論文の内容の要旨

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

【序論】

当研究室でストレス応答性 MAP3K の一つである ASK1 の活性化因子として同定された PGAM5 (Phosphoglycerate mutase 5) は、ミトコンドリアの内膜に局在するセリン・スレオニン特異的プロテインホスファターゼである。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。これまでに我々は、PGAM5 がミトコンドリア膜電位低下に伴い、膜貫通ドメイン内の配列で切断を受けること(膜内切断)、この切断には2つのミトコンドリア内膜局在のプロテアーゼ PARL とOMA1 が関与していることを見いだしている¹。近年、PGAM5 以外にも様々な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に伴い制御されており、これらの切断制御がミトコンドリアを起点とする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。PGAM5 の切断においても、他のグループから切断型 PGAM5 が XIAP の阻害を介してアポトーシスを促進することが報告された。しかしながら、ミトコンドリア膜電位低下依存的な PGAM5 の切断がどのように制御されているのか、その詳細な分子機構については未だ不明な点が多く残されている。そこで私はPGAM5 の切断を制御する上流因子を同定することで、PGAM5 の切断機構の詳細に迫りたいと考えた。その結果、PGAM5 の切断にリン脂質の一つであるホスファチジルエタノールアミン (PE) が重要であることを見出した。本研究成果は、ミトコンドリア脂質によってミトコンドリアにおける膜内切断酵素の活性が制御される可能性を示すものである。

【方法・結果】

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

本学修士課程において、私は切断型 PGAM5 特異的認識抗体を作製し、この抗体を用いた蛍光免疫染色により PGAM5 の切断を可視化させ、その蛍光シグナルを全自動イメージアナライザーで解析することで、PGAM5 の切断効率を迅速に定量する系を確立にすることに成功した。この PGAM5 切断定量評価系を用いて、ゲノムワイド siRNA スクリーニングを実施し、PGAM5 の切断に必要な遺伝子を網羅的に探索した。多段階のスクリーニングを経て候補遺伝子の絞り込みを行った結果、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。上位 10 遺伝子の中には、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 が含まれ、スクリーニングの妥当性が伺える。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 PGAM5 の切断抑制が見られた PISD (Phosphatidylserinedecarboxylase) に着目し、解析を行うことにした。スクリーニングとは異なる siRNA を用いた再検討においても、PISD の発現抑制により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。

PISD の酵素活性が PGAM5 の切断に必要である

PISD は PGAM5 と同じくミトコンドリアの内膜に存在し、PSから PE を合成し、ミトコンドリアへの PE 供給を担うリン脂質代謝酵素である。そこで 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 の酵素活性を失った変異体を用いた戻し実験を行った。 PISD には LGST というアミノ酸配列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。PISD 発現抑制細胞に野生型 PISD を戻すと、PGAM5 の切断を回復させることができた。一方で、上述の LGST 配列を LAAT に変換した LAAT 変異体 (LAAT) や酵素活性部位を欠損した PISD ($\Delta \alpha$) を戻した場合には、PGAM5 の切断は回復しなかった。このことから、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。

PISD により合成される PE が PGAM5 の切断に必要である

PISD を欠損するとミトコンドリア PE 量が減少することが報告されている。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ところ、我々の手によっても、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。そこで、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 の十分性を確かめる実験を行った。過去の報告で、PISD の欠損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。そこで、我々の系においても PISD 発現抑制細胞に 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 の切断の回復がみられることが確かめられた。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。

PISD によって合成される PE は PARL 依存的な PGAM5 の切断に必要である

序論で述べたように、PGAM5 の切断には PARL と OMA1 の2つのプロテアーゼが関与する。そこで、PISD によって合成された PE がいずれのプロテアーゼによる切断制御に関与しているのかを検討するため、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。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。したがって、OMA1 を発現抑制した状態では、PARL 依存の切断が起きていると考えられる。ここに、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。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。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。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。しかし、OMA1 の自己切断による膜電位低下依存的なタンパク量の減少や OMA1 が担う OPA1 の切断に対しては、PISD の発現抑制は影響を与えなかった。さらに、PARL の過剰発現によって誘導される PGAM5 の切断も PISD の発現抑制により、抑制されることが明らかとなった。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 の切断に必要であることが明らかとなった。

【まとめと考察】

本研究において、私は切断型 PGAM5 特異的抗体を用いた Image-based のゲノムワイド siRNA スクリーニングを実施することにより、PISD が合成する PE が PARL 依存的な PGAM5 の切断に必要であることを見出した。これまでの検討から、① PARL の別の基質である PINK1 の切断にも PE が必要である可能性、② PE は PGAM5 と PARL の膜電位低下依存的な結合には必要でないこと、を確認している。また、過去の報告で、③ リン脂質の組成により膜内切断酵素の活性が調節される可能性が示唆されている。以上の3点をふまえ、現在、PISD によって合成された PE は PARL の酵素活性そのものに必要である可能性が高いと考えている。今後、PARL による PGAM5 の切断を $in\ vitro$ で再構成する系を確立し、この仮説を検証していきたい。

[1] Sekine, S., Kanamaru, Y. et al. J. Biol. Chem. 287, 34635-34645. (2012)