

氏名（本籍）	武田 啓佑（埼玉県）
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 第112号
学位授与の日付	平成30年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	MITOLはIRE1 α のユビキチン化を介して小胞体ストレス誘導性 アポトーシスを抑制する
論文審査委員	(主査) 柳 茂 教授 多賀谷 光男 教授 玉腰 雅忠 准教授 松下 暢子 准教授

論文内容の要旨

【序論】

小胞体はタンパク質の合成・フォールディングや脂質代謝、カルシウムイオンの貯蔵など多彩な機能を持つ細胞小器官である。しかしながら、酸化ストレスや飽和脂肪酸の蓄積をはじめとした細胞内環境の変化は小胞体の生理機能を著しく障害する。その結果生じる小胞体恒常性の不均衡は小胞体ストレスの原因となり、Unfolded protein response (UPR)の引き金となる。

UPRは変性タンパク質の再構成や分解を誘導することで小胞体近傍の異常を排除し小胞体恒常性の維持に貢献する。一方で小胞体ストレスが慢性化すると、UPRは細胞生存から細胞死へとシグナルを変化させる。UPRによる細胞死誘導機構ではミトコンドリアが中心的役割を担っている。小胞体膜上に局在するUPRセンサーPERK, IRE1 α , ATF6はBcl-2ファミリータンパク質の発現誘導を介してミトコンドリア膜透過性遷移 Mitochondrial permeability transition pore (mPTP)を引き起こし、細胞を死へと至らしめる。しかしながら、UPRのシグナルが細胞生存から細胞死へと変化する際の詳細な分子機序はほとんど解明されていない。近年では小胞体ストレスにおける細胞死が、小胞体からミトコンドリアへのシグナル伝達によって惹起されることに着目し、小胞体・ミトコンドリア間の膜接触領域 Mitochondria-associated ER membrane (MAM)の重要性が明らかとなりつつある。実際、UPRセンサーであるPERKとIRE1 α は小胞体膜上の中でも、とりわけこのMAMに豊富に存在している。しかしながら、UPRセンサーとMAMの因果関係を正しく理解するためには、更なる研究が必要とされている。

当研究室にて同定された **Mitochondrial ubiquitin ligase (MITOL)** はミトコンドリア外膜に局在するユビキチンリガーゼである。これまでの研究成果により、MITOL はミトコンドリア恒常性の維持に重要な機能を有することが多数報告された。以前の研究より、MITOL の発現抑制がミトコンドリアのみならず、小胞体の形態異常を増大させることが示唆されたものの、小胞体における MITOL の新機能は未だ発見されていない。

ここで本研究は MITOL の新規基質として IRE1 α を同定し、MITOL による IRE1 α の抑制制御が小胞体ストレス下におけるアポトーシス誘導を阻害することを報告する。また MITOL-IRE1 α 間の相互作用は小胞体ストレスの持続に伴って減衰することを見出したので、MITOL-IRE1 α 間のシグナル変化が小胞体ストレス下における細胞運命を決定付ける分子機序の一端であると推測される。

【結果】

1. MITOL は小胞体ストレス誘導性の細胞死を抑制する

小胞体の形態異常は小胞体ストレスや UPR 活性化による特有の表現型として知られている。そのため、MITOL 欠損細胞における小胞体ストレス誘導剤の影響を検証した。その結果、MITOL 欠損細胞はコントロール細胞と比較して、小胞体ストレスに対し非常に脆弱であった。また MITOL の欠損は小胞体ストレス誘導性の mPTP を過剰に生じさせた。MITOL 欠損細胞の示す小胞体ストレス脆弱性は野生型 MITOL の再発現によって回復したが、酵素不活性変異体では解消されなかったため、MITOL は酵素活性依存的に小胞体ストレス抵抗性を示すものと考えられる。

2. MITOL は IRE1 α の過剰活性化と細胞死誘導を阻害する

MITOL 欠損細胞における小胞体ストレス脆弱性の分子機序を理解するため、UPR の活性について検証した。その結果、MITOL の欠損は 3 種類の UPR センサーの中でも IRE1 α の活性のみを顕著に増大させた。IRE1 α は Kinase と RNase の両活性をもつ非常にユニークなタンパク質で、Kinase 活性は JNK のリン酸化を、RNase 活性はアンチアポトーシス miRNA の分解を媒介することで mPTP と細胞死を惹起する。実際に、MITOL の欠損は IRE1 α 依存的な JNK のリン酸化とアンチアポトーシス miRNA の分解を亢進させた。また IRE1 α の発現抑制は MITOL 欠損細胞における小胞体ストレス脆弱性を解消した。したがって、MITOL は IRE1 α のシグナル経路を介して小胞体ストレス下の細胞運命を制御していると推察される。

3. MITOL は IRE1 α を K63 結合型ポリユビキチン鎖によってユビキチン化する

MITOL が IRE1 α の過剰活性化を妨げることで小胞体ストレス誘導性の細胞死を抑制することが示されたので、MITOL と IRE1 α の因果関係について詳細な分子機序の解明を試みた。その結果、MITOL が直接的に IRE1 α と結合し、基質としてポリユビキチン鎖修飾を行うことが明らかとなった。重要なことに、MITOL による IRE1 α のユビキチン化は、K48 結合型ポリユビキチン鎖による古典的なタン

パク質分解誘導ではなく、近年提唱された K63 結合型ポリユビキチン鎖によって基質の活性・局在変化を誘導する新しいポリユビキチン鎖修飾であった。実際に、MITOL の欠損は IRE1 α のタンパク質分解速度に関与しなかった。そのため、MITOL は IRE1 α を基質とし、その活性を制御することが示唆された。

4. MITOL は IRE1 α K481 を特異的にユビキチン化する

MITOL-IRE1 α 間の分子相互作用について詳細に理解するため、IRE1 α のユビキチン化部位の同定を試みた。その結果、MITOL は IRE1 α K481 を特異的にユビキチン化することが解明された。IRE1 α K481R 変異体は MITOL による K63 結合型ポリユビキチン鎖修飾を受けないため、MITOL 欠損細胞と同様に IRE1 α の過剰活性化を示すと想定される。IRE1 α K481 が真なる修飾部位であることを証明するため、IRE1 α K481R の過剰発現時における IRE1 α RNase の活性を検証した。期待通り、IRE1 α K481R は IRE1 α WT と比較して、高い RNase 活性を有し、アンチアポトーシス miRNA の過度な分解と強いアポトーシス誘導を示した。これらの結果より、IRE1 α K481 は MITOL によるユビキチン化部位であると考えられる。

5. MITOL は MAM 依存的に IRE1 α と結合する

MITOL はミトコンドリア外膜に 4 回膜貫通するユビキチンリガーゼであるが、小胞体膜タンパク質である IRE1 α を基質にできることを解き明かした。小胞体とミトコンドリアは MAM によって直接的な膜接触を形成するため、MITOL-IRE1 α 制御経路における MAM の意義について検討した。その結果、MITOL、IRE1 α 共に MAM に豊富に存在することが示された。さらに、小胞体-ミトコンドリア間の膜接触を媒介する架橋分子 PACS2 および Mfn2 の発現抑制は MITOL-IRE1 α 制御経路を破綻させた。したがって、MITOL は MAM を足場として IRE1 α と結合することが明らかとなった。

6. MITOL-IRE1 α 制御経路は小胞体ストレスの持続化により減衰する

MITOL による IRE1 α の抑制制御が小胞体ストレス下においてどのような生理的意義を持つか理解するため、小胞体ストレス下における MITOL-IRE1 α 制御経路の経時変化を追跡した。その結果、MITOL は小胞体ストレス下よりもむしろ、基底状態において IRE1 α をユビキチン化しており、MITOL-IRE1 α 制御経路は小胞体ストレスが未解消のまま持続すると、急速に減弱した。さらに、MITOL は活性型 IRE1 α よりも RNase 不活性型 IRE1 α と強く結合した。以上の結果は、MITOL による IRE1 α 制御経路は小胞体ストレス発生以前に最も効果を発揮しており、この制御経路が次第に減衰することこそが小胞体ストレスにおけるアポトーシス誘導を惹起させると推察される。

【結論】

本研究より、MITOL の小胞体恒常性における新しい機能が発見された。MITOL は IRE1 α を直接

ユビキチン化することによって、一過的な小胞体ストレス応答時に IRE1 α が過剰活性化することを妨げており、一方で小胞体ストレスが慢性的で不可避なものに転じるとともに、IRE1 α の抑制制御を減衰させることで細胞運命をアポトーシスへと至らしめる(図 1)。小胞体ストレスによる細胞死は、細胞内のストレス応答と機能不全を周囲へ伝播させないためのマクロな防御機構としての側面をもつものの、過剰な細胞死は多種多様なヒト疾患の原因ともなっている。今回、小胞体ストレス下における細胞運命、生と死を決定付ける分子機構について新しい制御経路が解明されたことで、小胞体ストレスを原因としたヒト疾患の新規治療法の確立に強く貢献すると期待できる。また本研究によって提唱された小胞体-ミトコンドリア間のユニークで新しい関係性は、小胞体ストレス下におけるシグナル経路の全体像を把握する上で、非常に重要な知見になると考えられる。

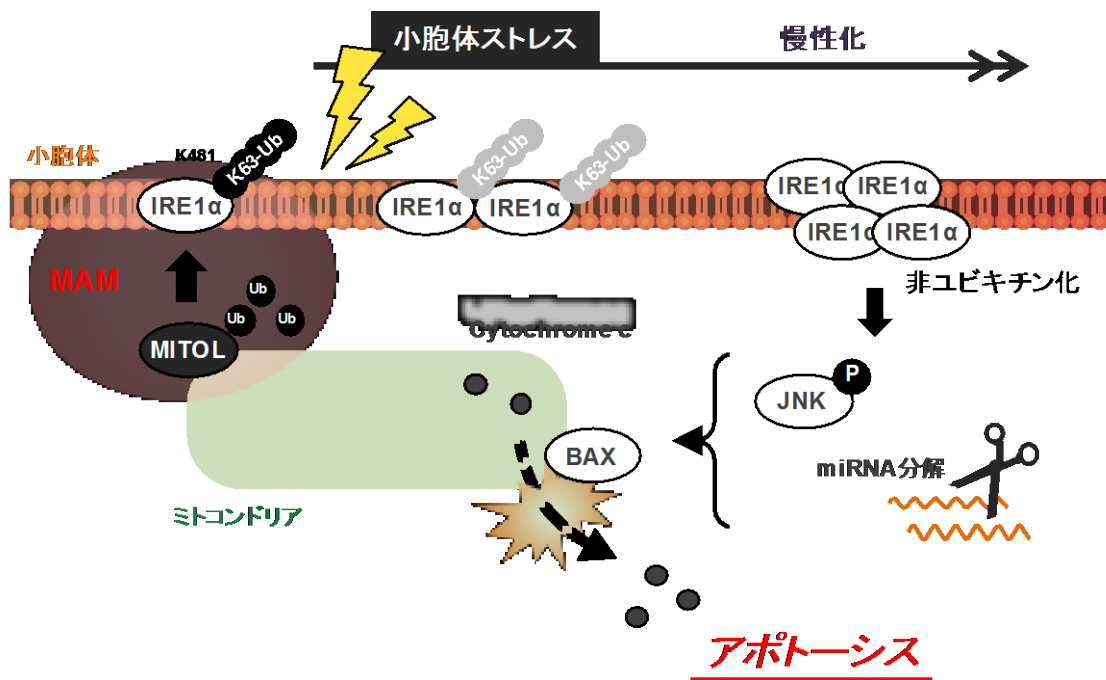


図1. MITOLによるIRE1 α の制御機構

審査結果の要旨

小胞体はタンパク質の合成・フォールディングや脂質代謝、カルシウムイオンの貯蔵など多彩な機能を持つ細胞小器官である。しかしながら、酸化ストレスや飽和脂肪酸の蓄積をはじめとした細胞内環境の変化は小胞体ストレスの原因となり、Unfolded protein response (UPR)の引き金となる。UPRは変性タンパク質の再構成や分解を誘導することで小胞体近傍の異常を排除し小胞体恒常性の維持に貢献する。UPRは3つのキーセンサータンパク質によって制御されることが知られている。その一つであるIRE1 α はストレス初期には細胞生存を、ストレス慢性期には細胞死を誘導できる二面性をもつタンパク質である。しかしながら、UPRにおけるIRE1 α を介した細胞の生と死のスイッチ機構は未だ解明されていない。

申請者は、所属研究室にて同定されたミトコンドリア膜型ユビキチンリガーゼMITOL (MARCH5) の新規基質として、IRE1 α を同定した。MITOLはIRE1 α の481番目のリジン残基(K481)にK63型ポリユビキチン鎖を付加することで、分解誘導ではなく、IRE1 α の過剰な活性化を抑制していることを明らかにした。実際にIRE1 α のK481R変異やMITOLの欠損が、IRE1 α を過剰活性化させ、UPR誘導性の細胞死を引き起こすことを示した。またこの経路はマウスの脊髄においても機能しており、脊髄におけるMITOLの欠損はIRE1 α の過剰な活性化による細胞死の亢進を引き起こすことが観察された。これらの結果は、MITOLによるIRE1 α の活性制御は筋萎縮性硬化症などの神経変性疾患の病態に関与する可能性が示唆された。さらに、MITOLによるIRE1 α の抑制制御はミトコンドリア-小胞体接触場

(Mitochondria-associated ER membrane : MAM) に依存していることを明らかにしたことより、MAMが小胞体ストレス下における細胞死スイッチの起点となりうるというMAMの新たな役割を示したことは学術的に重要な意義を持つと評価できる。

本審査での発表と質疑応答も適切であり、研究者として資質も高いと判断できる。以上のことから、本申請論文は博士学位授与に値すると考えられる。