

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04053

研究課題名(和文) MITOLによるミトコンドリアダイナミクス制御と疾患

研究課題名(英文) Role of MITOL in mitochondrial dynamics and diseases

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：従来のオルガネラコンタクトの観察方法は、免疫組織染色や電顕観察による2次元解析が用いられてきたが、2次元解析では正確な定量が困難であった。私たちは、マウス脳を用いて3次元走査電子顕微鏡を用いて一つの神経細胞に存在するほぼすべてのミトコンドリアと小胞体の接着構造(MAM)の実態を可視化することに成功し、MITOLが生体内においてもMAM形成に必須であることを証明した(Life Science Alliance 2019)。さらに、MAMが小胞体ストレス応答の場として重要な役割をしていることを明らかにした(EMBO J. 2019)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガネラコンタクトは時空間的にダイナミックに変動する立体的な機能領域であり、2次元解析では、近接した小胞体とミトコンドリアの切断位置によってMAMの有無が異なることから重大な欠陥が指摘されていた。実際にMAMを制御するMfn2に関して、解析法の違いから相反する結果が報告され混乱を招いている。私たちが3次元走査電子顕微鏡を用いてミトコンドリアとMAM構造の実態を3次元で可視化することに成功したことより、生体内の膜コンタクトの観察には3次元解析が有用かつ不可欠であることを示すことができた。今後、3次元解析技術を駆使することによりオルガネラコンタクトの基本原理の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：A role of MITOL in both mitochondrial dynamics and ER-mitochondria tethering prompted us to characterize three-dimensional structures of mitochondria in vivo. In MITOL-deficient neurons, we observed a significant reduction in the ER-mitochondria contact sites. We also found that branched large mitochondria disappeared by deletion of MITOL. These morphological abnormalities of mitochondria resulted in enhanced oxidative stress in brain, which led to astrogliosis and microglial activation partly causing abnormal behavior. In conclusion, the reduced ER-mitochondria tethering and excessive mitochondrial fission may trigger neuroinflammation through oxidative stress. Furthermore, we demonstrate that mitochondria regulate cell fate under ER stress through IRE1 ubiquitylation by MITOL at the MAM.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(国内・国外の研究動向及び位置づけ)

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。(着想に至った経緯)

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、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 (EMBO J. 2006) 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 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 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 (Mol. Cell 2013)。このように MITOL はミトコンドリアダイナミクスを制御する酵素であり、その分子メカニズムの解明を通してミトコンドリアの新機能の同定と疾患との関連性が期待できる。

2. 研究の目的

ミトコンドリアの機能が低下して有害な活性酸素種 (ROS) が慢性的に漏出すると、様々な老化関連疾患を引き起こすことが知られている。ミトコンドリアの機能は、融合と分裂によるミトコンドリアダイナミクスの制御を介して正常に維持されており、その破綻は心不全や神経変性疾患などさまざまな病態を引き起こすと考えられている。私たちはミトコンドリア外膜に局在するユビキチンリガーゼ MITOL を同定し、MITOL がミトコンドリアダイナミクスを制御していること、微小管の品質管理機構に関与していること、さらにミトコンドリアと小胞体の接着 (MAM) を制御していることを報告してきた。しかしながら、ミトコンドリアにおける MITOL の役割はいまだ不明な点が多い。本研究プロジェクトは、各種臓器特異的欠損マウスの解析を通して MITOL を介したミトコンドリアダイナミクスの制御機構とその破綻による疾患との関連を明確にして MITOL によるミトコンドリア機能調節に着目した新しい治療法の開発を目指す。

・MITOL によるミトコンドリア形態制御の解析

MITOL 欠損したマウス繊維芽細胞 (MEF) および臓器特異的 MITOL 欠損マウスを用いて Drp1 のユビキチン化の減少と蓄積ならびにミトコンドリアの分裂状態の亢進の有無を検討し、Drp1 が MITOL の生理的基質であることを明らかにする。

・MITOL によるミトコンドリアと小胞体の接着制御

私たちは MITOL の基質として、Mitofusin2 (Mfn2) を同定した。Mfn2 は小胞体膜上にも局在し、ミトコンドリア外膜上の Mfn2 と手をつなぐことにより、両オルガネラを繋ぎ留めている。私たちは、小胞体-ミトコンドリア間相互作用の ON/OFF 機構について、MITOL による Mfn2 の活性化を介した新たな機構を見いだした (Mol. Cell 2013)。今後、MITOL 欠損マウスを用いて、MITOL による Mfn2 の活性化機構と生理的意義を明らかにしたい。

・過剰な一酸化窒素ストレスに対する MITOL を介した防御機構

私たちは MITOL の生理的基質として微小管の安定化因子である MAP1B-light chain1 (LC1) を同定し、MITOL が一酸化窒素により S-ニトロシル化された LC1 を特異的にユビキチン化し、プロテアソームによる分解を促進することによって LC1 のタンパクレベルを調節していることを示した (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2012)。MITOL による LC1 の分解機構と酸化ストレスによる神経細胞死における役割を明らかにする。

・MITOL による変性タンパク質の分解機構

私たちは MITOL が筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子産物である変異した SOD1 を特異的に認識・会合し、分解を促進することを見いだした (Mol. Biol. Cell 2009, Mitochondrion 2011)。MITOL がどのようにして変性タンパク質を特異的に認識しているかについてのメカニズムおよび病態との関連性を解明する。

・MITOL によるミトコンドリアと小胞体の接着制御

私たちは MITOL の基質として、Mitofusin2 (Mfn2) を同定した。Mfn2 は小胞体膜上にも局在し、ミトコンドリア外膜上の Mfn2 と手をつなぐことにより、両オルガネラを繋ぎ留めている。私たちは、小胞体-ミトコンドリア間相互作用の ON/OFF 機構について、MITOL による Mfn2 の活性化を介した新たな機構を見いだした (Mol. Cell 2013)。さらに MITOL 欠損マウスを用いて、MITOL による Mfn2 の活性化機構と生理的意義を明らかにする。

・MITOL と疾患との関連性の解析

各種臓器特異的 MITOL 欠損マウスを樹立し、病態との関連について詳細に解析を行う。

学術的特色・独創的な点及び予想される結果と意義

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 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 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事が期待できる。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 Ca²⁺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事が期待される。さらに、各臓器特異的 MITOL 欠損マウスを作製し解析することにより、MITOL によるミトコンドリアの新たな制御機構と、神経変性疾患・心不全・老化などさまざまな疾患との関連性が明らかとなり、これらの研究成果を基にミトコンドリア機能に着目した新しい治療法の開発が期待される。

3. 研究の方法

・MITOL による Drp1 を介したミトコンドリア形態制御と病態の解析

私たちは MITOL が Drp1 をポリユビキチン化して、プロテアソームを介した分解を促進することによってミトコンドリアの形態を調節していることを報告した。一方、米国の Youle らのグループは異なる現象を報告しており意見が分かれている。この意見の相違に決着をつけるために MITOL 欠損マウス繊維芽細胞 (MEF) および心臓特異的 MITOL 欠損マウスを用いて Drp1 のユビキチン化の減少と蓄積ならびにミトコンドリアの分裂状態の亢進の有無を検討し、Drp1 が MITOL の生理的基質であることを明らかにする。また Drp1 が心不全への病態関与について予想が外れた場合は、何らかの代償作用が働いている可能性について検討する。

・MITOL 欠損によるミトコンドリア機能障害の解析

MITOL 欠損 MEF を用いてミトコンドリアの機能障害の有無を詳細に解析する。まず MITOL 欠損がミトコンドリアからの活性酸素種 (ROS) の産生に及ぼす影響についてフローサイメーターを用いて検討する。顕著な差異が認められない場合は、ミトコンドリアの ROS 産生を誘発するアンチマイシン C 刺激により ROS 産生の増大ならびに ROS による細胞死の亢進について野生型 MEF と MITOL 欠損 MEF で比較検討を行う。また、ミトコンドリア DNA 損傷の有無、ATP 産生量、各呼吸鎖複合体形成の異常の有無について生化学的・分子生物学的手法を用いて明らかにする。最終的に、臓器特異的 MITOL 欠損マウスを用いてミトコンドリア機能障害による細胞死ならびに臓器の機能障害の有無を検討する。

・MITOL によるミトコンドリアと小胞体の接着制御機構の解明

私たちは MITOL の基質として Mitofusin2 (Mfn2) を同定した。Mfn2 は小胞体膜上にも局在し、ミトコンドリア外膜上の Mfn2 と手をつなぐことにより、両オルガネラを繋ぎ留めている。MITOL が MAM にも局在していることがわかったので、Mfn2 との関係について解析を行った結果、MITOL は Mfn2 をユビキチン化して分解ではなく Mfn2 の活性化を誘導し、小胞体-ミトコンドリアの相互作用 (MAM) の破綻は、Mfn2 の機能異常により発症するシャルコー・マリー・トゥース病のみならず、アルツハイマー病の病態や心不全の発症にも関与することが報告されており、その重要性が注目されている。MITOL による MAM 制御機構の解明と生体内における生理的意義を明らかにする。以下に列挙した 2 項目の研究を行う。

・Mfn2 のユビキチン化による局在変化と機能調節の解明

MITOL による Mfn2 のユビキチン化によって Mfn2 分解促進が亢進しないことが実験で示唆されているので、Mfn2 のユビキチン化は Mfn2 の活性化と細胞内局在を調節している可能性が考えられる。それぞれ GTP 加水分解能の活性測定と免疫染色法にて細胞内局在への影響を明らかにする。また、ユビキチン化による GTP 結合能や GTP 加水分解能について検討する。これらの活性に変化が観察された場合、MAM 形成に対する影響を免疫細胞化学法や、in vitro ER-mitochondria binding assay により確認する。

・新たな MAM 解析方法の構築

これまでの MAM の解析方法は細胞分画法や 2 次元的な電子顕微鏡写真を用いた解析が主であり、その解析方法の正確性が不十分であることから、MAM の実態を正確に捉えることが困難であった。本研究では MAM を 3 次元的に観察することにより、MAM の実態を捉え、新たな MAM 解析方法の構築を行う。

・MITOL 機能低下と心不全の病態との関連解析

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。

MITOL の基質である 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 の特異的阻害剤である Mdivi-1 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。

4. 研究成果

本研究は、ミトコンドリア外膜に局在するユビキチンリガーゼ MITOL を介したミトコンドリアダイナミクスの制御機構とその破綻による疾患との関連を明らかにするプロジェクトである。以前私たちは、ユビキチンリガーゼ MITOL を同定し、MITOL が Drp1 をポリユビキチン化して、プロテアソームを介した分解を促進することによってミトコンドリアの形態を調節していることを報告したが、一方で米国の Youle らのグループは異なる現象を報告しており意見が分かれている。この意見の相違に決着をつけるために MITOL 欠損マウス繊維芽細胞(MEF)および心臓特異的 MITOL 欠損マウスを用いて Drp1 のユビキチン化の減少と蓄積ならびにミトコンドリアの分裂状態の亢進の有無を検討した結果、Drp1 が MITOL の生理的基質であることを明らかにした。また Drp1 が心不全への病態に密接に関与していることを明らかにした。次に、MITOL 欠損 MEF を用いてミトコンドリアの機能障害の有無を解析した。まず MITOL 欠損がミトコンドリアからの活性酸素種(ROS)の産生に及ぼす影響についてフローサイメーターを用いて検討した結果、MITOL 欠損によりわずかな ROS 産生の増加が認められた。さらにミトコンドリアの ROS 産生を誘発するアンチマイシン C 刺激により ROS 産生の増大ならびに ROS による細胞死の亢進が観察された。また、MITOL 欠損により ATP 産生量の低下が観察されたが、ミトコンドリア DNA 損傷、各呼吸鎖複合体形成の異常については顕著な差が検出されなかった。今後、臓器特異的 MITOL 欠損マウスを用いてミトコンドリア機能障害による細胞死ならびに臓器の機能障害の有無を検討する予定である。

ミトコンドリアの融合タンパク質である Mitofusin2 (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ミトコンドリアと小胞体の接着を仲介することが知られていたが、その制御機構は不明であった。私たちはミトコンドリアに局在するユビキチンリガーゼ MITOL を同定し、MITOL が Mfn2 を活性化することにより、ミトコンドリアと小胞体の接着(MAM)を促進することを明らかにした。しかしながら、MAM の生理機能については未だ不明な点が多い。そこで、MAM における MITOL の新規基質を探索したところ、小胞体ストレスセンサーの一つであり IRE1 が同定された。MITOL は MAM において IRE1 と特異的に会合して、K63 型のユビキチン鎖を付加していることが明らかとなった、このユビキチン化はさらに、生理的意義を解析した結果、MITOL による IRE1 のユビキチン化は IRE1 の分解誘導ではなく、活性を制御している可能性が示唆された。その生理機能を詳細に解析した結果、MITOL は IRE1 をユビキチン化することにより、IRE1 の過剰なオリゴマー形成を抑制していることがわかった。さらにこのユビキチン化は IRE1 の細胞死誘導活性を減弱させる役割が見いだされた。このことは MAM においてミトコンドリアが MITOL を介して小胞体のストレス制御していることを示しており、新たなオルガネラ間の連携制御機構として注目される。小胞体ストレス応答は神経変性疾患や糖尿病など様々な老化関連疾患の病態に関与しているので、今後、様々な疾患に於いて MITOL による小胞体ストレス応答の制御機構の解明が待たれる。

小胞体-ミトコンドリアの相互作用(MAM)の破綻は、Mfn2 の機能異常により発症するシャルコー・マーリー・トゥース病のみならず、アルツハイマー病の病態や心不全の発症にも関与することが報告されており、その重要性が注目されている。MITOL は Mfn2 をユビキチン化して分解ではなく Mfn2 を活性化して MAM を誘導することを報告したが(Mol.Cell 2013)、生体内での役割は不明であった。これまでの MAM の解析方法は細胞分画法や電子顕微鏡解析が主であり、その解析方法の正確性が不十分であることから、MAM の実態を正確に捉えることが困難であった。私たちはマウスを用いて MAM を 3 次元的に観察することに成功し、MITOL が生体内においても MAM の制御に重要であることを示した(Life Sci. Alliance 2019)。

心筋特異的 MITOL 欠損マウスは欠損 6 ヶ月後に心不全を発症し、1 年以内に致死になることがわかった。さらに、MITOL の基質である Drp1 によるミトコンドリア断片化が起きていることを Western blotting 法、電子顕微鏡観察にて証明した。また、Drp1 阻害剤によるレスキュー実験を行った結果、Drp1 の特異的阻害剤である Mdivi-1 投与により心不全が回復することを明らかにした(論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6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 武田啓佑, 柳茂	4. 巻 32
2. 論文標題 アルツハイマー病におけるMAMの本当の役割	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 782-787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 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
2. 論文標題 MITOL dysfunction causes dwarfism with anterior pituitary hypoplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa050	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Tokuyama Takeshi, Hirai Asei, Shiiba Isshin, Ito Naoki, Matsuno Keigo, Takeda Keisuke, Saito Kanata, Mii Koki, Matsushita Nobuko, Fukuda Toshifumi, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 10
2. 論文標題 Mitochondrial Dynamics Regulation in Skin Fibroblasts from Mitochondrial Disease Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 450 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10030450	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Nagashima Shun, Takeda Keisuke, Shiiba Isshin, Higashi Mizuho, Fukuda Toshifumi, Tokuyama Takeshi, Matsushita Nobuko, Nagano Seiichi, Araki Toshiyuki, Kaneko Mari, Shioi Go, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 9
2. 論文標題 Critical role of CRAG, a splicing variant of centaurin- 3/AGAP3, in ELK1-dependent SRF activation at PML bodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56559-9	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Fukuda Toshifumi、Nagashima Shun、Inatome Ryoko、Yanagi Shigeru	4. 巻 14
2. 論文標題 CAMDI interacts with the human memory-associated protein KIBRA and regulates AMPAR cell surface expression and cognition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0224967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0224967	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Nagashima Shun、Takeda Keisuke、Ohno Nobuhiko、Ishido Satoshi、Aoki Motohide、Saitoh Yurika、Takada Takumi、Tokuyama Takeshi、Sugiura Ayumu、Fukuda Toshifumi、Matsushita Nobuko、Inatome Ryoko、Yanagi Shigeru	4. 巻 2
2. 論文標題 MITOL deletion in the brain impairs mitochondrial structure and ER tethering leading to oxidative stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900308	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Takeda Keisuke、Nagashima Shun、Shiiba Isshin、Uda Aoi、Tokuyama Takeshi、Ito Naoki、Fukuda Toshifumi、Matsushita Nobuko、Ishido Satoshi、Iwakaki Takao、Uehara Takashi、Inatome Ryoko、Yanagi Shigeru	4. 巻 38
2. 論文標題 MITOL prevents ER stress induced apoptosis by IRE1 ubiquitylation at ER-mitochondria contact sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e100999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2018100999	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 柳 茂
2. 発表標題 ミトコンドリアダイナミクスと老化
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳茂, 長島駿, 徳山剛士, 武田啓佑, 稲留涼子
2. 発表標題 MITOL/MARCH5によるミトコンドリアダイナミクス制御とMAM機能制御
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shigeru Yanagi
2. 発表標題 Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL in mitochondrial dynamics and aging-related diseases
3. 学会等名 International Meeting on RECQ Helicases and Related Diseases 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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