

みにれびゅう

MITOL によるミトコンドリアダイナミクス制御と破綻による疾患

長島 駿, 柳 茂

1. はじめに

ミトコンドリアの形態は融合と分裂のバランスによって調節されており, そのバランスが崩れるとミトコンドリアの機能は低下し, 神経疾患などさまざまな病気を引き起こすことが知られている. 近年のライブイメージング解析技術の進歩により, ミトコンドリアの融合と分裂のみならず微小管に沿った動的な移動や, 小胞体などのほかのオルガネラとの接着と解離現象が見いだされ, その生理的重要性が注目されている. このようなミトコンドリアダイナミクスはどのように調節されているのであろうか? 生体内においてミトコンドリアダイナミクスが破綻するとどのような異常が起こるのであろうか? 近年我々が同定したミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL の機能解析を通してミトコンドリアダイナミクスを調節する機構が明らかになってきた. 本稿では, MITOL による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についてこれまでの我々の知見を紹介する.

2. MITOL による Drp1 を介したミトコンドリア形態制御

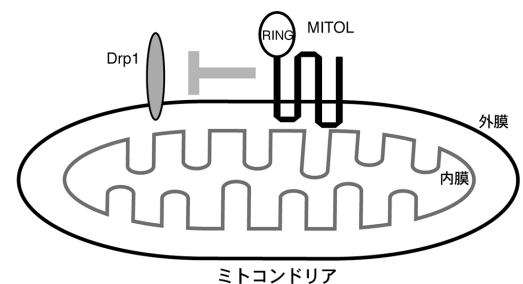
MITOL (別名 MARCH5) はミトコンドリア外膜を 4 回貫通するユニークな膜型ユビキチンリガーゼである. HeLa 細胞において MITOL の発現を RNAi 法により抑制するとミトコンドリアの形態は分裂状に変化することが観察されたので, MITOL の基質を探索したところ, ミトコンドリアの分裂因子である Drp1 が同定された. 詳細な解析の結果, MITOL は Drp1 をポリユビキチン化して, プロテアソームを介した分解を促進することによってミトコンドリアの形態を調節していることが明らかになった¹⁾

東京薬科大学生命科学部分子生化学研究室 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

Role of MITOL in mitochondrial dynamics and diseases

Shun Nagashima and Shigeru Yanagi (Laboratory of Molecular Biochemistry, School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan)

A



B

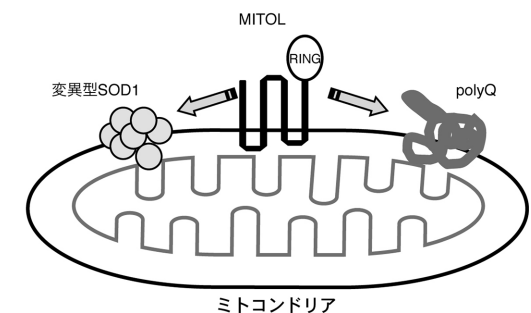


図1 MITOL によるミトコンドリアの形態制御機構

(A) MITOL はミトコンドリア外膜を 4 回貫通するユビキチンリガーゼであり, 分裂因子 Drp1 を基質にしてミトコンドリアの形態を制御する. (B) MITOL は C 末端の天然不規則領域を介して変異型 SOD1 や polyQ などの変性タンパク質を特異的に認識して分解を誘導する.

(図 1A). その後に樹立された MITOL を欠損したマウス胎仔由来の線維芽細胞 (MEF) においても Drp1 が MITOL の生理的基質であることが確認されたが, ミトコンドリアの形態は正常に近いレベルにまで回復していたので, 何らかの代償作用が働いている可能性が考えられる. 興味深いことに, MITOL 欠損細胞において活性酸素種 (ROS) の上昇が顕著に観察されている. Drp1 の蓄積はミトコンドリアの機能低下や ROS 産生を引き起こすことが知られているので, MITOL 欠損による ROS 産生機構において Drp1 の蓄積が関与していると推察される.

3. MITOL による変性タンパク質の分解と微小管の品質管理

変性し凝集化したタンパク質はミトコンドリアに集積する傾向があり、神経変性疾患の病態において、凝集タンパク質によるミトコンドリア機能障害の影響が注目されている。具体例として筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因遺伝子産物の一つである SOD1 (superoxide dismutase1) は、変異することによって凝集塊を形成し、ミトコンドリアに蓄積することが発症と密接に関連していることが報告されている²⁾。同様に、遺伝性脊髄小脳変性症の代表的な疾患であるポリグルタミン病では、グルタミン鎖が伸長して異常な立体構造に変化したタンパク質 (polyQ) がミトコンドリアに蓄積することが神経毒性の原因の一つとして注目されている。我々は MITOL がアミノ酸変異を持つ SOD1 や伸長 polyQ を特異的に認識して結合し、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を見いだした^{3,4)} (図 1B)。また、MITOL の機能が低下すると、変性タンパク質がミトコンドリアに蓄積し、神経細胞死を誘導することが確かめられた。ミトコンドリアが MITOL を介して積極的に変性タンパク質を除去し、神経細胞の生存維持に貢献している可能性が強く示唆された。神経変性疾患においては、何らかの原因で MITOL の動きが低下したことにより、変性タンパク質がミトコンドリアに集積して、神経変性疾患の病態を増悪させている可能性が考えられる。興味深いことに、加齢とともに MITOL の発現は有意に低下することが観察されている。加齢によって神経変性疾患の発症が増加するのは、MITOL の発現低下に伴う変性タンパク質の蓄積が関与しているのかもしれない。今後、MITOL は神経変性疾患の治療標的になる可能性が考えられる。

ところで MITOL は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のでしょうか。HSP70 のようなシャペロン分子との結合は今のところ観察されていない。興味深いことに MITOL は C 末端に定まった立体構造を持たない天然不規則領域 (disordered domain) を持つ。この領域を欠失した MITOL は変異型 SOD1 と会合することができなくなり、ユビキチン化による変異型 SOD1 の分解誘導も観察されなくなる。したがって、MITOL は C 末端の天然不規則領域を介して変性タンパク質を認識している可能性が高いと思われる。今後より詳細に変性タンパク質の認識機構を明らかにする必要がある。

冒頭に変性タンパク質はミトコンドリアに集積する傾向があると述べたが、実際はその逆で、ミトコンドリアが変性タンパク質に集まっているのかもしれない。変性タンパク質は微小管に移行する性質があるので、微小管上を移動

しているミトコンドリアが変性タンパク質を見つけて、MITOL を使って掃除しているとも考えられる。ミトコンドリアは、微小管の品質管理の一環として変性タンパク質を分解しているのかもしれない。

4. MITOL による微小管品質管理と酸化ストレス防御機構

MITOL の発現をノックダウンするとミトコンドリアの動きが著しく抑制されることが観察されていたが、そのメカニズムは不明であった。酵母ツーハイブリッド法を用いて MITOL の生理的基質を探索したところ、微小管の安定化因子である MAP1B-light chain1 (LC1) が同定された。LC1 はミトコンドリアの逆行輸送を阻害することやミトコンドリアの機能低下を引き起こして細胞死を誘導することなどが報告されていた。解析の結果、MITOL は LC1 と特異的に結合してユビキチン化し、プロテアソームによる分解を促進することによって LC1 のタンパク質レベルを調節していることがわかった⁵⁾。MITOL の機能を抑制すると、LC1 の蓄積によるミトコンドリア凝集とミトコンド

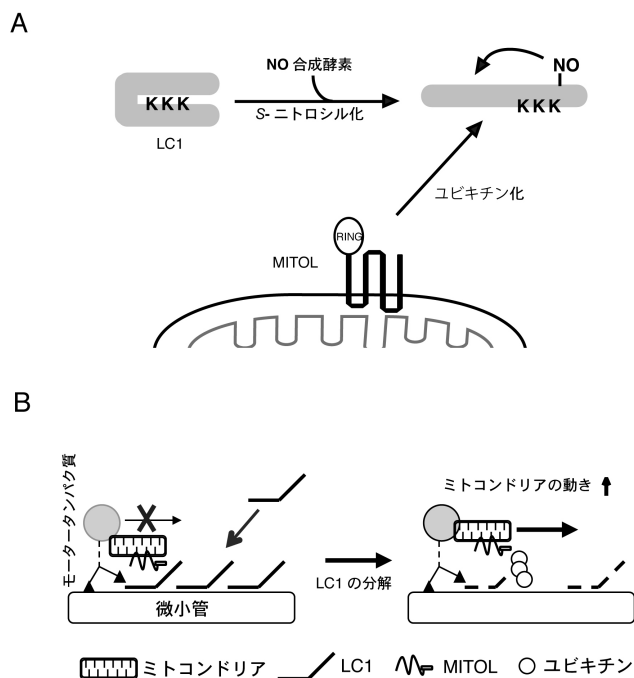


図2 MITOL による MAP1B-LC1 の制御機構

(A) MITOL による MAP1B-LC1 (LC1) の認識機構。LC1 は NO による S-ニトロシル化修飾を受けることにより構造変化を起こし、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 (B) MITOL による微小管の品質管理機構。活性化した S-ニトロシル化 LC1 は速やかに微小管に移行し、ダイニンなどのモータータンパク質を抑制してミトコンドリアや小胞輸送を一時的に停止させる。MITOL は LC1 の分解を誘導することにより微小管の過剰な安定化を解除する。

リアの機能低下が観察されることから、MITOLがLC1による細胞毒性を防御していることが示された。さらに、MITOLによるLC1の認識において新たなメカニズムが明らかとなった。LC1は一酸化窒素(NO)によってS-ニトロシル化されて活性型として機能することが報告されている⁶⁾。興味深いことに、MITOLはS-ニトロシル化依存的にLC1を特異的にユビキチン化することがわかった。LC1は、S-ニトロシル化により立体構造変化を起こし、マスクされていたユビキチン化部位を露出させることが示唆された(図2A)。S-ニトロシル化修飾がユビキチン化シグナルとして機能することは新しい概念であり、今後ますます広がることが推測される。

神経細胞は外界からの刺激によって細胞質のカルシウム濃度が上昇し、NO合成酵素が活性化してNOが産生される。NOによりS-ニトロシル化されたLC1は、ダイニンなどのモータータンパク質と結合し微小管を安定化することによって酸化ストレスなどの細胞内の緊急事態を伝達し、ミトコンドリアの移動や小胞輸送など、微小管上の輸送を一時的に停止することによりストレスに抵抗しようとしていると思われる。しかしながら、微小管の安定化が長く継続して、ミトコンドリアの移動や小胞輸送が止まってしまうと細胞は生存できないので、MITOLはLC1の分解を促進することによって微小管の過剰な安定化を解除していると思われる。このようにミトコンドリアが微小管上を活発に移動する一つの目的は、変性タンパク質の分解とともに微小管の安定性の調節という品質管理を行うことではないだろうか(図2B)。また、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一つの原因として疑われ

ているので、これらの病態におけるMITOLの関与を調べることは今後の治療につながるかもしれない。

5. MITOLはMfn2を活性化してミトコンドリアと小胞体との接着を制御する

エネルギーを産生するミトコンドリアは、タンパク質合成の場である小胞体と近接することにより、 Ca^{2+} の受け渡しや脂質代謝を効率よく行っている。ミトコンドリアの融合に関わるタンパク質Mfn2は、ミトコンドリアと小胞体の両方に局在して互いに結合することによりミトコンドリアと小胞体と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⁷⁾。MITOLがミトコンドリアと小胞体との接着部位にも局在していることが確かめられたので、MITOLとMfn2との結合について解析したところ、MITOLは小胞体に局在するMfn2とではなく、ミトコンドリアに局在するMfn2と結合してこれをユビキチン化することがわかった⁸⁾。また、MITOLはMfn2を特異的にポリユビキチン化するが、Mfn2の分解は誘導せず、Lys63結合型ポリユビキチン鎖を形成しミトコンドリアと小胞体との接着部位へのMfn2の局在に必要であることが示された。さらに、MITOLはMfn2のもつGTP結合能を上昇させ、Mfn2のGTPase活性に依存的な多量体化を誘導することが明らかになった。

RNAi法によりMITOLの発現を安定的に抑制したHeLa細胞において、小胞体とミトコンドリアとの接着部位は有意に減少することが確かめられた。また、ヒスタミンによる刺激ののちミトコンドリアにおける Ca^{2+} 濃度の変化を観察したところ、MITOLノックダウン細胞では対照とな

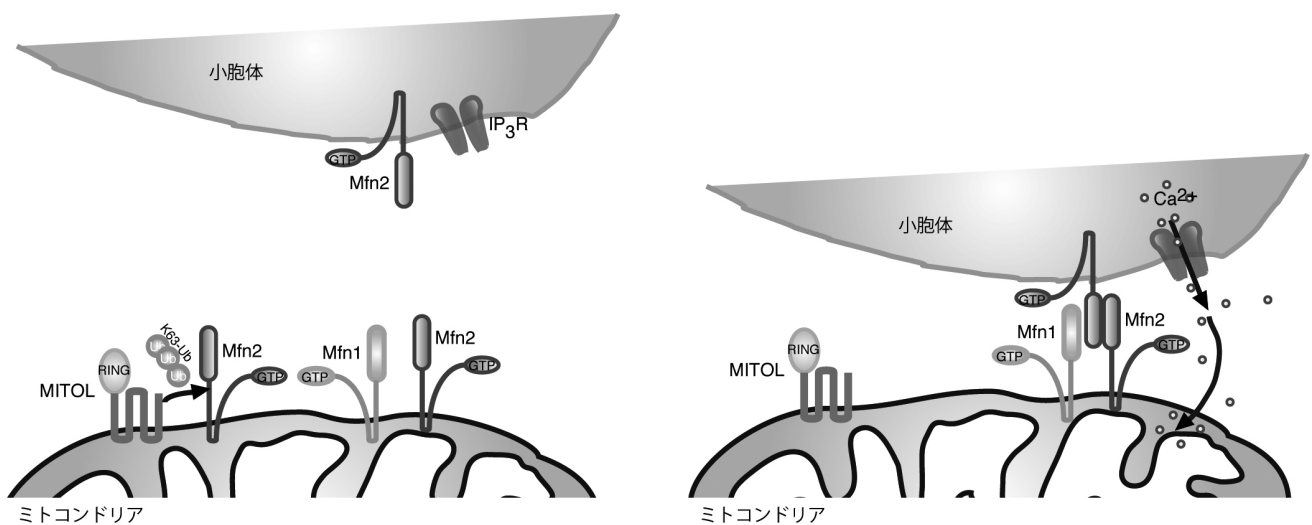


図3 MITOLによる小胞体-ミトコンドリア相互作用の制御機構モデル

MITOLはミトコンドリアのMfn2をユビキチン化することによりMfn2を活性化する。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。

る細胞に比べ Ca^{2+} 濃度の上昇が著しく抑制された。MITOL ノックダウン細胞では Mfn2 が多量体化しないためミトコンドリアと小胞体との接着部位の形成不全が生じ、ミトコンドリアは小胞体から Ca^{2+} を効率よく取り込めなかったと考えられる。以上の結果から、MITOL による Mfn2 の活性化を介した小胞体とミトコンドリアとの接着の制御という新たなモデルを提唱した (図 3)。MITOL はミトコンドリアに局在する Mfn2 と結合し、Mfn2 の Lys192 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 結合能が上昇することにより活性化され、小胞体に局在する Mfn2 と結合し Mfn2 が多量体化することによりミトコンドリアと小胞体とが接着する。

Mfn2 は、その遺伝子変異が神経難病である Charcot-Marie-Tooth 病の原因の一つとなることから、機能制御機構の解明が期待されていた。この研究により、Mfn2 の活性化の機構が明らかになり、Charcot-Marie-Tooth 病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果たしており、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連していることがこれまで多く報告されている。ミトコンドリアと小胞体との接着の機構の一端が解明されたことより、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。

6. お わ り に

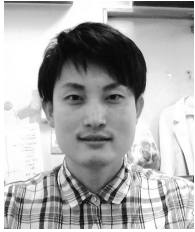
MITOL 欠損マウスから樹立されたタモキシフェン誘導型 MITOL 欠損線芽細胞 (MEF) に、タモキシフェンを添加して MITOL 遺伝子を欠損させるとほとんどの細胞は 48 時間以内に細胞周期を停止して肥大化しながら死滅する。ところがごく一部の細胞は何とか生き残り、その後時間経過とともに野生型 MEF と見分けがつかないほど元気に

なって増殖する。したがって、MITOL は必ずしも細胞の生存に必須ではない。しかし、一見正常に回復したと思われる MITOL 欠損 MEF のミトコンドリアから異常な ROS レベルの上昇が観察される。我々は大脳皮質・海馬特異的、心筋特異的、ケラチノサイト特異的 MITOL 欠損マウスを樹立して現在解析中であるが、どのマウスも老化所見を伴った重篤かつ多彩な表現型を示している。正常組織においても加齢とともに MITOL の発現が有意に低下することから、MITOL はミトコンドリアからの活性酸素種の産生を調節することにより老化を制御しているように思われる。あらためてミトコンドリアの重要性を痛感しつつ、ミトコンドリア疾患学の新たな展開が MITOL 研究から拡がることを予感している。

- 1) Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., Inatome, R., & Yanagi, S. (2006) *EMBO J.*, 25, 3618–3626.
- 2) Deng, H.X., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, G.H., Khan, M.S., Hung, W.Y., Bigio, E.H., Lukas, T., Dal Canto, M.C., O'Halloran, T.V., & Siddique, T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 7142–7147.
- 3) Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., Ogata, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., & Yanagi, S. (2009) *Mol. Biol. Cell*, 20, 4254–4530.
- 4) Sugiura, A., Yonashiro, R., Fukuda, T., Matsushita, N., Nagashima, S., Inatome, R., & Yanagi, S. (2011) *Mitochondrion*, 11, 139–146.
- 5) Yonashiro, R., Kimijima, Y., Shimura, T., Kawaguchi, K., Fukuda, T., Inatome, R., & Yanagi, S. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 2382–2387.
- 6) Stroissnigg, H., Trancikova, A., Descovich, L., Fuhrmann, J., Kutschera, W., Kostan, J., Meixner, A., Nothias, F., & Propst, F. (2007) *Nat. Cell. Biol.*, 9, 1035–1045.
- 7) de Brito, O.M. & Scorrano, L. (2008) *Nature*, 456, 605–610.
- 8) Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H.M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., & Yanagi, S. (2013) *Mol. Cell*, 51, 20–34.

 著者寸描

●長島 駿（ながしま しゅん）



東京薬科大学生命科学部分子生化学研究室
助教。博士（生命科学）。

■略歴 1985年立川市に生る。2007年東京薬科大学生命科学部卒業。09年同大学大学院生命科学研究科修士課程修了。12年同大学大学院生命科学研究科博士課程修了。12年より現職。

■研究テーマと抱負 研究を通して神経疾患の新たな治療法の確立に貢献したい。

■ホームページ <http://logos.ls.toyaku.ac.jp/Life-Science/lmb-8/>

■趣味 サッカー、フットサル、盆栽。

●柳 茂（やなぎ しげる）



東京薬科大学生命科学部分子生化学研究室
教授。博士（医学）。

■略歴 1964年姫路市に生る。92年福井医科大学卒業。内科医を経て同年福井医科大学助手（生化学講座、山村博平教授）。米国Yale大学にて黒崎知博博士に師事し、94年神戸大学医学部助手（生化学講座）。

2000年同助教授を経て05年より現職。02年から06年まで科学技術振興機構さきがけ研究員兼任。04年日本生化学会奨励賞受賞。

■研究テーマと抱負 MITOLの機能解析を通してミトコンドリアの新たな役割を解明し、神経疾患や老化を中心にミトコンドリア疾患学の体系化に貢献したい。

■ホームページ <http://logos.ls.toyaku.ac.jp/Life-Science/lmb-8/>

■趣味 イカ釣り。三浦半島の長井にある小見山丸に乗船していますが、イカオヤジとよばれるお金と暇を持て余した武装集団にいつも打ち負かされています。