

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650195

研究課題名（和文） ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL による酸化ストレス防御機構

研究課題名（英文） Role of MITOL in mitochondrial function and oxidative stress signaling.

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）：新規の膜型ユビキチンリガーゼ MITOL はミトコンドリアに局在するユニークなユビキチンリガーゼであり、ミトコンドリアにおける機能が注目されている。本研究プロジェクトにおいて、MITOL の生理的基質を探索した結果、微小管関連タンパク質 MAP1B-light chain1 (LC1) を同定することに成功した (PNAS 2012)。MITOL が神経細胞において一酸化窒素によって S-ニトロ化された 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、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見出し、ミトコンドリアによる新しい酸化ストレスに防御機構の存在を示唆した。さらに、MITOL が mitofusin2 (Mfn2) を介してミトコンドリアと小胞体との接着に関与していることを明らかにした (Mol. Cell 2012)。酸化ストレス反応におけるミトコンドリアと小胞体との情報伝達系の重要性が示唆されており、今後 MITOL を介した新たな酸化ストレス防御機構の発見が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We previously identified a novel mitochondrial ubiquitin ligase called MITOL. MITOL has been shown to control mitochondrial dynamics by regulating mitochondrial fission factors such as Drp1 (EMBO J 2006). In this research project, we found that MITOL protects neuronal cells from mitochondrial damage caused by accumulation of MAP1B-light chain 1 (PNAS 2012). Therefore, MITOL is involved in mitochondrial dynamics, mitochondrial quality control, and protection against oxidative stress. Most recently, we found that MITOL regulates ER-mitochondria interaction by controlling Mfn2 activity (Mol Cell 2013). These results suggest that MITOL plays a critical role in mitochondrial regulation and oxidative signaling. Further investigations may shed light on new protective role of MITOL against oxidative stresses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：

キーワード：ミトコンドリア、ユビキチンリガーゼ、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

私たちはミトコンドリア外膜を4回貫通する新規の膜型ユビキチンリガーゼを世界に先駆けて発見し、MITOL と命名した (EMBO J. 2006)。MITOL はミトコンドリアに特異的に局

在することが報告されている唯一のユビキチンリガーゼであり、その機能が注目されている。私たちは最初に MITOL がミトコンドリアの分裂因子である DRP1 を基質にすることにより、ミトコンドリアの融合と分裂を制御

することを報告した (EMBO J. 2006)。さらに、最近、MITOL がミトコンドリアにおいて、変性タンパク質を分解することを発表した (Mol. Biol. Cell, 2009, Mitochondrion 2010)。このように MITOL はミトコンドリアの機能発現と細胞の生存においてきわめて重要な酵素であるが、その分子メカニズムはいまだ不明な点が多い。今回、MITOL の基質として MAP1B-light chain 1 (LC1) が同定され、MITOL が一酸化窒素による酸化ストレスからミトコンドリアを保護している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) MITOL が酸化ストレスによる神経変性疾患の病態にどのように関連しているかを明らかにする。

(2) MITOL の新たな基質を同定し、ミトコンドリア機能における役割と酸化ストレス反応における役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) MITOL の基質として同定された LC1 に焦点を当て、MITOL による LC1 の分解機構とその破綻による病態について生化学・細胞生物学的手法にて解析する。

(2) MITOL 欠損マウスは致死であったため、MITOL の conditional knockout mice を作製し解析を行う。

(3) MITOL の新規基質を同定するために、酵母ツーハイブリッド法などを用いてスクリーニングし、同定された基質についてミトコンドリア機能調節における役割を明らかにして、酸化ストレス防御機構との関連性を検討する。

4. 研究成果

(1) MITOL による MAP1B-LC1 と生理的意義

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経疾患の発症において、酸化ストレスによるミトコンドリアの機能低下が原因として注目されていたが、酸化ストレスがどのようにしてミトコンドリアの障害を引き起こすか不明であった。また、その防御機構の存在についても知られていなかった。私たちは酸化ストレスによってミトコンドリアがダメージを受けるメカニズムを明らかにし、ミトコンドリア上に存在するユビキチンリガーゼ MITOL という酵素が、酸化ストレスからミトコンドリアを保護していること、MITOL による防御機構の破綻が神経細胞死を誘導することを発見した。微小管関連タンパク質の一

つである MAP1B は、一酸化窒素による酸化修飾を受けてミトコンドリアに過剰に蓄積すると、ミトコンドリアの形態異常を伴うミトコンドリアの機能不全を引き起こすことがわかった。通常、ミトコンドリアは MITOL を仲介して MAP1B の分解を促すことによって、ミトコンドリアの機能を正常に保っているが、過剰な一酸化窒素に晒されると MITOL の酵素活性が低下もしくは消失し、その結果、MAP1B 蓄積によるミトコンドリアの機能低下とそれに伴う神経細胞死が誘導されることがわかった。これらの研究成果は、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、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理解に新たな視点を提供する。

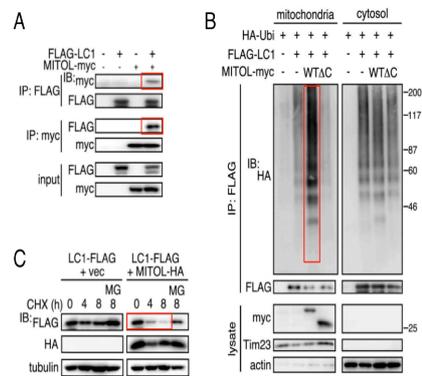


図 1. MITOL は MAP1B-LC1 にユビキチンを付加し分解を促進する

(A) MITOL と LC1 の会合を免疫沈降法で確認。両者は特異的に会合する (赤枠)

(B) MITOL による MAP1B-LC1 のユビキチン化。MAP1B-LC1 は MITOL (WT) によって特異的にユビキチン化される (赤枠)。MITOL の基質認識部位欠失 (ΔC) ではユビキチン化できない。

(C) MITOL による MAP1B-LC1 の分解が促進された。タンパク質分解の場であるプロテアソームを阻害 (MG) すると分解が抑制される。

(Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA より転載)

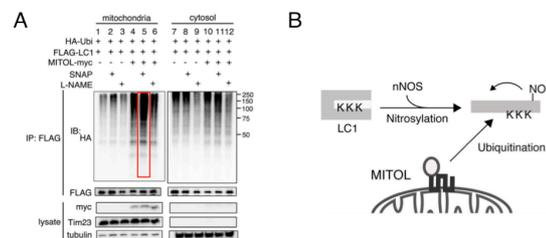


図 2. MITOL は酸化された MAP1B-LC1 を特異的に認識しユビキチン化する

(A) 一酸化窒素を供与すると (SNAP)、MITOL による MAP1B-LC1 のユビキチン化が亢進する (赤枠)。

(B)一酸化窒素による酸化修飾と MITOL による基質認識メカニズム。MAP1B-LC1 は一酸化窒素合成酵素 (nNOS) により生じる一酸化窒素によって酸化修飾を受けると、構造変化を起こしユビキチン化部位が露出される。その結果、MITOL によるユビキチン化が可能となる。

(Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA より転載)

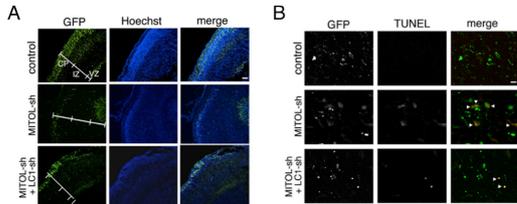


図 3. マウス大脳皮質で MITOL を抑制すると神経細胞移動の異常と神経細胞死が起こる

(A)マウス大脳皮質で MITOL をノックダウンすると正常 (control) と比較して神経細胞移動が遅れる。さらに MITOL と MAP1B-LC1 の両方を同時にノックダウンすると神経細胞移動が正常に戻る。

(B) (A) と同じ条件で神経細胞死を観察。MITOL をノックダウンすると神経細胞死 (TUNEL 陽性細胞) が増加し、MITOL と MAP1B-LC1 の両方を同時にノックダウンすると神経細胞死が抑制される。このことは、MITOL ノックダウンによる細胞死が MAP1B-LC1 の蓄積によって引き起こされることを意味する。

(Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA より転載)

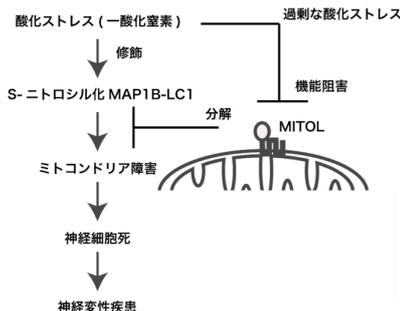


図 4. MITOL によるミトコンドリア防御機構およびその破綻による神経変性疾患の発症仮説

通常状態において、MITOL は酸化型 MAP1B-LC1 を分解することによりミトコンドリア機能を正常に維持している。しかし、過剰な酸化ストレスに晒されると MITOL 自身の酵素活性が低下もしくは消失し、MAP1B-LC1 の蓄積によるミトコンドリア障害が起こる。その結果、神経細胞死が引き起こされることが、アルツ

ハイマー病やパーキンソン病が発症する一因となると考えられる。

(2) MITOL による Mfn2 を介した ER-ミトコンドリア間の接着制御機構

ミトコンドリアは、小胞体と近接することによってカルシウムの受け渡しや脂質代謝の効率性を高めて細胞機能を正常に維持している。Mfn2 は、ミトコンドリアと小胞体の両方に局在して、お互いに手を繋ぐことにより両オルガネラの接着を仲介しているが、その活性制御機構は不明であった。私たちは MITOL がミトコンドリアに局在する Mfn2 の 192 番目のリジン残基を特異的に K63 結合型ポリユビキチン化することにより、Mfn2 の GTP 結合能を上昇させて Mfn2 の重合化と複合体形成を誘導し、MAM を形成することを示した。実際に MITOL の機能低下によって Mfn2 の活性化が抑制されると MAM 形成に異常が生じ、小胞体からミトコンドリアへのカルシウム流入が著しく減弱することが観察される。本研究結果は、Mfn2 遺伝子の変異により発症することが知られている遺伝性末梢神経疾患シャルコー・マリー・トゥース病のみならず、アルツハイマー病などのさまざまな神経変性疾患の機序解明への糸口になることが期待される。

①MITOL は Mfn2 をユビキチン化し Mfn2 を活性化する

MITOL がミトコンドリアと小胞体の接着点である MAM にも局在していることを解明したため、Mfn2 との会合について解析を行ったところ、MITOL は小胞体に局在する Mfn2 ではなく、ミトコンドリアに局在する Mfn2 と会合してユビキチン化することがわかった (図 5)。

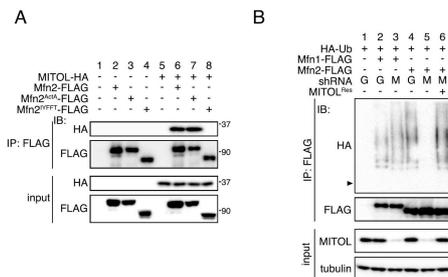


図 5 MITOL は Mfn2 と結合しユビキチン化する

(A)MITOL は小胞体ではなくミトコンドリアの Mfn2 と結合する。

(Mfn2^{ActA} と Mfn2^{LYFF} はそれぞれ、ミトコンドリアおよび小胞体へのターゲットシグナルである)

(B)MITOL を抑制した細胞において Mfn2 のユビキチン化が減弱する。

(M : MITOL の発現を抑制した HeLa 細胞、G : コントロール)

(Sugiura. et al.: Mol. Cell, 2013 より転載)

結合部位を詳細に調べた結果、MITOL の基質認識領域である C 末端が Mfn2 の HR1 ドメインと特異的に認識して結合することがわかった。MITOL はミトコンドリアに局在する Mfn2 をユビキチン化するが、意外なことに、MITOL による Mfn2 のユビキチン化は、Mfn2 の分解を促進するのではなく、Mfn2 の GTP 結合能力を上昇させて Mfn2 を活性化し、Mfn2 の重合を誘導することがわかった (図 6)。

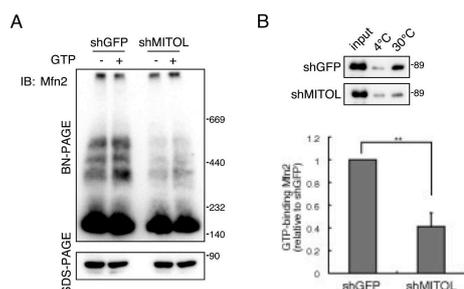


図 6 MITOL は Mfn2 の重合を促進する
 (A)MITOL を抑制した細胞において Mfn2 の重合化と複合体形成が抑制される (Blue-Native PAGE 解析)。
 (B)MITOL を抑制した細胞において Mfn2 の GTP 結合能が減少する。
 (shMITOL : MITOL の発現を抑制した HeLa 細胞、shGFP : コントロール)
 (Sugiura. et al.: Mol. Cell, 2013 より転載)

MITOL の機能を抑制すると Mfn2 の活性化が抑制されて Mfn2 の重合を阻害することが示された。

②MITOL の機能抑制によりミトコンドリアと小胞体の接着形成が抑制される

MITOL の発現を安抑制した HeLa 細胞 (shMITOL) において、小胞体とミトコンドリアの接着領域 MAM が有意に減少することが確かめられた (図 7A)。また、ヒスタミン刺激後のミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度の変化を観察したところ、shMITOL ではコントロール細胞に比べてカルシウムイオン濃度の上昇が著しく抑制されることを見出した (図 7B)。ミトコンドリアのカルシウム取り込みに対する感受性は鈍いので、効率よく取り込むためには、MAM を形成して小胞体のカルシウム吹き出し口に近接する必要がある。したがって、shMITOL では Mfn2 の複合体形成ができないために MAM の形成不全が起こり、ミトコンドリアが小胞体から効率よくカルシウムを取り込めなかったと考えられる。

③MITOL による Mfn2 の制御機構モデル

MITOL による Mfn2 の活性化を介した小胞体とミトコンドリアの接着制御という新たなモデルを提唱した (図 7C)。MITOL はミトコンドリアに局在する Mfn2 と会合して Mfn2 の 192 番目のリジンを特異的にポリユビキチン化する。ポリユビキチン化された Mfn2 は GTP 結合能力が上昇して活性化し、Mfn2 の重合と複合体形成を起こし、その結果、ミトコンドリアの Mfn2 と小胞体の Mfn2 が手を繋ぐことによってミトコンドリアと小胞体の接着が起こる。

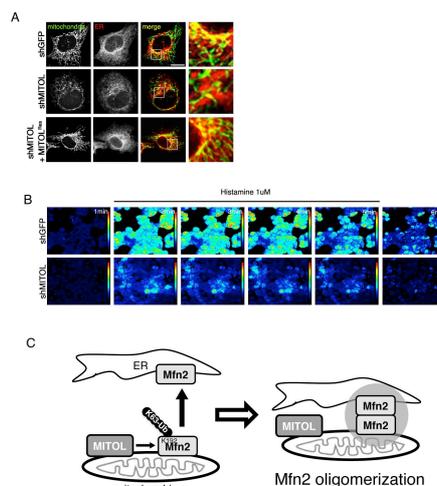


図 7 MITOL による小胞体-ミトコンドリア相互作用の制御機構

(A)MITOL 発現抑制によりミトコンドリア (緑) と小胞体 (赤) の接着 (黄) が阻害された。
 (B)MITOL 発現抑制によりヒスタミン 1uM で刺激後のミトコンドリアのカルシウムイオン (Xrhod-2 により標識) の取り込み量が低下した。
 (C)MITOL による Mfn2 を介した小胞体-ミトコンドリア接着の制御機構モデル。MITOL がミトコンドリアの Mfn2 をユビキチン化し活性化する。Mfn2 は小胞体膜の Mfn2 と手をつなぎ、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。
 (Sugiura. et al.: Mol. Cell, 2013 より転載)

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 4 件)

- (1) Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H. M., Fukuda, T., Matsushita, T., Inatome, R., and

Yanagi, S. MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2.

Mol. Cell 51, 1-15 (2013)

DOI:10.1016/j.molcel.2013.04.023

- (2) Yonashiro, R., Kimijima, Y., Shimura, T., Kawaguchi, K., Fukuda, T., Inatome, R., and **Yanagi, S.** Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL blocks S-nitrosylated MAP1B-light chain 1-mediated mitochondrial dysfunction and neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(7), 2382-2387 (2012)
DOI:10.1073/pnas.1114985109
- (3) Nagashima, S., Fukuda, T., Kubota, Y., Sugiura, A., Nakao, M., Inatome, R., and **Yanagi, S.** CRAG protects neuronal cells against cytotoxicity of expanded polyglutamine protein partially via c-fos-dependent AP-1 activation. *J. Biol. Chem.* 286(39), 33879-33889 (2011)
DOI:10.1074/jbc.M111.234997
- (4) Matsushita, N., Endo, Y., Sato, K., Kurumizaka, H., Yamashita, T., Takata, M., and **Yanagi, S.** Direct Inhibition of TNF- α promoter activity by Fanconi anemia. *PLoS ONE* 6(8): e23324 (2011)
DOI:10.1371/journal.pone.0023324

[学会発表] (計 16 件)

- (1) Yanagi, S. A critical role of CRAG in neuronal cell survival and possible use of CRAG as a gene therapy for neurodegenerative diseases. The 11th biennial meeting of Asian Pacific Society for Neurochemistry (APSN), the 55th Meeting of Japanese Society for Neurochemistry (JSN), Sym 10 "Recent progress in nerve degeneration research and its therapeutic application", 2012, 10/2, Kobe, Japan
- (2) 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機能調節と神経疾患 A role of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL in mitochondrial function and neurological disorder Neuro2012 第 35 回日本神経科学大会 シンポジウム「神経系のミトコンドリア疾患学」. 2012, 9/20, 名古屋
- (3) 杉浦 歩, 與那城亮, 長島 駿, 柳 茂: ミトコンドリアユビキチンリガーゼ

MITOL の機能解析 第 85 回日本生化学会大会 シンポジウム「ミトコンドリア応答性から見る細胞機能解析: ミトコンドリアの新しい視点」. 2012, 12/15, 福岡

- (4) 吉田有里, 徳山剛士, 稲留涼子, 長島駿, 石戸 聡, 柳 茂: MITOL 欠損が及ぼす細胞内への影響の解析. 第 86 回日本生化学会年会. 2012, 12/15, 福岡
- (5) 山崎絃子, 福田敏史, 柳 茂: CAMDI 遺伝子ノックアウトマウスにおける大脳皮質の解析. 第 86 回日本生化学会年会. 2012, 12/15, 福岡
- (6) Yanagi, S., Sugiura, A., Inatome, R., Yonashiro, R. Role of Mitochondrial Ubiquitin Ligase MITOL in Mitochondrial Function. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia), 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), 2011, 9/2, Kagoshima, Japan
- (7) Sugiura, A., Yanagi, S. Functional regulation of Mfn2 by mitochondrial ubiquitin ligase MITOL. Mitochondrial Dynamics: from Mechanism to Disease, 2011, 9/12, Sardinia, Italy
- (8) 長島 駿, 福田敏史, 岩瀬彩香, 三浦恒平, 稲留涼子, 柳 茂: CRAG は c-fos 依存的な AP-1 の活性化を介して異常伸長したポリグルタミンの毒性から細胞を保護する CRAG protects neuronal cells against cytotoxicity of expanded polyglutamine protein partially via c-fos-dependent AP-1 activation. 第 34 回日本神経科学大会. 2011, 9/15, 横浜
- (9) 柳 茂: ミトコンドリアユビキチンリガーゼの機能解析と神経変性疾患 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「神経変性疾患に関する調査研究班」の分科班「病態に根ざした ALS の新規治療法開発班」平成 23 年度ワークショップ. 2011, 9/22, 東京
- (10) 柳 茂, 杉浦 歩, 與那城亮: S-ニトロ化 MAP1B-LC1 によるミトコンドリア機能不全と MITOL による防御機構 第 84 回日本生化学会大会 シンポジウム「疾患に関与するミトコンドリア研究の新展開」. 2011, 9/24, 京都
- (11) 柳 茂: 統合失調症脆弱遺伝子 DISC1 に関連する新規遺伝子 CAMDI の機能解析. 第 38 回日本脳科学会. 2011, 10/8,

- 那覇
- (12) 服部 晶、福田敏史、岩瀬彩香、須田幸司、三浦恒平、山崎紘子、渡部愛美、長島 駿、稲留涼子、柳 茂：Functional Analysis of CAMDI during hippocampus development. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12/13, 横浜
- (13) 太田 莉英子、松下暢子、罇 龍介、徳山剛士、稲留涼子、柳 茂：TAX1BP1 欠損 DT40 細胞の機能解析 ～NF- κ B 転写活性亢進が細胞に与える影響の検討～ Functional Analysis of TAX1BP1 deficient cells. 第34回日本分子生物学会年会. 2011, 12/14, 横浜
- (14) 松下暢子、菊間 啓太、太田莉英子、罇龍介、徳山剛士、高田 穰、胡桃坂仁志、山下孝之、稲留涼子、柳 茂：ファンコニ貧血蛋白 FANCD2 による NF-kappaB 転写制御機構の解析 FANCD2 regulates NF-kappaB transcriptional activity. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12/15, 横浜
- (15) 菊間啓太、松下暢子、志村卓哉、川口浩平、吉田有里、加藤 翔、稲留涼子、柳茂：Analysis of the Fanconi Anemia pathway. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12/15, 横浜志村卓哉、與那城亮、川口浩平、柳 茂：ミトコンドリアユビキチンリガーゼ、MITOL の S-ニトロシル化による活性制御機構の解析 Regulation of ubiquitin ligase activity of MITOL by S-nitrosylation. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12/15, 横浜
- (16) 川口浩平、志村卓哉、加藤翔太、吉田有里、與那城亮、柳 茂：ミトコンドリアユビキチンリガーゼ、MITOL の基質認識機構の解析. Analysis of substrate recognition of MITOL. 第 34 回日本分子生物学会年会. 2011, 12/15, 横浜

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：