µg/ml, 10 µg/ml Brastcidine (Invitrogen)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Sigma) High Glucose で、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

CHO 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS ; Biowest), 100 units/ml ペニシリン G カリウム (PG ; 明治製菓) を含む Ham's F-12 (Wako) で、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 試薬

Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP, Sigma)

PE: Egg PE (Avanti Polar Lipids)

LysoPE: 18:1 Lyso PE (Avanti Polar Lipids)

PS: Brain PS L-α-phosphatidylserine (Brain, Porcine, Avanti Polar Lipids)

PC: Egg PC (Avanti Polar Lipids)

PI: Liver PI (Avanti Polar Lipids)

n-Dodecyl β-D-maltoside: DDM (Sigma)

各遺伝子のノックダウンは以下に示す配列の Stealth™ RNAi (Invitrogen)を用いた。

PISD #1: 5' CGGGAAGGGAAUGAGCUCUAUCACU 3'  
PISD #2: 5' UGGAUCAAAAGAGCUCUUCUGCCAUA 3'  
PARL: 5' UUCACUAGCGGCUCCUGUUCUUC 3'  
OMA1: 5'-CAGCAGUCCCUAGUCUGUCAGUAUU-3'  
mPISD #1: 5' GGGUACCGGCAGUAUGAGAAGUACA 3'  
mPISD #2: 5' GCAUGGCCCGAUGGAUCAAAAGAGCU 3'  
mPARL: 5' AAAGACUGUUUCUUCUCCAGAGGCGGG 3'  
mOMA1: 5' CCGGAAGGAGCAAACUGUUGUUACU 3'

### **プラスミド DNA 導入**

細胞を播種し、上述の培養条件で 12-18 時間培養後、トランスフェクションカクテルを添加し、さらに 24-48 時間培養した。トランスフェクションカクテルは、HeLa 細胞に対しては、100  $\mu$ l DMEM (100 units/ml Penicillin G 含有) 中に、1.5  $\mu$ g のプラスミド DNA ミックス、3  $\mu$ l PEI-MAX (polysciences)を混和し、室温に 15 分静置して作製した。

### **Western Blot 法**

#### **[細胞からのサンプル調製]**

培養した細胞に、IP lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10mM EDTA, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton-X 100, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5  $\mu$ g/ml leupeptin) に置換し、4°C 10 分以上溶解した。この細胞溶解液を回収し、15,000 rpm, 4°Cで 10 分間遠心した後、上清 50  $\mu$ l を等量の 2 $\times$ SDS sample buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 10% bromophenol blue, 36% glycerol, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mM dithiothreitol) と混合し、98°Cで 3 分間煮沸することで sample 化した。なお、Silencer Select siRNA を用いる場合は、96 well プレートにて IP Lysis buffer 140  $\mu$ l/well で溶解し、上清 50  $\mu$ l を等量の 2  $\times$  SDS sample buffer と混合し、98°Cで 3 分間煮沸することで sample 化した。

#### **[分離・転写・検出]**

sample は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離し、セミ

ドライ式のプロッターによって BioTrace™ polyvinylidene difluoride membrane (0.45  $\mu\text{m}$ ; Pall)へと転写した。転写後、メンブレンを 5% Skim Milk (雪印) を含む TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.05% tween 20) に浸し、室温で 2 hr 程度 blocking した。その後、TBS-T で wash し、1st antibody dilution buffer (TBS-T に 5% bovine serum albumin (BSA; 岩井化学) と 0.1% NaN<sub>3</sub> を添加) で希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。翌日、メンブレンを TBS-T で wash し、5% Skim Milk を含む TBS-T で希釈した、二次抗体と常温で一時間反応させた。そして、TBS-T で 2 時間 wash して、Enhanced chemiluminescence (ECL) システム (GE Healthcare) を用いて検出した。

### 【抗体】

一次抗体として、マウスモノクローナル抗 Actin 抗体 (Sigma)、マウスモノクローナル抗 FLAG 抗体 (Sigma)、マウスモノクローナル抗 OPA1 抗体 (BD Transduction Laboratories) を使用した (Tom70、Tim23 は久留米大学石原先生より供与)。ラビットポリクローナル抗 PGAM5 抗体 (RTL)二次抗体として、いずれも Horseradish Peroxidase (HRP) 標識された、抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare)、抗ラット IgG 抗体 (Cell Signaling)、抗ラビット IgG 抗体 (Cell Signaling) を用いた。

### 免疫沈降法

培養した細胞に IP lysis buffer を加え、4°C 20 分間振盪して、細胞を溶解した。細胞溶解物を遠心して得た上清から、50 ml をとって SDS sample buffer を等量加え、Lysate サンプルとした。抗 FLAG 抗体で免疫沈降する場合は、Anti-FLAG M2 agarose (Sigma) もしくは Anti-FLAG 1E6 agarose (Wako) を 20  $\mu\text{l}$ /tube で加え、4°Cで 30 分間転倒混和し、IP lysis buffer で wash した。wash した beads に、2 倍量の DTT を加えた SDS sample buffer を添加して、98°Cで 3 分煮沸して IP サンプルとした。サンプルはウェスタンブロット法によって解析した。

### 細胞免疫染色法

15 mm 丸形カバーガラス (MATSUNAMI) およびガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) のコートは、Cellmatrix type I -C (新田ゼラチン) でコートを行った

あと、PBS で洗浄し、各細胞を播種した。細胞は、2% ホルムアルデヒド (Wako) で室温 20 分間固定し、0.2% TritonX-100 で室温 10 分間浸透化を行い、ブロッキングは、0.2% BSA (岩井化学) で 30 分間行った。一次抗体は抗 Flag 抗体 (PA1-984B; Thermo Scientific)、AVAV 抗体、二次抗体は、Alexa 594 anti-mouse IgG (Invitrogen)、Alexa 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen) を用い、室温で 1-2 時間インキュベートした。PBS および MilliQ で wash し、スライドガラスに ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) を滴下し、細胞を封入した。細胞は、Axiovert 100 M inserted microscope (Carl Zeiss)を用いて、LSM510 confocal laser scanning unit (Carl Zeiss)、あるいは TCS-SP5 (Leica) で観察した。

### **ミトコンドリア単離および単離ミトコンドリアを用いたリン脂質定量**

#### **[ミトコンドリア単離]**

ミトコンドリア粗分画は、細胞を等張ホモジナイズバッファー (10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 0.22M Mannitol, 0.07M sucrose) で懸濁後、ホモジナイザーで 30 回ホモジナイズして細胞を破碎した後、4°C、500g で 10 分間遠心して上清を採取し、この上清を 4°C、8000g で 10 分間遠心し、沈殿物を回収することで得た。

精製ミトコンドリアは粗ミトコンドリアを Percoll 密度勾配遠心を行うことで得た。下から 40% Percoll 1ml、23% Percoll 3 ml、粗ミトコンドリアを 15% Percoll 1ml で懸濁したものを重層し、20,000 g, 4°C, Slow accel, Slow brake で 30 分遠心した。下から 1 ml 付近の中間層を回収し、ホモジナイズバッファーで 4 回 wash した。

#### **[Bligh and Dyer 法による脂質抽出]**

精製ミトコンドリアを 0.9% KCl 溶液で 1 ml にメスアップし、メタノール (Wako) 2 ml、クロロホルム (Wako) 1 ml を加え、5 分間 vortex する。0.9% KCl 1 ml、クロロホルム 1 ml を加え、5 分間 vortex し、2,500 rpm 5 分間遠心し、下層を回収した。上層にクロロホルム 2 ml、2N HCl 10  $\mu$ l を加え、5 分間 vortex し、2,500 rpm 5 分間遠心し、下層を回収した。回収した溶液を合わせ、窒素下で乾固させた。

#### **[LC/MS によるリン脂質の定量]**

抽出した脂質はリン定量を行い、リン量に合わせ内部標準を加えた。これを LC/MS で

測定した。

RPLC: Acquity UPLC HSS T3 カラム (2.1 mm × 100 mm × 1.7 μm; Waters)

HILIC: Acquity UPLC BEH HILIC カラム (2.1 mm × 100 mm × 1.7 μm; Waters)

MS/MS: リニアイオントラップ型四極質量分析計 (QTRAP 4500; AB Sciex, Foster City, CA)

定量は各リン脂質の分子種のピークの面積を算出し、内部標準で割ったものを合計した。

(内部標準)

12:0, 13:0 PS

12:0, 13:0 PE

12:0, 13:0 PI

12:0, 13:0 PC

(測定条件)

PE: HILIC, full scan

PC: RPLC, neutral loss scan of 74 kDa

PS: RPLC, neutral loss scan of 87 kDa

PI: RPLC, precursor ion scan of  $m/z = 241$

### ミトコンドリア膜電位の測定

培養した細胞に、TMRE を終濃度 50 nM になるように添加し、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベータで 20 分培養した。細胞を PBS で wash し、トリプシン消化後、培地で細胞を懸濁した。件諾した細胞は BD FACScalibur で 10,000 細胞あたりの蛍光強度を測定した。

### PGAM5 切断型特異的抗体 (AVAV 抗体) の作製

#### [マウスへの免疫]

抗原として切断型 PGAM5 の N 末端のアミノ酸配列

NH<sub>2</sub>-AVAVGKPRC-COOH

を 1 mg/ml に調整した切断型 PGAM5 KLH コンジュゲート化ペプチドを外注した

(Operon)。

また、切断型特異的な抗体の評価のために

Acetyl-AVAVGKPRC-COOH

を 1 mg/ml に調整した非切断型 PGAM5 KLH コンジュゲート化ペプチドを外注した (Operon)。

この切断型 PGAM5 KLH コンジュゲート化ペプチド 100  $\mu$ l と Freund's complete adjuvant (Sigma) 200  $\mu$ l をルアー式注射器でよく混ぜエマルジョン化し、抗原とした。調整した抗原は一匹あたり 200  $\mu$ l をマウス (C57BL/6JJmsSlc メス 免疫時 9 週齢; 日本エスエルシー) 3 匹に尾こん部より片足 100  $\mu$ l ずつ筋肉注射した。

### [細胞融合]

免疫から 2 週間後のマウスから腸骨リンパ節を摘出し、セルストレイナー (BD falcon) を用いて、リンパ節から抗体産生 B 細胞を含むリンパ節組織細胞を DMEM 2 ml 中に回収した。

このリンパ節細胞液を、DMEM 5 ml に浮遊させた SP2 に加え、DMEM で全量 40 ml として懸濁後、1,200 rpm、10 分間遠心した。上清を吸引除去し沈殿をほぐした後、37 °C で 2 分間インキュベートした。そこに、融解させた poly ethyleneglycol (PEG ; nacalai tesque) 1 ml を 1 分かけてゆっくり滴下し、2 分間震盪することで融合反応を行った。反応終了後、DMEM 9 ml を 二回にわけ、一回目は 3 分、2 回目は 2 分かけて滴下した。900 rpm、5 分遠心後、上清を吸引除去し、BM-Condimed H1 (Roche) 4 ml 及び、HAT 培地 36 ml を加えて細胞を浮遊させた。この細胞懸濁液を 96 well プレートに 100  $\mu$ l/well ずつ播種した。

### [ELISA]

96 well Maxisorp ELISA plate (Nunc) に 3  $\mu$ g/ml の KLH conjugated 切断型 PGAM5 ペプチドもしくは、KLH conjugated 非切断型 PGAM5 ペプチドを含む PBS を 100  $\mu$ l/well で加え、4 °C で一晩インキュベートして抗原を吸着させた。抗原液を捨てて、1% BSA を含む PBS を 100  $\mu$ l/well で添加し、37 °C で 1 時間インキュベートしてブロッキングした。その後、ハイブリドーマ培養上清を 40  $\mu$ l/well で添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。培養上清を捨て、PBS で 2 回洗浄し、HRP 標識 mouse IgG

抗体 (GE Healthcare) 原液を 1000 倍希釈した 0.1% BSA を含む PBS を 100  $\mu$ l/well で添加し、37 °Cで 1 時間インキュベートした。二次抗体を捨て、PBS で 3 回洗浄し、0.4 mg/ml o-phenylenediamine (OPD ; 和光純薬) を含む PBS に 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (和光純薬) を 0.4  $\mu$ l/ml で調整した基質液を 100  $\mu$ l/well で添加し、室温で 30 分放置し発色させた。その後、1 mM HCl を 50  $\mu$ l/well で添加し、反応を停止させ、Labsystems Multiskan BICHROMATIC (Labsystems) を用いて 490 nm での吸光度を測定した。その結果、切断型 PGAM5 ペプチドで反応し、非切断型で反応しないクローンを選択した。

#### **[限界希釈]**

24 well で培養していたポリクローンのハイブリドーマを 96 well プレートに 1.5 cell/well ずつ播種した。限界希釈でモノクローン化したハイブリドーマは ELISA で切断型 PGAM5 ペプチドで反応し、非切断型で反応しないことを確認した。

#### **[腹水、IgG 精製]**

限界希釈でモノクローン化したハイブリドーマは、BM-Condimed H1 を抜いた培養条件に適応させた後、ヌードマウスを用いた腹水精製、IgG 精製を外注した (MBL)。

#### **PGAM5 安定発現細胞の樹立**

PGAM5-Flag を発現する組み換えレトロウイルスベクターをコードするプラスミドを、pMX-IP-DEST ベクターをディスティネーションベクターとし Gateway システム (Invitrogen) の LR/BP 反応を利用して作製した。作製したプラスミドを PLAT-E 細胞にトランスフェクションし、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 48 時間培養した。その後、培養上清を回収し、ウイルス液とした。mSlc7a1-Flag をトランスフェクションした HeLa 細胞の培養上清を除きにウイルス液原液中で 48 時間培養することで感染させた。感染させた細胞は puromycin 1  $\mu$ g/ml で選択し、モノクローン化した。

半自動化による細胞免疫染色 (High-throughput screening 系)

溶液の添加には Multidrop Combi (Thermo Scientific) を用いた。

溶液の吸引と、プレートの洗浄には AquaMax2000 (Molecular devices) を用いた。

### **プラスミド DNA の作製**

以下のコンストラクトは、Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (FINNZYMES) を用い、PCR 法により作製した。

PARL-3'FLAG 発現用ベクターは、以下のプライマーを用いて作製した。

(sense) 5' GCGAATTCATGGCGTGGCGAGGCTGGGCGCA 3'

(antisense) 5' GCCTCGAGCTTAGAGCCACCTCCTTTTT 3'

PCR 産物を pcDNA3-GW-3'FLAG の EcoR I / Xho I サイトに挿入した。

PINK1-3'FLAG 発現用ベクターは、以下のプライマーを用いて作製した。

(sense) 5' GCAAGCTTGCCACCATGGCGGTGCGACAGGCGCTGGGC 3'

(antisense) 5' GCCTCGAGCAGGGCTGCCCTCCATGAGCAGAG 3'

PCR 産物を pcDNA3-GW-3'FLAG の Hind III / Xho I サイトに挿入した。

PISD-3'FLAG 発現用ベクターは、以下のプライマーを用いて作製した。

(sense) 5' GCGAATTCGCCACCATGGCGACGTCCGTGGGGCA 3'

(antisense) 5' GCCTCGAGGAGCGAGCCCAGGGCTTCCCCA 3'

PCR 産物を pcDNA3-GW-3'FLAG の EcoR I / Xho I サイトに挿入した。

GST-ΔMTS PARL 発現用ベクターは、以下のプライマーを用いて作製した

(sense) 5' GCGAATTCTTCAGAAAAGCACCCAGGAAGG 3'

(antisense) 5' GCCTCGAGTTACTTAGAGCCACCTCCTTTTTTGGG 3'

最終 PCR 産物を pGEX6p-1 ベクターのサイトの EcoR I / Xho I サイトに挿入した。

GST-PGAM5 発現用ベクターは、以下のプライマーを用いて作製した。

(sense) 5' GCGAATTCGGCATGGCGTTCCGGCAGGCGC 3'

(antisense) 5' GCCTCGAGTCAGGATCGAGTGATCTTGTCG 3'

最終 PCR 産物を pGEX6p-1 ベクターのサイトの EcoR I / Xho I サイトに挿入した。

### **PARL、及び PISD 変異体の作製**

PARL 及び PISD 変異体は、以下に示すプライマーセットで、PCR を行い、変異を導

入した。

PARL (S277G) プライマー：

5' CCATCACTTGGTGCAGGTGGTGCCATCATGACA 3' およびその相補配列

PISD (LAAT) プライマー：

5' TTCAACCTGGCCGCCACCATCGT 3' およびその相補配列

PISD ( $\Delta\alpha$ ) プライマー：

(sense) 5' GCGAATTCGCCACCATGGCGACGTCCGTGGGGCA 3'

(antisense) 5' GCCTCGAGGCCCCAGGTTGAACTCGCCCA 3'

### RNA 抽出と cDNA の作製

細胞を Isogen (Wako)を加えてピペッティングした後、クロロホルムを混和し、遠心分離後、その上清からイソプロパノール沈殿によって RNA を抽出した。得られた RNA を鋳型として、Quantec Reverse Transcript Kit (QIAGEN) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

### Real-time PCR

上述の方法で得た cDNA を鋳型として、以下のプライマーセットと、Polymerase および検出試薬として SYBER GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems)、検出器として ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) を用いて PCR 反応を行った。得られた PISD 遺伝子の発現量は、40S ribosomal subunit protein S18 発現量で標準化した。

S18 プライマー：

(left) 5' CTTCCACAGGAGGCCTACAC 3'

(right) 5' GCAGTGATGGCAAAGGCTAT 3'

PISD プライマー：

(left) 5' GGACTGGAAACATGGCTTCT 3'

(right) 5' GGCTGTTTGTGTGCAGGTC 3'

### リコンビナント GST-PGAM5、及び GST- $\Delta$ MTS-PARL の作製

リコンビナント GST-PGAM5、及び GST- $\Delta$ MTS-PARL 作製用ベクターを BL21 competent cell にトランスフォーメーションし、この菌体を培養後、0.1 mM IPTG を添加し 20°C、18 h 培養した。タンパク質の精製は、菌液沈殿物を PBS-EDTA (10 mM) で洗浄した後、液体窒素で凍結させ、PBS-EDTA にて再融解後、ホモジナイズして破碎し、1% DDM を加え、ソニケーターでさらに破碎した。このホモジネートを 4°C、18500 rpm で 30 分間遠心し、得られた上清に、GST sepharose (Amersham Biosciences) を加え、0.1% DDM 存在下で免疫沈降を行い、この免疫沈降産物をカラムに充填した。溶出液 (10 mM L-Glutathione reduced (Sigma)、50 mM Tris pH8.0、DDM 0.1%) で溶出した反応用バッファーで溶出し回収した。

### *In vitro* protease assay

前述の方法で回収したリコンビナント切断型 GST-PGAM5、及び リコンビナント GST- $\Delta$ MTS-PARL を *In vitro* protease assay に使用した。GST-PGAM5 750 ng、GST- $\Delta$ MTS-PARL 100 ng を 反応バッファー中で混和した(50mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 10% glycerol and 50mM EDTA, 1% または 0.1% DDM)。リン脂質は終濃度 10  $\mu$ M になるように窒素下で乾固させたものに対して反応バッファーを加え、よく vortex し、37°C で 12 時間反応させた。

**[Reverse Transfection ]** (siRNA は final 40 nM、1 次スクリーニングのみ final 30 nM) 375 nM siRNA in OPTI-MEM を 4  $\mu$ l/well で添加しておき、1/60 Lipofectamine RNAi-MAX in Opti-MEM を 6  $\mu$ l/well で添加して、室温で、15 min 静置する。その後、PGAM5-Flag 恒常過剰発現 HeLa を 40000 cells/ml を培地に調整し、40  $\mu$ l/well でプレートに添加し、37 °C CO<sub>2</sub> インキュベータで 48 時間培養した。

### [CCCP 処理]

培地を Aspirate (by AquaMax2000 ; probe height = 1.9 mm (残液量 = 約 10  $\mu$ l))し、40

$\mu$ M CCCP を 30  $\mu$ l 添加し、(final 30  $\mu$ M) 37 °C CO<sub>2</sub> インキュベータで 3 h 培養した。

#### **[Fixation]**

培地を Aspirate し、2 x 4% Formaldehyde in PBS を 10  $\mu$ l/well で添加し、室温で 10 min 静置した。その後、PBS で wash (by AquaMax2000) を 2 回行い、Aspirate した。

#### **[Permeabilization]**

2 x 0.2% Triton X-100 in PBS を 10  $\mu$ l/well で添加し、室温で 10 min 静置した。その後、PBS で wash (by AquaMax2000) を 2 回行い、Aspirate した。

#### **[Blocking]**

2 x 2% BSA in PBS を 10  $\mu$ l/well で添加し、室温で 30 min 静置した。その後、PBS で wash (by AquaMax2000) を 3 回行い、Aspirate した。

#### **[1st Immunostaining]**

Decant で溶液を全量除き、1/600 抗 Flag 抗体 (PA1-984B; Thermo Scientific) (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) + 1/400 AVAV 抗体 (1.42 mg/ml) in 1st Ab dilution buffer を 10  $\mu$ l/well で添加し、4 °Cで 12 時間以上反応させた。その後、PBS で wash (by AquaMax2000) を 3 回行った。

#### **[2nd Immunostaining]**

Decant で溶液を全量除き、1/500 Alexa Fluor 594  $\alpha$ -rabbit IgG (Molecular probe) + 1/300 Alexa Fluor 594  $\alpha$ -mouse IgG (Molecular probe) in 1st Ab dilution buffer を 10  $\mu$ l/well で添加し、遮光して室温で 1 時間静置した。その後、PBS で wash (by AquaMax2000) を 3 回行った。

#### **[Hoechst staining]**

Decant で溶液を全量除き、1/2000 Hoechst 33342 in PBS で 10  $\mu$ l/well で添加し、室温で 10 分間静置した。その後、PBS で wash (by AquaMax2000) を 3 回行った。

### [Array Scan]

以上の行程で作製したサンプルを Array Scan VTI (thermo scientific) で測定した。

なお、使用した Multi Drop Combi と Aqua Max 2000 の設定は以下のようにした。

### [Multi Drop Combi]

- ・ 384 standard (15 mm)
- ・ Lipofetamine, Antibody, Hoechst → small cassette
- ・ Cell, Stimuli, Fixation, Permeabilization & Blocking → standard cassette
- ・ Dispensing Speed : medium

### [Aqua Max 2000]

- ・ Well: 384、Bottom: Flat、plate height: 14.4 , Well depth: 11.4
- ・ Aspirate . . . Mode: Center、Rate: Gentle、Descent speed: Slow、Dwell time:3.0s, Probe height:1.9 mm
- ・ Dispense . . . Inlet: Green, Rate: 1, Volume: 70  $\mu$ l
- ・ Wash . . . Aspirate → Dispense → Aspirate → Dispense → Aspirate → Dispense

### [Array Scan による解析]

予め、ソフトウェア Colocalization をベースとして、条件検討により各 parameter の値を最適化しておいたアルゴリズムを用いた。実際に Array Scan で行っているプログラムとして、384 well プレーットの 1 well あたり 4 視野について、まず、Ch1 (核)、Ch2 (Total-PGAM5)、Ch3 (AVAV)、CH4 (Total-PGAM5) の 4 つの画像を撮影して、次に、核の染色をもとに、核の領域を決定するとともに、各細胞をターゲットとして認識させる。続いて、Ch4 の Total-PGAM5 の画像から、核の領域を引いたものを各ターゲットのミトコンドリア領域(region of interest; ROI) として決定する。そして、Ch3 の AVAV の画像と、Ch2 の Total-PGAM5 の画像から、ROI 内の蛍光強度を測定し、最終的にその ratio (AVAV/Total PGAM5) を PGAM5 の切断効率の絶対値として算出した。なお、細胞数を評価する際にはターゲットとして認識された数 (ValidObjectCount) を用いた。

## 一次スクリーニング

1 遺伝子あたり 4 種類の異なる配列の siRNA が同一 well 内に混ぜて入っている、Dharmacon SMARTpool siRNA Library の G-005005-02 Human Genome、G-004655-02 Human Drug Targets、G004675-02 Human Druggable Subsets を用いて、全 18,115 遺伝子に対して High-throughput screening 系により、サンプルプレートを作製し、High-content 解析を行った。得られた data は、表計算ソフト Excel 上で、各パラメータの平均値、標準偏差、中央値、MAD をはじめとして、Z'-factor、Z-score、robust Z-score、B-score といった値を算出した。

各プレートには control siRNA (siGENOME Non-Targeting siRNA Pool #1 (D-001206-13) : Dharmacon) 38 well、PARL siRNA (siGENOME PARL siRNA Pool (M-021387-01-0005) : Dharmacon) 16 well、PGAM5 siRNA (stealth siRNA #1, #4 等量混和: invitrogen) 10 well を control として用意した。

## 二次スクリーニング

### [細胞免疫染色]

一次スクリーニングで得られた候補遺伝子 100 個に対し、1 遺伝子あたり、2 種類の異なる配列の Ambion Silencer Select siRNA を用いて、一次スクリーニングと同様に、High-throughput screening 系によって、サンプルを作製し、High-content 解析を行った。

ただし、siRNA の濃度は一次スクリーニングとは異なり、500 nM siRNA in OPTI-MEM を 384 well プレートに 4  $\mu$ l/well で準備し、最終濃度を 40 nM とした。

### [Western Blot]

500 nM siRNA in OPTI-MEM を 96 well プレートに 8  $\mu$ l/well で添加しておき、1/50 Lipofectamine RNAi-MAX in Opti-MEM を 10  $\mu$ l/well で添加して、室温で、15 min 静置する。その後、HeLa を 156,500 cells/ml を培地に調整し、80  $\mu$ l/well でプレートに添加し、37 °C CO<sub>2</sub> インキュベータで 72 時間培養した。その後、10  $\mu$ M CCCP を含む培地に置換し、37 °C CO<sub>2</sub> インキュベータで 1.5 h 培養した。その後、IP Lysis buffer 140  $\mu$ l/well で溶解し、上清 50  $\mu$ l を等量の 2×SDS sample buffer と混合し、98°Cで 3

分間煮沸することで sample 化し、通常と同じ Western Blot 法を行った。

#### **[偽陽性の排除]**

500 nM siRNA in OPTI-MEM を 96 well プレートに 8  $\mu$ l/well で添加しておき、1/50 Lipofectamine RNAi-MAX in Opti-MEM を 10  $\mu$ l/well で添加して、室温で、15 min 静置する。その後、HeLa を 156,500 cells/ml を培地に調整し、80  $\mu$ l/well で プレートに添加し、37 °C CO<sub>2</sub> インキュベータで 72 時間培養した。その後、100  $\mu$ M CCCP, Oligomycin A (Sigma) 1  $\mu$ M, Rotenone (Sigma) 5  $\mu$ M, Antimycin A (Sigma) 5  $\mu$ M を含む培地に置換し、37 °C CO<sub>2</sub> インキュベータで 1 h 培養した。その後、IP Lysis buffer 140  $\mu$ l/well で溶解し、上清 50  $\mu$ L を等量の 2×SDS sample buffer と混合し、98°Cで 3 分間煮沸することで sample 化し、通常と同じ Western Blot 法を行った。

#### **[Densiometry]**

Western Blot で得られたフィルムを、画像データに変換し、Image J にて解析した。

#### **[遺伝子の絞り込み]**

細胞免疫染色、Western Blot の各評価系による検討を複数回行い、基準として以下のように、全ての実験回においてコントロールより切断が抑制された遺伝子を選出した。いずれかの評価系で PGAM5 の切断が抑制されれば、ポジティブな遺伝子として選出した。合計で 66 遺伝子を選出した。

（細胞免疫染色の基準）

3 回の実験全てで control siRNA の平均値より、切断が抑制されたもの

（Western Blot の基準）

2 回の実験両方で control siRNA より、切断が抑制されたもの

#### **データベース解析**

データベース解析では以下のサイトからデータベース解析を行った

「DAVID」 <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

「PANTHER」 <http://www.pantherdb.org/>

「MitoCarta」 <http://www.broadinstitute.org/pubs/MitoCarta/index.html>

「MitoMiner」 <http://mitominer.mrc-mbu.cam.ac.uk/release-2.1/begin.do>

「LOCATE」 <http://locate.imb.uq.edu.au/>

「MitoProt」 <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>

Robust Z-score と B-score の積集合の遺伝子に対しては、データベース (DAVID および PANTHER) による解析から、ミトコンドリア局在の可能性が極端に低いと予想される遺伝子のみを排除した。具体的には、細胞外分泌タンパク質、細胞膜タンパク質の 10 遺伝子を排除した。その結果、積集合 86 遺伝子中 76 遺伝子が候補として残った。積集合からはずれた遺伝子の中からはミトコンドリア局在の可能性が強く示唆されるものを救済した。具体的には、ミトコンドリア局在遺伝子を網羅的に評価しているデータベース (MitoMiner および MitoCarta) を参考にして、実験データに基づき得られている情報 (単離ミトコンドリアの網羅的 Mass spectrometry 解析によりミトコンドリア局在が予想されたもの、GFP タグを付加したタンパク質の局在解析によりミトコンドリア局在が予想されたもの) を持つ遺伝子を選出した。その結果、積集合からはずれた 379 遺伝子の中からミトコンドリア局在の可能性が強く示唆される遺伝子を 24 遺伝子を選出した。

## 結果

### 1. ゲノムワイド siRNA スクリーニングによる新規 PGAM5 切断制御因子の同定

#### 【PGAM5 切断型特異的抗体の作製】

PGAM5 切断制御因子のスクリーニングを行うにあたり、PGAM5 切断効率を定量的に評価する必要がある。そこで、切断型 PGAM5 を特異的に認識する抗体の作製を試みた。切断型の PGAM5 の AVAV から始まるアミノ酸配列をエピトープとし、切断型 PGAM5 特異的抗体 (以後、AVAV 抗体と呼ぶこととする) を作製した (Fig. 1A)。作製した AVAV 抗体を用いて細胞免疫染色を行うと、CCCP 処理下においてこの抗体で検出される蛍光のシグナルの増強が観察され、そのシグナルは PGAM5 と共局在を示した (Fig. 1A)。また、Western Blot においても、AVAV 抗体由来のバンドは下にシフトした切断型 PGAM5 と同じ位置で検出され、上の全長型 PGAM5 のバンドは検出されなかった (Fig. 1B)。これらの結果から、作製した抗体は切断型 PGAM5 を特異的に認識していると考えられる。

#### 【全自動イメージアナライザーによる PGAM5 切断効率の定量的評価系の確立】

ゲノムワイド siRNA スクリーニングでは約 18,000 遺伝子に対し解析を行うため、ハイスループット性が重要となる [20]。既に当研究室の渡邊らが 384 well プレート上で細胞免疫染色を行ったサンプルから全自動イメージアナライザーを用いて High-content かつ High-throughput に画像解析する系を確立している (当研究室・渡邊ら、未発表)。我々はこのシステムを応用し、細胞免疫染色の画像から PGAM5 の切断を評価しようと考えた。1 細胞あたりの PGAM5 の切断効率は、AVAV 抗体由来の蛍光強度を抗 Flag 抗体由来の蛍光強度で割った値 (AVAV / Total-PGAM5) と定義し、数値化した。イメージアナライザーによって取得された免疫染色画像においても、CCCP 刺激依存的に AVAV 抗体由来シグナルの増強が検出できた (Fig. 2A)。そこで、この画像の蛍光強度の測定を行い、算出された細胞一つ一つの PGAM5 の切断効率 (AVAV / Total-PGAM5) をヒストグラムにすると、細胞分布は正規分布となり、この山

が CCCP の処理により切断効率の高い方へと明確にシフトすることを確認できた (Fig. 2B)。また、このシフトは PARL の発現抑制によって抑制された (Fig. 2B)。スクリーニングを行う際には well 間でのばらつきが問題となるが、スクリーニング系の精度と感度を示す統計的な指標として、Z'-factor が知られている [21, 22]。一般に、siRNA スクリーニングを行う場合、Z'-Factor が 0.5 以上でかなりの精度をもったスクリーニング系と評価される。今回の系において、PARL のノックダウンを positive control とし、Z'-factor の算出を行ったところ、Z'-factor が 0.8 以上という非常に高い値を得ることができた (Fig. 2C)。これらの結果から、構築した PGAM5 の切断効率の定量的評価系が、siRNA スクリーニング系として十分な精度と感度を持った系であることが確かめられた。

### 【一次スクリーニング】

PGAM5 の切断効率の定量的評価系を用いたゲノムワイド siRNA スクリーニングの概要を Fig. 3 に示す。一次スクリーニングでは、約 18,000 遺伝子の siRNA を用いて、一つ一つの遺伝子の発現抑制に対して PGAM5 の切断効率を測定し、robust Z-score により評価した [22]。その結果、発現抑制により膜電位低下時の PGAM5 切断を抑制する (robust Z-score が -2.57 以下 ( $p \leq 0.005$ )) 遺伝子が 93 個得られた (Fig. 4A)。ただし、プレートの端の行や列に位置する well では PGAM5 の切断が亢進する傾向が見られたため、これらを補正するために B-score を採用した [22]。B-score での評価においても -2.57 以下のものを選出したところ 458 遺伝子がヒットした (Fig. 4A)。

続いて、データベース解析による候補遺伝子の絞り込みを行った。本スクリーニングにおいては PGAM5 の切断を制御する因子の中でも、特にミトコンドリア局在の因子を同定したいと考えたため、ミトコンドリア局在を指標に遺伝子を絞り込むことにした。ミトコンドリア局在予測に関する各種データベースを用いて、上述の Robust Z-score でのヒット遺伝子および B-score でのヒット遺伝子の和集合のなかから、合計 100 遺伝子を二次スクリーニングへと進める候補遺伝子として選出した (※絞り込みの詳しい手順については Fig. 4B および 方法の項に記載)。

## 【二次スクリーニング】

siRNA スクリーニングにおいて off-target の影響は避けられない [22]。そのため、候補遺伝子の更なる validation として二次スクリーニングを行った。一次スクリーニングで得た候補遺伝子に対し、細胞免疫染色による候補遺伝子の再評価を行うとともに、Western Blot を用いた別の評価系においても検討を行った。各評価系による検討を複数回行い、全ての実験回においてコントロールより切断が抑制された遺伝子を選出した。ここでは、評価系ごとの特徴による取りこぼしを防ぐために、いずれかの評価系で PGAM5 の切断が抑制されれば、ポジティブな遺伝子として選出した。その結果、最終的に PGAM5 の切断に必要な因子を 66 遺伝子得ることができた (※絞り込みの詳細い手順については Fig. 5 および 方法の項に記載)。

## 【偽陽性の排除】

しかしながら、こうして絞り込まれた因子の中には膜電位低下に対して耐性を誘導する因子が含まれる可能性が予想される。スクリーニングで用いた CCCP は、プロトンフォアとして機能し、ミトコンドリア内膜を境に形成されているプロトン勾配を崩すことで、ミトコンドリアの膜電位低下を誘導する脱共役剤であるが、代償的に呼吸鎖複合体が活性化してしまうような場合には十分に膜電位を下げるできない (Fig. 6A)。実際、過去の報告においても、ミトコンドリア膜電位低下によって誘導される Mitophagy に必要な因子を網羅的に探索することを目的とした siRNA スクリーニングを行った際、呼吸鎖複合体の活性化を促進することで、CCCP によって誘導されるミトコンドリア膜電位低下の効果をキャンセルしてしまう因子が、偽陽性として選出された例が報告されている [23]。こうした因子は、膜電位低下後の PGAM5 の切断を制御している因子ではないので、目的の因子ではない。そこで、二次スクリーニングによって絞りこまれた最終候補 66 遺伝子に対し、CCCP と呼吸鎖阻害剤を併用することで膜電位を完全に下げた状態での再評価を行うことにより、上述したような偽陽性の排除を試みた。実際、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I の阻害剤であるロテノン (R)、呼吸鎖複合体 III の阻害剤であるアンチマイシン A (A)、 $F_0F_1$ -ATPase (ATP synthase) の阻害剤であるオリゴマイシン A (O) を併用することで (以下、O. R. A. 刺激と呼ぶ)、ミトコンドリア膜電位を ほぼ完全に下げることができることを確認した (Fig. 6B)。O.R.A.

刺激による再評価は、ウェスタンブロットにて行った (Fig. S1)。その結果、遺伝子発現抑制による切断抑制効果が、CCCP を用いた二次スクリーニングの結果より、減弱した因子が出現し、既に PGAM5 の切断への関与が分かっていた2つのプロテアーゼ PARL と OMA1 が最上位に繰り上がった (Fig. 7)。これらの結果は、O.R.A. 刺激による再評価の妥当性を示唆するものである。この中で、OMA1 や PARL と同じく、2つの異なる siRNA による発現抑制で上位 10 位以内に含まれた唯一の因子として PISD (Phosphatidylserinedecarboxylase) が同定された (Fig. 7)。そこで、この PISD に着目し、解析を行うことにした。

## 2. PISD の酵素活性が PGAM5 の切断に必要である

PISD はホスファチジルセリン (PS) から PE を合成するリン脂質代謝酵素である [12]。さらに、PISD は PGAM5 と同じくミトコンドリアの内膜に存在しており、酵素活性や相互作用を通して PGAM5 の切断に影響を与える可能性が十分に考えられる。

まず、PISD のノックダウンによる PGAM5 の切断の抑制を確かめるために、スクリーニングで用いた siRNA とは異なる遺伝子配列をターゲットとした siRNA により再確認を行った。その結果、ミトコンドリア膜電位低下依存的な PGAM5 切断の遅延を確認することができた (Fig. 8A)。このとき PISD の mRNA の発現が減少していることを確認している (Fig. 8B)。さらに、PISD の発現抑制が膜電位低下耐性を誘導していないか確かめるために膜電位を計測したところ、PISD の発現抑制において CCCP が誘導する膜電位低下に対して耐性は見られなかった (Fig. 9)。また、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株においても PISD ノックダウンによる PGAM5 切断の抑制が確認できた (Fig. 10)。

PISD のこれまでに知られている機能として、ミトコンドリアでの PE の供給がある。リン脂質輸送によるミトコンドリアへの PE の輸送経路は限定的であり [24, 25]、PISD の酵素活性による PS から PE の変換を通したミトコンドリアへの PE 供給が重要であることが知られている [25]。この PISD の酵素活性が PGAM5 の切断に必要であるか否かを検討するために PISD の酵素活性部位の変異体を用いた戻し実験を行った。PISD には LGST のアミノ酸配列 (LGST モチーフ) が進化的に保存されており、この配列が PISD の酵素活性に必要であることが知られている [12, 26]。PISD

は不活性型の前駆体として翻訳されるが、ミトコンドリアに輸送された後、進化的に保存された LGST モチーフのグリシンとセリンの間で自己切断が誘導され、 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットに分かれる [26, 27]。この $\alpha$ サブユニットの切断末端のピルボイル基を活性中心として PS を PE に変換することが知られている [27, 28]。そこで、酵素活性を持たない PISD 変異体として、LGST 配列を LAAT に変換した LAAT 変異体 (LAAT) [29]、および酵素活性部位を欠損した PISD ( $\Delta\alpha$ ) の二種類を作成した (Fig. 11A)。戻し実験は、Hamster PISD を発現抑制した CHO 細胞に Human PISD を発現させ切断の回復を観察した。Human PISD は Hamster PISD と遺伝子配列が部分的に異なっている。そこで、Human PISD の遺伝子配列と重ならない領域に標的配列をもつ siRNA により CHO 細胞株で Hamster PISD の発現抑制を行った後に、野生型 Human PISD を発現させた。その結果、PISD 発現抑制細胞に野生型の PISD を戻すと、PGAM5 の切断を回復させることができた (Fig. 11B レーン 5-6)。一方、上述した酵素活性を持たない二種類の Human PISD 変異体を戻した場合には、PGAM5 の切断は回復しなかった (Fig. 11B レーン 7-10)。以上の結果から、PISD の酵素活性が PGAM5 の切断に必要であることが示唆された。

### 3. PISD により合成される PE が PGAM5 の切断に必要である

PISD の酵素活性の欠失により予想される現象として、これまで PISD が欠損するとミトコンドリア PE 量が減少することが複数報告されている [13, 14]。そこで、我々の手でも実際にミトコンドリアのリン脂質の定量を行い、PISD の発現抑制によるミトコンドリア PE 量の減少を再確認することにした。ミトコンドリアのリン脂質を測定するためには細胞からミトコンドリアを単離する必要がある。しかし、ミトコンドリアは小胞体と一部接していることが知られており、通常の分画ではミトコンドリアと小胞体を厳密に分けることができない。そこで、まずより精製度の高いミトコンドリアを単離する方法として Percoll による密度勾配遠心を検討した [30]。Percoll による密度勾配遠心により、ER を含む粗ミトコンドリアをミトコンドリアと小胞体に細分化することができる。これにより精製した単離ミトコンドリアは ER のマーカーである Derlin1 を含まないことから、ミトコンドリアのみを精製できていると考えられる (Fig.

12)。

実際に PISD を発現抑制した細胞から単離したミトコンドリアにおいてリン脂質の定量を行った。単離したミトコンドリアから Bligh & Dyer 法により脂質を抽出し、その中のリン脂質の量をリン定量により測定した。各サンプルの計測したリン量に合わせて内部標準を加え、LC/MS で解析を行い、各リン脂質量を算出した。その結果、予想通り PISD の発現抑制によるミトコンドリア PE 量の減少が確認できた (Fig. 13)。一方、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルイノシトール (PI)、PS といった他の主要なリン脂質には大きな変化は観察されなかった (Fig. 13)。

以上の結果から、PISD によって合成された PE そのものが PGAM5 の切断に必要なのではないかと考え、PE のレスキュー実験を行った。過去の報告で、減少したミトコンドリア PE は LysoPE の添加により通常量程度まで回復することが示されている [13]。そこで、同様に我々の PISD 発現抑制細胞系においても LysoPE を添加し、減少したミトコンドリア PE 量を補うことで、PGAM5 の切断に対する PE の必要性を検討した。その結果、LysoPE の添加により、PGAM5 の切断の回復することが確かめられた (Fig. 14A)。同様の結果は CHO 細胞においても得られた (Fig.15)。また、HeLa 細胞において LysoPE の添加が PISD のノックダウン効率に影響しないことも確認している (Fig. 14C)。以上の結果から、PGAM5 の切断には PISD の酵素活性が必要であること、その酵素活性で合成される PE が PGAM5 の切断に必要であることが示された。

#### 4. PE の作用点の同定

～PARL か OMA1 か～

##### PISD は PARL 依存的な PGAM5 の切断に必要である

先述のように、当研究室のこれまでの解析から PGAM5 の切断には PARL と OMA1 の2つのプロテアーゼが協調的にはたらくことが分かっている (序論図. 4)。そこで、PISD が PARL と OMA1 いずれの切断を制御しているかを検討することにした。

一つめの判別方法として、PARL と OMA1 の切断を切り分ける刺激があれば、いずれの切断に関与するか判断できると考え、その刺激を探索した。PGAM5 の切断は膜電位低下を誘導する種々の刺激によって誘導できることが分かっているが、その中でも PARL 依存的な PGAM5 切断を誘導する刺激として、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 III の阻害剤であるアンチマイシン A の刺激を見出した。アンチマイシン A の刺激を行うと、CCCP 刺激と同様に PGAM5 の切断が誘導されるが、この切断は PARL 発現抑制で完全に抑制される一方で、OMA1 発現抑制では抑制されない (Fig. 16)。このとき、PISD の発現抑制では、アンチマイシン A 依存的な PGAM5 の切断は抑制されることから、PISD は PARL 依存的な切断に関わっていることが予想された (Fig. 17)。

この仮説をより直接的に証明するため、二つめの判別方法として、発現抑制の併用による両経路の切り分けを行おうと考えた。先述のとおり、OMA1 と PARL を共に発現抑制すると PGAM5 の切断は完全に抑制される (序論図. 4)。したがって、OMA1 を発現抑制した状態では、PGAM5 の切断は PARL に依存していると考えられる。このとき PISD の発現抑制を併用したところ、更なる PGAM5 の切断抑制が観察された (Fig. 18A 実線)。一方で、PARL を発現抑制した状態では、OMA1 依存の切断が起きていると考えられるが、この OMA1 依存の切断は PISD の発現抑制の併用を行っても、それ以上の抑制は見られなかった (Fig. 18A, 破線)。したがって、PISD によって合成された PE は PARL 依存の切断を制御することが示唆された。また、過去の報告において、OMA1 は膜電位低下依存的に自己切断により活性化し、OPA1 という別の基質を切断していることが報告されている (Fig. 18B) [31]。しかし、PISD の発現抑制により、OPA の切断は抑制されなかった (Fig. 18A)。加えて、自己切断による OMA1 のタンパク量の減少についても PISD の発現抑制は影響を与えなかった (Fig. 18)。以上の結果から、PISD によって合成された PE は OMA1 ではなく、PARL を介した PGAM5 の切断に関与していることが明らかとなった。

最後に、PISD の発現抑制により、PARL 共発現で誘導される PGAM5 切断も抑制されることが確かめられた (Fig. 19)。以上の結果から、PISD は PARL を介した PGAM5 の切断に関与していることが明らかとなった。

#### 4. PE の作用点の同定

##### ～二つの可能性の検証～

これまでの結果で、PE は PARL を介した PGAM5 の切断に必要であることが示唆されたが、PE はどのように PARL を介した PGAM5 の切断を制御するのだろうか。スクリーニングで得られることが予想される因子として、ミトコンドリアの膜電位を感知する因子や PGAM5 の切断を担うプロテアーゼの基質認識・酵素活性制御に関与する因子が想定されていた (序論図. 5)。そこで、それぞれの可能性に対して二つずつの実験を行い、可能性の検証を行った (Fig. 20)。

##### ① PE は PGAM5 切断の膜電位依存性に関与するか

実験 1. PE が PARL と PGAM5 の膜電位低下依存的結合を仲介するか？

実験 2. PE の量が膜電位依存的に変化するか？

##### ② PE は PARL のプロテアーゼ活性そのものを制御するか

実験 1. 定常状態で切断される別の基質にも影響するか？

実験 2. *In vitro* 再構成系でも切断を制御できるか？

##### ① 膜電位依存性への関与

当研究室によるこれまでの解析から PARL は PGAM5 と膜電位低下依存的に結合することが分かっている。そこで、PE が PGAM5 切断の膜電位依存性を制御する因子である可能性を検討するためのひとつの方法として、PE が PGAM5 と PARL の膜電位低下依存的結合を仲介するか否かを検証することにした。

PARL は 277 番目のセリンと 335 番目のヒスチジンが活性中心として知られており、この部位をグリシンに置換すると活性を失う [32, 33]。当研究室のこれまでの解析から、この酵素活性を失った PARL の S277G 変異体はより効率的に PGAM5 と結合することが分かっている [10]。このときに PISD の発現抑制を行い刺激依存的な PARL と PGAM5 の結合を評価した。その結果、PISD を発現抑制した場合でも刺激依存的な PARL と PGAM5 の結合は影響を受けなかった (Fig. 21)。

次に、膜電位低下依存的に PE の量が増加することで PGAM5 の切断が調節されている可能性を検討した。検討は、膜電位低下時のミトコンドリアのリン脂質の定量を行うことで行った。CCCP 刺激を行った細胞から、先述した方法を用いて (Fig. 13)、ミトコンドリアを精製し各リン脂質の量を測定したところ、PE の量は膜電位低下後も変化は見られなかった (Fig. 22)。また、その他の代表的なリン脂質の量も変化しないことから (Fig. 22)、ミトコンドリア全体のリン脂質の比率は膜電位低下前後で変化しないことがわかった。

以上、膜電位低下依存的な PARL と PGAM5 の結合は PE の影響を受けないこと、PE の量は膜電位低下前後で変化しないことから、PE が PGAM5 切断の膜電位依存性に関与する可能性は低いと考えられる。

## ② 酵素活性への影響

次に、「PE が PARL の酵素活性を制御する可能性」を検討するために次の実験を行った。

PARL の PGAM5 以外の基質として機能不全ミトコンドリアのオートファジー依存的分解 (Mitophagy) に関わるミトコンドリア局在型キナーゼ PINK1 が知られている [2]。PGAM5 が膜電位低下時に切断されるのに対して、PINK1 は定常状態において PARL により切断されている。PE が PARL の酵素活性を制御するのであれば、ミトコンドリアの膜電位の有無や基質の違いに関わらず、定常状態の PINK1 の切断も制御することが予想される。そこで、PISD 発現抑制を行い、PGAM5 の切断と同様に、PINK1 の切断においても遅延が見られるか否かを検討した。

PINK1 は PARL により切断された後、プロテアソームによってすみやかに分解されているため [2]、プロテアソーム阻害剤である MG132 を処理することで切断型 PINK1 を蓄積させ、PINK1 の切断効率を評価した (Fig. 23A)。まず、この切断型 PINK1 の蓄積が PARL による切断をモニターしているか確かめるために PARL の発現抑制を行った。その結果、PARL 発現抑制により、切断型 PINK1 の蓄積が見られなくなったことから、MG132 処置によって蓄積した切断型 PINK1 は PARL によって切断された PINK1 であることが確かめられた (Fig. 23B)。さらに、このとき PISD の発現抑制においても切断型 PINK1 の蓄積が減弱したことから (Fig. 22B)、PE は

PGAM5 のみだけではなく PARL の別の基質の切断も制御することが示唆された。この結果は、ミトコンドリアの膜電位の有無、また、ターゲットとする基質の種類に関わらず、PE が PARL による基質切断を全般的に制御する因子である可能性を示唆するものである。

## PE は PARL の酵素活性を制御する

細胞を用いた *in vivo* の検討では、PE のターゲットを同定することはできない。また、序論で述べた通り、これまでに PARL が PGAM5 を直接切断しているか否かについては生化学的には証明されていなかった。そこで次に、PARL と基質のみの純粋な条件下で PARL による基質の切断をモニターできる *In vitro* 再構成系の構築を検討した (Fig. 24)。

まず、GST タグ付きのリコンビナント PGAM5 と PARL を大腸菌から精製した。PARL はミトコンドリア内膜に輸送された後、速やかにミトコンドリアターゲットシーケンスが切断されることが知られている [33]。そのため、あらかじめ、ミトコンドリアターゲットシーケンスを除いた PARL (GST- $\Delta$ MTS-PARL) を精製し、実験に用いた。一方、PGAM5 については、ミトコンドリアへ輸送後、切断されるようなミトコンドリアターゲットシーケンスを持たないため、全長型 PGAM5 の精製を行った。リコンビナント PARL および PGAM5 の可溶化には、界面活性剤である n-Dodecyl- $\beta$ -maltoside (DDM) を用いた。両リコンビナントタンパク質の大腸菌からの精製過程においても DDM を用いたが、精製の過程で DDM 濃度は希釈される。ミトコンドリア局在のロンボイドプロテアーゼの *in vitro* 再構成系は未だ報告がないが、他のロンボイドプロテアーゼの *in vitro* 再構成系については過去に成功例が存在し、系中の DDM の濃度がロンボイドプロテアーゼの活性に影響を与えることが報告されている [34]。そのため、反応用バッファの DDM 濃度は、リコンビナントタンパク質の精製に用いたバッファよりも高い濃度 (1%) に調整し、この反応用バッファ中で、リコンビナント PGAM5 と PARL を混合した。その結果、DDM 添加なしのレーンと比べて、DDM 添加ありのレーンでは、切断された PGAM5 と予想される位置にバンドの増加が検出された (Fig. 24 レーン 4)。この結果は ミトコンドリア局在型ロンボイドプロテアーゼ PARL の *in vitro* 再構成系の構築に成功したことを示唆するだけでな

く、すくなくとも強制的に両者の結合を誘導できるような条件下においてはPGAM5 の PARL による切断が他のタンパク質を必要としない直接の切断であることを初めて示した結果である。

次に、構築した *in vitro* 再構成系において、上述した反応用バッファーに HeLa 細胞から抽出した脂質の添加し、PARL による PGAM5 の切断への影響の有無を検討した。すると、HeLa 細胞から抽出した脂質を添加したレーンにおいて、脂質添加なしのレーンと比べ、切断された PGAM5 が増加している様子が観察された (Fig. 24 レーン 5-6)。HeLa 細胞由来の脂質には、様々な種類のリン脂質が含まれるが、脂質添加による切断の促進が PE によって担われているものであることを確かめるため、HeLa 細胞由来の脂質の代わりに代表的なリン脂質を添加し、PGAM5 の切断効率に与える影響を検証した。検討は、上述の反応用バッファーに PC、PE、PS、PI それぞれを添加することで行った。ただし、PE は単独で二重膜を生成しづらいことから、lysoPE を 1:1 で混ぜることで二重膜を安定化させている。その結果、PE の添加によって PARL による PGAM5 の切断の促進が見られた (Fig. 25 レーン 6)。この結果から、PARL による PGAM5 の切断は PE によって直接制御されていることが明らかになった。

最後に、PE が PARL の酵素活性の制御に働くのか、それとも基質側のプライミングに働くのか、を検討した。PARL はその活性依存的に自己切断が起こることが知られている [32, 33]。そこで、上述の可能性の検討は、構築した *in vitro* 再構成系において PARL のみを反応用バッファー中でインキュベートし、PARL の自己切断に対する影響を検討することで行った。その結果、PARL の自己切断は PE や HeLa 細胞由来脂質添加によって増強する様子が観察された (Fig. 26)。したがって、PE 添加時の PARL が活性を持つものと考えられる。以上の結果から、PE は PARL の酵素活性そのものを制御する可能性が高いことが示唆された (Fig. 27)。

## 考察

### PARL の酵素活性のリン脂質による制御

本研究において私は、Image-based の大規模 siRNA スクリーニングの実施により、PGAM5 の切断に関与する新たな因子として、PISD を同定し、PISD によって合成されるミトコンドリアリン脂質 PE が PARL 依存的な PGAM5 の切断を制御することを明らかにした。さらに、リコンビナントの PGAM5 と PARL を用いた切断の *in vitro* 再構成を構築することにより、PE が PARL による PGAM5 の切断を直接制御していること、さらには PE は PARL の酵素活性そのものに必要である可能性を見いだした。

先述のとおり、PARL は膜内切断酵素ファミリーのひとつであるロンボイドプロテアーゼファミリーに属する [17]。他のロンボイドプロテアーゼファミリー分子においては、リン脂質の組成が基質の切断に影響を与えることは知られていたが [34]、哺乳類のロンボイドプロテアーゼ、およびその中で唯一ミトコンドリアに局在する PARL については、リン脂質による活性制御の可能性について、生化学的に証明した例はこれまでにない。一方で、Yeast を用いた遺伝学的解析からは、PARL による基質の切断に PISD が関与することが示唆されていた [35, 36]。Yeast においては PARL のオルソログとして Rbd1 と呼ばれるミトコンドリア局在のロンボイドプロテアーゼが存在する。Yeast Rbd1 は Yeast における OPA1 のオルソログである Mgm-1 を切断することが知られており [37]、Mgm-1 の切断パターンは、PISD のオルソログである Psd1 の欠損株で、弱いながらも抑制傾向が見られることが報告されている [35]。哺乳類においては、OPA1 の切断は OMA1 によって担われるとの見解が一般的であり [3, 4]、我々の結果からも PISD 欠損による切断の減弱は見られなかったため (Fig. 18)、PARL がターゲットとしている基質は、種によって異なるようではあるが、その活性制御に共通して PE が使われている可能性を示唆する点で興味深い。

本研究で行った再構成系の実験により PARL による切断に重要なリン脂質は PE であることが明らかとなった。一方で、上述した他の種のロンボイドプロテアーゼにおいては PE のみだけでなく PI や PS が重要な例も報告されている [34]。このこと

は、ロンボイドプロテアーゼによって作用するリン脂質は異なっていることを示唆するものと考えられ、興味深い。一方で、実際の生体膜は単一の成分ではなく、より複雑な組成から成っていることを鑑みると [15]、そのような環境下においても、実際にそれぞれのリン脂質がロンボイドプロテアーゼの活性制御に重要であることを確認するためには、より慎重な精査が必要と考えられる。例えば、今回見出した PE による PARL の活性制御の可能性についても、ミトコンドリアのリン脂質の割合を模倣したリン脂質組成において、各リン脂質の量を一部変えるといった厳密な検討を行う必要があると考えられる。特に、PGAM5 の切断が遅延する PISD のノックダウン条件において、PE は一部しか減少していないため (Fig. 13)、同程度のリン脂質比率の変化で PARL の活性が変わり得るかを確かめる必要がある。実際に、過去の再構成系の報告でも、単一のリン脂質で切断の十分性が見えている一方で、そのリン脂質が多いとされている組織由来の脂質で、必ずしも他の組織より切断が促進することはないことが疑問視されていた [34]。このように複雑な組成の中では切断酵素の活性は作用するリン脂質の量だけで制御されていないことが示唆される。Fig. 26 の PARL の自己切断においても、HeLa 由来の脂質の添加により、PE 単独と比べ PARL の自己切断が切断が亢進していることから、生理的なリン脂質の組成がより効率的な酵素活性の発揮に必要である可能性が推察される。

スクリーニングの上位遺伝子に他のリン脂質合成に関わる因子は含まれておらず、再構成系の検討においても主要なリン脂質 (PS、PI、PC) の添加で PARL による PGAM5 切断の亢進は見られなかった (Fig. 25)。しかし、単一のリン脂質成分ではリン脂質ごとに二重膜を形成する安定性は異なっている可能性があり、PE 以外の他のリン脂質においても、先述のミトコンドリアのリン脂質の割合を模倣したリン脂質組成において、各リン脂質の量を一部変えるといった厳密な検討を行う必要があると考えられる。特に、今回は検討できなかったが、ミトコンドリア特異的なリン脂質としてカルジオリピン (CL) が知られている。CL の再構成系への影響は検証できておらず、この CL の合成酵素である Cardiolipin synthase 1 (CRLS1) はスクリーニングでは上位に含まれていない (Fig. S2)。しかし、CL は PE と構造的に類似しており、湾曲した二重膜に含まれるという共通点がある [35, 38]。また、Yeast の Cardiolipin synthase 1 の欠損株においても、先述の Psd1 の欠損株と同様に Mgm-1 の切断抑制が見られること

が報告されている [36]。これらことから PE と CL が機能を補完し合っているとの報告もあり [39]、CL の関与に関して PE の補完性を含めて今後検証する必要があると考えられる。

Fig. 26 で PARL の自己切断が PE の添加により促進されたことから、PE が PARL の酵素活性を制御する可能性が示唆された。過去に報告された *in vitro* の再構成系においては、基質と酵素のどちらをリン脂質が制御しているか明確に示せていなかったが、今回 PARL の自己切断を見ることで、酵素側へのリン脂質の重要性を初めて証明した。しかしながら、依然として PARL 同士の認識 (結果として基質の認識) に寄与している可能性も否定できないため、今後より詳細な検討が必要と考えている。

リン脂質による切断酵素の制御例として、膜内切断酵素の一つである  $\gamma$  セクレターゼにおいて、同様にリコンビナントタンパク質による切断の再構成による検討から、膜脂質の重要性が報告されている [40, 41]。さらに、 $\gamma$  セクレターゼにおいては、厳密なリン脂質量比の変化による切断効率の変化や [41]、結晶構造解析によるリン脂質との相互作用の解析も進んでいる [42]。また近年、膜タンパク質の脂質二重膜存在下での結晶化が急速に進んでいる [43, 44]。これにより、膜タンパク質の結晶化が容易になるとともに、より生理的に近いと考えられる構造が得られると言われている [43]。PARL においても、今後 PE を含めた結晶構造解析により、PE がどのように PARL の活性化状態を維持しているか精査したいと考えている。

## 膜電位依存性

本研究による解析による以下の結果から、PE が膜電位依存性に関与する可能性は低いとした。

- ① 膜電位低下依存的な PARL と PGAM5 の結合は PE の影響を受けない
- ② PE の量は膜電位低下前後で変化しない

しかし、膜電位低下時の PE の変化については ミトコンドリア全体における観察しかできていないため、刺激依存的に局所的な変化を介して切断に関与している可能性がある。本研究において膜電位低下依存的な PGAM5 の切断制御メカニズムは見いだせなかったが、これまで得られている知見と報告から考えられる可能性について以下に議

論したい。

### (内膜コンパートメント仮説)

一つの仮説として、ミトコンドリア内膜の中でもタンパク質や脂質の局在は均一ではなく限局しており、膜電位依存的にこれらの局在が変化する可能性が考えられる。PARL とその基質である PGAM5 と PINK1 は共に内膜に存在していながら、PINK1 は定常状態で切断される一方で、PGAM5 は膜電位低下依存的に切断される [2, 10]。また、PINK1 の発現抑制をただけでは、定常状態でわずかに見られる PGAM5 の切断が促進される様子は観察されないことがわかっており (Data not shown)、PINK1 と PGAM5 の両者が PARL に対して競合関係にある可能性は低いことが示唆されている。すなわち、少なくとも一部の PARL は定常状態から活性を持っているにも関わらず、PGAM5 ではなく PINK1 を選択的に切断し、ミトコンドリアの膜電位低下に応じたより積極的な基質スイッチのメカニズムにより、PGAM5 を切断できるようになるものと考えられる。このことを説明するひとつのメカニズムとして、PARL、PINK1、PGAM5 の存在する内膜コンパートメントがミトコンドリア膜電位によって制御されているのではないかという仮説を考えている。これまでにいくつかの報告から、ミトコンドリアの内膜の環境が不均一であることが示唆されている。例えば、ミトコンドリアにおいて呼吸鎖タンパク質の分布が内膜の中でも一部に限局している可能性が提唱されている [45, 46]。また、タンパク質だけでなくリン脂質が限局して存在している可能性もある。ミトコンドリアにおいてこのような「脂質ラフト」の存在は直接証明されていないが、細胞膜で脂質ラフトを形成する SPFH ファミリーがもつ SPFH ドメインをもつタンパク質である Prohibitin1/2 がミトコンドリアにも存在することが知られており [47]、これらがミトコンドリアで脂質ラフト状の構造体を形成しているモデルも想定されている [48, 49]。Yeast において呼吸鎖タンパク質 Cox3p は m-AAA によって切断されているが、この切断は Prohibitin2 を欠損した株において促進される [50]。また、Prohibitin 欠損マウス由来 MEF において膜電位低下依存的に切断される OPA1 の切断が定常状態で誘導されていることも報告されている。これらの報告から、膜電位低下依存的にこれらの脂質環境やタンパク質の局在が変化することで、定常状態でわかれていた PARL と PGAM5 の内膜コンパートメントが一致し、ミトコンドリア膜電位低下依存的な両者の結合が誘導され、PGAM5 の切断が引き起こされている可能性も考えら

れる。これらを証明するためには、ミトコンドリア PE を特異的にモニターするプローブやバイオマーカーを用いたり、ミトコンドリア内膜における PARL や PGAM5 の局在を詳細に可視化できるような高度な電顕解析の手法を用いることで、ミトコンドリア内膜におけるタンパク質や脂質の偏りを観察する必要がある。現在のところ、これらの実験はいずれも技術的には大変難しいことが予想されるが、将来的にはこのような手法を用いて PGAM5 の膜電位低下依存的な切断やミトコンドリア膜電位に応じた PARL の基質スイッチを説明する詳細な分子メカニズムの解析に迫りたいと考えている。

序論で述べたように、PGAM5 切断の膜電位依存性を制御する因子の同定は、本スクリーニングの目的の一つでもあった。脂質ラフトの仮説による PE の局所的な作用により、膜電位依存的な PGAM5 の切断制御が説明できることも期待したいが、説明できない部分もある。例えば、Fig. 21 の IP の結果から膜電位依存的な PGAM5 と PARL の結合が PISD の発現抑制下でも影響を受けないことから、この刺激依存的な結合には別の因子 (Factor X) が少なくとも別に存在していることが示唆される。こうした因子に関しては、今回のスクリーニングで得られた他の候補因子の解析や、PARL と PGAM5 の刺激依存的な結合をアウトプットにしたより直接的なスクリーニング系の構築および実施を通じ、同定を試みていきたいと考えている。

#### **(PARL と OMA1 の膜電位依存性に関して)**

今回、ミトコンドリア膜電位の低下を速やかに誘導するために脱共役剤である CCCP を用いたが、生理的な条件下で膜電位が低下する場合は、呼吸鎖複合体の機能不全などを介して緩やかに膜電位が減少する [51-53]。Fig. 16 で PARL 依存的な切断を誘導する刺激としてアンチマイシン A を用いた。この刺激も膜電位低下を誘導するために PGAM5 が切断されていると考えられるが、CCCP との違いとして緩やかに膜電位の低下を誘導することが挙げられる [54]。アンチマイシン A はミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の阻害剤であるため、処理すると電子伝達が阻害される。そのため、膜電位の創出が滞り、膜電位はプロトンの流出によって緩やかに減少する [54]。実際に、アンチマイシン A 処理による膜電位低下は 6 時間後であっても部分的であることを確認している (Fig. S3)。アンチマイシン A 依存的な PGAM5 の切断は PARL 依存的

であることから、緩やかな膜電位低下の誘導時には PARL 依存的な切断が誘導される可能性があると考えられる。また、定常状態あっても PGAM5 の切断が一部見られる場合があるが、これは一部のミトコンドリアにおいて突発的に生じた呼吸鎖複合体の機能低下などにより膜電位が低下しているためではないかと考えている。この定常状態において自然に誘導された PGAM5 の切断は PARL の発現抑制によって完全に抑制されることも確認している (Data not shown)。

このように生理的に近い膜電位低下時には PARL が機能すると予想されることから、OMA1 は PARL が機能できず膜電位が下がりきった場合の代替経路である可能性も考えられる。OMA1 の切断制御に関しては今回明らかにすることができなかったが、最近 OMA1 が膜電位低下に直接応答する可能性が報告されている [31]。前項では、PARL と PGAM5 の刺激依存的な結合に際し、第三の仲介因子 X が存在することを想定したが、PARL や PGAM5 が膜電位を直接感知し、構造変化などを通じて、刺激依存的な結合が誘導される可能性も否定出来ない。この可能性については、*in vitro* の再構成系において、膜電位低下を模倣する系を確立することで、検証ができるのではないかと考えている。

### スクリーニングによる PISD 同定と PE 合成経路の特徴

本研究ではゲノムワイドの網羅的なスクリーニングにより、PGAM5 の新たな切断制御因子として PISD から合成される PE を同定した。一方で、スクリーニングの上位因子の中に PISD 以外に PE の合成に関与する因子は含まれてはいなかった。しかし、これはミトコンドリア PE 合成経路の特徴を考慮すると妥当であると考えられる。

まず、上位因子の中に他の PE の合成関連因子が含まれなかった原因として、PE の中間体の合成過程には複数の代替経路が存在していることが考えられる。今回行ったような siRNA スクリーニングでは単独の遺伝子の発現抑制しかできないため機能的にリダンダンシーを持つ因子が複数存在するような因子については同定できない。例えば、ミトコンドリアの PE の直接の原料となる PS の合成酵素は複数あり、一つを欠損しても PS の量は変化しない [55, 56]。さらに、供給されるミトコンドリア PS の量は ER からの輸送により厳密に調整されているため [57]、PISD 発現抑制においても合成基質である PS の増加は認められない (Fig. 12) [13, 14]。このように、リン脂質の量

は容易に変化しないように厳密に制御されていることが推察される。

反対に、スクリーニングにより PISD が同定できたのは、ミトコンドリアの PE の供給が主に PISD によって担われていることが要因として挙げられる。通常、オルガネラのリン脂質は細胞質を巡回する輸送タンパク質や輸送小胞によって供給されているが [15]、ミトコンドリアの PE の供給に関してはこれらの輸送経路は知られていない。実際に、PE の合成経路は ER にも存在するが、この ER から合成された PE のミトコンドリアへの輸送はほとんどないと言われている [24, 25]。このようなミトコンドリア PE 供給の特殊性は、PARL の活性制御の観点からは都合が良いとも考えられる。先述のようにロンボイドプロテアーゼの活性制御は PE に限らず様々なリン脂質に選択性があることが知られているが [34]、PARL が数あるリン脂質の中で PE により制御される理由として、ミトコンドリア PE の供給量の制御が PISD を介して容易に行えることが可能性として挙げられる。このように、ロンボイドプロテアーゼは、各々が局在する場所周囲の脂質環境に応じて、自身の活性制御に最適なリン脂質を選択しているのかもしれない。

### **PGAM5 の切断が PE によって制御されることの生理的意義**

PGAM5 の切断が生理的にどのような環境下で誘導され、機能しているかに関しては不明な点が多いが、報告されている PGAM5 の機能と本研究による PE による切断制御からその生理的意義を以下に考察したい。

序論において、切断された PGAM5 はアポトーシス誘導時にミトコンドリアから細胞質へと放出され、アポトーシスの促進因子として機能することを述べた (序論図. 3) [11]。しかしながら、Staurosporine や Actinomycin D などの一般的なアポトーシス刺激時には、Cytochrome c がミトコンドリアから放出されているにも関わらず、ミトコンドリアの膜電位はほとんど低下していないことが報告されている [58]。当研究室のこれまでの解析で、切断されていない PGAM5 はアポトーシス刺激下でも細胞質への放出が認められないことから (Fig. S4)、こうした細胞質での機能を発揮するために PGAM5 はアポトーシスに先立って切断されている必要があると考えられる。しかしながら、膜電位低下とアポトーシスが同時に進行する生理的状況は、これまで想定できていなかった。本研究により、PE が膜電位状態に依らず PGAM5 の切断を制御してい

ることが明らかになったが、アポトーシス誘導時に PGAM5 を切断された状態であらかじめ整えておくことでアポトーシスを有利に進めている可能性が考えられる。

これまでの解析から、PGAM5 の切断は組織ごとに異なったパターンを示すことが分かっており、特に脳においては切断型のバンドがドミナントに検出されることを見込んでいる (Fig. S5)。脳組織における PGAM5 切断の理由は説明できていなかったが、本研究により明らかになった PE による PGAM5 の切断制御の知見から、各組織におけるミトコンドリアリン脂質の組成が PGAM5 の切断パターンに影響を与えている可能性も考えられる。組織ごとのミトコンドリア内膜での脂質組成は知られていないが、組織全体として脳には PE が多く含まれるとの報告もあり [59]、PGAM5 の切断の促進を誘導している可能性も考えられるため、構築した *in vitro* の再構成系において、脳などの組織から単離したミトコンドリアの脂質を添加することで確認していきたい。

本研究により、PISD は アンチマイシン A 処理時に見られるような緩やかな膜電位低下に対して切断を誘導する PARL を制御することが分かった (Fig. 15)。こうした膜電位低下は、生理的条件下においてもミトコンドリア呼吸鎖遺伝子のダメージによる呼吸鎖の機能低下時や [51, 52]、UCP1 などによるミトコンドリア膜電位を利用した発熱反応時に誘導される [60]。実際、UCP1 の高発現がみとめられる褐色脂肪組織において、マウス個体を寒冷刺激に曝すと PGAM5 の切断が誘導されること、また、初代培養褐色脂肪細胞において、分化段階の進行に伴う UCP1 の発現の増大と相関して PGAM5 の切断が誘導されることも観察されている (当研究室・矢尾ら、未発表)。こうした状況における PGAM5 の切断の必要性を探索することで、PGAM5 の切断の意義やミトコンドリア PE によって PGAM5 の切断が制御される意義を見いだせる可能性も期待できる。

## 総括

私は、本学博士課程において、以下のことを新たに見いだした。

- ・ **Image-based** のゲノムワイド **siRNA** スクリーニングにより、新規 **PGAM5** 切断制御因子として、**PISD** を同定した。
- ・ **PISD** によって合成されるホスファチジルエタノールアミン (**PE**) が **PARL** による **PGAM5** の切断に必要なことを見いだした。
- ・ **PARL** による **PGAM5** の切断を *in vitro* で再構成する系を構築した。
- ・ 上記の系を用いて、**PE** が **PARL** の酵素活性を制御している可能性を見出した。

本研究は、**PGAM5** 切断の新たな制御因子として、ミトコンドリアリン脂質 **PE** を同定しただけでなく、**PE** がミトコンドリア局在ロンボイドプロテアーゼ **PARL** の活性に重要な因子であることを *in vivo* および *in vitro* の実験系を駆使し、必要性和十分性の両側面から示したものである (Fig. 27)。

しかし、検討しなければならないことは多く残っている。

例えば、生理的に変動する **PE** 量で **PGAM5** の切断が制御され得るか、より厳密なリン脂質比率の変化による **PGAM5** の切断の再構成系による検討を行う必要がある。加えて、本研究結果から **PE** は **PARL** の酵素活性そのものを制御する可能性が高いことが示唆されたが、より直接的に本仮説を証明する実験系での検証が不可欠である。

また、本研究では **PGAM5** 切断の膜電位依存性に関しては、明らかにできなかった。今後は、**PE** の局在等も含め、膜電位依存的なミトコンドリア内膜の変化をより詳細に解析できる実験技術の構築や、スクリーニングで得られた他の候補因子の解析、また異なるリードアウトを用いた新たなスクリーニングの実施を通じて、その分子メカニズムにせまりたいと考えている。

## 参考文献

- [1] N. Ishihara, Y. Fujita, T. Oka, et al., "Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1," *The EMBO Journal*, vol. 25, no. 13, pp. 2966-2977, 2006.
- [2] S.M. Jin, M. Lazarou, C. Wang, et al., "Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL," *The Journal of Cell Biology*, vol. 191, no. 5, pp. 933-942, 2010.
- [3] B. Head, L. Griparic, M. Amiri, et al., "Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells," *The Journal of Cell Biology*, vol. 187, no. 7, pp. 959-966, 2009.
- [4] S. Ehses, I. Raschke, G. Mancuso, et al., "Regulation of OPA1 Processing and Mitochondrial Fusion by M-AAA Protease Isoenzymes and OMA1," *The Journal of Cell Biology*, vol. 187, no. 7, pp. 1023-1036, 2009.
- [5] N. Matsuda, S. Sato, K. Shiba, et al., "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy," *The Journal of Cell Biology*, vol. 189, no. 2, pp. 211-221, 2010.
- [6] D.P. Narendra, S.M. Jin, A. Tanaka, et al., "PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin," *PLoS Biology*, vol. 8, no. 1, 2010.

- [7] T. Tatsuta and T. Langer, "Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing," *EMBO J*, vol. 27, no. 2, pp. 306-314, 2008.
- [8] K. Takeda, Y. Komuro, T. Hayakawa, et al., "Mitochondrial phosphoglycerate mutase 5 uses alternate catalytic activity as a protein serine/threonine phosphatase to activate ASK1," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 30, pp. 12301-12305, 2009.
- [9] M.J. Jedrzejewski, "Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 73, no. 2-4, pp. 263-287, 2000.
- [10] S. Sekine, Y. Kanamaru, M. Koike, et al., "Rhomboid Protease PARL Mediates the Mitochondrial Membrane Potential Loss-induced Cleavage of PGAM5," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 41, pp. 34635-34645, 2012.
- [11] M. Zhuang, S. Guan, H. Wang, et al., "Substrates of IAP ubiquitin ligases identified with a designed orthogonal E3 ligase, the NEDDylator," *Molecular Cell*, vol. 49, no. 2, pp. 273-82, 2013.
- [12] I. Schuiki and G.n. Daum, "Phosphatidylserine decarboxylases, key enzymes of lipid metabolism," *IUBMB Life*, vol. 61, no. 2, pp. 151-162, 2009.

- [13] G. Tasseva, H.D. Bai, M. Davidescu, et al., "Phosphatidylethanolamine Deficiency in Mammalian Mitochondria Impairs Oxidative Phosphorylation and Alters Mitochondrial Morphology," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 6, pp. 4158-4173, 2013.
  
- [14] M. Bürgermeister, R. Birner-Grünberger, R. Nebauer, et al., "Contribution of different pathways to the supply of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine to mitochondrial membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1686, no. 1-2, pp. 161-168, 2004.
  
- [15] J.E. Vance, "Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells," *Traffic*, no. pp. n/a-n/a, 2014.
  
- [16] R. Steenbergen, T.S. Nanowski, A. Beigneux, et al., "Disruption of the Phosphatidylserine Decarboxylase Gene in Mice Causes Embryonic Lethality and Mitochondrial Defects," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 48, pp. 40032-40040, 2005.
  
- [17] M. Freeman, "Rhomoid Proteases and their Biological Functions," *Annual Review of Genetics*, vol. 42, no. 1, pp. 191-210, 2008.
  
- [18] N.D. Rawlings and A.J. Barrett, *Families of serine peptidases*, B.T.M.i. Enzymology, Editor 1994, Academic Press. p. 19-61.
  
- [19] K. Strisovsky, H.J. Sharpe, and M. Freeman, "Sequence-Specific Intramembrane Proteolysis: Identification of a Recognition Motif in Rhomoid Substrates," *Molecular Cell*, vol. 36, no. 6, pp. 1048-1059, 2009.

- [20] C.J. Echeverri and N. Perrimon, "High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide," *Nature Reviews Genetics*, vol. 7, no. 5, pp. 373-384, 2006.
- [21] J.-H. Zhang, T.D.Y. Chung, and K.R. Oldenburg, "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays," *Journal of Biomolecular Screening*, vol. 4, no. 2, pp. 67-73, 1999.
- [22] A. Birmingham, L.M. Selfors, T. Forster, et al., "Statistical methods for analysis of high-throughput RNA interference screens," *Nature Methods*, vol. 6, no. 8, pp. 569-575, 2009.
- [23] V. Lefebvre, Q. Du, S. Baird, et al., "Genome-wide RNAi screen identifies ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) as essential for PARK2 recruitment and mitophagy," *Autophagy*, vol. 9, no. 11, pp. 1770-1779, 2013.
- [24] M.P. Yaffe and E.P. Kennedy, "Intracellular phospholipid movement and the role of phospholipid transfer proteins in animal cells," *Biochemistry*, vol. 22, no. 6, pp. 1497-1507, 1983.
- [25] Y.J. Shiao, G. Lupo, and J.E. Vance, "Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of mitochondrial phosphatidylethanolamine is derived from decarboxylation of phosphatidylserine," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 19, pp. 11190-11198, 1995.

- [26] O. Kuge, M. Nishijima, and Y. Akamatsu, "Phosphatidylserine biosynthesis in cultured Chinese hamster ovary cells. III. Genetic evidence for utilization of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine as precursors," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 13, pp. 5795-5798, 1986.
- [27] D.R. Voelker, "Phosphatidylserine decarboxylase," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 1348, no. 1-2, pp. 236-244, 1997.
- [28] S.E. Horvath, L. Böttinger F.N. Vögtle, et al., "Processing and Topology of the Yeast Mitochondrial Phosphatidylserine Decarboxylase 1," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 44, pp. 36744-36755, 2012.
- [29] A. Thanawastien, W.R. Montor, J. LaBaer, et al., "Vibrio cholerae Proteome-Wide Screen for Immunostimulatory Proteins Identifies Phosphatidylserine Decarboxylase as a Novel Toll-Like Receptor 4 Agonist," *PLoS Pathog*, vol. 5, no. 8, pp. e1000556, 2009.
- [30] M.R. Wieckowski, C. Giorgi, M. Lebiedzinska, et al., "Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells," *Nature Protocols*, vol. 4, no. 11, pp. 1582-1590, 2009.
- [31] M.J. Baker, P.A. Lampe, D. Stojanovski, et al., "Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics," *The EMBO Journal*, no. 2014.
- [32] D.V. Jeyaraju, H.M. McBride, R.B. Hill, et al., "Structural and mechanistic basis of Parl activity and regulation," *Cell Death Differ*, vol. 18, no. 9, pp. 1531-1539, 2011.

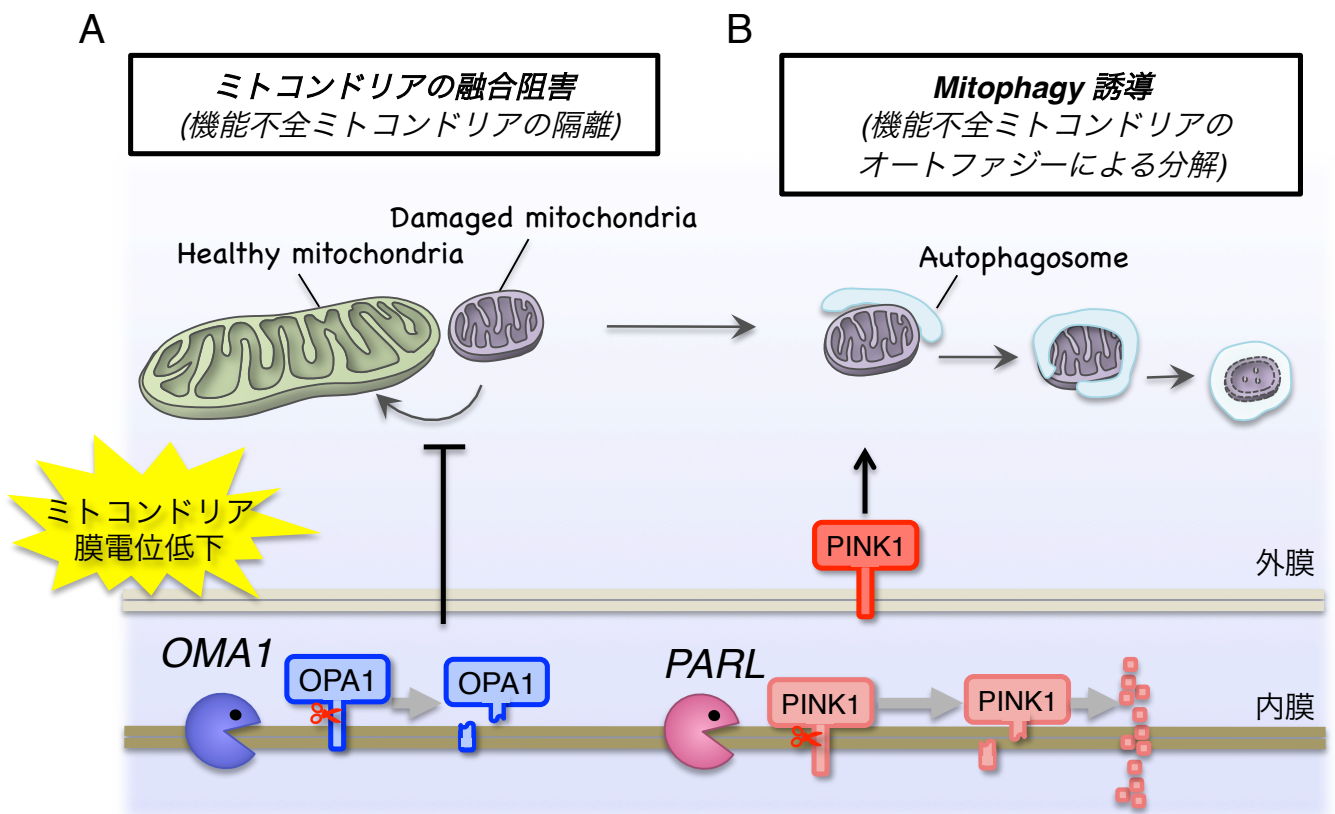
- [33] A. Sík, B.J. Passer, E.V. Koonin, et al., "Self-regulated Cleavage of the Mitochondrial Intramembrane-cleaving Protease PARL Yields P $\beta$ , a Nuclear-targeted Peptide," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 15, pp. 15323-15329, 2004.
- [34] S. Urban and M.S. Wolfe, "Reconstitution of intramembrane proteolysis in vitro reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 6, pp. 1883-1888, 2005.
- [35] E.Y.L. Chan and G.A. McQuibban, "Phosphatidylserine Decarboxylase 1 (Psd1) Promotes Mitochondrial Fusion by Regulating the Biophysical Properties of the Mitochondrial Membrane and Alternative Topogenesis of Mitochondrial Genome Maintenance Protein 1 (Mgm1)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 48, pp. 40131-40139, 2012.
- [36] C. Osman, M. Haag, C. Potting, et al., "The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria," *The Journal of Cell Biology*, vol. 184, no. 4, pp. 583-596, 2009.
- [37] G.A. McQuibban, S. Saurya, and M. Freeman, "Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease," *Nature*, vol. 423, no. 6939, pp. 537-541, 2003.
- [38] M.A. Churchward, T. Rogasevskaia, D.M. Brandman, et al., "Specific Lipids Supply Critical Negative Spontaneous Curvature—An Essential Component of Native Ca<sup>2+</sup>-Triggered Membrane Fusion," *Biophysical Journal*, vol. 94, no. 10, pp. 3976-3986, 2008.

- [39] A.S. Joshi, M.N. Thompson, N. Fei, et al., "Cardiolipin and Mitochondrial Phosphatidylethanolamine Have Overlapping Functions in Mitochondrial Fusion in *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 21, pp. 17589-17597, 2012.
- [40] Y.-M. Li, M.-T. Lai, M. Xu, et al., "Presenilin 1 is linked with  $\gamma$ -secretase activity in the detergent solubilized state," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 11, pp. 6138-6143, 2000.
- [41] O. Holmes, S. Paturi, W. Ye, et al., "The effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified  $\gamma$ -secretase," *Biochemistry*, vol. 51, no. 17, pp. 3565-3575, 2012.
- [42] X.-c. Bai, C. Yan, G. Yang, et al., "An atomic structure of human  $\gamma$ -secretase," *Nature*, vol. 525, no. 7568, pp. 212-217, 2015.
- [43] M. Caffrey, "Crystallizing Membrane Proteins for Structure Determination: Use of Lipidic Mesophases," *Annual Review of Biophysics*, vol. 38, no. 1, pp. 29-51, 2009.
- [44] K. Shimono, M. Goto, T. Kikukawa, et al., "Production of functional bacteriorhodopsin by an *Escherichia coli* cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid," *Protein Science*, vol. 18, no. 10, pp. 2160-2171, 2009.
- [45] V. Wilkens, W. Kohl, and K. Busch, "Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution," *Journal of Cell Science*, no. 2012.

- [46] M. Zick, S.p. Duvezin-Caubet, A. Schäfer, et al., "Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion," *FEBS Letters*, vol. 583, no. 13, pp. 2237-2243, 2009.
- [47] C. Osman, C. Merkwirth, and T. Langer, "Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes," *Journal of Cell Science*, vol. 122, no. 21, pp. 3823-3830, 2009.
- [48] T. Tatsuta, K. Model, and T. Langer, "Formation of Membrane-bound Ring Complexes by Prohibitins in Mitochondria," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 248-259, 2005.
- [49] H. McBride and V. Soubannier, "Mitochondrial Function: OMA1 and OPA1, the Grandmasters of Mitochondrial Health," *Current Biology*, vol. 20, no. 6, pp. R274-R276, 2010.
- [50] G. Steglich, W. Neupert, and T. Langer, "Prohibitins Regulate Membrane Protein Degradation by the m-AAA Protease in Mitochondria," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19, no. 5, pp. 3435-3442, 1999.
- [51] M.V. Miceli, J.C. Jiang, A. Tiwari, et al., "Loss of mitochondrial membrane potential triggers the retrograde response extending yeast replicative lifespan," *Genetics of Aging*, vol. 2, no. pp. 102, 2012.
- [52] D.A. Knorre and F.F. Severin, "Longevity and mitochondrial membrane potential," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 77, no. 7, pp. 793-794, 2012.

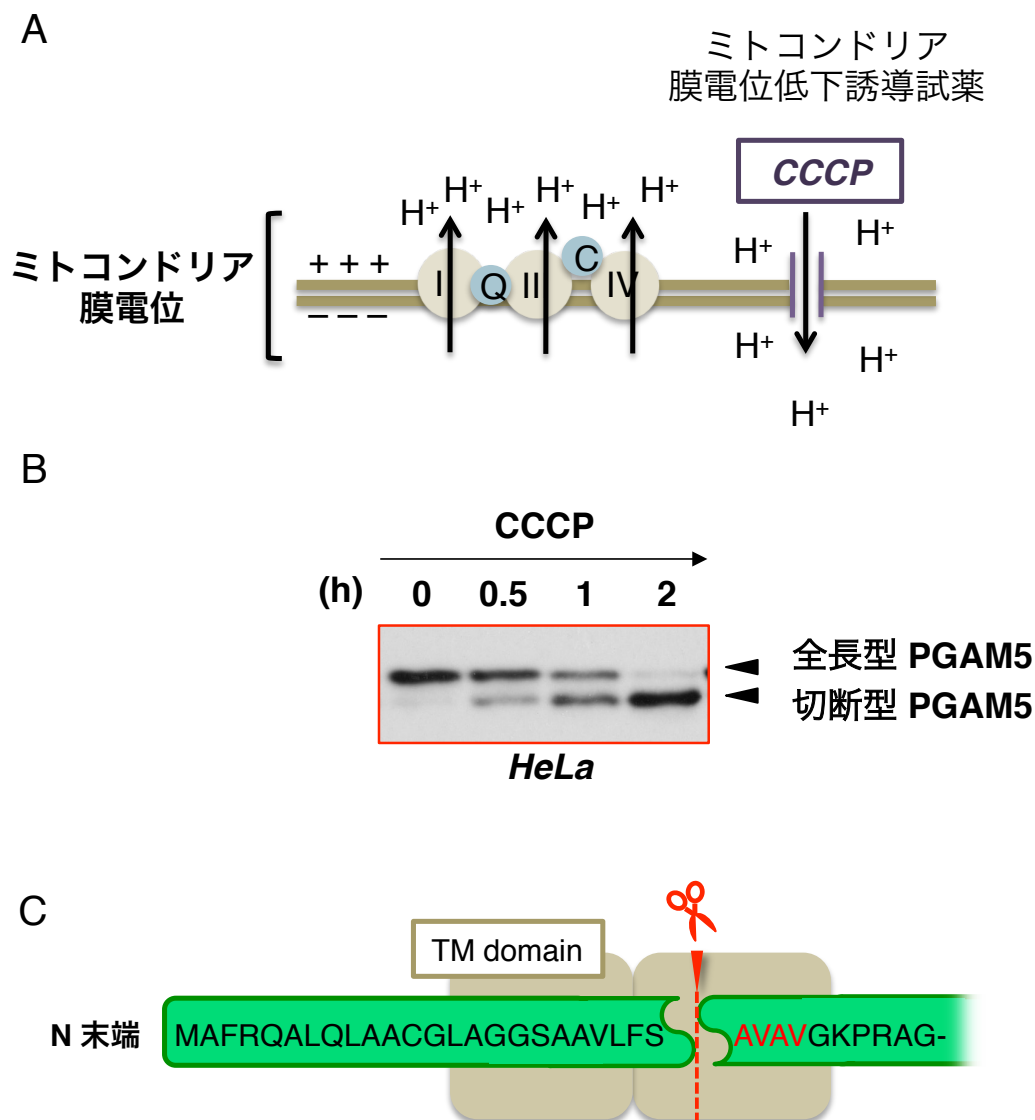
- [53] M. Hüttemann, I. Lee, A. Pecinova, et al., "Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease," *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 40, no. 5, pp. 445-456, 2008.
- [54] N. Dairaku, K. Kato, K. Honda, et al., "Oligomycin and antimycin A prevent nitric oxide-induced apoptosis by blocking cytochrome C leakage," *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 143, no. 3, pp. 143-151, 2004.
- [55] D. Arikketh, R. Nelson, and J.E. Vance, "Defining the Importance of Phosphatidylserine Synthase-1 (PSS1) Unexpected Viability of PSS1-Deficient Mice," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 19, pp. 12888-12897, 2008.
- [56] M.O. Bergo, B.J. Gavino, R. Steenbergen, et al., "Defining the Importance of Phosphatidylserine Synthase 2 in Mice," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 49, pp. 47701-47708, 2002.
- [57] D.R. Voelker, "Reconstitution of phosphatidylserine import into rat liver mitochondria," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, no. 14, pp. 8019-8025, 1989.
- [58] J.C. Goldstein, N.J. Waterhouse, P. Juin, et al., "The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant," *Nature Cell Biology*, vol. 2, no. 3, pp. 156-162, 2000.
- [59] O. Camici and L. Corazzi, "Import of phosphatidylethanolamine for the assembly of rat brain mitochondrial membranes," *The Journal of Membrane Biology*, vol. 148, no. 2, pp. 169-176, 1995.

- [60] Z. Zhou, S.Y. Toh, Z. Chen, et al., "Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity," *Nature Genetics*, vol. 35, no. 1, pp. 49-56, 2003.
  
- [61] G.F.G. Allen, R. Toth, J. James, et al., "Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy," *EMBO reports*, vol. 14, no. 12, pp. 1127-1135, 2013.



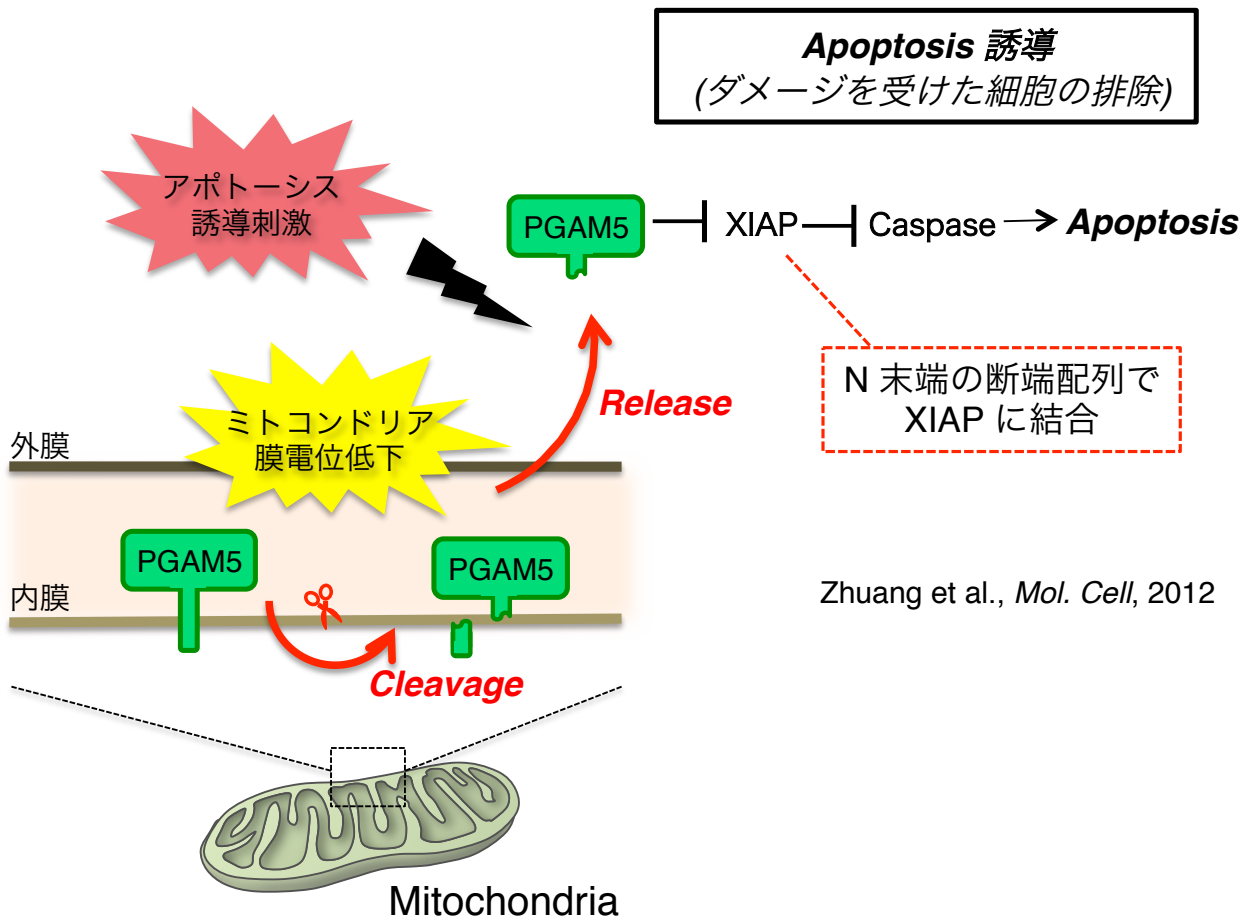
**序論図. 1 膜電位低下依存的に切断制御を受けるタンパク質とミトコンドリアにおけるストレス応答の例**

- (A) OPA1 はミトコンドリア膜電位低下に応答して切断を受け、融合促進活性を失う。それに伴い、ミトコンドリア融合マシナリーが不活性化し、機能低下したミトコンドリアが他の正常ミトコンドリアと再融合するのを防ぐ。
- (B) PINK1 は膜電位低下依存的に切断を免れ、外膜で安定化する。安定した PINK1 は、膜電位低下を起こした機能不全ミトコンドリアの目印として、機能低下ミトコンドリア特異的なオートファジー (Mitophagy) に誘導する。



**序論図. 2 PGAM5 はミトコンドリア膜電位低下依存的に膜内で切断される**

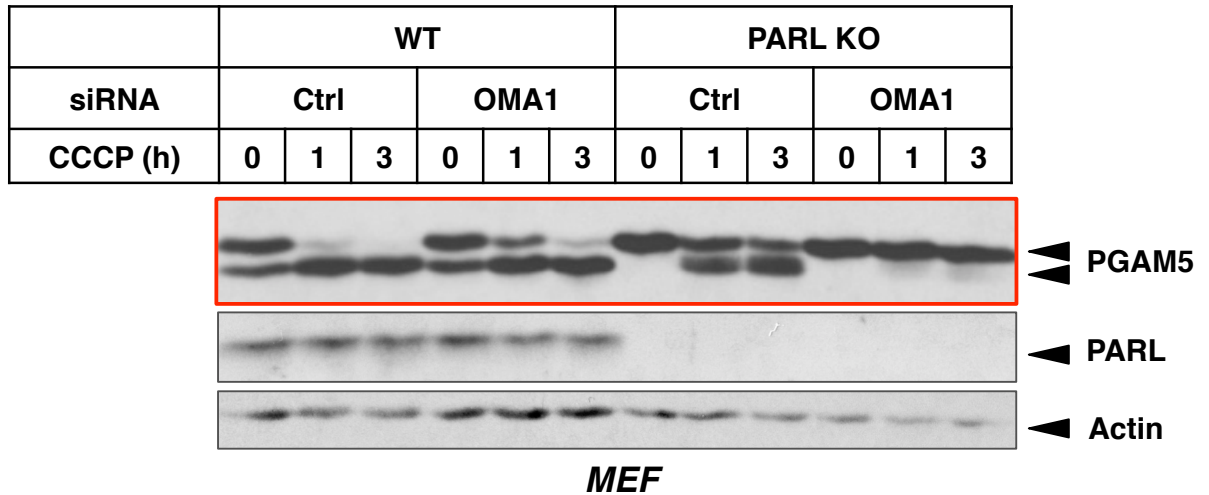
- (A) 脱共役剤 CCCP の処理により、電子伝達系で作られたミトコンドリア膜電位は低下する。
- (B) PGAM5 のバンドはミトコンドリア膜電位低下誘導試薬 CCCP の処置により、下一本に収束する。HeLa 細胞において、CCCP 刺激を行った。  
(CCCP: 10  $\mu$ M, 各時間.)
- (C) PGAM5 のN 末端のアミノ酸配列。PGAM5 の膜内切断を受ける箇所を点線で示す。



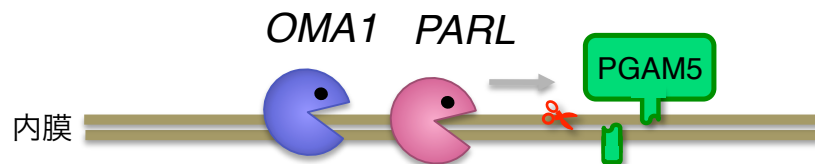
### 序論図. 3 PGAM5 は切断されアポトーシス促進にはたらく

切断型 PGAM5 はアポトーシス誘導時に、ミトコンドリアから細胞質へと放出され、カスパーゼ阻害因子である XIAP に結合し、その機能の阻害を介することで、アポトーシスの促進因子としてはたらく (Zhuang et al., *Mol. Cell*, 2012)。

A



B



#### 序論図. 4 PARL と OMA1 の2つのプロテアーゼが PGAM5 の切断を担う

(A) 野生型あるいは PARL 欠損マウス由来の MEF 細胞において、各 siRNA を導入し、CCCP 刺激を行った。PGAM5 の CCCP 刺激依存的なバンドの収束は PARL の欠損や OMA1 の発現抑制において部分的に抑制される。PARL 欠損 MEF 細胞に OMA1 の発現抑制を行うと、PGAM5 の切断はほぼ完全に抑制される。

(siRNA: 40 nM, 72 h. CCCP: 30  $\mu$ M, 各時間.)

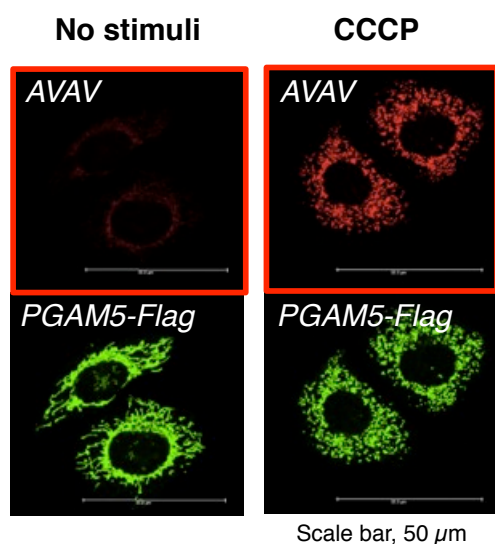
(B) PARL と OMA1 はともにミトコンドリア内膜局在のプロテアーゼである。

56

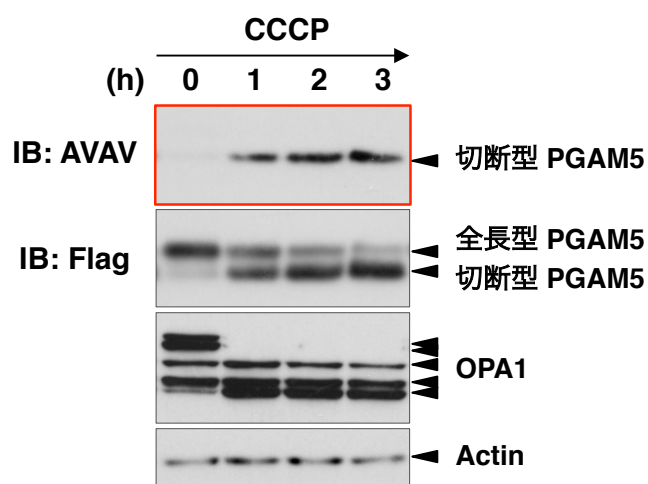
A



B



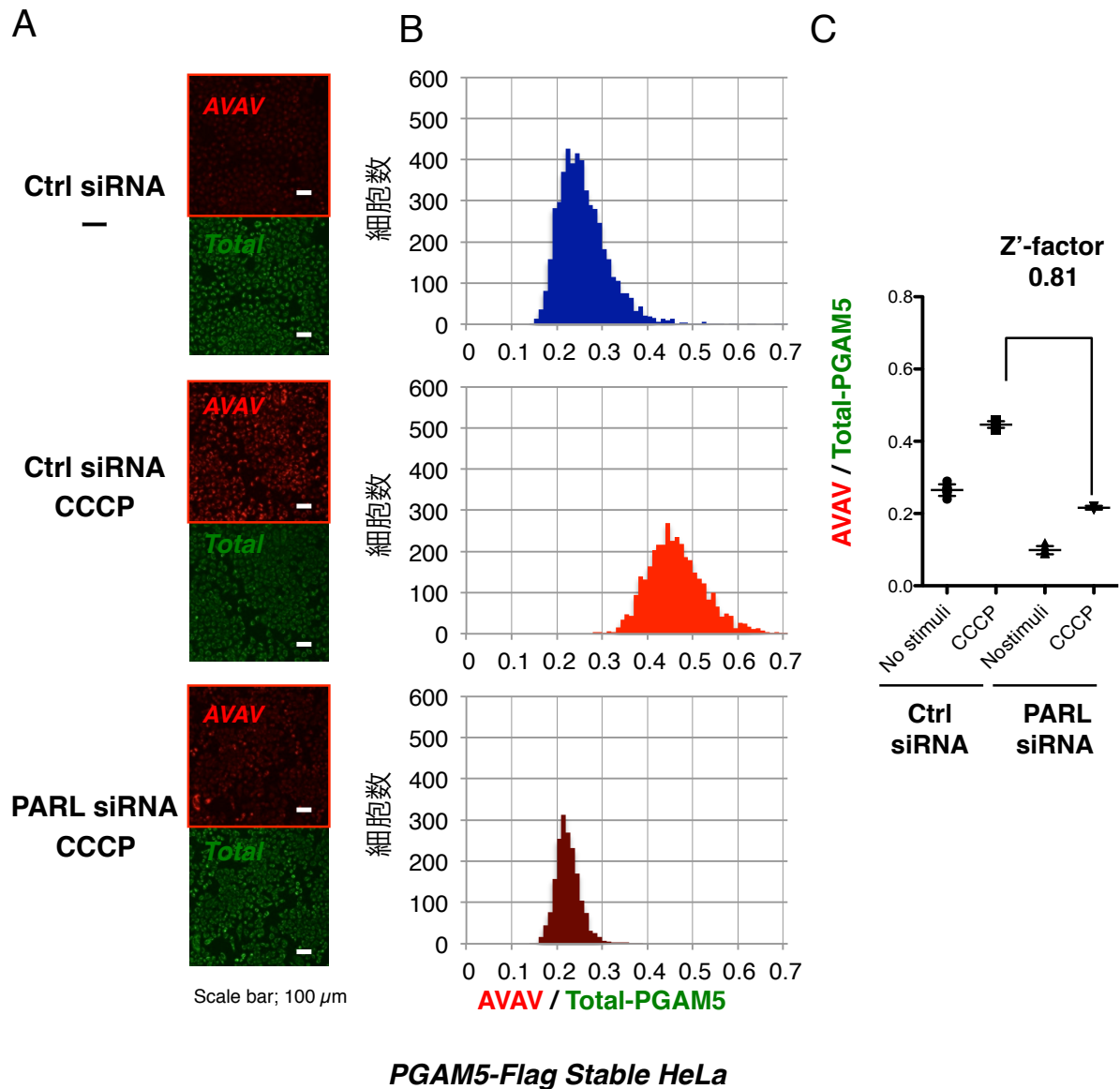
C



### PGAM5-Flag Stable HeLa

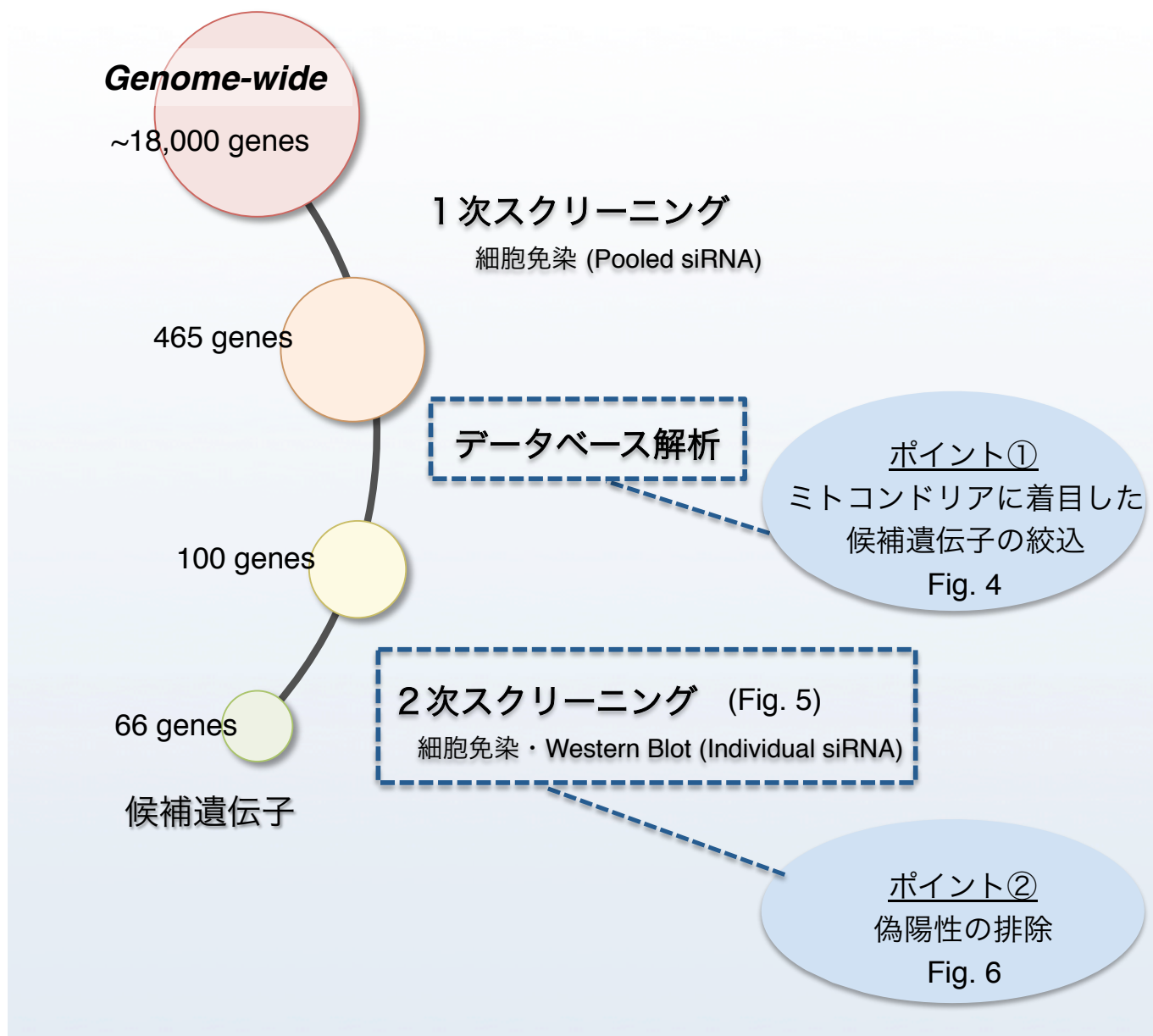
## Fig. 1 切断型 PGAM5 特異的抗体 (AVAV) の作製

- (A) 切断型 PGAM5 特異的抗体 (AVAV) のエピトープ。切断型 PGAM5 の N 末端のアミノ酸配列をエピトープとした。エピトープの箇所を赤字で示す。
- (B) PGAM5-Flag を恒常的に発現する HeLa 細胞に CCCP を処理し、AVAV 抗体と Flag 抗体で細胞免疫染色をおこなうと、AVAV 抗体由来のシグナルの増加がみられた。
- (C) AVAV 抗体によるウェスタンブロット。PGAM5-Flag を恒常的に発現する HeLa 細胞において AVAV 抗体で検出されるバンドは CCCP 処理によってシフトダウンした切断型 PGAM5 と同じ位置で検出される。  
(CCCP: 30  $\mu$ M, 各時間.)



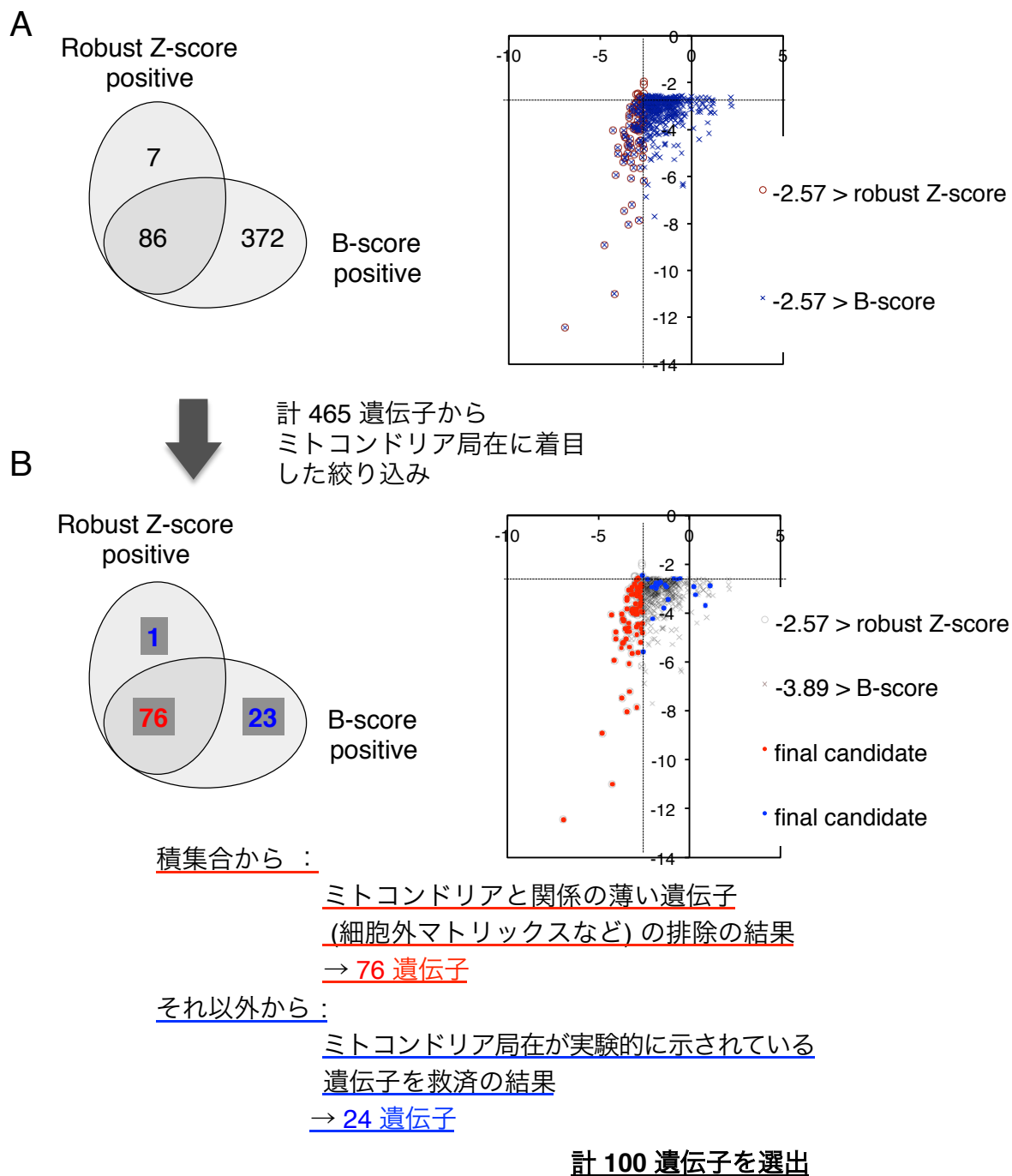
**Fig. 2** 全自動イメージアナライザーを用いた切断効率の定量

- (A) Array Scan で取得した細胞免疫染色画像。PGAM5-Flag 恒常発現細胞において各 siRNA を導入し、CCCP 処理後、細胞免疫染色を行い、Array Scan によって画像を取得した。CCCP 処理下の AVAV 抗体由来の蛍光強度が増加し、PARL 発現抑制により AVAV 抗体由来の蛍光強度は減弱した。(siRNA: 40 nM, 72 h. CCCP: 30  $\mu$ M, 3 h.)
- (B) PGAM5 切断率の細胞分布。画像解析によって PGAM5 切断率 (AVAV / Total-PGAM5) を算出した。PGAM5 の切断率の細胞分布は正規分布に近似出来るような分布をとり、CCCP 処理によって明確にシフトした。PGAM5 切断効率 (AVAV / Total-PGAM5) の細胞分布は CCCP 処理下において PARL のノックダウンにより抑制された。
- (C) Z'-factor の算出。Z'-factor =  $1 - 3 \times (SD_P + SD_N) / (Mean_P + Mean_N)$ 。Control のノックダウンを negative control (N) 群、と PARL のノックダウンを positive control (P) 群と見なした場合、Z'-factor が 0.8 を超えた。(n = 8.)



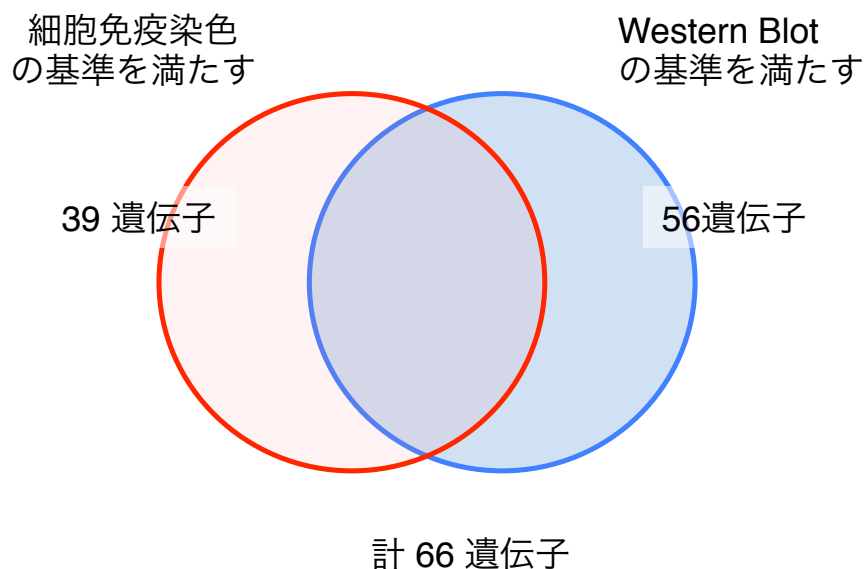
**Fig. 3 Genome-wide siRNA スクリーニングの流れ**

一次スクリーニングで選出された上位遺伝子はさらに複数の段階を経て絞り込まれる。一次スクリーニングの次に、データベースをもとにミトコンドリアに着目した絞り込みを行った。続いて、二次スクリーニングでは細胞免疫により再検討を行うとともに WesternBlotを用いて、最終候補遺伝子を絞った。さらに、最終候補遺伝子に対し、CCCP とは異なる刺激を用いた系 (Fig. 6 参照) を用いて偽陽性の排除を目的とした Western Blot による再評価を行った。



**Fig. 4 1 次スクリーニングの候補遺伝子の絞り込み**

- (A) Robust Z-score、B-score の分布。縦軸に B-score、横軸に Robust Z-score をとり、各遺伝子をプロットするとした。各スコアで  $-2.57$  以下に存在する遺伝子の分布のみを示す。ベン図で各分布の遺伝子数を示す。
- (B) データベースによる絞り込みの結果、一次スクリーニングの結果から、合計 100 遺伝子を二次スクリーニングへと進める候補遺伝子として選出した。積集合 86 遺伝子中 76 遺伝子 (赤)、積集合からはずれた 379 遺伝子の中 24 遺伝子 (青) を選出した。



**【細胞免疫染色の基準】**  
3 回の実験全てで control siRNA の  
平均値より、切断が抑制されたもの  
 → **39 遺伝子**

**【Western Blot の基準】**  
2 回の実験両方で control siRNA より、  
切断が抑制されたもの  
 → **56 遺伝子**

## Fig. 5 2次スクリーニングの候補遺伝子の絞り込み

細胞免疫染色、Western Blot の各評価系による検討を複数回行い、基準として以下のよう  
 うに、全ての実験回においてコントロールより切断が抑制された遺伝子を選出した。い  
 ずれかの評価系で PGAM5 の切断が抑制されれば、ポジティブな遺伝子として選出した。  
 その結果、最終的に PGAM5 の切断に必要な因子を 66 遺伝子得ることができた。

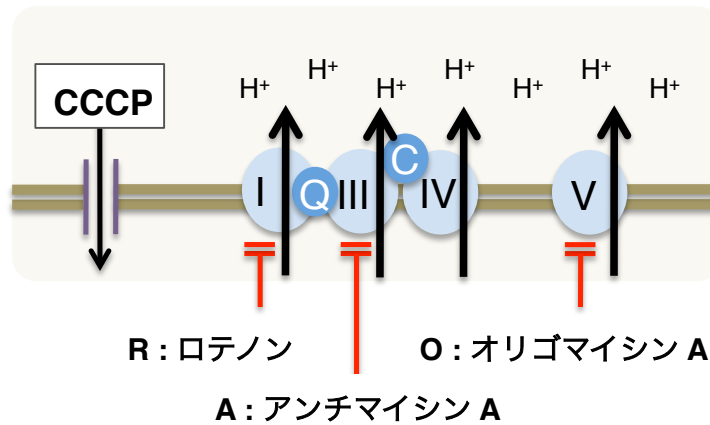
(細胞免疫染色の基準)

3 回の実験全てで control siRNA の平均値より、切断が抑制されたもの

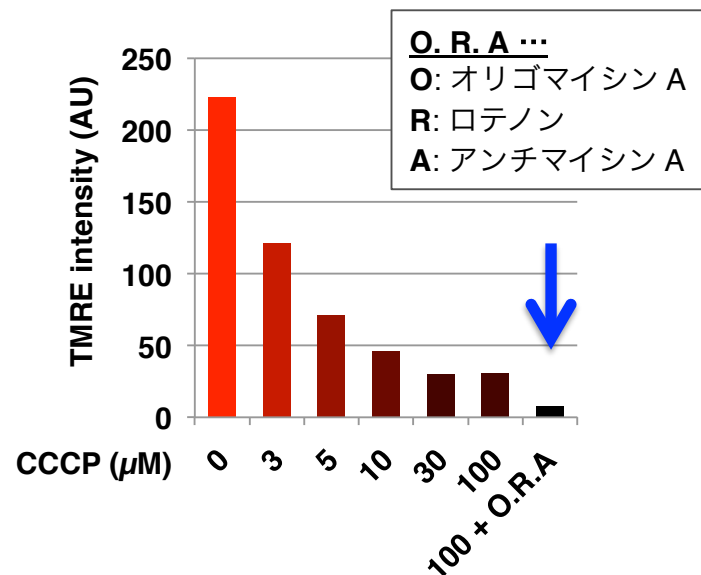
(Western Blot の基準)

2 回の実験両方で control siRNA より、切断が抑制されたもの

A



B



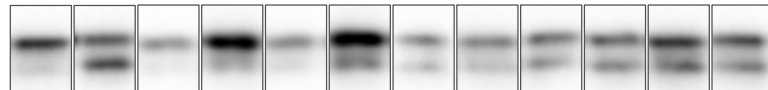
**Fig. 6 2次スクリーニングにおける偽陽性の排除**

- (A) 各呼吸鎖阻害剤の作用点。呼吸鎖複合体が活性化する場合、CCCP による脱共役に対して耐性を持つ可能性が示唆される。
- (B) HeLa 細胞において、CCCP および O. R. A 処理後、TMRE 染色を行い FACS で蛍光強度を測定した。縦軸は蛍光強度の平均値を示す。CCCP とオリゴマイシン (O)、ロテノン (R)、アンチマイシン (A) を併用することで、膜電位をほぼ完全に下げることができた。  
(CCCP: 各濃度, 1h. O: 1  $\mu M$ , 1 h. R: 5  $\mu M$ , 1 h, A: 5  $\mu M$ , 1 h.)

A

スクリーニングでの順位	-	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
siRNA	Control	Control	OMA1 #2	PARL #2	OMA1 #1	PARL #1	RNF121 #2	MRPL41 #1	MARS2 #1	PISD #1	PISD #2	MRPL14 #1
CCCP + O. R. A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

IB : PGAM5

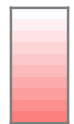


切断効率 : 0.22 0.55 0.17 0.18 0.23 0.27 0.32 0.34 0.36 0.38 0.39 0.39

HeLa

B

全長



切断

$$\text{切断効率} = \frac{\text{下のバンド}}{\text{上下のバンド}}$$

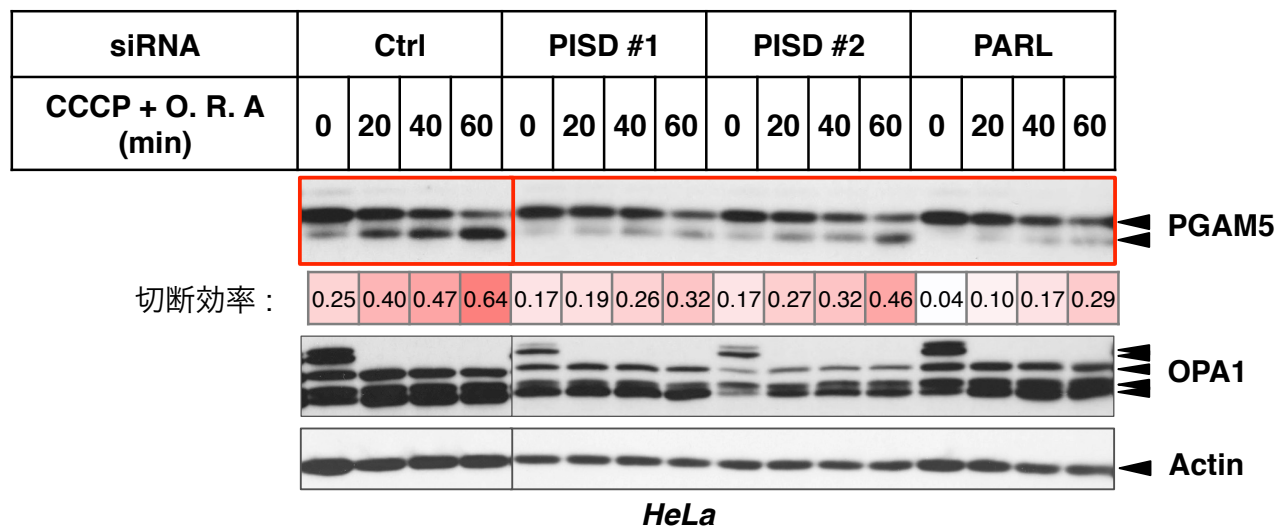
## Fig. 7 スクリーニングの上位遺伝子の結果

(A) 上位 10 位以内遺伝子の結果。HeLa 細胞において、各 siRNA を導入し、CCCP + O. R. A. 刺激を行った。この中に OMA1、PARL といった既知の切断制御因子が含まれたことからスクリーニングの妥当性が伺える。2 つ用意した siRNA 両方で上位になった遺伝子として PARL と OMA1 の他に PISD が同定された。

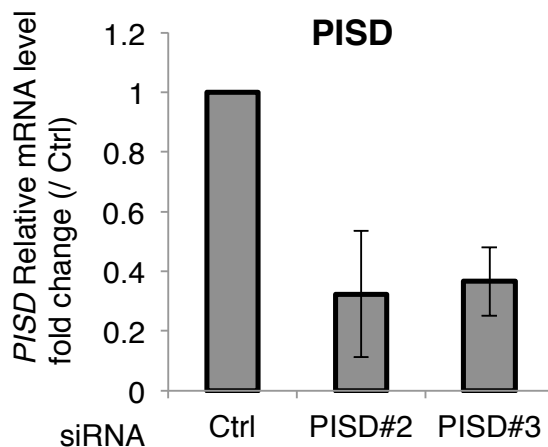
(siRNA: 40 nM, 72 h, CCCP: 100  $\mu$ M, 1 h. O: 1  $\mu$ M, 1 h. R: 5  $\mu$ M, 1 h, A: 5  $\mu$ M, 1 h.)

(B) PGAM5 切断効率の算出式。切断効率 = 上のバンド / 上下のバンド。Image J によりバンドを定量した。

A



B



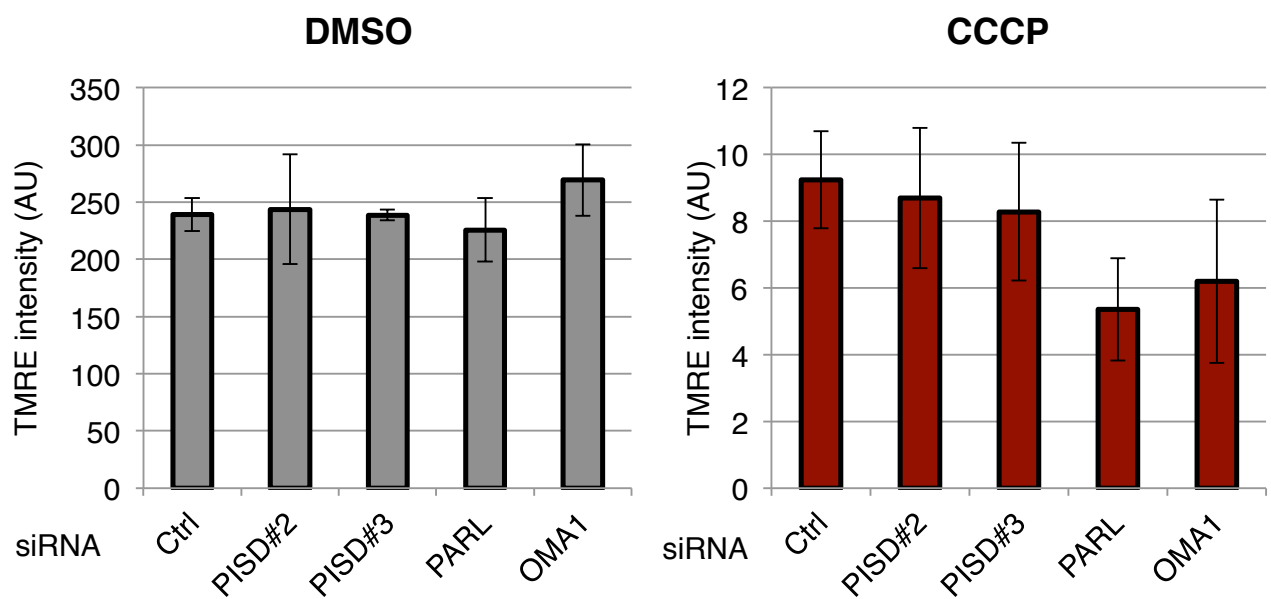
**Fig. 8 PISD の発現抑制は PGAM5 の切断を抑制する**

(A) HeLa 細胞において、各 siRNA を導入し、CCCP + O. R. A 刺激を行った。PISD の発現抑制により PGAM5 の切断が抑制された。

(siRNA: 40 nM, 72 h, CCCP: 100  $\mu$ M. O: 1  $\mu$ M. R: 5  $\mu$ M. A: 5  $\mu$ M, 各時間.)

(B) Real-time PCRの結果。各 siRNA の処理により PISD の発現が抑制されている。

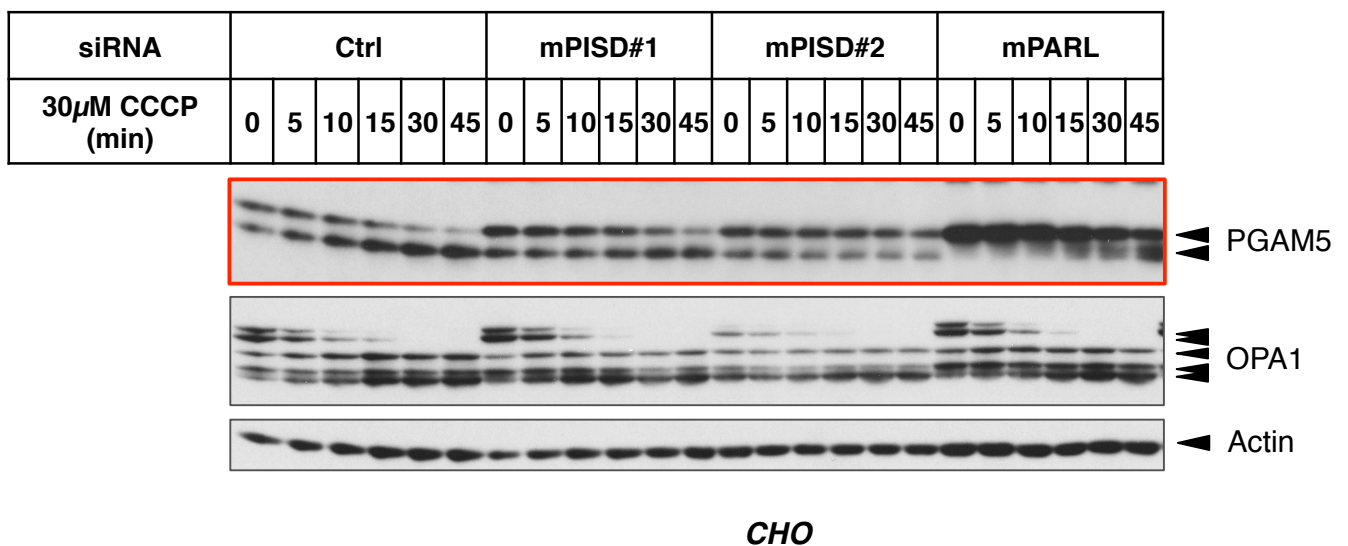
(数値は Control siRNAを基準とした Mean  $\pm$  SEM, n = 3.)



**Fig. 9 PISD の発現抑制は膜電位に影響を与えない**

HeLa 細胞において、各 siRNA を導入し、CCCP 処理後、TMRE 染色を行い FACS で蛍光強度を測定した。縦軸は蛍光強度の平均値を示す。

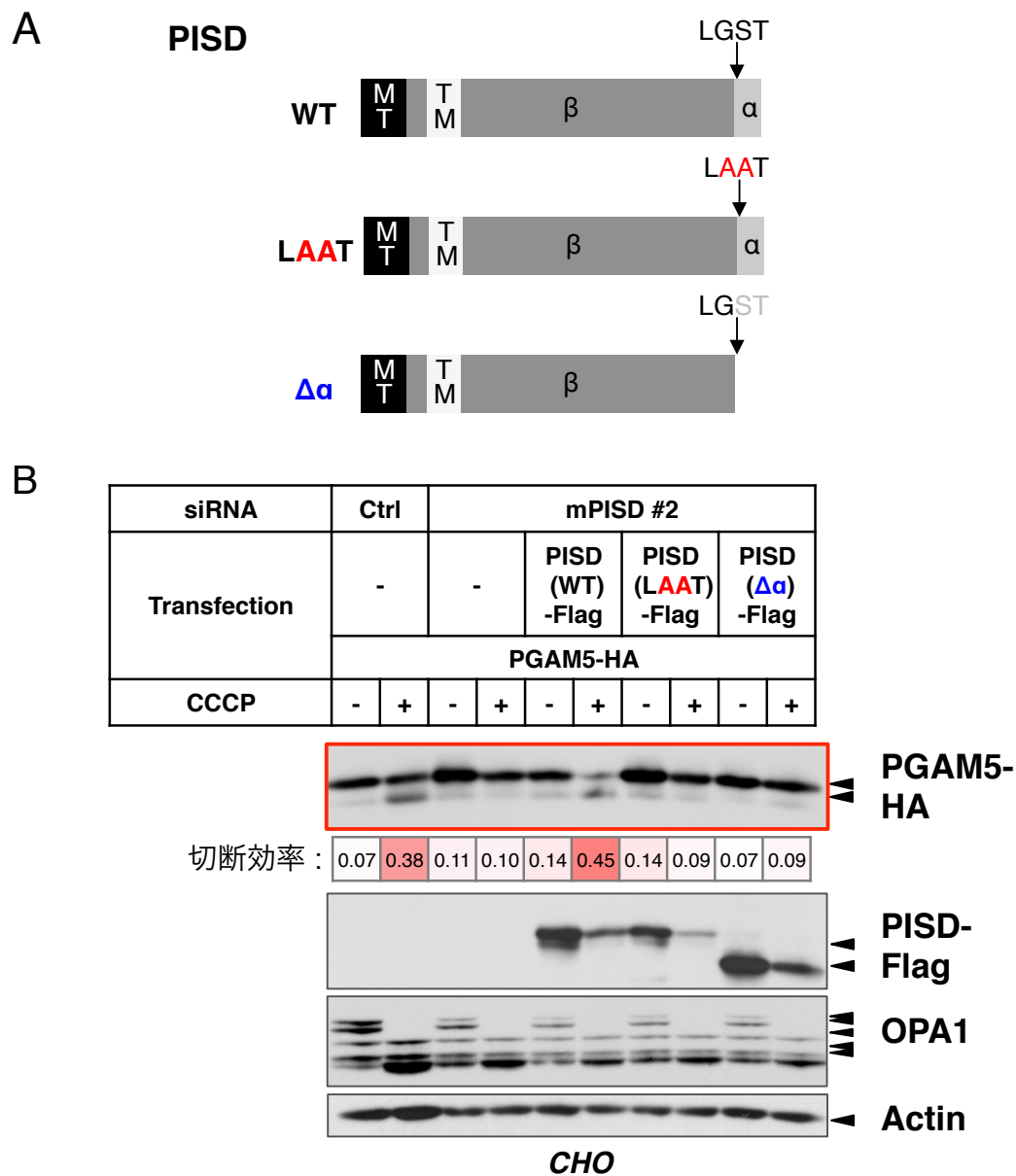
(siRNA: 40 nM, 72 h. CCCP: 100  $\mu$ M, 1 h. 数値は Mean  $\pm$  SEM, n=3.)



**Fig. 10 PISD の発現抑制は PGAM5 の切断を抑制する**

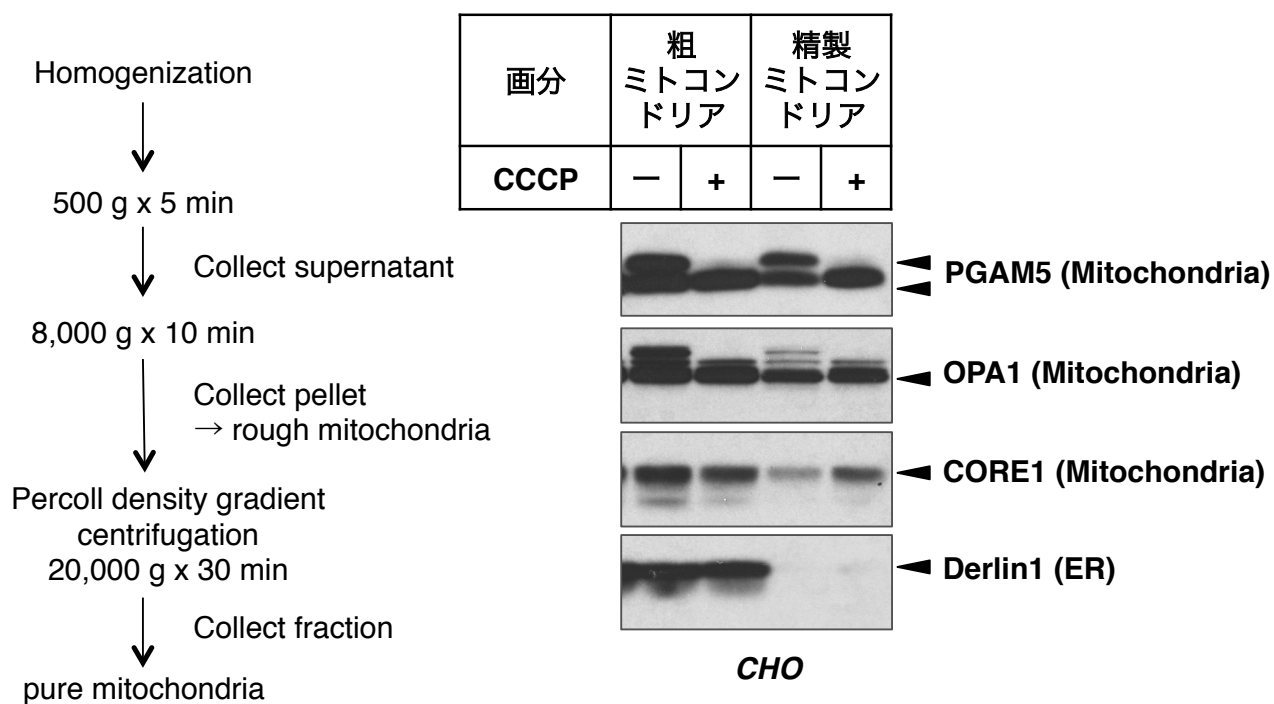
CHO 細胞において、各 siRNA を導入し、CCCP 刺激を行った。PISD の発現抑制により PGAM5 の切断が抑制された。

(siRNA: 40 nM, 72 h. CCCP: 30  $\mu$ M, 各時間.)



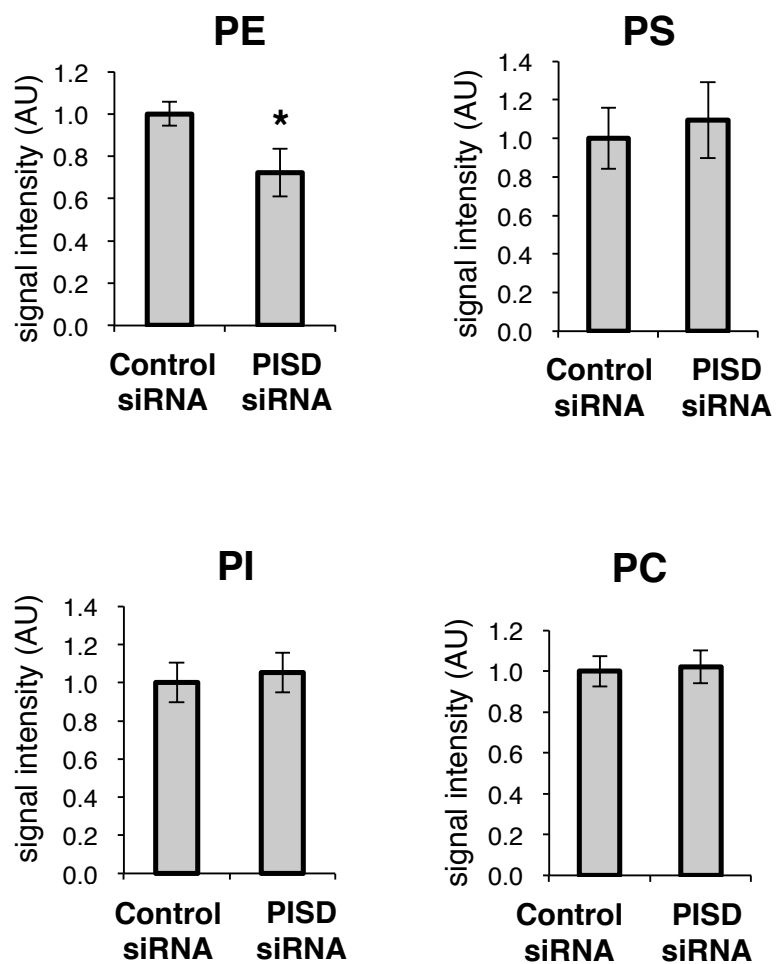
**Fig. 11 PISD の酵素活性が PGAM5 の切断に必要である**

- (A) PISD の一次配列。(MT, ミトコンドリアターゲット配列、TM : Transmembrane domain、 $\alpha$  :  $\alpha$ サブユニット、 $\beta$  :  $\beta$  サブユニット)
- (B) CHO 細胞において、各 siRNA を導入し、PGAM5-HA、PISD-(WT, LAAT,  $\Delta\alpha$ )-Flag を過剰発現し、CCCP 刺激を行った。野生型の PISD を PISD 発現抑制細胞に戻すと切断が回復する一方で、LAAT 変異体や、 $\Delta\alpha$  変異体では切断が回復しなかった。(siRNA: 40 nM, 72 h. 過剰発現: 48 h, CCCP: 100  $\mu$ M, 1.5 h.)



### Fig. 12 ER を含まないミトコンドリアの精製

HeLa 細胞において、CCCP 処理後、Percoll 密度勾配遠心によりミトコンドリアを精製した。精製したミトコンドリアは Percoll 密度勾配遠心前の粗ミトコンドリア画分と比較して ER タンパク質の混入が見られない。  
(CCCP: 100  $\mu$ M, 1.5 h.)



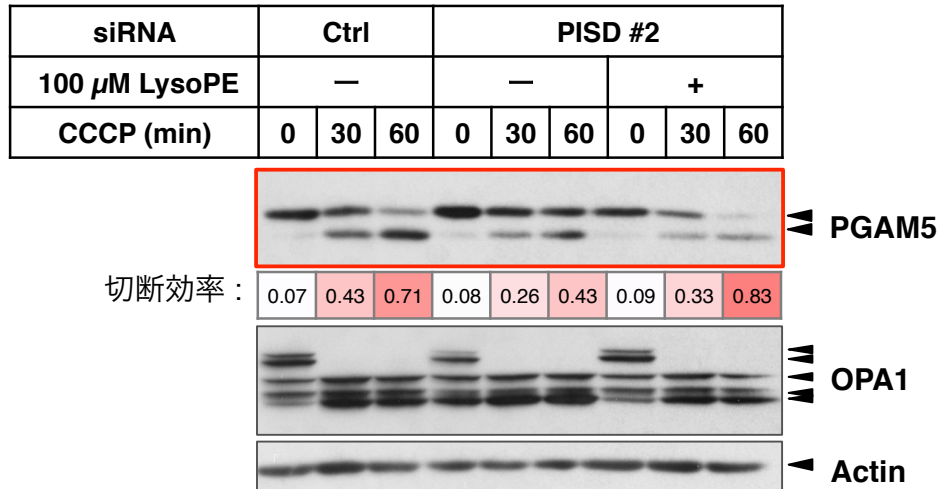
**Fig. 13 PISD 発現抑制によりミトコンドリア PE 量が減少する**

HeLa 細胞において、各 siRNA を導入した細胞からミトコンドリアを精製後、脂質の抽出を行い、LC/MS によりリン脂質定量を行った。

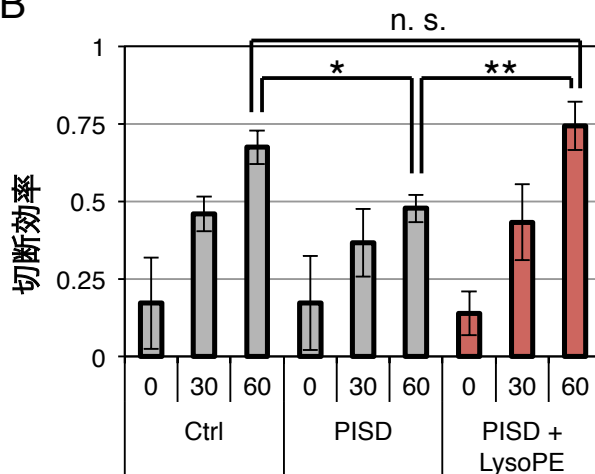
(siRNA: 40 nM, 72 h. 数値は Control siRNA を基準とした Mean  $\pm$  SEM, n=3. student's t-test, \*P < 0.05.)

## HeLa

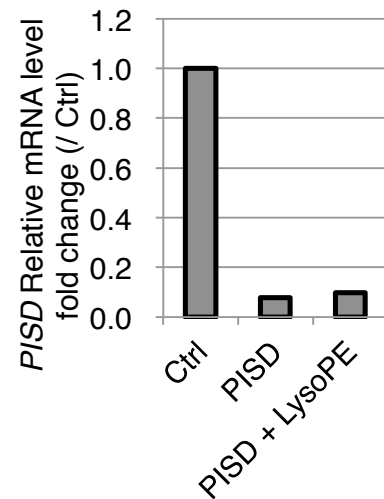
A



B



C



**Fig. 14 LysoPE の添加により PGAM5 の切断をレスキューできる**

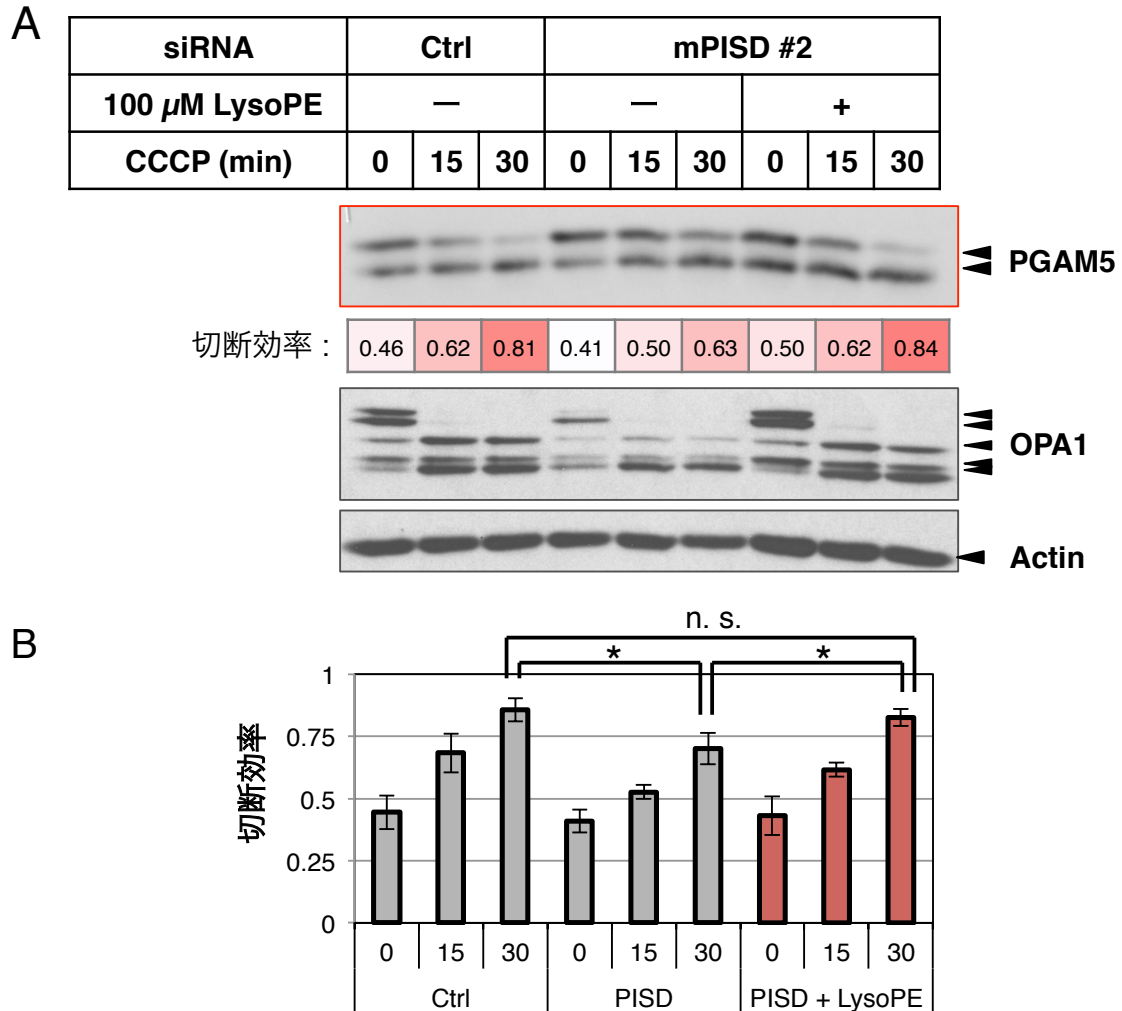
(A) HeLa 細胞において、各 siRNA を導入し、LysoPE を処理した後、CCCP 刺激を行った。LysoPE の添加により、PISD 発現抑制による切断の遅延が回復した。  
(siRNA; 40 nM, 72 h. LysoPE: 100 $\mu$ M, 60 h, CCCP: 30  $\mu$ M, 各時間.)

(B) PGAM5 の切断効率。

(Mean  $\pm$  SD, n=3, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, n. s. not significant, One way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test.)

(C) Real-time PCRの結果。LysoPE 処理によって PISD の発現抑制効率は影響を受けない。

## CHO

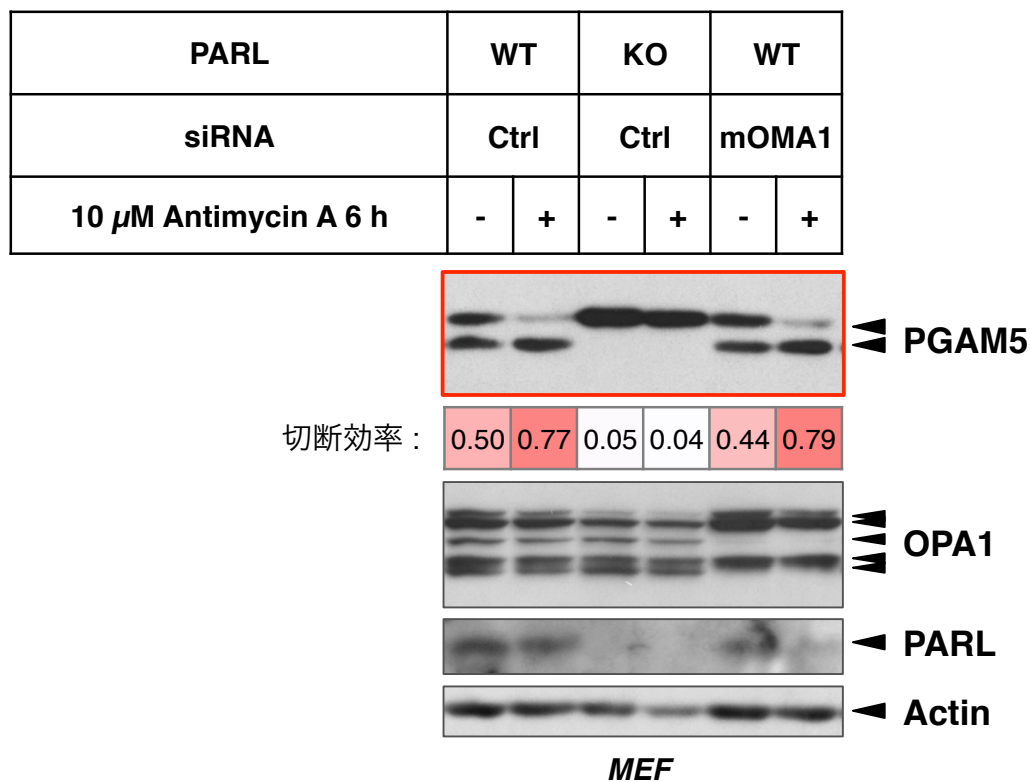


**Fig. 15 LysoPE の添加により PGAM5 の切断をレスキューできる**

(A) CHO 細胞において、各 siRNA を導入し、LysoPE を処理した後、CCCP 刺激を行った。LysoPE の添加により、PISD 発現抑制による切断の遅延が回復した。  
(siRNA: 40 nM, 72 h. LysoPE: 100  $\mu$ M, 60 h, CCCP: 30  $\mu$ M, 各時間.)

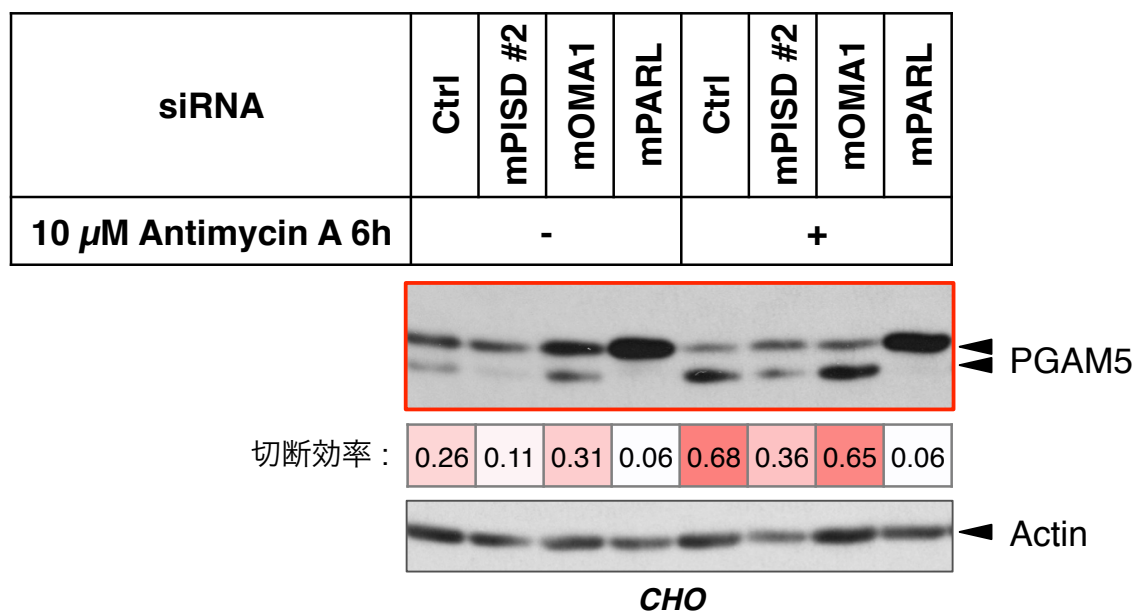
(B) PGAM5 の切断効率。

(Mean  $\pm$  SD, n=3, \*P < 0.05, n. s. not significant, One way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test.)



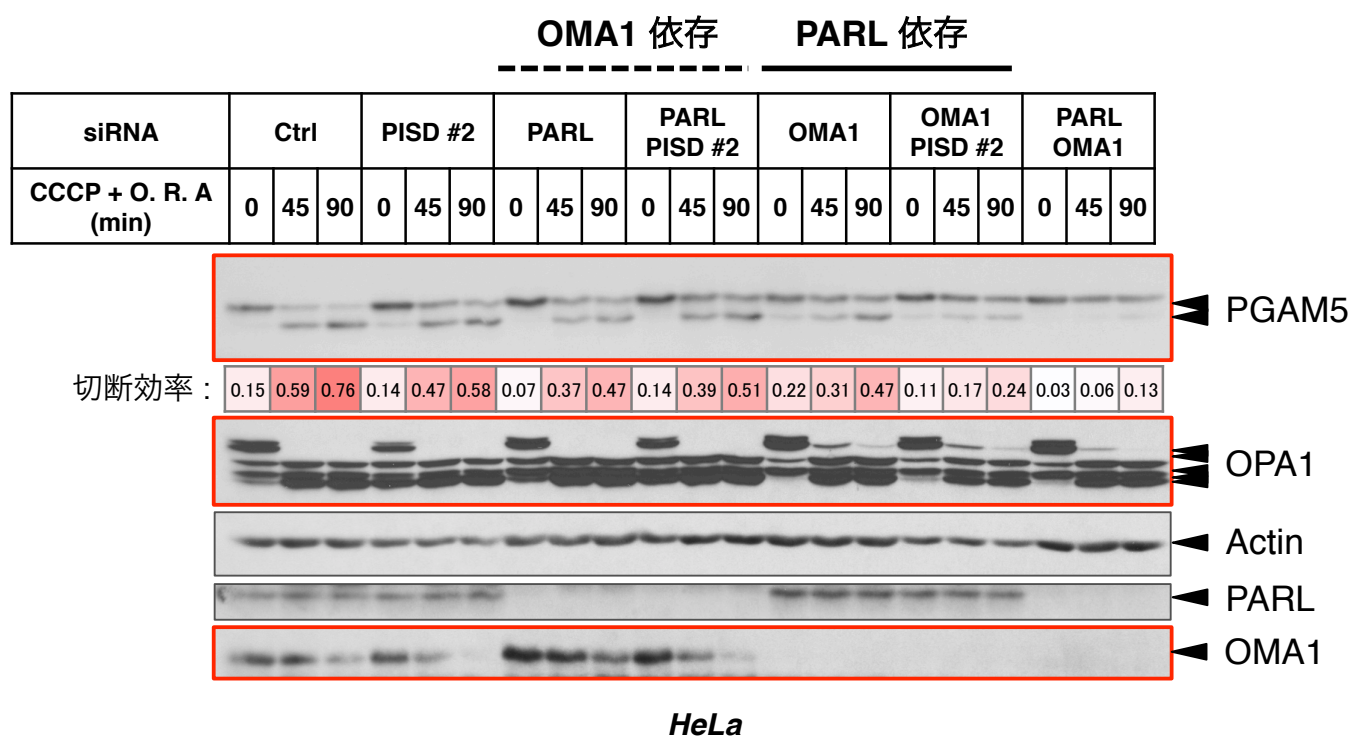
**Fig. 16 アンチマイシンAによるPGAM5の切断はPARLに依存している**

(A) 野生型、あるいはPARL欠損MEF細胞において、各siRNAを導入し、Antimycin A刺激を行った。Antimycin Aによって誘導されるPGAM5の切断はPARL欠損マウス由来MEFで完全に抑制される一方で、OMA1発現抑制では抑制されない。  
(siRNA: 40 nM, 72 h. Antimycin A: 10  $\mu$ M, 6 h.)



**Fig. 17 アンチマイシンA による PARL 依存的な PGAM5 の切断は PISD 発現抑制で抑制される**

CHO 細胞において、各 siRNA を導入し、Antimycin A 刺激を行った。Antimycin A によって誘導される PGAM5 の切断は PISD ノックダウンにより抑制された。  
(siRNA: 40 nM, 72 h. Antimycin A: 10  $\mu$ M, 6 h.)



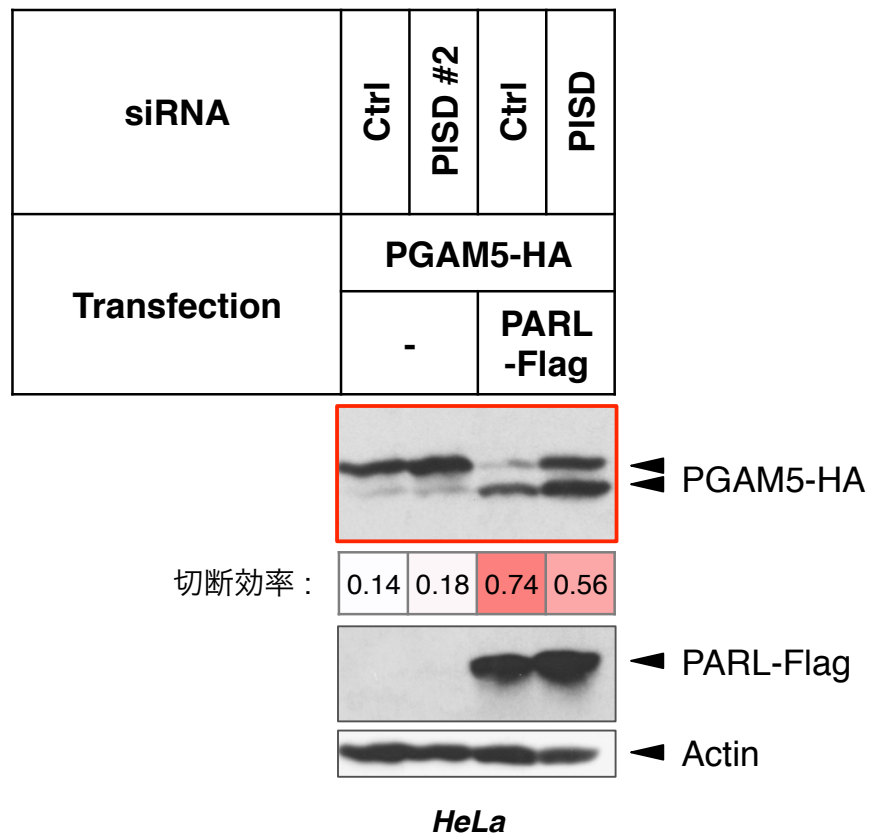
**Fig. 18 PISD は PARL 依存の切断を制御する**

HeLa 細胞において、各 siRNA を導入し、CCCP + O. R. A. 刺激を行った。PARL を発現抑制した状態では、PISD のノックダウンの併用で更なる抑制は観察されない。OMA1 を発現抑制した状態では、PISD のノックダウンの併用で更なる抑制が観察された。

OMA1 依存的な OPA1 の切断は、PISD のノックダウンによる影響を受けない。

OMA1 の自己切断によるバンドの減少は、PISD のノックダウンによる影響を受けない。

(siRNA: 40 nM, 72 h, CCCP: 100  $\mu$ M. O: 1  $\mu$ M. R: 5  $\mu$ M. A: 5  $\mu$ M, 各時間.)



**Fig. 19 PISD 発現抑制は PARL 過剰発現による切断を抑制する**

HeLa 細胞において、各 siRNA を導入し、PGAM5-HA、PARL-Flag を過剰発現した。PARL 過剰発現によって誘導される PGAM5 の切断は PISD 発現抑制で抑制された。(siRNA: 40 nM, 72 h. 過剰発現: 48 h.)

## PE の作用点の同定

PE はどのように PARL を介した  
PGAM5 の切断を制御するのか？

### 可能性① PE は PGAM5 切断の膜電位依存性を制御するか？

実験 1. PE が PARL と PGAM5 の膜電位低下依存的結合を仲介するか？ (Fig. 21)

実験 2. PE の量が膜電位低下依存的に変化するか？ (Fig. 22)

### 可能性② PE は PARL のプロテアーゼ活性そのものを制御するか？

実験 1. 定常状態で切断される別の基質にも影響するのでは？ (Fig. 23)

実験 2. In vitro 再構成系でも切断を制御できるか？ (Fig. 24-26)

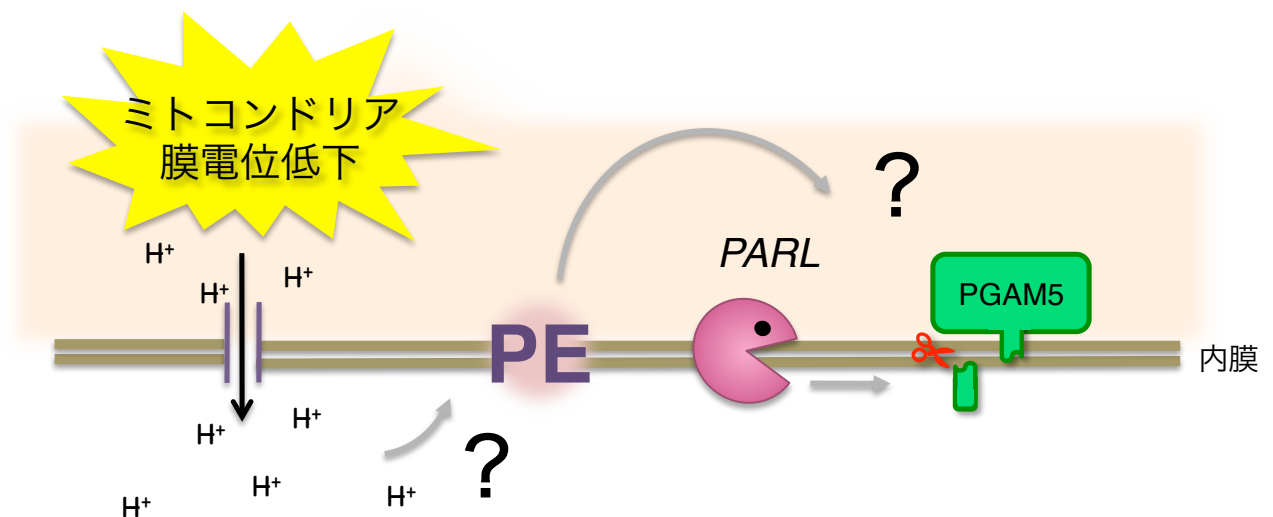
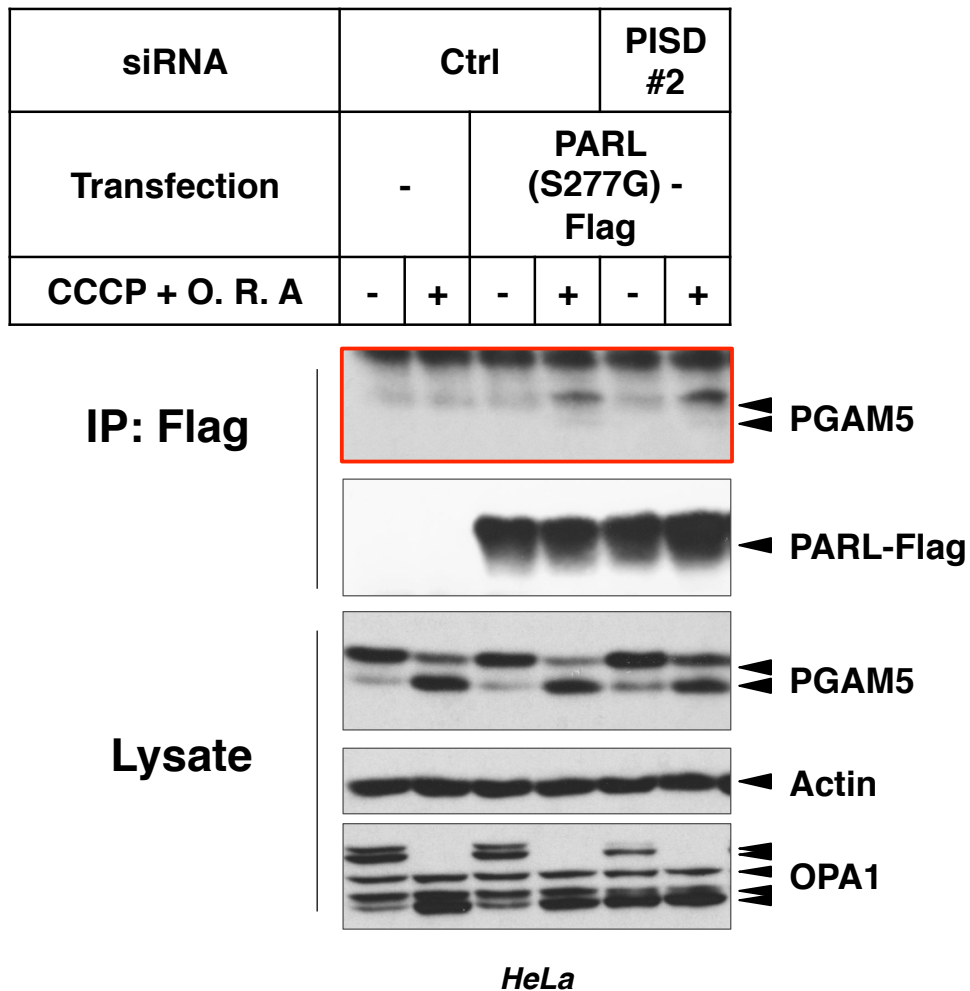


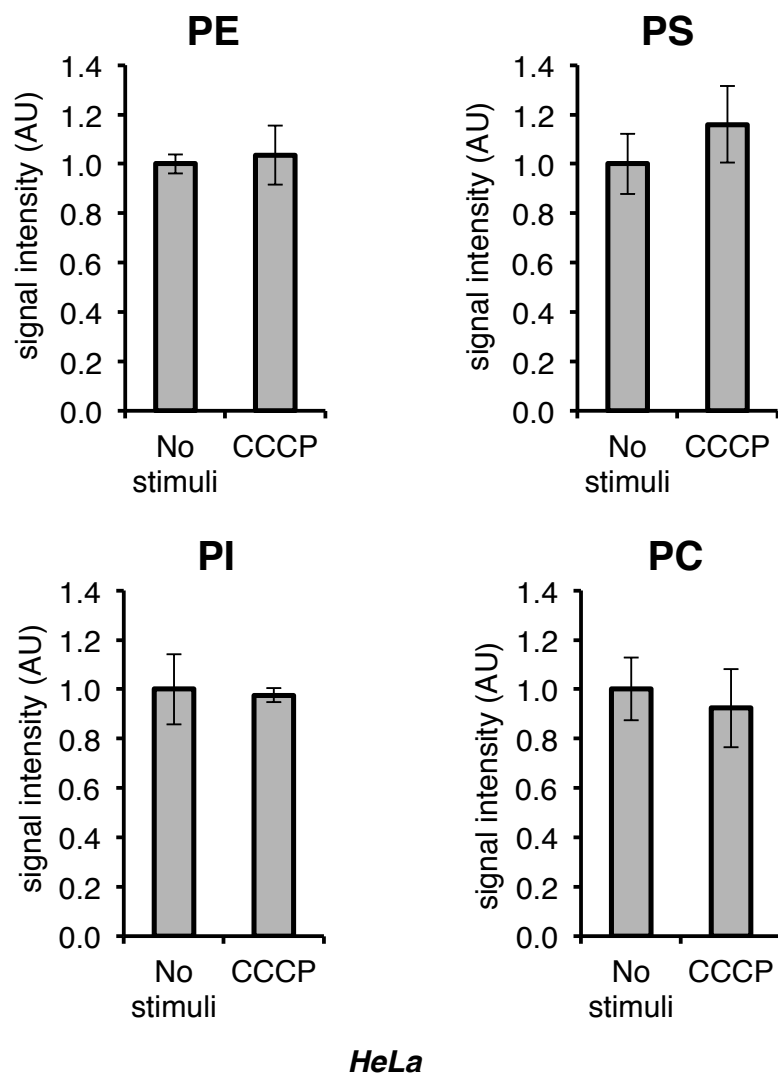
Fig. 20 PE の作用点の仮説と検証



**Fig. 21 PISD の発現抑制は刺激依存的な PARL と PGAM5 の結合に影響しない**

HeLa 細胞において、各 siRNA を導入し、PARL (S277G) -Flag を過剰発現し、CCCP + O. R. A 刺激後、免疫沈降した。PISD を発現抑制した場合でも、刺激依存的な PARL と PGAM5 の結合は影響を受けなかった。

(siRNA: 40 nM, 72 h, CCCP: 100  $\mu$ M. O: 1  $\mu$ M. R: 5  $\mu$ M. A: 5  $\mu$ M, 1 h.)

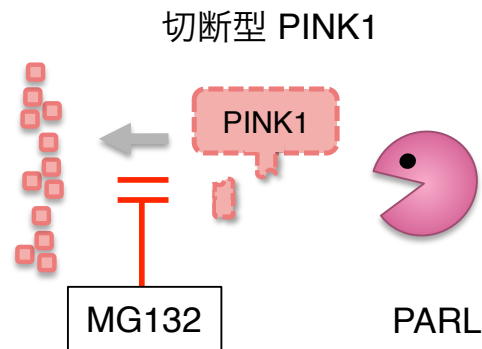


**Fig. 22** ミトコンドリア全体のリン脂質の比率は膜電位低下前後で変化しない

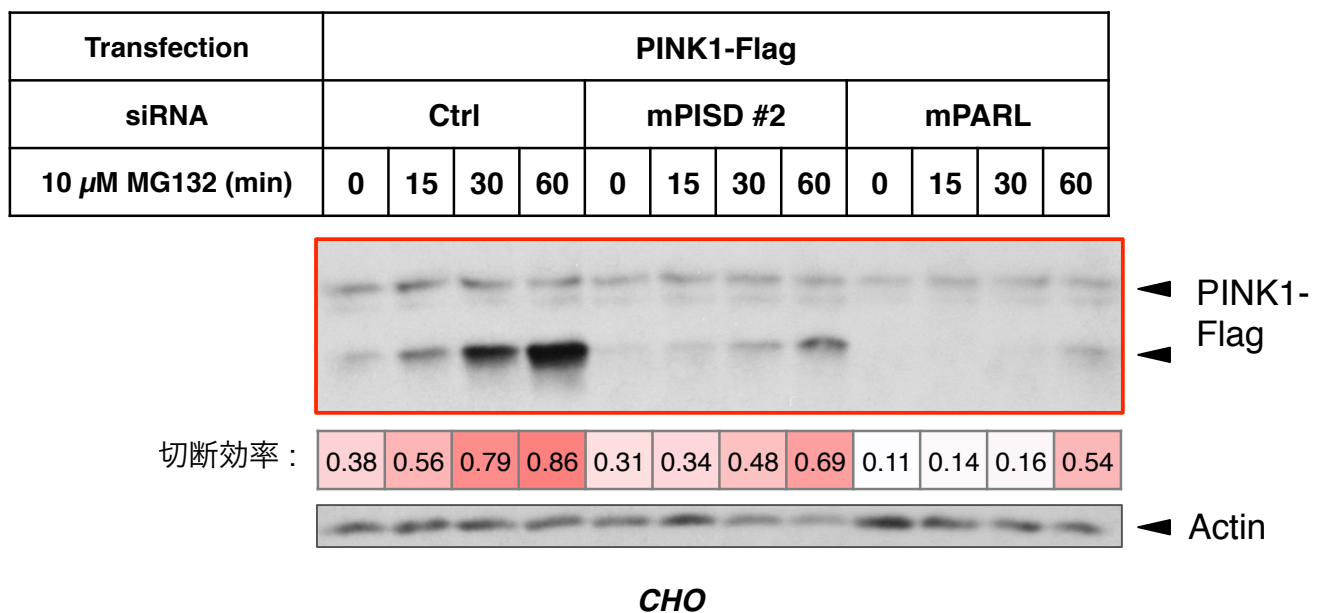
HeLa 細胞において、各 siRNA を導入し、CCCP 処理した細胞からミトコンドリアを精製後、脂質の抽出を行い、LC/MS によりリン脂質定量を行った。

(siRNA: 40 nM, 72 h. CCCP: 30  $\mu$ M 1.5 h. 数値は Control siRNA を基準とした Mean  $\pm$  SEM, n=3.)

A



B

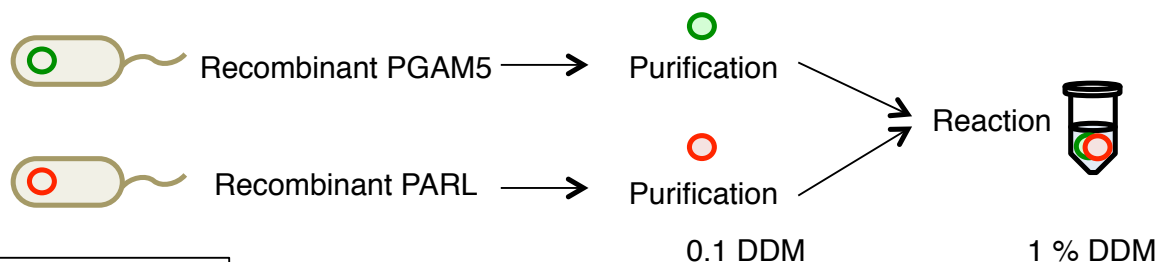


**Fig. 23 PISD の発現抑制は PARL の別の基質であるPINK1 の切断も抑制する**

(A) PINK1 は PARL により切断された後、プロテアソームによってすみやかに分解される。プロテアソーム阻害剤 MG132 処理により、切断が型 PINK1 の蓄積が見られる。

(B) CHO 細胞において、各 siRNA を導入後、PINK1-Flag を過剰発現し、MG132 処理を行った。PISD の発現抑制により、PINK1 の切断は抑制された。

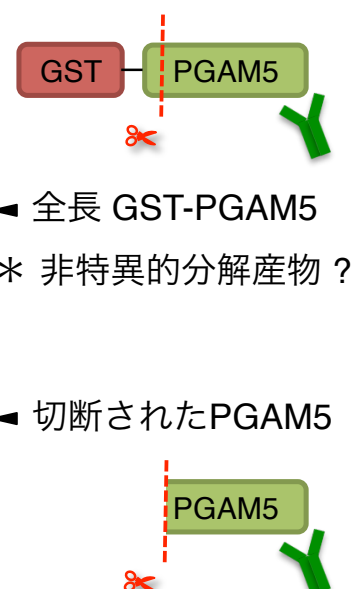
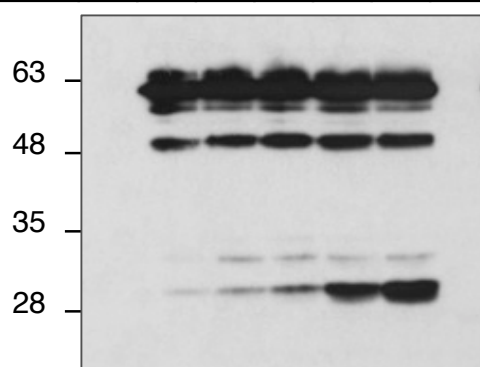
(siRNA: 40 nM, 72 h. 過剰発現 48 h. MG132: 10  $\mu$ M, 各時間.)



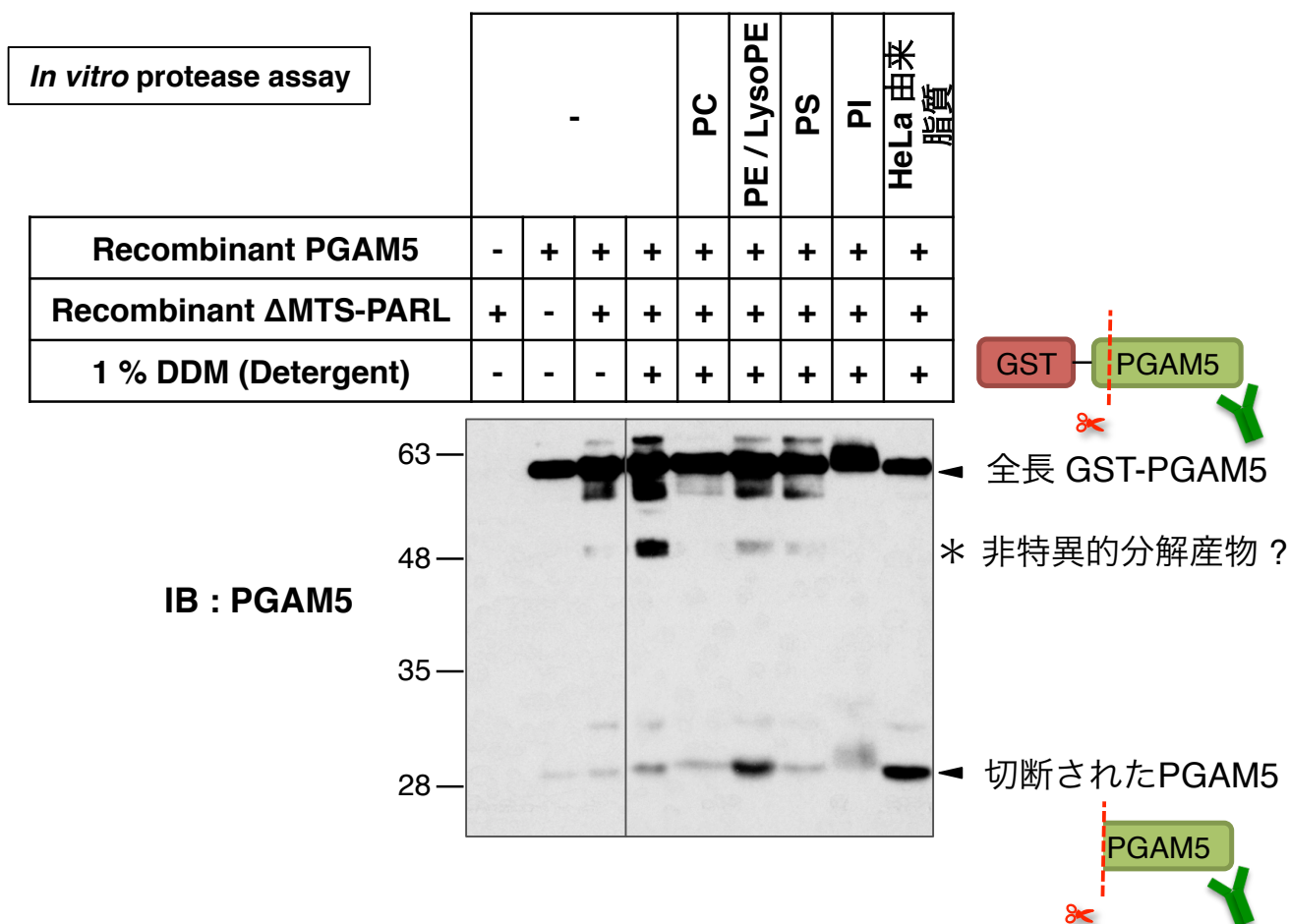
***In vitro* protease assay**

Recombinant PGAM5	-	+	+	+	+	+	-
Recombinant ΔMTS-PARL	+	-	+	+	+	+	-
1 % DDM (Detergent)	-	-	-	+	+	+	-
HeLa derived Lipid	-	-	-	-	+	++	++

**IB : PGAM5**



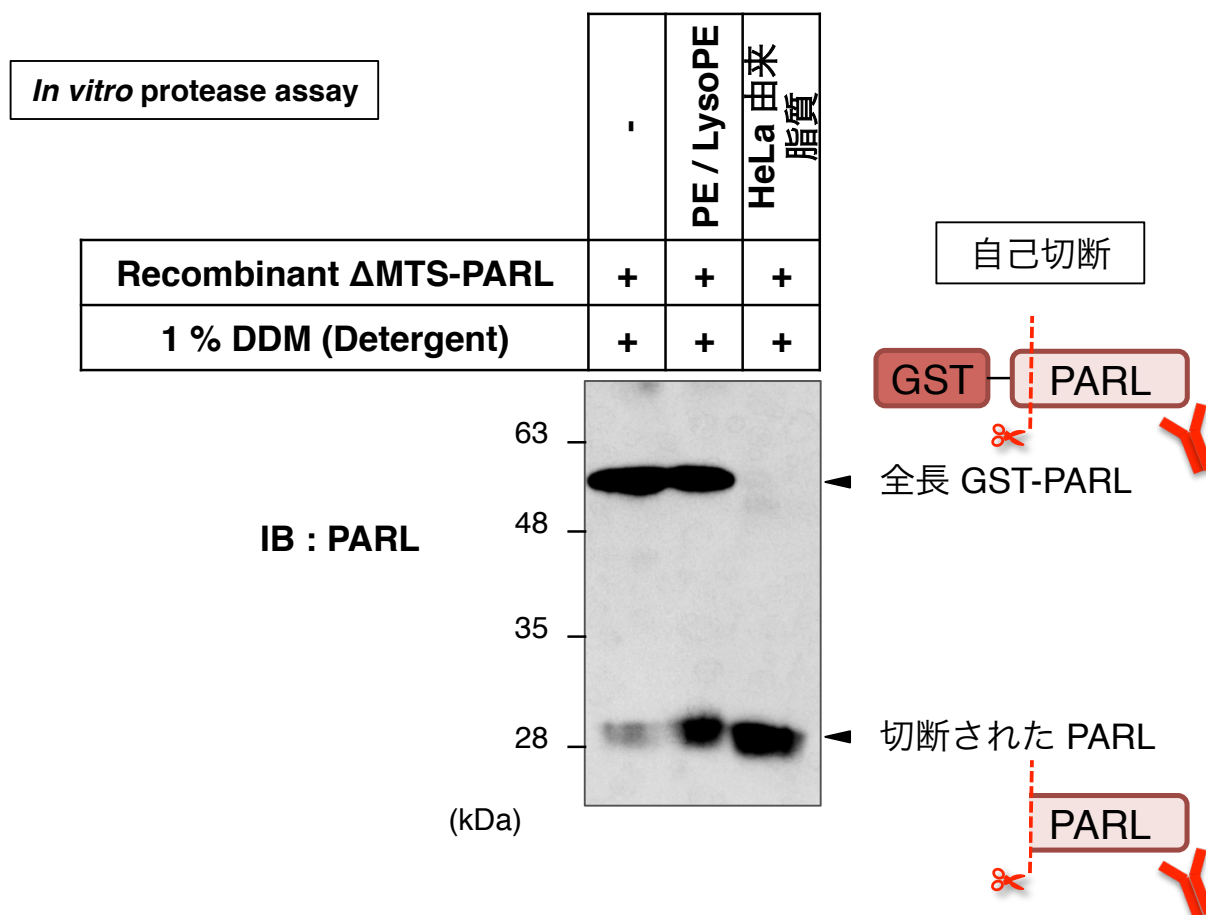
**Fig. 24** リコンビナントタンパク質を用いた **PARL** による **PGAM5** の再構成系  
大腸菌から精製した GST-PGAM5とGST-ΔMTS-PARL を、*in vitro* で混合した。1 % DDM  
存在下で、PGAM5 の切断が観察された。HeLa 細胞から抽出した脂質を添加すると、切  
断されたPGAM5 の増加が観察された。  
(GST-PGAM5: 750 ng. GST-ΔMTS-PARL: 100 ng, 37 °C, 12 h.)



**Fig. 25 PE は PARL による PGAM5 の切断を促進する**

大腸菌から精製した GST-PGAM5 と GST- $\Delta$ MTS-PARL を、*in vitro* で混合した。このとき、PC、PE、PS、PI の添加を行った。ただし、PE は単独で二重膜を生成しづらいことから、lysoPEを1:1で混ぜることで二重膜を安定化させている。PE の添加によって PARL による PGAM5 の切断の促進が見られた。

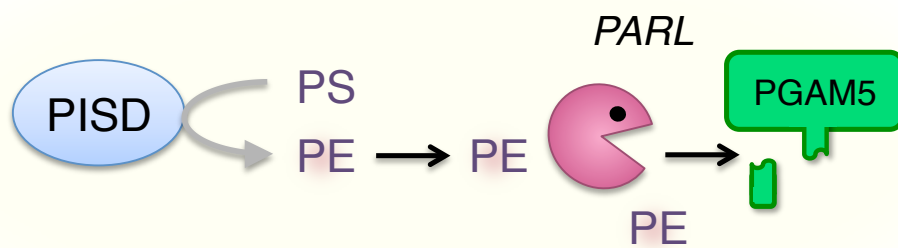
(GST-PGAM5: 750 ng. GST- $\Delta$ MTS-PARL: 100 ng, 37 °C, 12 h. PC: 10  $\mu$ M. PE/LysoPE: 10  $\mu$ M. PS: 10  $\mu$ M. PI: 10  $\mu$ M.)



**Fig. 26 PE は PARL の酵素活性を制御する**

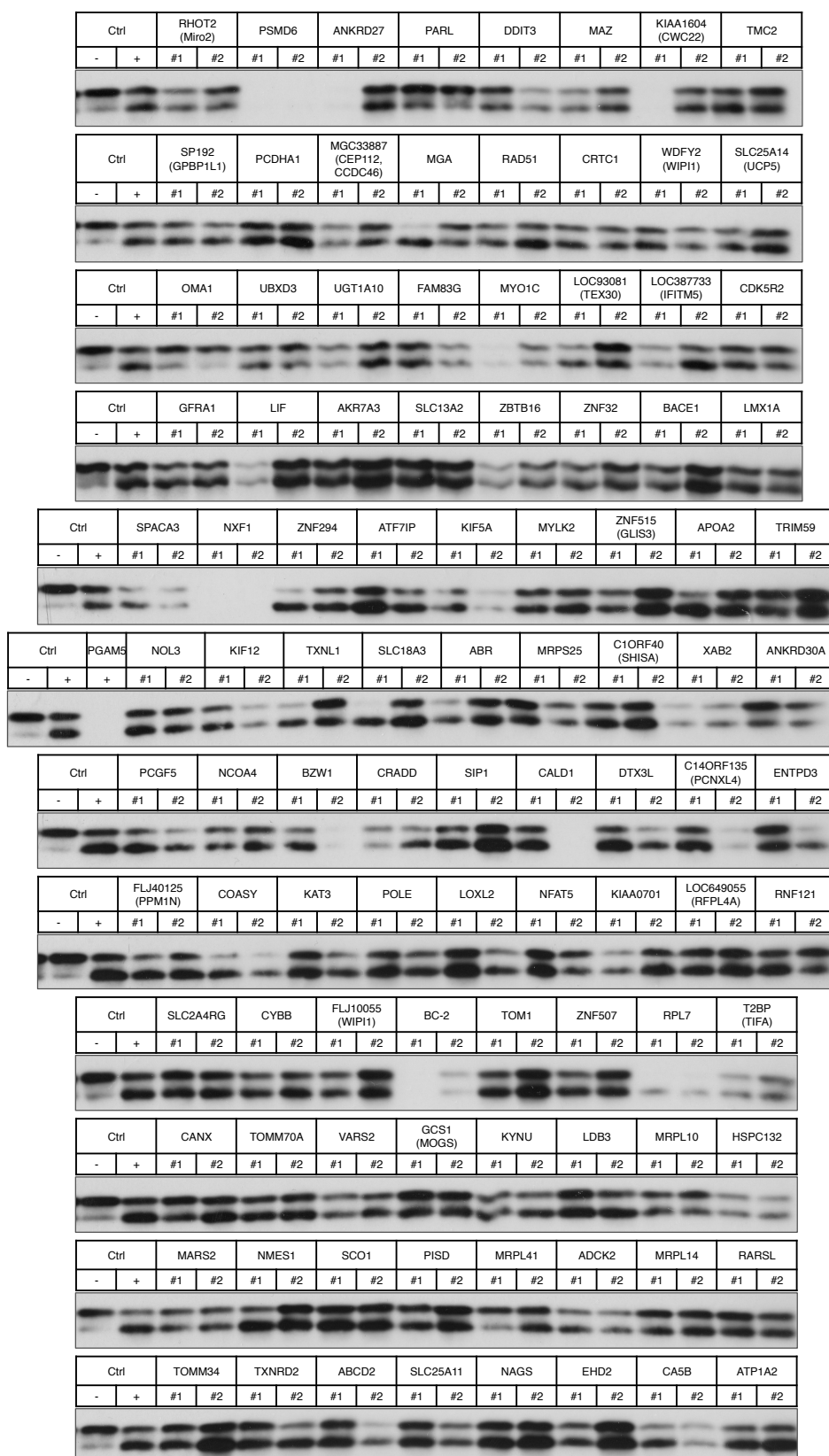
大腸菌から精製した GST-PARL ( $\Delta$ MTS) を *in vitro* で脂質と混合した。PE の添加により PARL の自己切断の促進が見られた。

(GST- $\Delta$ MTS-PARL: 100 ng, 37 °C, 12 h. PE/LysoPE: 10  $\mu$ M.)



**Fig. 27 PE は PARL の酵素活性を制御する**

PISD によって合成されたミトコンドリア PE は PGAM5 の切断に必要である。  
このミトコンドリア PE は PARL の酵素活性を制御すると考えられる。



**Fig. S1 2次スクリーニングにおける偽陽性の排除**

HeLa 細胞において、各 siRNA を導入し、CCCP + O. R. A. 刺激を行った。

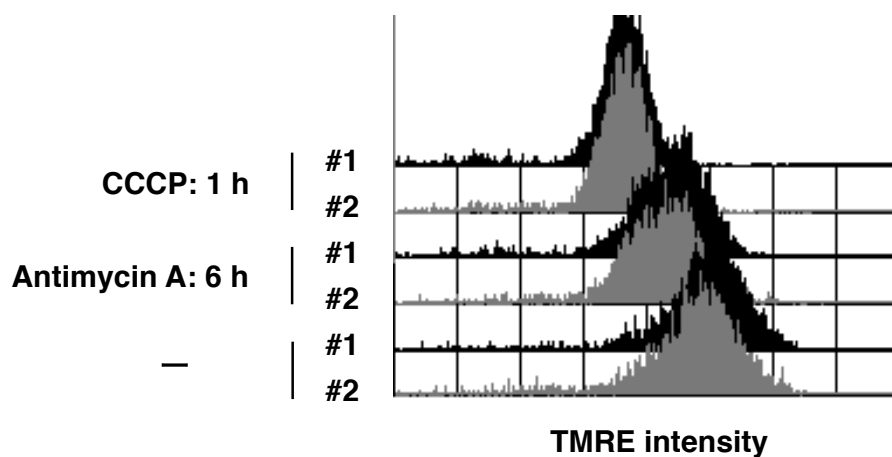
(siRNA: 40 nM, 72 h, CCCP: 100  $\mu$ M, 1 h. O: 1  $\mu$ M, 1 h. R: 5  $\mu$ M, 1 h, A: 5  $\mu$ M, 1 h.)

GeneID	Human homolog	abbr.	rob.Z-score	B-score	function
23761	PISD	PSD	-1.86	-2.88	PE synthesis
57678	GPAM	GPAT	1.21	0.81	PA synthesis
10554	AGPAT1	AGPAT	-0.17	0.09	PA synthesis
10555	AGPAT2	AGPAT	-0.40	-0.24	PA synthesis
54675	CRLS1	CRD	1.95	0.30	CL synthesis
1040	PEMT	PEMT	-0.84	-0.90	PC synthesis
5130	PCYT1A	CPT	1.51	0.07	PC synthesis
9468	PCYT1B	CPT	-0.45	-0.62	PC synthesis
85465	EPT1	EPT	-0.29	-0.49	PS synthesis
10390	CEPT1	EPT	-1.57	-1.33	PS synthesis
9791	PTDSS1	PSS1	1.35	0.25	PS synthesis
81490	PTDSS2	PSS2	1.75	2.24	PS synthesis
8611	PLPP1	PAP	-1.06	-2.32	DAG synthesis
8612	PLPP2	PAP	-1.40	-1.99	DAG synthesis
8613	PLPP3	PAP	-0.99	-1.39	DAG synthesis
196051	PLPP4	PAP	-0.90	-0.50	DAG synthesis
84513	PLPP5	PAP	-1.79	-2.21	DAG synthesis
403313	PLPP6	PAP	0.60	0.34	DAG synthesis
84814	PLPP7	PAP	-0.57	0.10	DAG synthesis
1040	CDS1	CDS	-0.84	-0.90	CDP-DAG synthesis
8760	CDS2	CDS	1.20	2.69	CDP-DAG synthesis

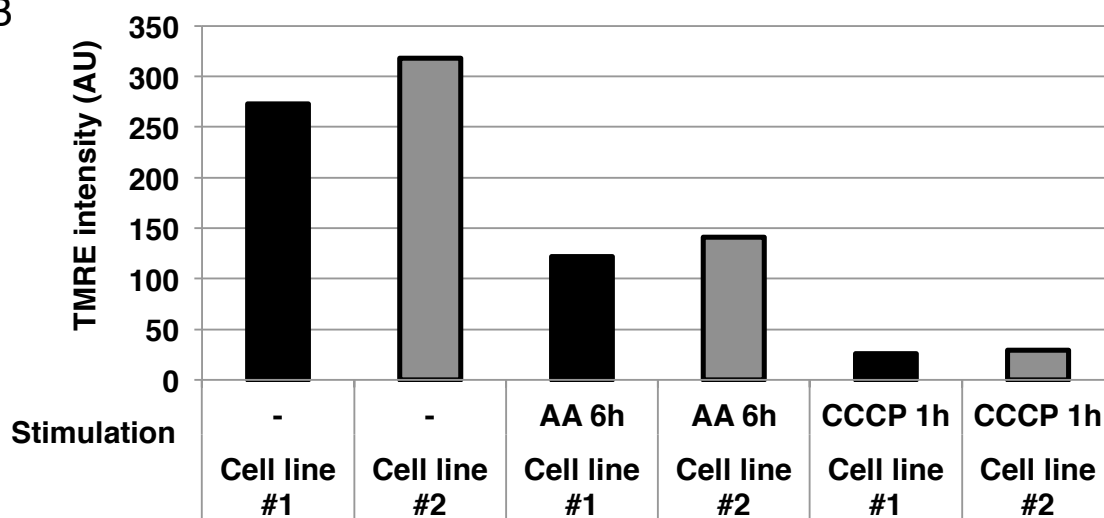
### Fig. S2 リン脂質合成関連遺伝子のスクリーニング結果

リン脂質合成因子の1次スクリーニングの結果。PISD 以外に -2.57 以下のスコアをもつ因子はなかった。

A



B

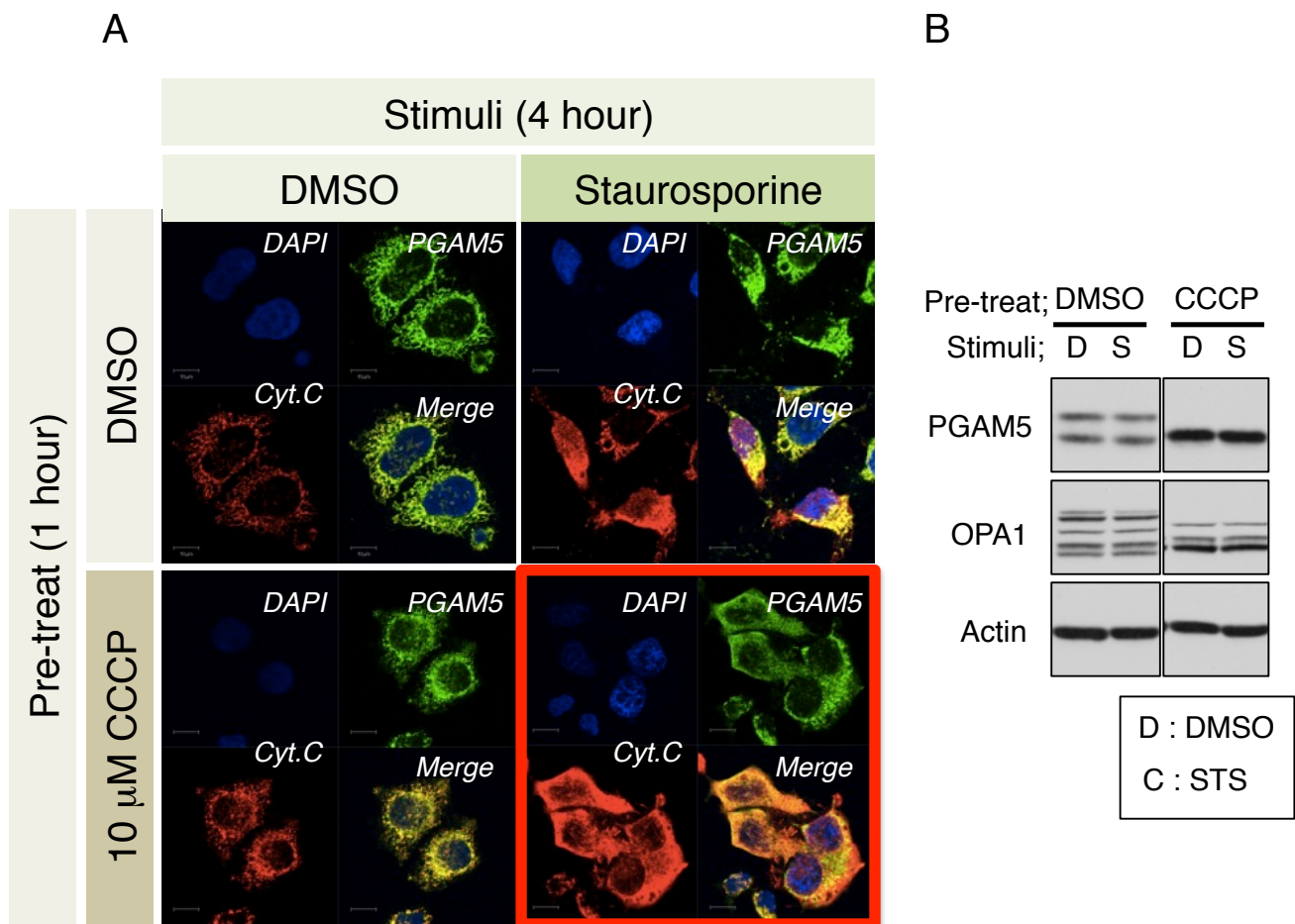


### Fig. S3 アンチマイシン A は部分的な膜電位低下を誘導する

(A) 2 line の MEF 細胞において、CCCP または Antimycin A (AA) を処理し、TMRE 行い FACS で蛍光強度を測定した。

(B) 上記の結果をグラフ化した。縦軸は蛍光強度の平均値を示す。Antimycin A は部分的な膜電位低下を誘導する。

(CCCP: 30  $\mu$ M, 1 h. Antimycin A: 10  $\mu$ M, 4 h.)



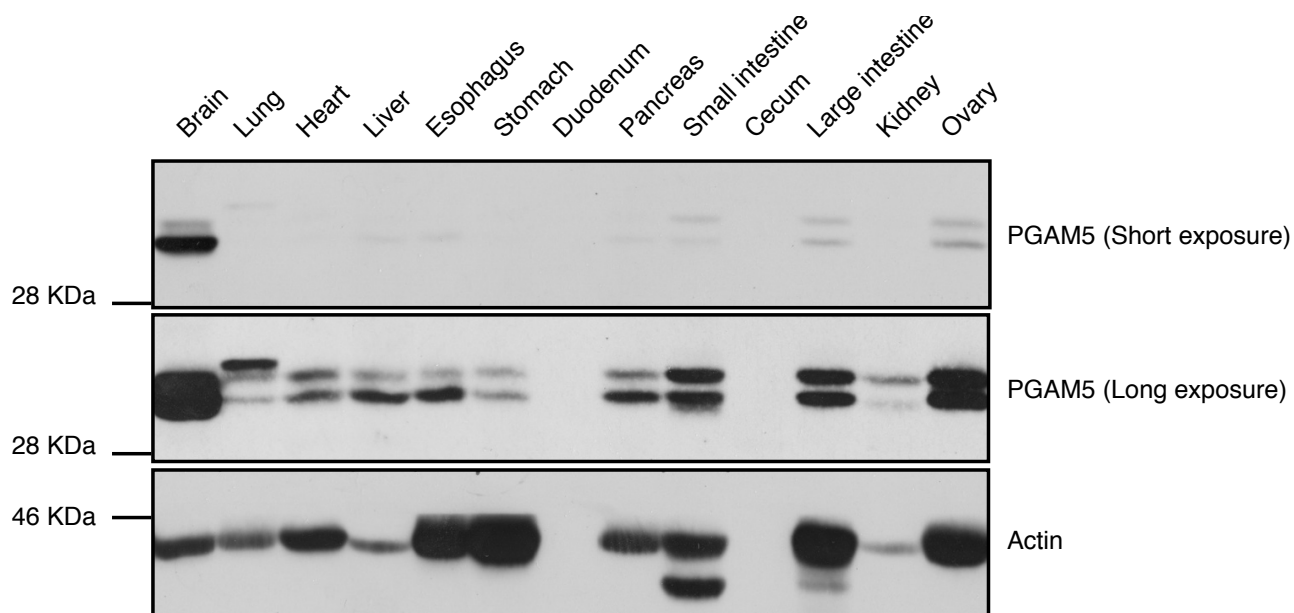
Data by Dr. Sekine

**Fig. S4 アポトーシス刺激時に切断型 PGAM5 が細胞質へと放出される。**

(A) HeLa 細胞において、CCCP および Staurosporine 処理後、細胞免疫染色を行った。

(B) 上記刺激時における Western Blot の結果。

(CCCP: 10  $\mu$ M, 5 h. Staurosporine: 1  $\mu$ M, 4 h.)



**Data by Dr. Sekine**

**Fig. S5 脳において切断型 PGAM5 のバンドがドミナントに検出される**

PGAM5 の切断は組織ごとに異なったパターンを示す。脳においては PGAM5 の切断型のバンドがドミナントに検出される。マウス組織を Lysis し、タンパク定量によりタンパク量を揃え、Western Blot で解析した。

## 謝辞

本研究の遂行に際し、ご指導ご鞭撻を賜りました、  
東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室  
一條 秀憲 教授  
に深く感謝致します。

本研究の遂行において、素敵なテーマを与えてくださり、時には自分の時間を割いてま  
でご指導頂きました、  
東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室  
関根 史織 助教  
に深く感謝致します。

本研究の遂行に際し、ご指導ご助言いただきました、  
長崎大学 大学院医歯薬総合研究科 細胞制御学研究室  
武田 弘資 教授  
に深く感謝致します。

本研究の遂行に際し、様々な視点からご助言いただきました、  
東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室  
名黒 功 講師  
服部 一輝 助教  
本間 謙吾 助教  
渡邊 謙吾 学振特別研究員  
に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、siRNA の分注を快諾して下さいました、  
東京大学 創薬オープンイノベーションセンター  
岡部 隆義 特任教授

峰岸 泉 特任研究員

に感謝致します。

本研究の遂行にあたり、リン脂質解析にご協力下さいました、

東京大学 大学院薬学系研究科 衛生化学教室

新井 洋由 教授

河野 望 講師

に感謝致します。

本研究に際し、様々な面でご協力くださいました、

東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室の皆様に深く感謝致します。