

機関番号 : 32659

研究種目 : 基盤研究 (B)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20300133

研究課題名 (和文) 神経回路形成におけるレドックスシグナリングと  
ミトコンドリアダイナミクス

研究課題名 (英文) Neuronal development via redox signaling and mitochondrial dynamics

研究代表者

柳 茂 (YANAGI SHIGERU)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号 : 60252003

研究成果の概要 (和文) : 神経回路形成過程において神経軸索はセマホリンなどの反発因子にナビゲートされながら、最終的に標的細胞とシナプスを形成する。セマホリンのシグナル伝達機構においてレドックス反応が関与するという概念が提唱されたがその実態は不明であった。私たちが同定した新規 GTP 結語タンパク質 CRAG はセマホリンなどのレドックス反応によって産生された活性酸素種により活性化し、核内において神経細胞の分化や酸化ストレスに抵抗するための生存シグナルを伝達していることが明らかとなった。一方、ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL による神経細胞の酸化ストレス防御機構が明らかとなった。これらの成果により、神経発生の新たな分子メカニズムが解明されると同時にアルツハイマー病、パーキンソン病などの社会的に重要性の高い疾患治療への応用が期待できる。

研究成果の概要 (英文) : Neuronal network and axonal guidance are critical processes that are highly regulated through extracellular signaling. Neuronal outgrowth is directed by repelling signaling molecules such as semaphorins. Redox reaction via activation of oxidoreductase MICAL has been shown to be involved in semaphorin-mediated signaling, however, the molecular basis was unknown. We have previously identified a novel GTPase named CRAG which was activated by reactive oxygen species generated by semaphorin and translocated to the nucleus. In this study, we found that CRAG mediated neuronal cell survival pathway by transcriptional regulation of AP-1 and SRF in the nucleus. In addition, CRAG was found to activate anti-oxidant signaling which also contributes to the cell survival. Furthermore, we succeeded to generate CRAG conditional knockout mice. These mice will provide an important information to understand the physiological role of CARG during neuronal development. On the other hand, MITOL is a novel mitochondrial ubiquitin ligase which regulates mitochondrial dynamics by ubiquitination of mitochondrial fission factor Drp1. Subsequently, we suggested that MITOL is involved in mitochondrial quality control by ubiquitination of unfolded proteins such as mutant SOD1 and expanded polyQ accumulated in mitochondria. However, the exact role of MITOL is still obscure. Most recently we identified two physiological substrates of MITOL, MAP1B-LC1 and mitofusin2. Further analysis of MITOL will uncover the new role of mitochondria, thereby contributing to a greater understanding of the molecular basis of the neurodegenerative disorders.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：神経変性疾患、ポリグルタミン病、神経回路形成、CRAG、遺伝子治療、ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL、MAP1B-LC1、Mfn2

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は神経回路網形成の分子機構、とくに反発因子セマホリンを介する細胞内シグナル伝達機構について解析を行ってきた。最初にセマホリンのシグナルに關与する CRMP に着目し、CRMP に結合する新規蛋白質として CRAM を同定した (J. Biol. Chem. 2000)。その後、セマホリンのシグナル伝達機構にチロシンキナーゼ Fes/Fps が活性化して微小管動態を調節すること、CRAM がセマホリン応答を負に制御する機能を報告した (EMBO J. 2002, J. Biol. Chem. 2003, Mol. Biol. Chem. 2005)。これらの一連の研究成果を通して、神経発生における軸索の崩壊や消失機構は活性酸素種 (ROS) をセカンドメッセンジャーとするレドックスシグナリングであり、微小管をはじめとする細胞骨格系の動態や酸化ストレスに対する独特の防御機構の存在に気が付いた。とくに私たちが最近同定した CRAM に結合する新規 GTPase CRAG (J. Cell. Biol. 2006) はまさにこのレドックスシグナリングの中核をなす分子であり、ROS に反応して核内に移行し、酸化ストレス抵抗性のシグナルを伝達する。同時に CRAG は変性蛋白質を排除することにより細胞毒性を回避させる活性が認められた。実際に CRAG はポリグルタミン病の原因物質であるポリグルタミン変性蛋白質 (PolyQ) の分解を促進させた。最近、私たちはポリグルタミン病モデルマウスの小脳にウイルスベクターに組み込んだ CRAG 遺伝子を導入することにより、PolyQ の消失と劇的な小脳失調運動の改善を見出している (EMBO R. 2008)。このことより CRAG による神経変性疾患の遺伝子治療の候補遺伝子としても期待できる。しかしながら、CRAG の神経発生における生理的役割は不明である。

一方、私たちはミトコンドリアに特異的に存在するユビキチンリガーゼ MITOL を同定した (EMBO J. 2006)。MITOL はミトコンドリア分裂因子を基質にすることによりミトコンドリア機能を調節している可能性が示唆された。しかしながら、MITOL の役割は不明な点が多く、MITOL の機能解析は、神経機能や神経変性疾患の病態の解明につながるものが期待できる。

### 2. 研究の目的

セマホリンシグナリングにおける CRAG の機能解析を行う。とくに活性酸素による

CRAG の活性化機構について分子レベルで詳細に解析する。さらに CRAG 欠損マウスを樹立し、個体発生における役割を解明する。MITOL については、ミトコンドリアダイナミクスにおける役割を分子レベルで明らかにする。さらに MITOL の生理的基質を同定する。最終的に MITOL 欠損発現マウスを樹立し、解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) CRAG の転写調節機能解析

CRAG による核内転写制御機構解析について、AP1 などさまざまなレポーター遺伝子を用いてルシフェラーゼアッセイにて解析する。

#### (2) 活性酸素による CRAG の活性化機構の解析

細胞レベルの実験系において、活性酸素により直接 CRAG が酸化されるかどうかを検討する。またストレス応答をより CRAG のリン酸化などの修飾の有無を検討する。

#### (3) CRAG による PML body のユビキチン化誘導機構の解析

CRAG とユビキチンリガーゼ parkin との関連性について解析する。具体的にはストレス応答により CRAG と RBCK1 が会合するかどうか、CRAG により parkin が PML body に移行するかどうか、さらには parkin の活性化について検討する。

#### (4) CRAG の欠損マウスを樹立し解析

理研との共同研究にて推進する。

#### (5) MITOL によるミトコンドリア品質管理機構の解析

ミトコンドリア変性蛋白質を細胞に人為的に発現させて、MITOL との会合おとびユビキチン化と分解促進活性を検討する。ミトコンドリア変性蛋白質として mutant SOD1 を用いて解析する。

#### (6) MITOL と神経変性疾患との関連性の解析

パーキンソン病はミトコンドリアの機能異常が疾患の発症に密接に関連していることが報告されている。病態における MITOL とミトコンドリア機能異常を解析する。

#### (7) MITOL の欠損マウスを樹立し解析

理研との共同研究にて推進する。

### 4. 研究成果

神経回路形成に關与するシグナル伝達タンパク質 CRAG は、伸長ポリグルタミン変性タ

ンパク質と会合して、共に核内に移行し、核内のプロテアソーム活性を介して変性タンパク質を分解することにより神経細胞の生存を誘導すると考えられてきた。私たちはCRAGが転写因子であるc-fos (AP1)を活性化して細胞の生存をさらに高める可能性を示した。CRAGは、転写因子AP1を活性化して、下流に位置するSulfiredoxinやSestrin2を誘導することにより抗酸化ストレスのシグナルを伝達している可能性が示された。さらに、CRAGが神経細胞の分化を誘導して、神経突起の進展と成熟に関与している可能性も示唆された。これらの結果より、CRAGは遺伝子治療分子として優れた特性を有していることが示された。さらにCRAGの生理的な役割を知るためにCRAG欠損マウスを樹立した。CRAG欠損マウスは生後3週齢で致死となることが判明し、様々な神経回路形成異常が観察され、神経発生においてきわめて重要なシグナル分子であることが示された。今後、CRAG欠損マウスの詳細な解析により、CRAGの生理的な役割および遺伝子治療分子としての整合性を示すことが期待できる。

一方、ミトコンドリアユビキチンリガーゼMITOLはALSの原因遺伝子産物であるmutant SOD1やポリグルタミン病の原因遺伝子産物であるpolyQと会合し、ユビキチン化することにより分解を促進し、毒性を回避することが明らかとなった。これらのことより、MITOLによるミトコンドリアの品質管理機構に関与していることが示された。

さらに、MITOLは、MAP1B-LC1およびMfn2を生理的基質としていることを見出した。さらなる詳細な解析により、MAP1B-LC1経路を介した新たなミトコンドリア機能不全による細胞死の分子メカニズムとMITOLによる防御機構、およびMITOLとMfn2を介した新たなミトコンドリアダイナミクス調節機構が明らかになりつつある。今後、MITOLマウスの詳細な機能解析により、ミトコンドリアの新たな役割が明らかになることが期待できる。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- (1). Sugiura, A., Yonashiro, R., Fukuda, T., Matsushita, N., Nagashima, S., Inatome, R., and Yanagi, S. A mitochondrial ubiquitin ligase MITOL controls cell toxicity of polyglutamine-expanded protein. *Mitochondrion* 11, 139-146 (2011)
- (2). Matsushita, N., Yonashiro, R., Ogata, Y., Sugiura, A., Nagashima, S., Fukuda, T., Inatome, R., and Yanagi, S. Distinct regulation of mitochondrial localization and stability of two human Sirt5 isoforms. *Genes Cells* 16, 190-202 (2011)
- (3). Kouchi, Z., Igarashi, T., Shibayama, N., Inanobe, S., Sakurai, K., Yamaguchi, H., Fukuda, T., Yanagi, S., Nakamura, Y., and Fukami, K. Phospholipase Cδ3 regulates RhoA/Rho kinase signaling and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 286, 8459-8471 (2011)
- (4). Fukuda, T., Sugita, S., Inatome, R., and Yanagi, S. CAMDI, a novel disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)-binding protein, is required for radial migration. *J. Biol. Chem.* 285, 40554-40561 (2010)
- (5). Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Hirao, A., Yanagi, S., Fukami, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E., and Ohtani, N. Intrinsic cooperation between p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>Waf1/Cip1</sup> in the onset of cellular senescence and tumor suppression *in vivo*. *Cancer Res.* 70, 9381-9390 (2010)
- (6). Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., Ogata, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., and Yanagi, S. Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced ROS generation. *Mol. Biol. Cell* 20, 4524-4530 (2009).
- (7). Morota, S., Månsson, R., Hansson, M.J., Kasuya, K., Shimazu, M., Hasegawa, E., Yanagi, S., Omi, A., Uchino, H., and Elmér, E. Evaluation of putative inhibitors of

mitochondrial permeability transition for brain disorders - specificity vs. toxicity. *Exp. Neurol.* 218, 353-362 (2009).

- (8). Kojima, M., Kezuka, Y., Nonaka, T., Hiragi, Y., Watanabe, T., Kimura, K., Takahashi, K., Yanagi, S., and Kihara, H. SxMDView: a three-dimensional graphics program for displaying force vectors *J. Synchrotron Radiat.* 15, 535-537 (2008).

[学会発表] (計 26 件)

- (1). Sugiura, A., Watanabe K., Inatome, R., Yanagi, S. A role of MITOL in the regulation of ER-mitochondria junction via Mfn2. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMEM) and The 10th Annual Conference of the Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), 2010, 12/16, Fukuoka, Japan
- (2). 遠藤雄二郎、松下暢子、菊間啓太、太田莉英子、稲留涼子、柳 茂 : ファンconi 貧血経路 (FA 経路) の解析 Analysis of the Fanconi anemia pathway. BMB 2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010, 12/8, 神戸
- (3). 柳澤香菜、福田敏史、服部 晶、稲留涼子、柳 茂 : CAMDI ノックアウトマウスの解析 of CAMDI knockout mouse. BMB 2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010, 12/8, 神戸
- (4). 井上晴満、福田敏史、角 千春、稲留涼子、柳 茂 : CAMDI のエンドサイトーシスとリサイクリングにおける機能解析 Functional analysis of CAMDI with endocytosis and recycling. BMB 2010 第

33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010, 12/8, 神戸

- (5). 長島 駿、福田敏史、岩瀬彩香、三浦恒平、稲留涼子、柳 茂 : CRAG によるポリグルタミン病遺伝子治療の分子メカニズム Molecular mechanism of CRAG gene therapy for polyglutamine disease. BMB 2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010, 12/7, 12/8, 神戸
- (6). 渡辺香林、杉浦 歩、柳 茂 : MITOL による Mfn2 の制御機構の解析 Analysis of regulatory mechanism of Mfn2 by MITOL. BMB 2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010, 12/8, 神戸
- (7). 杉浦 歩、渡辺香林、吉田有里、柳 茂 : ER-ミトコンドリア接着点における MITOL の機能解析 The functional analysis of MITOL at the ER-mitochondria junction BMB 2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010, 12/8, 神戸
- (8). 與那城亮、川口浩平、志村卓哉、長谷川江里香、稲留涼子、柳 茂 : ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL による S-ニトロシル化 LC1 のユビキチン化. BMB 2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 2010, 12/9, 神戸
- (9). 福田敏史、杉田智子、稲留涼子、柳 茂 : 新規 DISC1 結合蛋白質 CAMDI による神経細胞移動の制御機構の解析 Neuro 2010 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会. 2010, 9/2, 神戸
- (10). 柳 茂 : 神経細胞移動における中心体動

- 態 第 2 回中心体研究会. 2010, 6/26, 東京
- (11). 福田敏史、柳 茂 : 新規 DISC1 結合蛋白質 CAMDI による Myosin II 依存的な中心体の制御を介した大脳皮質形成機構の解析 第 82 回日本生化学会大会合同大会. 2009, 10/22, 神戸
- (12). 窪田有花、長島 駿、楊 立偉、柳澤香菜、井上晴満、角 千春、稲留涼子、福田敏史、柳 茂 : 新規 GTPase タンパク CRAG による公算機構の解明 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009, 12/9, 横浜
- (13). 君嶋悠矢、杉浦 歩、長谷川江里香、渡辺香林、遠藤雄二郎、松下暢子、與那城亮、柳 茂 : ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL によるミトコンドリアダイナミクスの制御 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009, 12/10, 横浜
- (14). 福田敏史、杉田智子、稲留涼子、柳 茂 : 新規 DISC1 結合蛋白質 CAMDI による中心体成熟と神経細胞移動の制御 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009, 12/10, 横浜
- (15). 杉田智子、福田敏史、稲留涼子、柳 茂 : 新規 DISC1 結合蛋白質 CAMDI による大脳皮質神経細胞移動の制御機構の解析 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009, 12/10, 横浜
- (16). 與那城亮、君嶋悠矢、杉浦 歩、柳 茂 : ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL によるミトコンドリアダイナミクス 第 9 回日本ミトコンドリア学会年会. 2009, 12/18, 東京
- (17). 尾形佳靖、稲垣俊一、杉田智子、松下暢子、柳 茂 : SIRT5 の安定性と細胞内局在は愛想フォーム特異的な C 末端により決定する 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008, 12/9, 神戸
- (18). 松下暢子、大波正司、稲垣俊一、高田 穰、柳 茂 : ファンコニコア複合体による NF-kappaB 転写制御機構の解析 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008, 12/10, 神戸
- (19). 柳 茂、寅嶋 崇、平井宏和 : CRAG を用いたポリグルタミン病の遺伝子治療 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008, 12/11, 神戸
- (20). 長島 駿、窪田有花、寅嶋 崇、平井宏和、稲留涼子、福田敏史、柳 茂 : CRAG によるポリグルタミン病原因タンパクの分解機構 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008, 12/11, 神戸
- (21). 戸根卓磨、楊 立偉、安田惇一、井上英史、福田敏史、柳 茂 : 線虫 CRAG/Centaurin gamma ホモログ CNT-2 による発生制御と抗酸化機能 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008, 12/12, 神戸
- (22). 杉浦 歩、與那城亮、秋元拓也、君嶋悠矢、宮沢良太、柳 茂 : Mitochondrial Ubiquitin Ligase, MITOL の機能解析 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008, 12/12, 神戸
- (23). 君嶋悠矢、中川隆司、與那城亮、杉浦 歩、東ヶ崎健、加藤 薫、柳 茂 : ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL によるミトコンドリアダイナミクスの制御 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008, 12/12, 神戸

- (24). 秋元拓也、杉浦 歩、中川隆司、君嶋悠矢、與那城亮、柳 茂 : DT40 欠損細胞を用いた MITOL の機能解析 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008, 12/12, 神戸
- (25). Kojima, M., Morimoto, Y, Nakagawa, T., Yanagi, S., Kihara, H., and Nonaka, T Additivity, redundancy, and complementarity between structural information from NMR and SAXS data. IUCr 2008 (8/27), Osaka, Japan
- (26). 與那城亮、宮地美沙子、杉浦 歩、柳 茂: ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL は筋萎縮性側索硬化症原因蛋白質変異 SOD1 をユビキチン化する 第 60 回日本細胞生物学会大会. 2008, 7/1, 横浜

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳 茂 (YANAGI SHIGERU)  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：60252003

### (2) 研究分担者

松下 暢子 (MATSUSHITA NOBUKO)  
東京薬科大学・生命科学部・講師  
研究者番号：30333222  
福田 敏史 (FUKUDA TOSHIFUMI)  
東京薬科大学・生命科学部・助教  
研究者番号：50372313  
與那城 亮 (YONASHIRO RYO)  
東京薬科大学・生命科学部・助教  
研究者番号：60453809

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：