ミトコンドリアにおける タンパク質分解とストレス応答

関根 史織

要約：我々の着目する phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5) は、ヒスチジンを酵素活性中心とする酵素学的にユニークな Ser/Thr プロテインホスファターゼである。また、N 末端の膜貫通ドメインを介してミトコンドリア内膜にターゲットすることがわかっており、その細胞内局在においても興味深い特徴を持つ。我々は、ミトコンドリアにストレスを負荷すると、PGAM5 がミトコンドリア局在のプロテアーゼによって膜貫通ドメイン内での切断（膜内切断）を受けることを見出した。さらに最近、他の研究室から、切断型 PGAM5 がアポトーシス促進機能を有する可能性が提唱され、PGAM5 膜内切断とストレス応答との関わりが示唆されている。二重膜構造のオルガネラであるミトコンドリアには、内膜、膜間腔、そしてマトリックスのそれぞれのコンパートメントに、多種類のプロテアーゼが存在している。先に挙げた PGAM5 以外にも様々なタンパク質がこれらミトコンドリア局在のプロテアーゼにより切断制御を受ける。さらに、最近の研究から、こうしたミトコンドリアにおけるタンパク質の切断・分解が、多様なかたちで、細胞やミトコンドリア自身のストレス応答に寄与していることもわかってきた。本稿では、PGAM5 について我々が明らかにしてきた知見を含め、国内外の報告を紹介するとともに、ミトコンドリアにおけるタンパク質分解の役割について、ストレス応答への関与という観点から、最近の知見を概説したい。

1. ミトコンドリア局在型プロテインホスファターゼ PGAM5 の膜内切断

Phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5) は一次構造上の相同性から、解糖系で働くホスホグリセリンムターゼ等がそのメンバーとして含まれる PGAM ファミ

リーと呼ばれる酵素群に属する。PGAM5 の C 末端側には、他の PGAM ファミリー分子と同様に、ムターゼ活性（リン酸基の分子内転移反応を触媒する活性）に必要な PGAM ドメインが保存されている。しかしながら我々は、PGAM5 は PGAM 活性を有さず、Ser/Thr 特異のプロテインホスファターゼ活性を有することを見出した(1)。さらに、PGAM5 のホスファターゼ活性は、PGAM ドメイン内に保存されたヒスチジンに変異を導入すると全く検出されなくなることから、PGAM5 はヒスチジンを酵素活性中心とする、分子構造的に全く新しいプロテインホスファターゼであることが明らかとなった。PGAM5 の分子構造上のもう一つの特徴として、N 末端の膜貫通ドメインが挙げられる。PGAM5 は PGAM ファミリー分子の中で唯一、膜貫通ドメインを持つ分子であり、PGAM5 はこのドメインを介してミトコンドリアに局在する。ミトコンドリアは外膜、内膜の 2 つの膜構造を持つオルガネラである。我々は、単離ミトコンドリアを用いた種々の生化学的解析や免疫電顕解析の結果から、PGAM5 が主にミトコンドリア内膜に局在することを見出した(2)。

ミトコンドリア内膜には、ATP 産生を担う電子伝達系の働きによりプロトン勾配が形成されており、これにより膜電位が生じている。ミトコンドリア膜電位の低下は、ATP 産生を不能にするものであり、機能不全を起こしているミトコンドリアを象徴する 1 つの事象と捉えることができる。例えば、生体内において、ミトコンドリア膜電位低下は、呼吸鎖タンパク質をコードしているミトコンドリア DNA の変異や漏出性 ROS (reactive oxygen species) による酸化修飾などによって、電子伝達系を構成する呼吸鎖複合体の機能が低下した際に引き起こされる。実験的には、CCCP (m-chlorophenylhydrazine) とよばれる脱共役剤を用

キーワード：ミトコンドリア、ストレス応答、プロテアーゼ、タンパク質分解、品質管理

NINDS, NIH (35 Convent Dr. BG 35 RM 2C-911, Bethesda, MD 20892, USA)

E-mail: shiori.sekine@nih.gov 原稿受領日：2017 年 2 月 27 日、依頼原稿

Title: Mitochondrial proteolysis and its roles in stress responses Author: Shiori Sekine

いることによって、ミトコンドリアの膜電位低下を誘導することができ、ミトコンドリアの機能不全状態を模倣する方法としてよく用いられる。我々は、PGAM5の分子機能解析の過程で、細胞にCCCPを処置するとウェスタンブロット上で通常二本のバンドとして検出されるPGAM5が、下一本に収束することを見出した(2)。エドマン分解解析の結果から、CCCP依存的なPGAM5のバンドパターン変化は切断によるものであることが明らかとなった。面白いことにエドマン分解解析により同定した切断部位は、PGAM5の膜貫通ドメイン内に存在した。このような1回膜貫通型の膜タンパク質が膜内部で加水分解を受ける現象は、膜内切断と呼ばれる。膜内切断は、膜内切断酵素と呼ばれる膜貫通ドメイン内に活性中心を持つ特殊なプロテアーゼによって担われ、様々なシグナル伝達を惹起することが知られている。ミトコンドリアに局在する唯一の膜内切断酵素としてPARLと呼ばれるプロテアーゼが存在する。PARLは、膜内切断酵素のなかでも、セリンを酵素活性中心とするロンボイドプロテアーゼというファミリーに属する。PARLのミトコンドリア内局在は内膜であり、PGAM5の局在と一致することから、PGAM5の切断を担う酵素として、その可能性が高いことが予想された。実際、PARLを発現抑制すると、CCCP依存的なPGAM5の切断が遅延した。したがって、PARLがPGAM5の切断に寄与する1つのプロテアーゼであることが明らかとなった。PARLは当初、酵母ツーハイブリッドスクリーニング法により、アルツハイマー病原因遺伝子のpresenilinの新規結合分子として同定されたことから、その名はpresenilin-associated rhomboid-likeに由来して名付けられたものである。しかし、その局在はミトコンドリア内膜であり、細胞内局在を異にするpresenilinとの関係性は、その後触れられていない。さらに、PARLの基質候補として様々なミトコンドリアタンパク質が報告されているが、現在までのところ、少なくとも哺乳類においては、我々の同定したPGAM5および後述するPINK1の2つがPARLの最も確からしい基質と考えられはじめている。このような背景を鑑み、ごく最近のいくつかの総説において、PINK1/PGAM5-associated rhomboid-like proteaseへの改名が提唱されている(3, 4)。

一方で、CCCP依存的なPGAM5の切断は、メタロプロテアーゼ阻害薬によっても抑制される他(2)、PARL欠損マウス由来胎仔線維芽細胞におけるPGAM5の切断抑制は部分的であり、PGAM5の切断にはPARL以外のプロテアーゼも関与することが示唆されていた。

最近、他の研究室から、PGAM5の切断を担うもう一つのプロテアーゼとして、ミトコンドリア内膜局在のメタロプロテアーゼOMA1が報告された(5)。後述するように、OMA1は、ミトコンドリア膜電位低下に伴い、そのプロテアーゼ活性がONになり、ミトコンドリア融合因子OPA1の切断にも関与することが知られている(6)。PARL欠損マウス由来胎仔線維芽細胞においてOMA1の発現抑制を行うと、CCCP依存的なPGAM5の切断が完全に抑制される(5)。我々の手によっても、同様の結果が得られており、ミトコンドリア膜電位低下依存的なPGAM5の切断はPARLとOMA1という2つのミトコンドリア内膜局在のプロテアーゼによって担われるものと考えられる(図1)。OMA1の活性中心はミトコンドリア膜間腔スペースに存在することが予想されており、OMA1がどのようにPGAM5の膜内切断を担っているか、その機構については今後明らかにする必要がある。

2. 切断型PGAM5とアポトーシス

それでは、PGAM5の切断は細胞にとってどのような機能を有するのだろうか。その1つの機能として、アポトーシスの促進が報告されている(7)(図1)。アポトーシス誘導時には、ミトコンドリア外膜の透過性が亢進し、ミトコンドリアからcytochrome Cが細胞質へと放出され、アポトソームが形成される。アポトソームは、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼの活性化の足場となる複合体であり、アポトーシスの誘導に重要な役割を果たす。Cytochrome Cに加え、HtrA2/OmiやSmac/DIABLOといったタンパク質もミトコンドリアから細胞質に放出される。これらのタンパク質はそのN末端に、カスパーゼ阻害因子として機能するIAPファミリータンパク質に結合するモチーフ、IAP結合モチーフを有する。IAP結合タンパク質は、このモチーフを介してIAPファミリータンパク質に結合することにより、競合的にIAPファミリータンパク質とカスパーゼの結合を阻害することで、IAPファミリータンパク質によるカスパーゼの阻害を解除する。したがって、HtrA2/OmiやSmac/DIABLOはアポトーシス促進因子として機能する。最近、IAPファミリータンパク質の1つであるXIAPの結合分子として切断型PGAM5が同定された(7)。実際、切断型PGAM5のN末端の断端配列は、IAP結合モチーフに非常によく類似している。さらに、アポトーシス誘導時、HtrA2/OmiやSmac/DIABLOと同様に、切断型PGAM5もミトコンドリアから細胞質へと放出される様子が観察されている。このような結果から、切断型

図1 PGAM5の切断とストレス応答

PGAM5は、機能不全ミトコンドリアにおいて、PARLおよびOMA1という2つのミトコンドリア内膜局在プロテアーゼにより切断を受ける。切断型PGAM5は細胞質においてアポトーシス促進因子として機能する。最近、脂質ドメイン制御に関する可能性が予想されているSLP2という分子がPGAM5の切断を負に制御する因子として同定された。その制御メカニズムの詳細解明は今後の課題である。

PGAM5の機能の1つとして、IAPファミリータンパク質の機能阻害を介したアポトーシスの促進機能が提唱された。一方で、我々の実験結果からは、アポトーシス誘導刺激単独だけでは、PGAM5の切断や細胞質移行が起こらないとの知見も得られており、どのようなコンテキストで起こるアポトーシスにおいてPGAM5の切断が誘導され、そのアポトーシス促進機能が発揮されるのか、精査していく必要があると考えている。

3. ミトコンドリア膜電位によるミトコンドリアタンパク質の切断制御

我々は、ミトコンドリア膜電位低下に伴い、PGAM5が切断を受けることを見出したが、興味深いことに、PGAM5以外にも、ミトコンドリア膜電位のレベルによって、その切断が制御されるミトコンドリアタンパク質が存在する。

先述のように、ミトコンドリア局在型ホスファターゼPGAM5は、ミトコンドリア膜電位が低下した機能不全ミトコンドリアにおいて、PARLにより膜内切断を受ける。面白いことに、膜電位を保持した健康なミトコンドリアでは、ミトコンドリア局在型キナーゼPINK1がPARLにより切断を受けていることが報告されている(8)。PARLによって切断されたPINK1は、その後細胞質へと逆輸送され、プロテアソーム依存的に分解される。電子伝達系を構成する一部のタンパク質を除いて、ミトコンドリアに局在する多くのタンパ

ク質は、核DNAにコードされているため、細胞質での翻訳を経て、それぞれの持つミトコンドリア局在配列に従って、ミトコンドリアへと輸送される。PINK1の場合、N末端に存在する正電荷を帯びたアミノ酸のクラスター配列が、ミトコンドリア局在配列として機能する。このタイプのミトコンドリア局在配列を使っ

てのミトコンドリアへのタンパク質輸送には、ミトコンドリアの膜電位が必要であると考えられている。したがって、CCCPによりミトコンドリアの膜電位低下を誘導すると、PINK1の内膜への輸送が停止し、PINK1はPARLによる切断を免れ、ミトコンドリア外膜で安定化する。外膜で安定化したPINK1はいわば機能不全ミトコンドリアの目印として機能し、その後、Parkinとともに、マイトファジー（オートファジーによる機能不全ミトコンドリアの選択的排除）を誘導することが明らかとなっている(9)。PINK1およびParkinはパーキンソン病原因遺伝子であり、マイトファジーによるミトコンドリアの品質管理の破綻がパーキンソン病発症の1つの原因と考えられ、現在非常にホットな研究領域となっている。一方で、ミトコンドリアでのタンパク質分解という観点からみると、異なる2つの基質の切断が、ミトコンドリアの膜電位のレベル、いわばミトコンドリアの健康状態により選択的に制御されている可能性を示す事象という点で、大変興味深い。ミトコンドリア膜電位という物理化学的ストレスがどのように感知され、PARLの基質特異性が制御されているのか、その分子メカニズムの解明

が待たれる。また、なぜ、キナーゼとホスファターゼの切断が、同一のプロテアーゼによって担われているにも関わらず、ミトコンドリアの健康状態によって異なる制御を受けているのか、その生理的意義についても今後の解析が期待される。

PGAM5と同様に、ミトコンドリア膜電位低下依存的に切断を受けるタンパク質として、ミトコンドリア融合因子OPA1が知られる(6)。ミトコンドリアは、活発に融合と分裂を繰り返している。ミトコンドリアの融合は、ミトコンドリアDNAや膜脂質成分などの互いの内容物を交換し合い、互いの機能低下を補完する目的があると考えられており、このシステムはcontent mixingと呼ばれている。一方で、ある一部分のミトコンドリアが、融合によって補完しあうことが危険なほど、大きなダメージを負った場合には、ダメージを受けた自身の一部を積極的に排除することが必要と考えられる。ダメージを受けた自身の一部を切り離す機構の1つとして考えられているのが、ミトコンドリア膜電位低下に伴う、融合因子OPA1の切断である。ミトコンドリア膜電位低下依存的なOPA1の切断は、ミトコンドリア内膜局在のメタロプロテアーゼOMA1によって担われる。先述したようにOMA1はPARLと並んでPGAM5の切断を担う、もう1つのプロテアーゼである。面白いことに、OMA1は定常状態では活性を持たず、ミトコンドリア膜電位低下依存的に活性化される(6)。同報告において、OMA1のN末端側に存在する正電荷を帯びたアミノ酸のクラスターが、ミトコンドリア膜電位低下に伴う何らかの変化に対しセンサードメインとして機能している可能性が提唱されているが、明確なメカニズムはわかっていない。一方で、酵母を用いた遺伝学的研究から、prohibitinと呼ばれるタンパク質によって、ミトコンドリア内膜に、ある種の脂質コンパートメントが形成されており、このコンパートメントによって、プロテアーゼによる基質の切断が制御されている可能性が予想されている(10)。興味深いことに、哺乳類において、prohibitin欠損マウス由来のマウス胎仔線維芽細胞では、ミトコンドリア膜電位低下が起きていないにも関わらず、OPA1の切断が恒常的に促進していることが見出されている(11)。さらに重要なことには、先に紹介したPGAM5切断に対するOMA1の関与を報告した論文において、prohibitinと同様に、脂質コンパートメントの形成に寄与することが予想されているSLP2というタンパク質が、CCCP依存的なPGAM5の切断を負に制御する因子として同定されている(5)(図1)。SLP2の脂質コンパートメント形成能がPGAM5切断阻害に必

要か否か等、詳細な検討はされていないが、ミトコンドリア膜電位低下依存的なPGAM5の切断メカニズムを考える上で、非常に興味深い。ミトコンドリアにおける脂質コンパートメントの実体をモニターできるような技術開発が進むことで、ミトコンドリアの健康状態に応じた脂質コンパートメントの変化や、それに伴うミトコンドリア局在プロテアーゼの活性制御の解析が可能となることが期待される。

4. ミトコンドリアマトリックス局在のプロテアーゼとタンパク質品質管理

プロテアソームを持たないミトコンドリアでは、その内部で生じた不良タンパク質を自身で処理しなければならない。ミトコンドリアの内部には、膜間腔、内膜、マトリックス、それぞれのコンパートメントに、様々な種類のシャペロンとプロテアーゼが存在しており、これらの働きによって不良タンパク質のリフォールディングや分解がなされている(12)。一方で、最近の研究により、ミトコンドリア不良タンパク質の蓄積により、ミトコンドリア内外のストレス応答分子の活性化が誘導され、不良タンパク質排除のためのストレスシグナルが惹起されることがわかってきた。すなわち、ミトコンドリアは、自身の内部に蓄積した不良タンパク質を認識し、より積極的に不良タンパク質を排除するためのシグナルを発信することができることを意味する。現在のところ、2つの機構が明らかになっている。1つは、PINK1及びParkinによるマイトファジーを介した不良タンパク質の排除である(13)。先述したようにPINK1はミトコンドリア膜電位低下に応答してミトコンドリアの外膜に蓄積するが、ミトコンドリアに不良タンパク質を蓄積させることによって、外膜でのPINK1の安定化が見られることが報告されている。興味深いことに、ミトコンドリア不良タンパク質の蓄積に伴うPINK1の安定化は、ミトコンドリア膜電位低下を伴わないことがわかっている(13)。もう1つの機構は、*C. elegans*を用いた遺伝学的解析から明らかにされた(14)。この機構は、ミトコンドリアに不良タンパク質が蓄積したことが、細胞核へと伝達され、ミトコンドリア局在のシャペロンやプロテアーゼの発現を積極的に誘導し、不良タンパク質の蓄積を回避しようとするものである。この機構は、先行して解析されている小胞体における不良タンパク質応答(unfolded protein response (UPR)：小胞体への不良タンパク質の蓄積に応答して、ある特定の転写因子群が活性化し小胞体シャペロンの誘導等が惹起される)にならって、mitochondrial UPR (mtUPR)と呼ばれるよ

うになった(15)。細胞核での転写誘導には、ミトコンドリア不良タンパク質の蓄積に特異的に応答する転写因子の存在が必須である。哺乳類においては、未だ確定的な転写因子の同定はなされたとは言いがたいが、*C. elegans* においては、ATFS-1 という転写因子の関与が明らかとなっている(14)。ATFS-1 は、ミトコンドリア局在シグナルと核局在シグナルの両方を有するユニークなタンパク質である。定常状態では、ATFS-1 はミトコンドリアに輸送され、マトリックス局在のプロテアーゼである LON によって恒常的に分解を受けているが、不良タンパク質の蓄積の際には、ミトコンドリアへの輸送が停止し、LON による分解を免れ、核への輸送が ON になることが報告されている。先述した PINK1 の外膜への蓄積もまた、ストレス状況下でミトコンドリアへの PINK1 の輸送および分解が停止することが引き金となっている。これらの結果は、ミトコンドリアに蓄積したストレスがミトコンドリア局在タンパク質の輸送とそれに引き続くタンパク質分解の停止というかたちで、シグナルへと変換されるという点で、両者に共通項があることを示唆するものであり、興味深い。

5. まとめ

本稿では、「ミトコンドリアタンパク質の分解」を「ストレス応答との関わり」という観点から概説した。我々が行ってきた PGAM5 膜内切断解析の紹介をきっかけとして、PGAM5 以外のミトコンドリアタンパク質の切断についても触れさせていただいた。ミトコンドリア局在のプロテアーゼは、不良タンパク質を切断・分解するという役割だけでなく、時には、非常に制御された基質切断を介し、積極的にストレス応答を惹起する役割も併せ持つことがわかってきた。また、ミトコンドリアが、膜電位低下や不良タンパク質蓄積など、自身の内部で起きた異常を感知し、取り除こうとするストレス応答機構、「ミトコンドリア品質管理機構」についての研究は、現在とても大きな盛り上

がりを見せている。しかしながら、ミトコンドリアがどのような機構によって、自身内部に蓄積したこれらのストレスを認識するのか、その詳細については、未解明な部分が多く残されている。こうしたストレス状況下でのミトコンドリア局在のプロテアーゼの活性制御機構の詳細も含め、今後のさらなる解析が期待される。

謝辞：PGAM5 の解析は、東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室において、一條秀憲教授のもと、武田弘資准教授（現・長崎大学教授）と共にに行った研究です。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Takeda K, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:12301-12305.
- 2) Sekine S, et al. J Biol Chem. 2012;287:34635-34645.
- 3) Spinazzi M, et al. Semin Cell Dev Biol. 2016;60:19-28.
- 4) Urban S, et al. Cell. 2016;167:1898-1898.
- 5) Wai T, et al. EMBO Rep. 2016;17:1673-1901.
- 6) Baker MJ, et al. EMBO J. 2014;33:578-593.
- 7) Zhuang M, et al. Mol Cell. 2013;49:273-282.
- 8) Jin SM, et al. J Cell Biol. 2010;191:933-942.
- 9) Youle RJ, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;12:9-14.
- 10) Osman C, et al. J Cell Sci. 2009;124:3823-3830.
- 11) Merkwirth C, et al. Genes Dev. 2008;22:476-488.
- 12) Voos W, et al. Essays Biochem. 2016;60:213-225.
- 13) Jin SM, et al. Autophagy. 2013;9:1750-1757.
- 14) Nargund AM, et al. Science. 2012;337:587-590.
- 15) Haynes CM, et al. Trends Cell Biol. 2013;23:311-318.

著者プロフィール

関根 史織（せきね しおり）

米国国立衛生研究所（NIH），Research Fellow，博士（薬学）。

◇2011年東京大学大学院薬学系研究科，博士課程修了。'13年東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室，助教，'16年米国国立衛生研究所（NIH），Richard J. Youle 研究室にて現職。◇研究テーマ：ミトコンドリアにおけるストレス応答の解析。◇趣味：散歩，料理，手芸。