

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770109
 研究課題名（和文）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品質管理
 研究課題名（英文） A role of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL in mitochondrial quality control.
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：私たちが同定したミトコンドリア膜型ユビキチンリガーゼ、MITOL がミトコンドリアへ蓄積する異常タンパク質を除去しているかを調べた。モデルタンパク質として筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子の一つ変異 SOD1 を用いた。結果、変異 SOD1 を MITOL がユビキチン化、分解促進させ、変異 SOD1 のミトコンドリア毒性の一つである活性酸素種を、MITOL によって減少させることを明らかにした。以上の結果から MITOL がミトコンドリア品質管理に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have previously identified a novel mitochondrial ubiquitin ligase, MITOL, which is localized in the mitochondrial outer membrane and is involved in the control of mitochondrial dynamics. In this study, we examined whether MITOL eliminates misfolded proteins localized to mitochondria. Mutant superoxide dismutase1 (mSOD1), one of misfolded proteins, has been shown to localize in mitochondria and induce mitochondrial dysfunction, possibly involving in the onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis. We found that MITOL interacted with and ubiquitinated mSOD1. Moreover, MITOL overexpression promoted mSOD1 degradation and suppressed mSOD1-induced reactive oxygen species generation. Thus, our findings indicate that MITOL plays a protective role against mitochondrial dysfunction caused by the mitochondrial accumulation of mSOD1 via the ubiquitin-proteasome pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：細胞内タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患では変性タンパク質の蓄積が観察される。通常、このようなタンパク質は細胞内に備わっている品質管理機構によって再生及び消去が行なわれており、特に小胞体での品質管理機構が研究されている。しかしながら神経変性疾患の病態の一つとしてミトコンドリアへの変性タンパク質の蓄積及び障害が報告されているが、ミトコンドリア上での品質管理機構は報告されていない。

そこで私たちが同定したミトコンドリア膜型ユビキチンリガーゼ、MITOL がミトコンドリアにおいてミトコンドリア蓄積性変性タンパク質の消去機構に関与するかを調べた。

2. 研究の目的

MITOL がミトコンドリア毒性を有する変性タンパク質の消去機構、つまりミトコンドリア品質管理機構に関与するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子の一つ、変異 SOD1 がミトコンドリアへ蓄積する事でミトコンドリア障害を起こし、その病態に関与している事に着目し、モデル変性タンパク質として変異 SOD1 を用いて MITOL によるミトコンドリア品質管理機構を明らかにする。

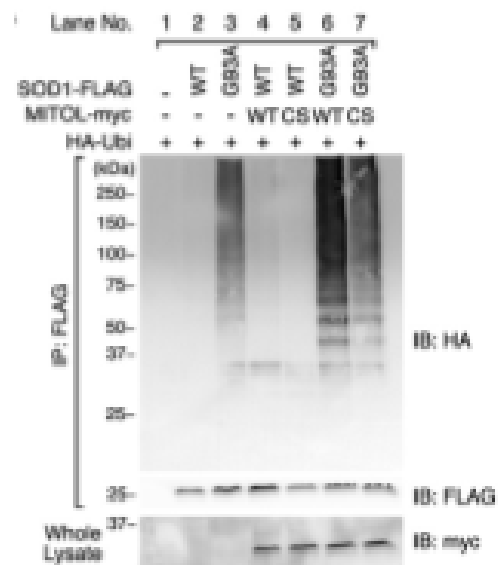
実験方法として MITOL による変異 SOD1 の分解促進、ユビキチン化及び毒性回避を一過性発現で調べる。同様に MITOL ノックダウン法においても調べる。変異 SOD1 のミトコンドリア毒性として活性酸素種の産生が報告されているので、MITOL 一過性発現、及びノックダウン法を用いて毒性を観察する。更に変異 SOD1 による細胞死を MITOL 依存的に回避するか、MTT アッセイ等を用いて計測する。

4. 研究成果

MITOL による変異 SOD1 のユビキチン化を調べるため、変異 SOD1 と MITOL を一過性発現させ、ミトコンドリア画分を採取し、ユビキチン化アッセイを実施したところ、MITOL 依存的に変異 SOD1 のユビキチン化レベルが亢進

していることが明らかとなった。また、変異 SOD1 には 100 種類以上の変異が報告されており、よく用いられる G93A の変異体 (SOD 活性有り) と別の変異体である G85R (SOD 活性無し) の両方ともユビキチン化し、分解促進していることを明らかにした。対して野生型 SOD1 に関してはユビキチン化しないことが明らかとなった。(図 1)

図 1



この結果より、MITOL は変異 SOD1 特異的に認識し、ユビキチン化することが明らかとなった。

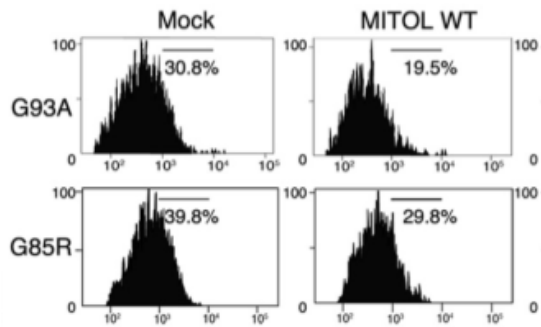
更に MITOL ノックダウン法で同様の実験を実施したところ、一過性発現とは反対に変異 SOD1 のユビキチン化の減少及び分解遅延が観察された。

次に変異 SOD1 がミトコンドリアに蓄積する事によって活性酸素種 (ROS) の産生が報告されているので、MITOL によって変異 SOD1 の毒性を減少させることができるかを確認したところ、MITOL 依存的に ROS の産生が抑制されていることが明らかとなった。(図 2)

また MITOL ノックダウンにおいては変異 SOD1 による ROS の増加が確認された。この結果と一致して、MITOL 一過性発現によって、変異 SOD1 による細胞死が抑制され、反対に MITOL

ノックダウンによって変異 SOD1 の毒性による細胞死の増加が確認された。

図 2



以上の実験結果より、MITOL は変異 SOD1 を特異的にユビキチン化し、消去している事を明らかにした。よって、MITOL はミトコンドリア上で変性タンパク質を認識、分解し、ミトコンドリア品質管理機構に関与している可能性を本研究で明らかにした。

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 1 件)

- ①. 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(21), 4524-4530 (2009)

[学会発表] (計 8 件)

- ①. 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
Ryo Yonashiro, Yuya Kimijima, Ayumu Sugiura, and Shigeru Yanagi : Role of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL in mitochondrial dynamics.
- ②. 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

Yuya Kimijima, Ayumu Sugiura, Erika Hasegawa, Karin Watanabe, Yujiro Endoh, Nobuko Matsushita, Ryo Yonashiro, and Shigeru Yanagi : Mitochondrial ubiquitin ligase, MITOL play a role in mitochondrial dynamics.

- ③. Ayumu Sugiura, Ryo Yonashiro, Misako Miyachi, Yoshinobu Ogata, and Shigeru Yanagi. Degradation of expanded polyglutamine protein by mitochondrial ubiquitin ligase MITOL The 7th Annual Conference of the Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, 2008, 12/21, Kagoshima, Japan
杉浦 歩、與那城 亮、宮地 美沙子、尾形 佳靖、柳 茂 : MITOL, mitochondrial ubiquitin ligase によるミトコンドリア品質管理日本ミトコンドリア学会 第 7 回年会
- ④. Ryo Yonashiro, Ayumu Sugiura, Takuya Akimoto, Toshifumi Fukuda, Nobuko Matsushita, and Shigeru Yanagi. MITOL, a novel mitochondrial ubiquitin ligase, ubiquitinates mutant SOD1 which causes amyotrophic lateral sclerosis The 7th Annual Conference of the Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, 2008, 12/21, Kagoshima, Japan
與那城 亮、杉浦 歩、秋元 拓也、福田 敏史、松下 暢子、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品質管理機構日本ミトコンドリア学会 第 7 回年会
- ⑤. 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
- ⑥. 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
- ⑦. 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

- ⑧. 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：