

令和元年6月17日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21680

研究課題名(和文) ミトコンドリア内膜プロテアーゼにより調節をうける新規ストレス応答因子の探索

研究課題名(英文) In silico screening of novel stress response factors regulated by mitochondrial inner membrane proteases

研究代表者

今井 賢一郎 (Imai, Kenichiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：80442573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアに局在するプロテアーゼは、基質タンパク質の局在や機能を調節することで、ストレス応答制御などの重要な役割を担うが、どの基質を切断し、どのような機能を制御するのかについてはほとんどわかっていない。そこで、本研究では、内膜プロテアーゼPARLに注目し、ブレ配列予測、内膜貫通セグメント予測、PARLによる切断部位予測を組み合わせた基質予測パイプラインを開発し、in silicoによる基質候補の網羅的な探索を行った。その結果、54個の基質候補を得た。これらの中には、最近新たに発見されたPARLの基質も含まれており、得られたPARL基質候補の中には、未発見の基質も含まれていると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで内膜プロテアーゼPARLの基質の網羅的な探索は行われていなかったが、本研究により54個のPARL基質候補が得られた。これらの中には、最近明らかになったPARL基質も含まれており、未発見の基質が含まれている可能性が高い。今後、この基質候補の中から実験的に新規基質を同定できれば、PARLによるミトコンドリアや細胞のストレス応答機構などの機能調節機構の解明を促進させることができる。

研究成果の概要(英文)：Importance of proteolytic regulations by mitochondrial inner membrane proteases recently is emerged in mitochondrial and cellular stress responses. However, the proteolytic regulations are poorly understood due to limited numbers of substrates. In this study, we focus on mitochondrial rhomboid protease PARL and then developed prediction pipeline for novel PARL substrates combining mitochondrial targeting sequence prediction, transmembrane domain prediction optimized for mitochondrial inner membrane and PARL cleavage site prediction. Using the prediction pipeline, we performed comprehensive search of PARL substrates against Human proteome. Consequently, we found 54 candidates. Interestingly, three recently discovered PARL substrates are included in the candidates. Thus, list of the candidate proteins found in this study is informative for discovery of novel PARL substrates.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：ミトコンドリア 内膜プロテアーゼ PARL バイオインフォマティクス ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアにおけるプロテアーゼの新たな役割

ミトコンドリアは、エネルギーの産生器官として細胞機能の維持に必須のオルガネラである。このため、過剰なストレスを受け、障害が起きたミトコンドリアは、脳神経疾患や臓器疾患など様々な疾患の原因となる。長年、ミトコンドリアに局在するプロテアーゼの役割は、主にミスフォールドを起こしたタンパク質の分解、ターゲティング配列の切除など、タンパク質の品質管理機構の一部であると考えられてきた。しかし、近年、ミトコンドリア局在プロテアーゼは、基質タンパク質の局在や機能を調節することでミトコンドリアの機能低下をシグナルとして伝達し、ミトコンドリアの選択的オートファジー（マイトファジー）やアポトーシスなどといったストレス応答を制御していることが明らかになってきており（Sekine & Ichijo, *BBA*, 2015, Quiros *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2015）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パラダイムシフトが起きている。

ミトコンドリア内膜プロテアーゼによる基質タンパク質の切断とストレス応答

ミトコンドリアに定常的に存在するプロテアーゼは、ヒトで 19 種類同定されており、その多くは内膜に局在している（Quiros *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2015）。例えば、Rhomboid 型の内膜プロテアーゼ PARL は、PINK1、PGAM5 の膜貫通 (TM) セグメントを切断し、局在部位や機能を調節することで、マイトファジーやアポトーシスといったストレス応答の制御を行う（図 1）。若年性パーキンソン病の原因遺伝子である PINK1 は、健全なミトコンドリアでは、PARL によって恒常的に切断を受け、分解されている。しかし、ミトコンドリアに障害がおき、膜電位低下やミスフォールドを起こしたタンパク質が蓄積すると、PINK1 の輸送が阻害され、外膜にとどまり、同じく若年性パーキンソン病の原因遺伝子 Parkin をミトコンドリアにリクルートし、マイトファジーの引き金となる（Okatsu *et al.*, *Nat Commun*, 2012, Jin & Youle, *Autophagy*, 2013）。一方、PGAM5 は、ミトコンドリアがストレスを受け、膜電位が低下すると PARL によって切断を受ける。切断された PGAM5 は、ミトコンドリアから細胞質にリリースされ、XIAP と競合することで、Caspase の活性阻害を阻み、アポトーシスを促進させる（Zhuang, *et al.*, *Mol. Cell*, 2013）。このように、内膜プロテアーゼによるタンパク質分解が、ミトコンドリアの機能低下のセンサーとなり、ストレス応答において重要な役割を担っていることが明らかになってきた。しかし、PARL も含め、それぞれの内膜プロテアーゼが、ミトコンドリアにおいてどの基質を切断し、どのような機能を制御するのかについてはほとんどわかっておらず、網羅的な基質の探索も行われていない。未発見の基質の中には、ストレス応答因子として働く基質も数多く存在すると考えられ、ミトコンドリアのタンパク質分解によって調節を受ける新規ストレス応答因子の網羅的探索は、ストレス応答機構の解明を促進させる重要な研究課題である。

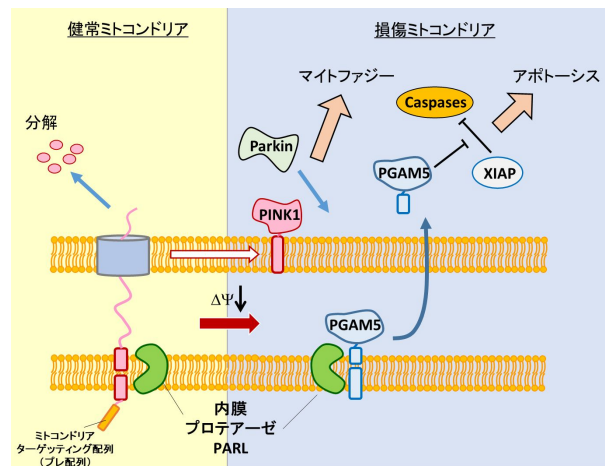


図 1. 内膜プロテアーゼ PARL によるタンパク質分解による機能制御

2. 研究の目的

本研究では、内膜プロテアーゼの中でもストレス応答制御と関係が深い PARL に注目する。PARL の基質に関しては、PINK1、PGAM5 が報告されている。PARL のノックアウトマウスは誕生するものの、小さく生後 8 ~ 12 週で死亡するとの報告があるが（Cipolat, *et al.*, *Cell*, 2006）この表現型は、PINK1、PGAM5 では説明できず、PINK1、PGAM5 以外にも PARL の基質は存在する可能性が高い。しかし、PARL の基質を実験的にプロテオームから同定することは容易でなく、in silico 技術による候補の絞り込みが期待されている。そこで、本研究では、PARL の基質を予測するパイプラインを開発し、ヒトプロテオームに対し、in silico による網羅的な基質候補探索を行う。さらに、得られた PARL の基質候補に対し、配列解析による機能予測などを行い、有望な候補の絞り込みを行うことを目的とする。

3. 研究の方法

PINK1 や PGAM といった PARL の基質に見られる特徴は、(1) 1 つの TM セグメントを持つ内膜タンパク質である、(2) 内膜プロテアーゼにより TM セグメントが切断される、(3) ミトコンドリアターゲティング配列 (プレ配列) を持つ (持たないものもある) に要約できる (図 1)。つまり、内膜タンパク質の TM セグメントを予測する技術、PARL による基質の切断部位を予測する技術、プレ配列を予測する技術を組み合わせた基質予測パイプラインを開発することができれば、in silico により網羅的な基質候補の探索を行うことができる。プレ配列予測に関しては、我々は、すでに世界最高精度でプレ配列及びその切断部位を予測する技術を開発している (Fukasawa *et al.*, MCP, 2015)。そこで、内膜タンパク質の TM セグメントを予測する技術と PARL による基質の切断部位予測の開発を行い、開発の済みのプレ配列予測手法と組み合わせ、PARL の基質を予測するパイプラインの開発を行った。そして、開発した PARL の基質予測パイプラインを用い、ヒトのプロテオーム、ミトコンドリアプロテオーム (MitoCarta2.0, MitoMiner IMPI) に対する PARL の基質候補探索を行った。さらに、得られた候補に対し、文献検索、データベース検索、配列解析、最近得られたシングルセルレベルの細胞内局在部位解析の情報 (Thul *et al.*, Science, 2017) を用い、機能解析や細胞内局在部位の解析を行い、基質候補の絞り込みを行った。

4. 研究成果

内膜の TM セグメント予測手法及び PARL 切断部位予測手法の開発

ミトコンドリア内膜の TM セグメントは、小胞体 (ER) や細胞膜の TM セグメントに比べ、疎水性も弱く、膜への組み込みに重要な TM セグメント周辺の物理化学的性質も異なる (Botelho, *et al.*, EMBO J, 2011)。TM セグメント予測については、すでに高精度の予測手法が開発されているが、オルガネラの区別なく、膜タンパク質すべてをまとめて扱っているため、ミトコンドリア内膜の TM セグメントを精度良く予測することは難しい。そこで、1 回膜貫通型の内膜タンパク質から得られた 76 個の TM セグメントを正例に、内膜タンパク質の TM セグメントと判別の難しい水溶性タンパク質の疎水性領域 275 個を負例としてデータセットを作成した。そして、内膜の TM 領域とその周辺を中心領域、マトリックス側領域、膜間部側領域に分類し、アミノ酸組成、物理化学的性質、ホモログ間でのアミノ酸の保存性を特徴量として、サポートベクターマシンを用いた機械学習を行うことで、ミトコンドリア内膜の TM セグメントに特化した予測方法を開発した。既知手法との予測性能の比較を行ったところ、本研究の開発手法は、Sensitivity, Specificity が、それぞれ、84.21%、95.27% で、共にセンカンドベストであったが、Matthews correlation coefficient (MCC) は、0.791 であり、総合的には最も良い予測性能を示した (表 1)。また、開発した TM セグメント予測法を応用し、赤痢アメーバのミトコンドリア関連オルガネラの膜タンパク質のプロテオーム解析を行い、系統特異的な新規の膜タンパク質を発見できた (Santos *et al.*, Genes, 2019)。

表 1. 内膜 TM セグメント予測の性能比較

	Sensitivity	Specificity	MCC
SOSUI	39.47% (30/76)	90.55% (249/275)	0.3377
TMHMM ver2.0	63.16% (48/76)	97.46% (268/275)	0.6868
Phobius	76.32% (58/76)	91.27% (251/275)	0.6579
SCAMPI	67.11% (51/76)	82.91% (228/275)	0.4592
Octopus (topcons)	96.05% (73/76)	60.36% (166/275)	0.4651
Our method*	84.21% (64/76)	95.27% (262/275)	0.7911

*: 5-fold cross-validation

次に、PARL の基質切断部位予測であるが、既知の PARL の基質は数例しかいないため、機械学習を用いたアプローチは難しい。そこで、PARL と同じ Rhomboid 型プロテアーゼファミリーに属する AarA、GlpG、YqgP の基質タンパク質やその変異体の切断部位情報を取り入れることで配列情報を増幅させ、17 個の切断部位情報を得た。そして、切断部位近辺に対し、配列プロファイル解析を行ったところ、-4、-1、+2 の位置にあるアミノ酸の出現傾向が重要であることがわかった (図 2)。この結果をもと

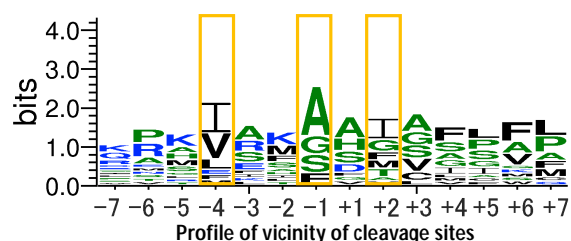


図 2. Rhomboid 型プロテアーゼファミリーの基質切断部位近辺の配列プロファイル

に位置特異的スコア行列を作成し、予測された TM 領域を走査することで、切断部位の予測を行う手法を開発した。予測性能を独立したテストデータ(実験的に確認の取れている Rhomboid 型プロテアーゼファミリーの基質 13 個、非基質 16 個)を用いて評価したところ、切断を受ける基質を 80.0%の精度で予測できた。この予測法と、プレ配列予測手法、内膜の TM セグメント予測手法と組み合わせ、PARL の基質予測パイプラインの開発を行った。PARL の基質は、数例しかなく、十分な配列情報が得られていないため、開発した切断部位予測法は、PARL に特化した切断部位予測になってはいないという問題点もあり、配列情報に頼らない予測法の開発も今後の課題である。同じ Rhomboid 型プロテアーゼファミリーとしては、GlpG と阻害ペプチドとの複合体構造が解かれている (Ticha *et al.*, *Cell Chem Biol*, 2017)。そこで、構造情報を基にした予測法として、この複合体をテンプレートに、PARL と基質ペプチドの複合体の構造モデルをホモロジーモデリングと分子動力学計算により構築し、基質ペプチドのアミノ酸置換による自由エネルギー変化量を計算することで、基質ペプチド予測を行う方法も有効であると考え、現在取り組んでいるところである。また、本研究で用いたホモロジーモデリングと分子動力学計算による複合体の機能解析は、ミトコンドリアのタンパク質輸送複合体 TOM 複合体の構造解析及び Tom6 のリン酸化による Tom40 との相互作用解析にも応用した (Sakaue *et al.*, *Mol. Cell*, 2019)。ミトコンドリアのタンパク質輸送複合体については、さらに、本研究で用いた構造モデリング技術、プレ配列予測法、TM セグメント予測、配列解析を組み合わせ、進化解析を行い、新しい進化モデルの提案も行った (Fukasawa *et al.*, *MBE*, 2017)。

in silico による PARL 基質候補の網羅的探索

開発したプレ配列予測、内膜タンパク質の膜貫通領域予測、PARL による切断部位予測という 3 つの予測技術を組み合わせた PARL の基質予測パイプラインを用い、ヒトのプロテオームに対する基質候補の網羅的探索を行った。PARL の基質予測パイプラインの概要は、次の通りである。PARL の基質は、プレ配列を持つものと、持たないものに分けられる。そこで、まず、ヒトのプロテオームに対しプレ配列予測を行い、予測されたタンパク質をミトコンドリアプロテオーム (MitoCarta2.0, MitoMiner IMPI) と合わせ、これに対し、内膜タンパク質の膜貫通領域予測、PARL による切断部位予測を行い、基質候補を網羅的に探索する。さらに、文献検索、データベース検索、配列解析、最近得られたシングルセルレベルの細胞内局在部位解析の情報 (Thul *et al.*, *Science*, 2017) を用い、機能や細胞内局在部位の解析を行い、基質候補の選別を行う。このパイプラインを用い、PARL の基質候補の網羅的探索を行ったところ、最終的に 54 個の基質候補 (プレ配列を持つ基質候補 36, プレ配列を持たない基質候補 18) を得ることができた。一方、本研究と平行して、他の研究グループにより、実験的アプローチによる PARL 基質のプロテオーム解析 (Saita *et al.*, *Nat Cell Biol.*, 2017) が行われ、新たに 4 つの基質 (Smac, STARD7, CLPB, TTC19) が同定された。本研究で得られた基質候補と比較を行ったところ、新たに得られた 4 つの基質のうち、STARD7, CLPB, TTC19 の 3 つの基質が含まれていた。また、Smac に関しては、その isoform が候補としてあげられていた。さらに、実験的確認はまだ取れていないものの、プロテオーム解析により得られた基質候補と我々の候補の間には、9 つの基質において、オーバーラップがあった。オーバーラップのない基質候補についても、その中には、プロテオーム解析では見つけることのできない基質も存在していると考えられる。また、ストレス応答と関連する基質は、切断後、細胞質にリリースされることで機能調節に関わる可能性が高い。PARL の基質の内膜貫通領域の膜間領域側にある負電荷残基のクラスターが、PARL 切断後の細胞質側へのリリースに重要との報告もある (Saita *et al.*, *EMBO J.*, 2018)。そこで、得られた候補に対し、プレ配列予測と膜貫通領域予測結果を基に膜間領域側にある負電荷クラスター解析を行った結果、8 候補が膜間領域側に負電荷残基のクラスターをもっており、これらは新規のストレス応答因子候補としても期待できる。これらの結果から、本研究によって得られた PARL 基質候補のリストは、新規基質を含んでいる可能性が十分にあると考えられる。今後、実験的検証も含め、さらなる解析を行うことで、新規基質の発見につながると期待できる。

引用文献

Sekine, S & Ichijo, H, Mitochondrial proteolysis: its emerging roles in stress responses, *BBA*, 1850(2), 274-80, 2015

Quiros P. M, Langer, T & Lopez-Otin, C: New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 16, 345-359, 2015

Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, Tani N, Kimura M, Go E, Koyano F,

Funayama M, Shiba-Fukushima K, Sato S, Shimizu H, Fukunaga Y, Taniguchi H, Komatsu M, Hattori N, Mihara K, Tanaka K, Matsuda N., PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria, *Nat Commun.*, 3:1016, 2012

Jin S.M & Youle R.J, The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria, *Autophagy*, 9(11), 1750-1757, 2013

Zhuang M, Guan S, Wang H, Burlingame A.L, Wells J.A, Substrates of IAP ubiquitin ligases identified with a designed orthogonal E3 ligase, the NEDDylator, *Mol Cell.*, 49(2), 273-282, 2013

Cipolat, S, Rudka, T, Hartmann, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B, Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell*, 126, 163-175, 2006

Fukasawa Y, Tsuji J, Fu S.C, Tomii K, Horton P, Imai K, MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites, *Mol Cell Proteomics.*, 14(4), 1113-1126, 2015

Thul P.J, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Björk L, Breckels L.M, Bäckström A, Danielsson F, Fagerberg L, Fall J, Gatto L, Gnann C, Hober S, Hjelmare M, Johansson F, Lee S, Lindskog C, Mulder J, Mulvey C.M, Nilsson P, Oksvold P, Rockberg J, Schutten R, Schwenk J.M, Sivertsson Å, Sjöstedt E, Skogs M, Stadler C, Sullivan D.P, Tegel H, Winsnes C, Zhang C, Zwahlen M, Mardinoglu A, Pontén F, von Feilitzen K, Lilley K.S, Uhlén M, Lundberg E, A subcellular map of the human proteome, *Science*, 356(6340), eaal3321, 2017

Botelho S.C, Osterberg M, Reichert A.S, Yamano K, Björkholm P, Endo T, von Heijne G, Kim H, TIM23-mediated insertion of transmembrane α -helices into the mitochondrial inner membrane, *EMBO J.*, 30(6), 1003-1011, 2013

Santos H.J, Hanadate Y, Imai K, Nozaki T, An Entamoeba-Specific Mitosomal Membrane Protein with Potential Association to the Golgi Apparatus, *Genes (Basel)*, 10(5), E367, 2019

Tichá A, Stanchev S, Vinothkumar K.R, Mikles D.C, Pachl P, Began J, Škerle J, Švehlová K, Nguyen M.T.N, Verhelst S.H.L, Johnson DC, Bachovchin DA, Lepšík M, Majer P, Strisovsky K, General and Modular Strategy for Designing Potent, Selective, and Pharmacologically Compliant Inhibitors of Rhomboid Proteases, *Cell Chem Biol.*, 24(12), 1523-1536, 2017

Sakaue H, Shiota T, Ishizaka N, Kawano S, Tamura Y, Tan K.S, Imai K, Motono C, Hirokawa T, Taki K, Miyata N, Kuge O, Lithgow T, Endo T, Porin Associates with Tom22 to Regulate the Mitochondrial Protein Gate Assembly, *Mol Cell.*, 73(5), 1044-1055, 2019

Fukasawa Y, Oda T, Tomii K, Imai K, Origin and Evolutionary Alteration of the Mitochondrial Import System in Eukaryotic Lineages, *Mol Biol Evol.*, 34(7), 1574-1586, 2017

Saita S, Nolte H, Fiedler K.U, Kashkar H, Venne A.S, Zahedi R.P, Krüger M, Langer T, PARL mediates Smac proteolytic maturation in mitochondria to promote apoptosis, *Nat Cell Biol.*, 19(4), 318-328, 2017

Saita S, Tatsuta T, Lampe P.A, König T, Ohba Y, Langer T, PARL partitions the lipid transfer protein STARD7 between the cytosol and mitochondria, *EMBO J.*, 37(4), e97909, 2018

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Santos H.J, Hanadate Y, Imai K, Nozaki T, An Entamoeba-Specific Mitosomal Membrane Protein with Potential Association to the Golgi Apparatus, *Genes*, 10(5), E367, 2019

Sakaue H, Shiota T, Ishizaka N, Kawano S, Tamura Y, Tan K.S, Imai K, Motonon C, Hirokawa T, Taki K, Miyata N, Kuge O, Lithgow T, Endo T, Porin Associates with Tom22 to Regulate the Mitochondrial Protein Gate Assembly, *Mol Cell*, 73(5), 1044-1055, 2019

Fukasawa Y, Oda T, Tomii K, Imai K, Origin and Evolutionary Alteration of the Mitochondrial Import System in Eukaryotic Lineages, *Mol Biol Evol.*, 34(7), 1574-1586, 2017

〔学会発表〕(計3件)

Yoshinori Fukasawa, Toshiyuki Oda, Kentaro Tomii, Kenichiro Imai, Origin and Evolutionary Alteration of the Mitochondrial Import System in Eukaryotic Lineages, YoungMito 2018, 2018年

今井賢一郎、深沢嘉紀、富井健太郎、Paul Horto, ミトコンドリア内膜局在プロテアーゼ PARL により機能調節を受ける新規基質探索と機能解析、ConBio2017、2017年

Kenichiro Imai, Yoshinori Fukasawa, Kentaro Tomii, Horton Paul, in silico screening of novel stress response factors regulated by mitochondrial inner membrane proteases、第54回日本生物物理学会年会、2016年