

論文の内容の要旨

ミトコンドリア局在型プロテインホスファターゼ PGAM5 の翻訳後修飾解析

村上 史織

【序論】

ミトコンドリアは、ATP 産生によるエネルギー供給の場としてのみならず、小胞体と並ぶ細胞内カルシウムイオンストアとして、また脂肪酸代謝の場として、多様な生命機能を担い、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引き起こす。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、ミトコンドリアがこうした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。

PGAM5 (Phosphoglycerate mutase 5) は、ストレス応答性 MAPKKK の一つである ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) の活性化因子として同定された、全く新しい一次構造を有するセリン・スレオニンプロテインホスファターゼである[1]。私は、博士課程において、PGAM5 がミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア膜電位低下に応答して興味深い翻訳後修飾を受けることを見だし、この修飾がミトコンドリア局在型ロンボイドプロテアーゼ PARL による膜内切断であることを明らかにした。

【方法と結果】

PGAM5 はミトコンドリアに局在する

PGAM5 は、ストレス応答性 MAPKKK の一つである ASK1 を活性化することから、

PGAM5 は何らかのストレス応答に関わっていることが示唆されていた。私は、PGAM5 の認識するストレスを探索する手がかりとして、PGAM5 がN末端に膜貫通ドメインを有することに着目した。内在性 PGAM5 を認識できるモノクローナル抗体を作製し、PGAM5 の細胞内局在を検討した。その結果、ミトコンドリアマーカーである Cytochrome C と共局在することなどから、PGAM5 は主にミトコンドリアに局在することが明らかとなった(Fig. 1)。

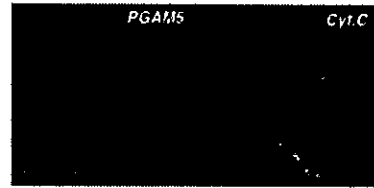


Fig. 1 PGAM5 はミトコンドリアに局在する。内在性 PGAM5 は、ミトコンドリアマーカーである Cytochrome C と共局在した。

ミトコンドリア膜電位低下に伴い、PGAM5 のバンドパターンがダイナミックに変化する

PGAM5 がミトコンドリアに局在することに着目し、ミトコンドリアに対する様々なストレス刺激を検討した。その結果、ミトコンドリア脱分極剤である CCCP により、SDS-PAGE における PGAM5 由来の二本のバンドが下一本に収束することを見いだした(Fig. 2)。CCCP はミトコンドリアプロトノフォアであるため、細胞に CCCP を処置すると、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がくずされ、ミトコンドリアの内膜電位差が急速に失われる。従って、PGAM5 はミトコンドリア膜電位低下に伴い、何らかの翻訳後修飾を受けている可能性が考えられた。

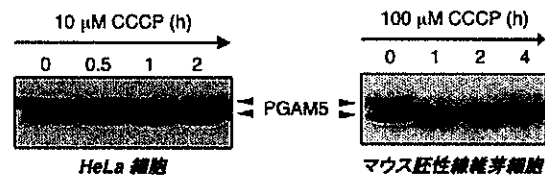


Fig. 2 ミトコンドリア脱分極剤 CCCP によって、SDS-PAGE 上で PGAM5 のバンドパターンが変化する。ミトコンドリアの膜電位を低下させると、二本のバンドとして検出される PGAM5 のバンドが下一本に収束する。

PGAM5 はミトコンドリア膜電位低下に伴い、膜内切断を受ける

次に、このミトコンドリア膜電位低下によって亢進する PGAM5 の翻訳後修飾の解析を行った。過去の報告から、ミトコンドリア融合マシナリーの一つである OPA1 がミトコンドリア膜電位低下に伴い SDS-PAGE 上のバンドパターンが変化することが知られており、この変化はプロテアーゼによる切断であることがわかってきた。また、生化学的実験から、収束型 PGAM5 は収束前と比較して膜結合性が弱いことを見いだしたことから、PGAM5 の翻訳後修飾が切断である可能性を検討した。まず、エドマン分解法により、収束型 PGAM5 の N 末端アミノ酸配列を同定した。同定されたアミノ酸配列を PGAM5 のアミノ酸配列と比較したところ、PGAM5 は確かに切断を受けていることが明らかとなった。興味深いことに、この切断部位は PGAM5 の膜貫通ドメイン内に存在していた (Fig. 3A)。

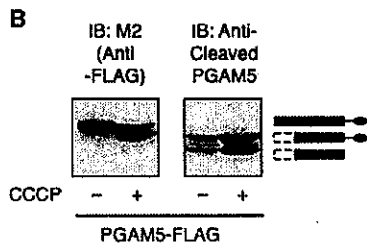
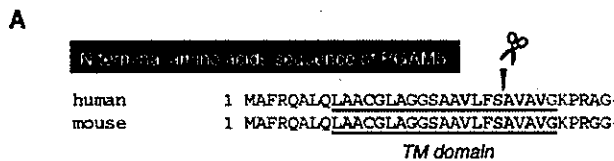


Fig. 3 PGAM5 はミトコンドリア膜電位低下に伴い、膜内切断を受ける。

(A)エドマン分解により、収束型 PGAM5 の N 末端アミノ酸配列を同定した。
(B)同定された切断配列を特異的に認識する抗体を作製した。

実際に、同定された切断配列を特異的に認識する抗体を作製し、ミトコンドリア膜電位低下に伴い、この配列で切断が起こっていることを確認した(Fig. 3B)。

可能性を検討した。まず、エドマン分解法により、収束型 PGAM5 の N 末端アミノ酸配列を同定した。同定されたアミノ酸配列を PGAM5 のアミノ酸配列と比較したところ、PGAM5 は確かに切断を受けていることが明らかとなった。興味深いことに、この切断部位は PGAM5 の膜貫通ドメイン内に存在していた (Fig. 3A)。

PGAM5 を切断するプロテアーゼの同定

次に、PGAM5 を切断するプロテアーゼの同定を試みた。エドマン分解の結果から、PGAM5 は膜内で切断されることが示唆されたため、膜内切断酵素に絞って、候補プロテアーゼの探索を試みた。現在までに知られている膜内切断酵素群は、I-Clips と総称され、酵素活性に必須なアミノ酸によって 3 つのファミリーに分類される。まず、PGAM5 を基質とする膜内切断プロテアーゼがどのファミリーに属するか検討するために、各種プロテアーゼ阻害剤を検討した。その結果、上述した 3 つのファミリーのうち、ロンボイドプロテアーゼファミリーと呼ばれる酵素群が第一候補となった(Fig. 4A)。ロンボイドプロテアーゼは、セリンを酵素活性中心とする膜内切断酵素で、シークエンスサーチの結果から、ほ乳類では、少なくとも 5 つのロンボイドプロテアーゼが存在することが報告されている。私は、これら 5 つの候補の中に PGAM5 の切断に関与するプロテアーゼが存在すると考え、各々の遺伝子発現を siRNA により抑制し、CCCP による PGAM5 の切断が抑制されるか否かを検討した。その結果、この候補の中の 1 つ、ミトコンドリア局在型ロンボイドプロテアーゼ PARL の発現抑制によって、PGAM5 の切断が抑制された(Fig. 4B)。また、野生型 PARL を過剰発現すると、PGAM5 の切断が誘導されること、酵素活性を持たない変異型 PARL では PGAM5 を切断できないことを確認した。さらに、過剰発現した PARL によって切断された配列も同定した切断配列と一致することを、切断部位を特異的に認識する抗体により確認することができた(Fig. 4C)。以上の結果から、PARL が PGAM5 の膜内切断を担うことが明らかとなった。PARL ノックアウトマウスは生後数週間で死に至ることが報告されており、その生理機能の重要性が示唆される。しかしながら、ほ乳類においては、PARL をはじめとして多くのロンボイドプロテアーゼファミリーの基質の同定が進んでおらず、その機能の詳細は未だ不明な部分が多い。今回、PGAM5 が PARL の基質として同定されたことから、ロンボイドプロテアーゼファミリーの機能解析においても重要な知見となることが期待される。

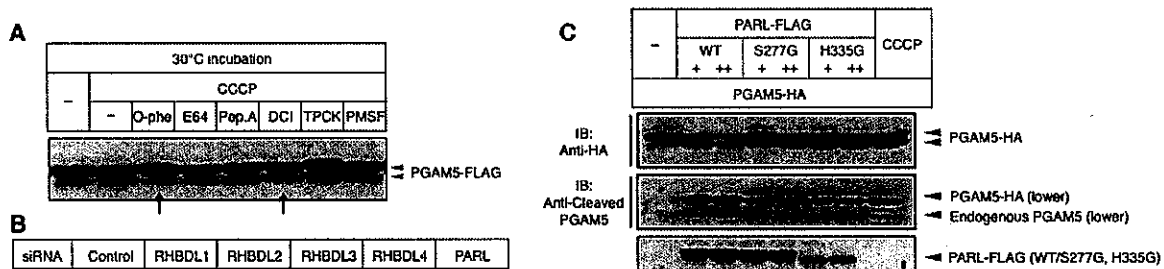


Fig. 4 PGAM5 の膜内切断を担う酵素の同定。
(A)単離ミトコンドリアに各種プロテアーゼ阻害剤を処置し、PGAM5 を切断する候補プロテアーゼの絞り込みを行った。
(B)ほ乳類に存在する 5 つのロンボイドプロテアーゼファミリーの発現抑制を行った。
(C)PGAM5 の切断は、野生型 PARL の過剰発現で誘導されるが、酵素活性を持たない変異体(S277G, H335G) の過剰発現では誘導されない。

ミトコンドリア膜電位低下に伴い、PARL の基質が PINK1 から PGAM5 へ入れ替わる

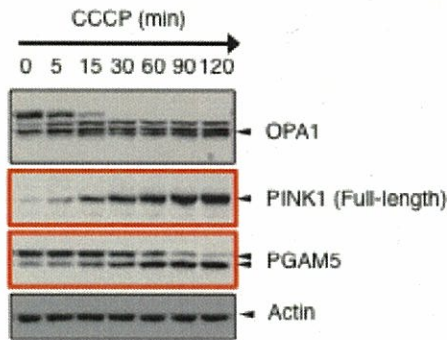


Fig. 5 ミトコンドリア膜電位低下に伴う PINK1 の安定化と PGAM5 の切断のタイムコースが一致する

膜電位低下を起こした機能不全ミトコンドリアにおける PARL の基質がミトコンドリア局在型ホスファターゼ PGAM5 であることを明らかとなったが、ごく最近になって、膜電位低下を起こしていない定常状態のミトコンドリアにおける PARL の基質は、ミトコンドリア局在型キナーゼ PINK1 であることが報告された [2]。PINK1 は定常状態で、常に PARL による切断を受けており、切断型 PINK1 はすみやかにプロテアソーム依存的な分解を受けるとされている。驚いたことに、ミトコンドリアの膜電位低下を誘導すると、PGAM5 の場合とは逆に、PINK1 は PARL による切断を免れ、外膜で安定化すると報告された。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、ミトコンドリアの品質管理応答を誘導することがわかっている。CCCP を処置すると PARL による切断を免れた全長型 PINK1 の安定化が確認され、この PINK1 の安定化のタイムコースは PGAM5 の切断（および OPA1 の切断）のタイムコースとほぼ一致することが観察された (Fig. 5)。さらに、CCCP 刺激時間依存的に、PARL から PINK1 が乖離すること、これに伴って PARL に PGAM5 が結合してくるのを見いだした (Fig. 6)。このことは、ミトコンドリア膜電位低下に伴い、PARL の基質がミトコンドリア局在型キナーゼ PINK1 からミトコンドリア局在型ホスファターゼ PGAM5 に入れ替わることを示唆するものと考えられる。

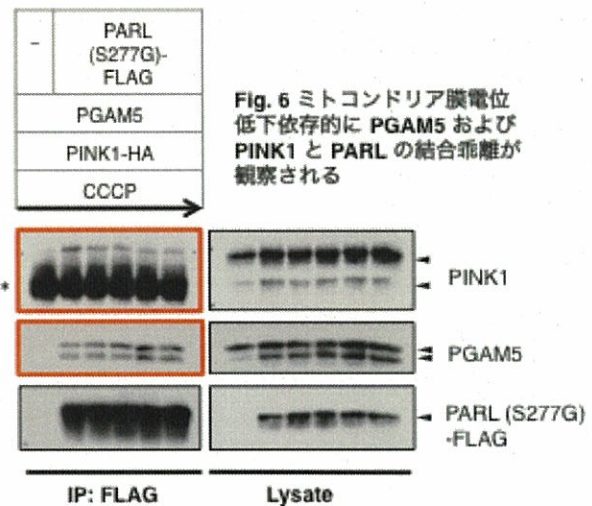


Fig. 6 ミトコンドリア膜電位低下依存的に PGAM5 および PINK1 と PARL の結合乖離が観察される

【まとめと考察】

私は、博士課程において、ミトコンドリア局在型セリン・スレオニンプロテインホスファターゼである PGAM5 が、ミトコンドリアの膜電位低下というストレスに伴い、膜内切断を受けるのを見だし、膜内切断酵素も合わせて同定することに成功した (Fig. 7)。最近、先述したミトコンドリア融合分子 OPA-1 や、パーキンソン病原因遺伝子 PINK1 など様々なミトコンドリア局在分子のプロテアーゼによる切断が、ミトコンドリア膜電位低下に伴って正もしくは負に制御されることが明らかとなって来た。これらの例はいずれも、膜電位低下により機能不全となったミトコンドリアを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であると考えられている。今回明らかとなった PARL による PGAM5 の膜内切断も、ミトコンドリア膜電位低下をめぐるプロテオリシス制御の一例であると考えられ、ミトコンドリアにおける

何らかのストレス応答を担っていることが予想される。今後は、PGAM5膜内切断の生理的意義やミトコンドリア膜電位低下の感知メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

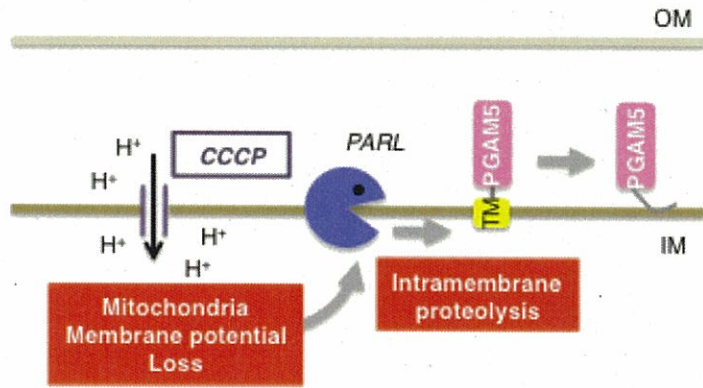


Fig. 7 ミトコンドリア膜電位低下に伴い、PGAM5 は PARL により膜内切断を受ける

【参考文献】

- [1] Takeda K, Komuro Y, Hayakawa T, Oguchi H, Ishida Y, Murakami S *et. al.*
Proc Natl Acad Sci USA 106 (30) (2009)
- [2] Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., and Youle, R.J.
J. Cell Biol. 191 (2010)