

審査の結果の要旨

氏名 金丸 雄祐

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。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。

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 PGAM5 は、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。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、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。

そこで本研究では、PGAM5 の切断効率を定量的に評価できる実験系を構築し、PGAM5 の切断を制御する上流因子を同定することで、PGAM5 の切断機構の詳細の解明を目指した。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。本研究結果は、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。

以下に本研究により得られた主要な知見をまとめた。

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

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。上位 10 遺伝子の中で、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) に着目した。

2. 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 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る一方で、酵素活性部位を欠損した変異体に戻した場合には、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。

3. 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。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予想されたため、PE の十分性を確かめる実験を行った。PE の前駆体を添加することで PGAM5 の切断に対する PE の必要性を検討したところ、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。

5. PE は PARL の酵素活性を制御する

これまでの検討から、PE は PARL の酵素活性を制御する可能性が高いと考えられた。そこで、PARL による PGAM5 の切断を *in vitro* で再構成する系を確立し、この仮説の検証を行った。リコンビナント PGAM5 と PARL を混合し、PE を添加した場合に、PGAM5 の切断の亢進が検出された。このことから、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。

以上のように、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り、プロテアーゼ活性制御において重要な知見であると考えられる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。