

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32606  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20H03454  
研究課題名（和文）MITOLによるミトコンドリア機能制御と疾患  
  
研究課題名（英文）Mitochondrial regulation by MITOL and diseases  
  
研究代表者  
柳 茂（Yanagi, Shigeru）  
  
学習院大学・理学部・教授  
  
研究者番号：60252003  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの破綻はエネルギー産生の低下や活性酸素種の慢性的に漏出を引き起こし、神経変性疾患や心疾患など老化に関連した病態を誘発する。私たちはミトコンドリア外膜に局在するE3ユビキチンリガーゼMITOLを発見し、MITOLがミトコンドリアダイナミクスを制御していることなどを報告してきた。今回、MITOLがアルツハイマー病、パーキンソン病、心不全の病態に密接に関与していることを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、私たちはアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患や心不全などの病態にミトコンドリアの機能不全が密接に関与していることを明らかにすることができました。また、MITOLを欠損した様々な老化モデルマウスの作出することができました。これらの老化モデルマウスを解析することにより、今後、老化の分子メカニズムの解明が期待されます。さらに、MITOLやミトコンドリアを標的とした創薬開発が期待されます。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial disruption leads to reduced energy production and chronic leakage of reactive oxygen species, triggering age-related pathologies such as neurodegenerative diseases and cardiac disorders. We have previously identified the E3 ubiquitin ligase MITOL, which localizes to the mitochondrial outer membrane, and reported that MITOL regulates mitochondrial dynamics. In the study, we found that MITOL is closely involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease and heart failure.

研究分野：生化学

キーワード：ミトコンドリア ユビキチンリガーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアダイナミクスとは、ミトコンドリアの融合・分裂による形態制御、ミトコンドリアの移動、小胞体などの他のオルガネラとの相互作用を包括する機能的概念である。これまでのミトコンドリアダイナミクスの研究は、主に分裂因子や融合因子によるミトコンドリアの形態制御機構に焦点が当てられてきた。一方、近年のイメージング解析技術の進歩により、微小管を中心とした細胞骨格に沿ったミトコンドリアの動的な移動や、小胞体などの他のオルガネラとの会合と解離現象が見いだされ、その制御機構と生理的重要性が注目されている。ミトコンドリアダイナミクスの破綻は神経疾患などさまざまな病態を引き起こすことが知られており、詳細な分子メカニズムの解明は病態解明と治療法開発に向けての急務な研究課題である。

私たちはこれまでミトコンドリア外膜を4回貫通する新規膜型ユビキチンリガーゼ MITOL を発見し (EMBO J. 2006) MITOL が分裂因子である Drp1 を制御することによりミトコンドリアダイナミクスを調節していること、および MITOL がミトコンドリアに蓄積する変性タンパク質の分解を促進することより、ミトコンドリアの品質管理機構に関与していることを示した (Mol. Biol. Chem. 2009, Mitochondrion 2010)。最近、MITOL が一酸化窒素によってS-ニトロ化された MAP1B-LC1 を特異的に認識し、ユビキチン・プロテアソーム経路を介して分解を促進することにより、MAP1B-LC1 の過剰蓄積によるミトコンドリア機能不全を防御していることを明らかにし、ミトコンドリアによる新しい酸化ストレス防御機構を示唆した (PNAS 2012)。さらに最近、MITOL が Mitofusin2 を活性化することにより、ミトコンドリアと小胞体との接着構造とカルシウム動態を制御していることを見出した (下図、Mol. Cell 2013)。このように MITOL はミトコンドリアの機能維持に必須の役割を果たす重要な酵素であり、MITOL の機能解析によりミトコンドリアの新機能や疾患との関連性の解明が期待された。

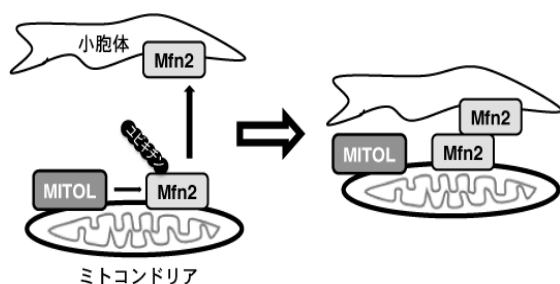


図 MITOL による小胞体-ミトコンドリア接着の制御モデル

MITOL はミトコンドリアの Mfn2 をユビキチン化し活性化する。Mfn2 は小胞体膜の Mfn2 と結合し、高分子量複合体を形成しミトコンドリアと小胞体が接着する。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病やパーキンソン病など多くの神経変性疾患の病態において、酸化ストレスによるミトコンドリア機能不全が原因の一つとされていたが、そのメカニズムはよくわかっていなかった。私たちの研究成果は、MITOL を介して神経細胞死を防ぐミトコンドリアの新しい役割を示すと共に (PNAS 2012) アルツハイマー病やパーキンソン病など、酸化ストレスによって引き起こされる神経疾患の病態解明と治療法開発に新たな視点を提供する。また、MITOL によって活性化される Mfn2 は、その遺伝子変異が神経難病であるシャルコー・マリー・トゥース病の原因のひとつとなることから、機能制御機構の解明が期待されていた。MITOL の研究により、Mfn2 の活性化の機構が明らかになり、シャルコー・マリー・トゥースの病態の解明につながることを期待できる。さらに、ミトコンドリアと小胞体との接着部位は脂質の生合成や  $Ca^{2+}$  の受け渡しなど細胞機能において重要な役割をはたしており、この機能の破綻はアルツハイマー病をはじめさまざまな神経変性疾患に密接に関与していることがこれまで多く報告されている。したがって、ミトコンドリアと小胞体との接着の機構を解明することにより、関連する多くの疾患の病態の理解と治療法の開発につながることを期待される。本研究の目的は、MITOL の新たなミトコンドリア機能制御機構を解明すると共に、各種臓器特異的欠損マウスの解析を通して MITOL と疾患との関連との関連を明らかにすることである。特に、パーキンソン病とアルツハイマー病及び心不全の病態における MITOL の役割を明らかにする。さらにその成果を活かして MITOL を標的にしてミトコンドリア機能の保護や賦活化する技術や薬剤の開発研究を目指す。

## 3. 研究の方法

A. アルツハイマー病における MITOL の役割を解明する。アルツハイマー病の患者脳において MAM の形成異常が観察されたことより、アルツハイマー病と MAM の関連が注目を集めている。MAM とアルツハイマー病の関連を明らかにするために、アルツハイマー病の原因の一つであるアミ

ロイド 42 が異常に発現するマウス (APP マウス : 変異型 APP<sup>swe</sup> と 9 番目のエクソンを欠損した presenilin 1 を発現したマウス) と MITOL-eKO をかけあわせて作製した APP-MITOL-eKO の解析を行う。APP-MITOL-eKO はアルツハイマー病の患者脳と同様にアルツハイマー病の原因となる変異型 APP が蓄積するが、MAM は減少する。MAM の減少により、APP-MITOL-eKO の病態が改善するか増悪するかを検討することで、アルツハイマー病における MAM の役割を解明できると考える。MAM の減少により、APP-MITOL-eKO の病態が改善するか増悪するかを検討することで、アルツハイマー病における MAM の役割を解明できると考える。MAM とアルツハイマー病の関連に主眼を置いて解析を行う。APP-MITOL-eKO が神経細胞死などアルツハイマー病の所見を示すかを組織学的に解析する。マウスの記憶などの行動テストを行い、APP-MITOL-Eco の認知機能を検証する。

B. パーキンソン病の原因遺伝子産物である Parkin に着目し、MITOL と Parkin との関連を明らかにする。パーキンソン病患者脳の黒質・線条体領域においてミトコンドリア機能の低下が主病因の一つと考えられているが、分子病態についても未だ不明な点が多い。パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin が細胞死を誘導すること、その抑制系として MITOL が Parkin を分解することの生理的意義を解明する。さらに、Parkin 誘導性細胞死の実態と Parkin 誘導性細胞死の抑制経路を分子および個体レベルで解明する。

C. 心筋特異的 MITOL 欠損マウスを用いて心不全の病態を詳細に観察する。予備の実験よりマウス心臓は心不全を発症し、さらにミトコンドリアの断片化と機能不全が観察された。これらの結果から、MITOL の基質である Drp1 と心不全病態の関連が示唆された。そこで Drp1 によるミトコンドリア断片化が起きているかどうかを Western blotting 法、電子顕微鏡観察を用いて解析する。また、Drp1 特異的阻害剤によるレスキュー実験を行う。Drp1 の特異的阻害剤をマウス腹腔内注射し心不全が回復するか、もしくは程度が弱いかを観察する。

D. ケラチノサイト特異的 MITOL 欠損マウスを用いて老化所見について病理解析を詳細に行う。老化マーカーを用いた老化の診断 ( ガラクトシダーゼ染色・テロメア DNA の短縮 の有無の測定) 皮脂腺の増加・表皮の肥厚・細胞死の増加については詳細に再現性を確認し、統計処理を行う。細胞レベルでの確認。細胞培養を用いて MITOL 機能抑制による老化現象の再現を確認する。また、MITOL の過剰発現により老化が抑制されるかどうかについて培養細胞を用いて確認する。老化が抑制された場合は MITOL 過剰発現トランスジェニックマウスを作製して、老化抑制効果を確認する。

#### 4. 研究成果

A. アルツハイマー病ではアミロイド (A $\beta$ ) と呼ばれるタンパク質の異常な凝集が引き金となって神経細胞死が誘導されると考えられているが、脳内で A $\beta$  凝集がどのように制御されるかについては未だよく理解されていない。私たちは、アルツハイマー病において A $\beta$  凝集がミトコンドリアを介して制御されることを明らかにした (Takeda et al., *Commun Biol* 2021)。本研究では、アルツハイマー病モデルマウスを用いて、ミトコンドリア機能の低下により、毒性の高い A $\beta$  オリゴマーが蓄積し、アルツハイマー病態が悪化することを明らかにすると共に、ミトコンドリア機能の低下によって A $\beta$  オリゴマーが産生されるメカニズムとして、脳に沈着する A $\beta$  線維の変容が重要な役割を果たすことを示した。これまで A $\beta$  線維は、線維自身が A $\beta$  凝集の足場となることが知られていたが、ミトコンドリアの機能が低下した脳内において、A $\beta$  線維は A $\beta$  凝集、特に A $\beta$  オリゴマーの形成を強く誘導することが明らかとなった。したがって、加齢に伴う MITOL の機能低下が、アルツハイマー病の増悪を引き起こしている可能性が強く示唆された。

B. ミトコンドリアの機能低下は、パーキンソン病などの神経変性疾患をはじめとする様々な疾患の原因になることが明らかとなっている。正常な細胞は、損傷や老化により機能が低下したミトコンドリアをマイトファジーと呼ばれる選択的な除去するシステムを用いて細胞を保護している。パーキンソン病原因遺伝子産物として知られている Parkin は、マイトファジーの調節に重要な役割を果たしており、Parkin の機能欠失によって機能低下した不良ミトコンドリアが蓄積し、パーキンソン病の発症につながると考えられている。一方、マイトファジーの進行途中で Parkin が細胞死を誘導することや孤発性パーキンソン病患者脳において Parkin が蓄積していることが報告されている。今回、私たちは、ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL がパーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin をミトコンドリア外膜上において特異的にユビキチン化して分解を誘導することを見出した。MITOL の機能が低下した場合、マイトファジーの際に Parkin が小胞体上で FKBP38 を分解し細胞死を引き起こすことを明らかにしました。一方で、MITOL が正常に機能している場合は、Parkin により機能低下したミトコンドリアの除去を妨げないよう、MITOL が Parkin を分解し FKBP38 を保護していることを見出した。この知見により、現在パーキンソン病の病態メカニズムの一部として世界中で支持される「損傷ミトコンドリアの蓄積による病態発症モデル」に加え、新たに「パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin の過剰蓄積による病態発症モデル」を提唱した (Shiiba et al., *EMBO Rep* 2021)。孤発性パーキンソン病患者脳において、パーキンの過剰活性化の可能性が報告されているので、孤発性パーキンソン病に対し

て MITOL を標的とした新たな治療戦略が期待される。

C. 心臓特異的 MITOL 欠損マウスを作製したところ、Drp1 の蓄積によるミトコンドリアの断片化が顕著に亢進しており、心筋老化を示す  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ染色領域の拡大と線維化の亢進が認められた。最終的にこのマウスは心不全を発症し、半年以内に全て死に至っている。Drp1 阻害剤の腹腔投与により、心臓老化の表現型が部分的にレスキューされたことから、MITOL の機能低下が Drp1 の蓄積によるミトコンドリアダイナミクスの破綻を誘発し、心臓老化を引き起こすことが示唆された (Tokuyama et al., iScience 2022)。さらに、ウイルスベクターを用いて MITOL 遺伝子を人為的に心筋に導入したところ、心機能障害が顕著に改善されたことから MITOL の発現上昇を誘導する薬剤は、虚血性心疾患や心臓老化による心不全の予防・治療薬になることが期待できる。

D. ケラチノサイト特異的 MITOL 欠損マウスを作出したところ、生後 6 ヶ月頃から顕著な白髪・脱毛・皮膚炎症が認められ、病理組織解析においても皮脂腺の増加・表皮の肥厚など皮膚の老化所見が観察された。このように MITOL の皮膚特異的欠損マウスはそれぞれの皮膚老化を反映した良い老化モデルマウスとして利用できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ito Naoki, Takahashi Takara, Shiiba Isshin, Nagashima Shun, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru   | 4. 巻<br>171             |
| 2. 論文標題<br>MITOL regulates phosphatidic acid-binding activity of RMDN3/PTPIP51  | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Biochemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>529-541   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/jb/mvab153  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Matsuno Keigo, Nagashima Shun, Shiiba Isshin, Taniwaka Keito, Takeda Keisuke, Tokuyama Takeshi, Ito Naoki, Matsushita Nobuko, Fukuda Toshifumi, Ishido Satoshi, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru | 4. 巻<br>168             |
| 2. 論文標題<br>MITOL dysfunction causes dwarfism with anterior pituitary hypoplasia   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Biochemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>305 ~ 312 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/jb/mvaa050  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Shiiba Isshin, Takeda Keisuke, Nagashima Shun, Ito Naoki, Tokuyama Takeshi, Yamashita Shun Ichi, Kanki Tomotake, Komatsu Toru, Urano Yasuteru, Fujikawa Yuuta, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru  | 4. 巻<br>22              |
| 2. 論文標題<br>MITOL promotes cell survival by degrading Parkin during mitophagy  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>EMBO Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>e49097    |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.15252/embr.201949097   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Takeda Keisuke, Uda Aoi, Mitsubori Mikihiro, Nagashima Shun, Iwasaki Hiroko, Ito Naoki, Shiiba Isshin, Ishido Satoshi, Matsuoka Masaaki, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru                        | 4. 巻<br>4               |
| 2. 論文標題<br>Mitochondrial ubiquitin ligase alleviates Alzheimer 's disease pathology via blocking the toxic amyloid- oligomer generation   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>192       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s42003-021-01720-2  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Mitsubori Mikihiro, Takeda Keisuke, Nagashima Shun, Ishido Satoshi, Matsuoka Masaaki, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru | 4. 巻<br>549           |
| 2. 論文標題<br>Identification of highest neurotoxic amyloid- plaque type showing reduced contact with astrocytes                  | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>67 ~ 74 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2021.02.081  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Tokuyama Takeshi, Uosaki H, Sugiura A, Nishitai G, Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Ito N, Amo T, Mohri S, Nishimura A, Nishida M, Konno A, Hirai H, Ishido S, Yoshizawa T, Shindo T, Takada S, Kinugawa S, Inatome R, Yanagi S | 4. 巻<br>25                    |
| 2. 論文標題<br>Protective roles of MITOL against myocardial senescence and ischemic injury partly via Drp1 regulation   | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>iScience  | 6. 最初と最後の頁<br>104582 ~ 104582 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.isci.2022.104582  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Nagashima Shun, Ito Naoki, Kobayashi Reiki, Shiiba Isshin, Shimura Hiroki, Fukuda Toshifumi, Hagihara Hideo, Miyakawa Tsuyoshi, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru | 4. 巻<br>296                   |
| 2. 論文標題<br>Forebrain-specific deficiency of the GTPase CRAG/Centaurin- 3 leads to immature dentate gyri and hyperactivity in mice                                       | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>100620 ~ 100620 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jbc.2021.100620   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|