

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20637

研究課題名（和文）ミトコンドリアユビキチン修飾シグナルのシステム解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mitochondrial ubiquitination signal transduction system

研究代表者

伊藤 直樹（ITO, Naoki）

学習院大学・理学部・研究員

研究者番号：20965834

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアはATP産生のみならず、様々な細胞内シグナル伝達の中継所としても重要な役割を果たしている。本研究ではミトコンドリアの主要なユビキチンリガーゼであるMITOLに着目し、ユビキチン化の生理的役割と作用の異なるユビキチン鎖付加機構の解明を主目的とした。解析の結果、MITOLは小胞体のHMOX2をユビキチン化することでミトコンドリアへの鉄供給を促進し呼吸能維持に寄与していることが示唆された。また、MITOLは脱ユビキチン化酵素OTUD4と協調し、Parkinに付加するユビキチン鎖の種類を決定している可能性も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MITOLが小胞体上のHMOX2を介してヘム分解を促進し、ミトコンドリアへの鉄供給を制御するという発見は、これまで不明瞭だった鉄供給機構の解明にとどまらず、ミトコンドリアをハブとしたオルガネラ連携の新たな事例ともなり、ミトコンドリア、小胞体、生命金属研究の発展に寄与すると考えられる。また、MITOLとOTUD4の解析結果は様々な場所で起こるユビキチン修飾に共通した普遍的課題であるユビキチン鎖の使い分け、決定因子の謎を解決する糸口となる。

研究成果の概要（英文）：Mitochondria play a pivotal role not only in ATP production but also as a relay station for various intracellular signal transductions. In this study, we concentrated on MITOL, a major mitochondrial ubiquitin ligase, with the primary objective of elucidating the physiological role of ubiquitination and the mechanism of ubiquitin chain addition with different actions. The analysis indicated that MITOL plays a role in maintaining respiratory capacity by facilitating iron supply to mitochondria through ubiquitination of HMOX2 in the endoplasmic reticulum. Additionally, it was observed that MITOL may collaborate with the deubiquitinating enzyme OTUD4 to determine the type of ubiquitin chain to be added to Parkin.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア ユビキチン修飾 ユビキチンリガーゼ 脱ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返し、また細胞内を活発に移動する動的なオルガネラである。ATP 合成の主要な場であるが、アポトーシスの開始や抗ウイルス免疫の制御にも密接に関与し、細胞内シグナル伝達の中継所として注目されている。さらに近年の顕微鏡技術の飛躍的な発展から、ミトコンドリアと他のオルガネラ膜の接触が相次いで報告され、オルガネラ間の連携が明らかになった。最初に発見されたミトコンドリアと小胞体の接触部位 (MERCs: Mitochondria-endoplasmic reticulum contact site) は特に解析が進んでおり、小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} やリン脂質などの物質の受け渡し、またシグナル伝達の間として機能することが知られている。

ミトコンドリア外膜に局在するユビキチンリガーゼ MITOL はミトコンドリア分裂因子である Drp1 の分解を促進することでミトコンドリアの断片化を抑制し、正常な形態に維持している。また、ミトコンドリアに蓄積する変性タンパク質の除去や抗ウイルス免疫シグナルを仲介する MAVS を制御している。さらには Mfn2 を活性化して MERCs の形成を促進することや MERCs を介して小胞体膜上の IRE1 α の活性を制御し、小胞体ストレス性アポトーシスを抑制する役割も明らかとなった。これまでの MITOL の機能解析から、外膜上でのユビキチン修飾はミトコンドリア形態および品質管理に不可欠であり、他のオルガネラとの連携時においても重要に機能することが示唆された。

ユビキチン修飾は、モノユビキチン化とポリユビキチン化に大別される。さらにポリユビキチン化は鎖を構成するユビキチンタンパク質の何番目のリジンを通じて連結するかによって、プロテアソーム分解誘導性か活性制御性か、作用が異なる。すなわち、K48 型ポリユビキチン鎖はプロテアソームでの分解を誘導し、K63 型ポリユビキチン鎖は活性を調節する。MITOL は基質をポリユビキチン化するが、どのようにして作用の異なるユビキチン鎖を使い分けているのか、決定因子は何なのかは不明である。この「問い」は MITOL だけに限ったものではなく、様々な場所で起こるユビキチン修飾に共通した普遍的な重要課題である。

2. 研究の目的

研究代表者が以前実施した近位依存性ビオチン標識の一種である APEX2 法を用いた MITOL の結合候補分子の網羅的スクリーニングでは、小胞体に局在するタンパク質 (HMOX2)、脱ユビキチン化酵素 (USP30 や OTUD4) などがヒットした (Ito N. et al., 2021, J. Biochem.)。本研究では、その探索結果を基盤にして、ミトコンドリア外膜から発するユビキチン修飾の生理的意義、および脱ユビキチン化酵素に着目したユビキチン修飾の制御機構の解明を目的とした。具体的には、ヘム鉄代謝関連酵素 HMOX2 との相互作用および MITOL と脱ユビキチン化酵素 OTUD4 の機能関連を明らかにする。これまでにミトコンドリアのユビキチンリガーゼが別のオルガネラのタンパク質をユビキチン化する事例は MITOL と IRE1 α の相互作用以外には見つかっていない。小胞体に局在する HMOX2 との相互作用は新たな事例として、ミトコンドリアをハブとした他のオルガネラ連携の役割および未知のユビキチン修飾シグナル経路の解明につながる。OTUD4 はリン酸化修飾の有無によって切断するポリユビキチン鎖 (分解誘導性の K48 型、活性制御性の K63 型) を変化させるというユニークな特徴をもつ。よって、OTUD4 に着目した解析はユビキチン化と脱ユビキチン化による新たなユビキチン修飾調節機構を明らかにし、ポリユビキチン鎖の使い分け、決定因子の謎を解決する可能性がある。加えて、ミトコンドリア上

のユビキチン修飾の包括的な理解に貢献するべく、MITOL によってユビキチン化されるタンパク質をより特異的に同定する新たなスクリーニング系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) MITOL によるユビキチン化の生理的役割の解明

MITOL と HMOX2 の相互作用に着目し解析を行う。予備実験において HMOX2 は MITOL と結合しユビキチン化されることが判明している。本研究では、まず特定のユビキチン鎖のみを切断する脱ユビキチン化アッセイを行い、HMOX2 へ付加されるユビキチン鎖を同定する。また、HMOX2 変異体の作製によりユビキチン化部位となるリジン残基を同定する。続いて、ゲノム編集により HMOX2 を欠損させた細胞に HMOX2 変異体を再発現させることで、HMOX2 機能へのユビキチン化の作用を解析した。

(2) MITOL の基質に対するユビキチン鎖決定機構の解明

予備実験として行った免疫沈降実験により、MITOL と OTUD4 が結合することは明らかになっている。また、研究代表者が所属する研究室にて解析を進めてきた Parkin は CCCP 刺激時には K48 結合型、Rotenone 刺激時には K63 結合型のユビキチン鎖が MITOL によって付加されることが見出されている。本研究では、同刺激条件下における OTUD4 のリン酸化状態を Phos-tag SDS-PAGE により解析した。

(3) ユビキチン化タンパク質スクリーニング系の構築

MITOL 欠損細胞や RNA 干渉法において起こりうる他のユビキチンリガーゼの活性化などの代償機構の影響を極力排除するために、数時間単位での発現抑制を可能にする AID2 システムを導入した細胞の樹立を試みた。樹立細胞において内在性 MITOL の消失処理の有無によって、蓄積またはユビキチン化が消失するタンパク質の同定を目指した。

4. 研究成果

(1) MITOL によるユビキチン化の生理的役割の解明

まず MITOL によってユビキチン化された HMOX2 に対して、脱ユビキチン化アッセイを実施した。非選択的にユビキチン鎖を切断する USP2、K63 結合型ユビキチン鎖のみを特異的に切断する AMSH で処理した際に、HMOX2 のユビキチン化が消失した (図 1)。よって HMOX2 へ付加されるポリユビキチン鎖はプロテアソーム分解に働く K48 結合型ではなく、活性制御に働く K63 結合型であることが明らかになった。ゆえに HMOX2 の活性は MITOL によって調節されている可能性がある。

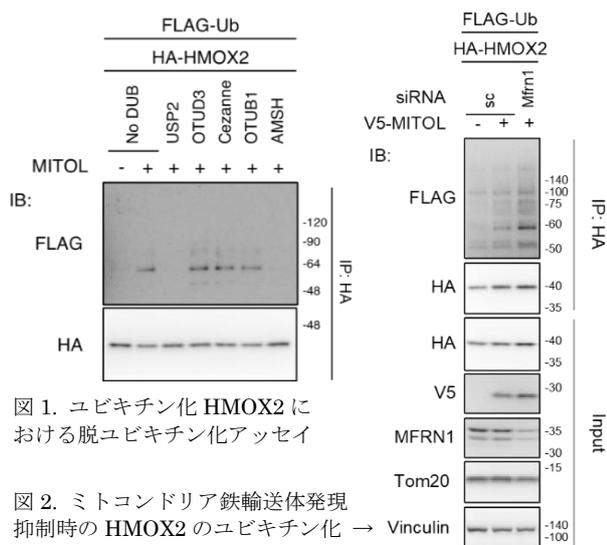


図 1. ユビキチン化 HMOX2 における脱ユビキチン化アッセイ

図 2. ミトコンドリア鉄輸送体発現抑制時の HMOX2 のユビキチン化 → Vinculin

ミトコンドリアの電子伝達系において鉄は必須金属であるにも関わらず、ミトコンドリアへの鉄供給メカニズムは不明な点が多い。小胞体膜に局在する HMOX2 はヘムを分解し鉄を取り出す酵素であり、MITOL との相互作用はミトコンドリアと小胞体の接触領域を介していると考えられる。ミトコンドリア鉄輸送体である Mfrn1 のノックダウンにより、ミトコンドリア内の鉄を欠乏させると MITOL による HMOX2 へのユビキチン化が亢進した (図 2)。鉄キレート剤

の処理でも同様な亢進が認められた。これまでミトコンドリアと小胞体間での鉄動態制御機構は報告がなく、新規のシグナル伝達経路、鉄供給メカニズムの存在が示唆された。

続いて、HMOX2 のユビキチン化リジン残基を同定するべく、26 箇所全てのリジンを 1 箇所ずつアルギニンに置換した KR 変異体を作製し、各変異体の修飾を検討した。その結果、MITOL によるユビキチン化が顕著に減少する変異体を見出した。ヘム分解量をモニター可能な蛍光レポーターを用いて HMOX2 の酵素活性を測定したところ、HMOX2-KR 変異体では活性の低下が認められた。また、外部の専門家に依頼してミトコンドリア内の鉄量を測定すると、野生型に比べ HMOX2 欠損細胞では鉄量が減少し、野生型 HMOX2 の再発現では回復する一方で HMOX2-KR 変異体では回復しなかった。また、HMOX2 欠損細胞ではミトコンドリア呼吸能の低下が認められたが、予想通り HMOX2-KR 変異体の再発現では回復しなかった。

以上の結果から、MITOL は HMOX2 をユビキチン化することでその酵素活性を上昇させ、ミトコンドリアへの鉄供給を促進し呼吸能維持に寄与していることが示唆された。一連の成果をまとめた論文はまもなく投稿予定である。

(2) MITOL の基質に対するユビキチン鎖決定機構の解明

OTUD4 は通常 K48 結合型のユビキチン鎖を切断するが、リン酸化されることで K63 結合型を切断するようになるユニークな脱ユビキチン化酵素である。MITOL のユビキチン化基質として同定された Parkin は CCCP 刺激時に K48 結合型、Rotenone 刺激時に K63 結合型のユビキチン鎖が付加される。同刺激条件下において、OTUD4

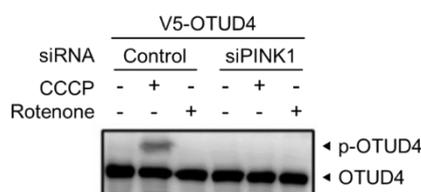


図 3. 薬剤刺激および siPINK1 処理における OTUD4 のリン酸化

のリン酸化状態を Phos-tag PAGE により検出したところ、CCCP 刺激時にのみリン酸化が認められた (図 3)。CCCP 刺激はミトコンドリアの膜電位低下を引き起こし、それに伴ってキナーゼである PINK1 がミトコンドリア外膜に蓄積することが知られている。siRNA により PINK1 をノックダウンしたところ、CCCP 刺激時の OTUD4 のリン酸化は消失した。したがって、Parkin のユビキチン鎖の種類は MITOL ではなく、OTUD4 によって決定されている可能性が示された。また、その決定過程にはミトコンドリア外膜におけるキナーゼ PINK1 が関与することが示唆された。今後、OTUD4 が実際に Parkin のユビキチン鎖決定に寄与するのか、OTUD4 欠損細胞と各種 OTUD4 変異体を作製し検証を進める。

(3) ユビキチン化タンパク質スクリーニング系の構築

CRISPR-Cas9 法を用いて、AID2 システムに必要な OsTIR1、mAID-tag をそれぞれ AAVS1 領域、MITOL 遺伝子のエキソン 1 領域にノックインした HeLa 細胞 (HA-mAID-KI 細胞) を樹立した。HA-mAID-KI 細胞に 5-Ph-IAA を 3 時間処理したところ、内因性の MITOL タンパク質をほぼ消失させることに成功した (図 4)。ミトコンドリア分裂因子である Drp1 は MITOL によってユビキチン化され分解されるが、5-Ph-IAA 処理の時間依存的に僅かな蓄積が認められた。続いてスクリーニングの前段階として、まず既報基質の過剰発現系にて検討した。しかし、5-Ph-IAA 処理により MITOL を消失させても、基質のユビキチン化量に変化がみられなかつた。また、HA-mAID-KI 細胞では HA-tag のみをノックインした (HA-KI) 細胞に比べ、5-

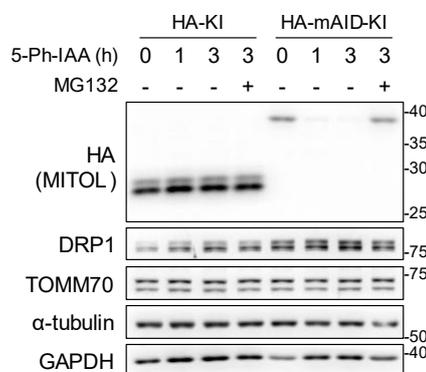


図 4. HA-KI または HA-mAID-KI 細胞における 5-Ph-IAA 処理による MITOL ノックダウン
MG132: プロテアソーム阻害剤

Ph-IAA 処理により MITOL を消失させても、基質のユビキチン化量に変化がみられなかつた。また、HA-mAID-KI 細胞では HA-tag のみをノックインした (HA-KI) 細胞に比べ、5-

Ph-IAA 処理以前に MITOL の発現量が低下していた。薬剤非依存的なバックグラウンド分解の可能性もあるが、発現量低下の明確な理由は不明である。いずれにせよ以上の結果から、HAM-1AID-KI 細胞において内在レベルでの MITOL の発現量では基質へのユビキチン化能が不十分であることが示唆された。MITOL は個体発生初期には発現量が高く、また多能性幹細胞ではその未分化性維持に働いていることも報告されている。よって今後、MITOL を高発現する他の細胞種でシステムを再構築し、ユビキチン化基質スクリーニング系の実現を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塩 聖, 椎葉 一心, 柳 茂, 伊藤 直樹
2. 発表標題 ミトコンドリア-小胞体接触場を介したミトコンドリア鉄供給機構
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大塩 聖, 椎葉 一心, 伊藤 直樹, 柳 茂
2. 発表標題 オルガネラ接触場を介したミトコンドリア鉄供給機構
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柳茂, 三牧正和 / 編, 椎葉一心, 伊藤直樹, 柳 茂	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 245
3. 書名 実験医学増刊 Vol.41 No.5 ミトコンドリア 疾患治療の新時代, 第1章-7 パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkinの光と影, pp.54-59	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------