

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07007

研究課題名(和文)ミトコンドリア形態制御におけるAAA型分子シャペロンCdc48の役割

研究課題名(英文)Function of the AAA ATPase Cdc48 in mitochondrial morphology regulation

研究代表者

江崎 雅俊 (Esaki, Masatoshi)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：70437911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：活発に増殖する細胞においてミトコンドリアはヒモ状の形態をとるが、頻繁に分裂と融合を繰り返していることが知られている。AAA型ATPaseであるCdc48に加えて、本研究ではさらに、Cdc48と相互作用するUbp3とUbx2が、それぞれミトコンドリアの融合反応と融合制御因子Fzo1の分解を制御していることを見出した。Ubp3は、Fzo1の融合活性を低下させる因子であるUbp12の分解を促進することによって、ミトコンドリア融合反応を促進していると考えられる。一方、Ubx2はFzo1の分解に直接関わると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria form tubular structures during vegetative growth and undergo consecutive division and fusion. We have shown that the AAA ATPase Cdc48 is required for the fusion and for turnover of the fusion-responsible mitochondrial outer membrane protein Fzo1. In this study, we found that two Cdc48-interacting proteins, Ubp3 and Ubx2, are involved in mitochondrial fusion and Fzo1 turnover, respectively. Ubp3 facilitates degradation of Ubp12, a down-regulation factor for the fusion-responsible modification of Fzo1, thereby facilitating mitochondrial fusion. By contrast, Ubx2 facilitates Fzo1 turnover without affecting mitochondrial morphology.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 膜融合 タンパク質分解 AAA ATPase 分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリア

ミトコンドリアは二重の生体膜によって囲まれた細胞小器官で、エネルギーである ATP の産生やヘム鉄の合成などを行う。ATP 産生には酸素分子を利用することから、ミトコンドリアのタンパク質や DNA は活性酸素によってダメージを受けやすい。ミトコンドリアは融合と分裂を頻繁に繰り返すことが知られているが、これはミトコンドリア内環境の均一化や、深刻なダメージを受けた分子の排除などに役立っていると考えられている。

(2) Cdc48

Cdc48 (p97 や VCP と呼ばれる) は、AAA 型の分子シャペロンであり、様々な細胞機能に必須であることが明らかとなっている。私たちは、ミトコンドリアの融合反応に Cdc48 が必須であることを見出した。

Cdc48 は主に、ユビキチン修飾 (Ub 化) されたタンパク質を基質とし、これを複合体から脱会合させる活性を持つ。脱会合された Ub 化タンパク質は新しい反応に用いるためにリサイクルされたり、不要であれば分解される。一方、Cdc48 は小胞融合における係留複合体 (SNARE) の脱会合に関わるが、これは Ub 化非依存的であり、脱会合された SNARE タンパク質はリサイクルされる。ミトコンドリア融合反応における Cdc48 の機能は何であろうか？

(3) Fzo1

ミトコンドリアの融合反応では、GTPase である Fzo1 が必須の役割を果たしている。Fzo1 はミトコンドリア外膜に結合しており、ミトコンドリア外膜融合に先立って、GTPase 活性依存的に図 1 のような係留複合体を形成すると考えられている。近接した外膜同士が融合した後に係留複合体はなんらかの方法によって解体される必要があるが、脱会合された後 Fzo1 は次の膜融合反応にリサイクルされるのか、それともタンパク質分解によって係留複合体は除去されるのかなど、その詳細は不明である。

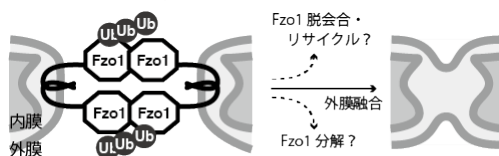


図 1 ミトコンドリア外膜融合反応

Fzo1 は異なる 2 種類の Ub 化を受ける。リジン 398 の Ub 化は、ミトコンドリア外膜の融合反応に必須であり、脱 Ub 化酵素 Ubp12 によって負に制御される (図 2)。一方、部位は未知だが、Fzo1 の分解を促進する別の Ub 化も受け、これは脱 Ub 化酵素 Ubp2 によって負に制御される (図 2)。このように異なる Ub 化と脱 Ub 化のバランスによって、Fzo1 の機能が調節されると考えられている。

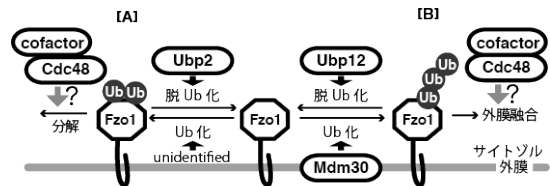


図 2 ユビキチン (Ub) 化による Fzo1 の機能制御

(4) Cdc48 と Fzo1

私たちはこれまでに、Cdc48 の機能欠損株では、ミトコンドリアの融合反応が阻害されていることに加え、Fzo1 の分解抑制も見られることを見出している (Esaki and Ogura, 2012)。はたして、Fzo1 の分解とミトコンドリア膜融合反応に相関関係はあるのだろうか？

Cdc48 の多くの機能は、Cdc48 に直接結合する補因子 (コファクター) によって制御されている。したがって、ミトコンドリアに関する Cdc48 のコファクターの同定が、機能解明に必須である。

2. 研究の目的

ミトコンドリアに関する Cdc48 のコファクターを同定し、ミトコンドリア融合反応の制御機構を解明する。

3. 研究の方法

ミトコンドリア形態制御に関する Fzo1 や Ubp12 などの様々な因子が、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究によって同定されており、哺乳類でも同様の因子が保存されていることがこれまでにわかっている。また、遺伝操作などが容易であることから、本研究では *S. cerevisiae* をモデル生物として用いた。

Cdc48 のコファクターは、Cdc48 と直接相互作用するいくつかの特徴的なドメインを有する。*S. cerevisiae* は、機能未知のタンパク質も含めて、約 20 種類の Cdc48 コファクターを持っている。このうち、Npl4 と Ufd1 以外の Cdc48 コファクターは、細胞の生育に必須ではない。そこで、Cdc48 コファクター遺伝子をそれぞれ欠失した酵母株を作製した。これらの Cdc48 コファクター変異株に、ミトコンドリアに局在化する GFP を発現するプラスミドを導入し、ミトコンドリア形態を蛍光顕微鏡によって観察した。

タンパク質の細胞内安定性は、シクロヘキシミド-チェイス実験によって評価した。シクロヘキシミドはリボソームに結合し、タンパク質合成を阻害する。したがって培地にシクロヘキシミドを加え細胞内の新規タンパク質合成を阻害した後、一定時間ごとに細胞内のタンパク質量変化を観察すると、タンパク質の細胞内分解速度を評価できる。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア形態

ミトコンドリアに局在する GFP を用いて、ミトコンドリア形態を観察すると、増殖細胞においては、ヒモ状の形態が観察される(図3; Chowdhury et al., unpublished)。UBX2 欠失株など、多くの Cdc48 コファクター欠失株では、野生型株と同様にヒモ状形態が観察された。調べた中では唯一、UBP3 欠失株において凝集した蛍光像が観察された。Cdc48 機能欠失変異株における凝集した蛍光像 (Esaki and Ogura, 2012) に相似していることから、Ubp3 はミトコンドリア形態制御に関わる Cdc48 コファクターであると考えられる。

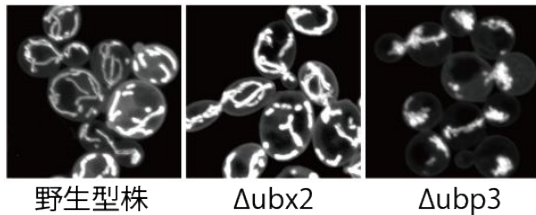


図3 ミトコンドリア GFP の蛍光像

(2) Fzo1

それぞれの Cdc48 コファクター欠失株において Fzo1 の細胞内安定性を調べるため、C 末端に検出用の HA タグを付加した Fzo1 を各細胞で発現させ、シクロヘキシミド-チェイス実験を行った。野生型株では、120 分で 90% 程度の Fzo1-HA が分解された(図4; Chowdhury et

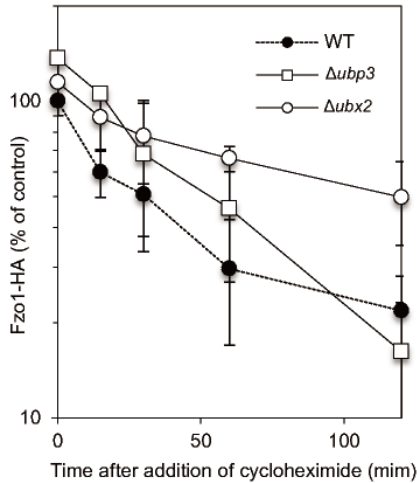


図4 Fzo1-HA のシクロヘキシミド-チェイス実験

al., unpublished)。UBP3 欠失株を含む多くの Cdc48 コファクター欠失株でも同様に、Fzo1-HA の速い分解が観察された。一方、UBX2 欠失株において、Fzo1-HA の分解速度の著しい遅延が観察された。これは、Cdc48 機能欠失変異株における Fzo1-HA の分解阻害 (Esaki and Ogura, 2012) と相同であることから、Ubx2 は Fzo1-HA の分解に関わる Cdc48 コファクターであると考えられる。

Fzo1 は、ホモ二量体や、ミトコンドリア融合時の係留複合体など様々な複合体を形成することが明らかとなっている。そこで、Ubp3

および Ubx2 が Fzo1 複合体形成に影響を与えるかどうか、密度勾配遠心実験によって調べた。それぞれの株からミトコンドリアを単離し、界面活性剤 digitonin で Fzo1 複合体を可溶化した。可溶化画分をショ糖密度勾配遠心にかけ、分子量ごとに分けした。その結果、UBP3 欠失株の Fzo1 複合体は、野生型とほぼ変わらなかったが、UBX2 欠失株から単離した Fzo1 では、野生型より大きい複合体の蓄積が見られた(図5; Chowdhury et al., unpublished)。したがって、Ubx2 は Fzo1 の複合体を脱会合し分解に導くと考えられる。

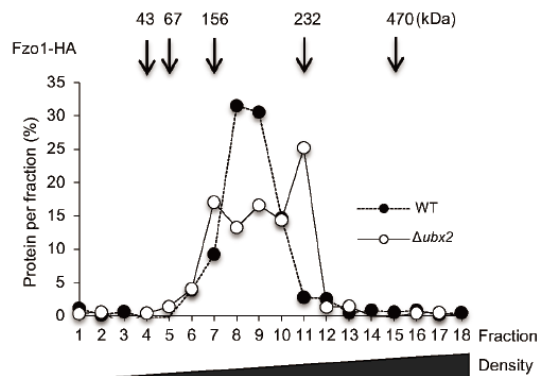


図5 Fzo1 の複合体状態

(3) Ubp2 および Ubp12

Fzo1 の動態制御、ひいてはミトコンドリア形態制御には脱ユビキチン化酵素 Ubp2 および Ubp12 が重要な役割を果たしている。そこで、UBP3 および UBX2 欠失株でのそれぞれのタンパク質量を調べた。その結果、UBP3 欠失株において、Ubp12 の安定化が見られた。一方、UBX2 欠失株において、Ubp2 の不安定化が見られた。

(4) まとめ

本研究の結果を表1にまとめた。

表1 まとめ

	$\Delta ubx2$	$\Delta ubp3$
ミトコンドリア融合	正常	異常
Fzo1 分解	抑制	正常
Fzo1 複合体	異常	正常
Ubp12 量	正常	増加
Ubp2 量	減少	正常

これらの結果から以下のモデルが考えられる。

<a> Ubp3 は Ubp12 の分解を促進する。これによって、ミトコンドリア外膜融合反応に必要な Ub 化 Fzo1 の脱 Ub 化が抑えられ、ミトコンドリア融合反応が促進する。このとき、Fzo1 の安定性に変化が見られなかったことから、Fzo1 の分解反応とミトコンドリアの融合反応との関連性は極めて低いと考えられる。

<b> Ubx2 は Ubp2 の分解を抑制する。おそらく、Ubp2 の分解のシグナルとなる未知の Ub 化酵素の分解を促進することに起因するのではないかと考えられる。既存のモデルでは、Ubp2 の分解抑制は、Fzo1 の分解を抑制する。逆に言うと、UBX2 の欠失は Ubp2 の分解を促進し、その結果 Fzo1 の分解が促進されると期待される。これは、UBX2 欠失株において、Fzo1 の分解抑制が観察された実験結果と矛盾する。したがって、Ubx2 は Fzo1 の分解を直接担っており、Fzo1 の分解カスケードの中で Ubp2 のステップよりも下流で Ubx2 は機能すると考えられる。

<引用文献>

Masatoshi Esaki and Teru Ogura. Cdc48p/p97-mediated regulation of mitochondrial morphology is Vms1p-independent. *J. Struct. Biol.*, **179**, 112-120, 2012

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2件)

1. Masatoshi Esaki<sup>1,2</sup>, Md. Tanvir Islam<sup>1</sup>, Naoki Tani, and Teru Ogura (<sup>1</sup>equal contribution, <sup>2</sup>corresponding author). Deviation of the typical AAA substrate-threading pore prevents fatal protein degradation in yeast Cdc48. *Sci. Rep.*, **7**, 5475, 2017.
2. Ai Johjima, Kentaro Noi, Shingo Nishikori, Hirotsugu Ogi, Masatoshi Esaki<sup>1</sup>, and Teru Ogura<sup>1</sup> (<sup>1</sup>corresponding author). Microtubule severing by katanin p60 AAA+ ATPase requires the C-terminal acidic tails of both  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins and basic amino acid residues in the AAA+ ring pore. *J. Biol. Chem.*, **290**, 11762-11770, 2015.

[学会発表](計4件)

1. 江崎 雅俊, Abhijit Chowdhury, 小椋 光。Cdc48 AAA ATPase によるミトコンドリア融合反応の制御機構。BMB2015 神戸, 平成 27 年 12 月 3 日。
2. 江崎 雅俊, Md. Tanvir Islam, 小椋 光 (招待講演)。多機能 AAA タンパク質 Cdc48 はいかにして基質タンパク質に作用するのか? 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 平成 28 年 12 月 1 日。
3. Abhijit Chowdhury, 小椋 光, 江崎 雅俊 Roles of the Cdc48-cofactor complexes in regulation of mitochondrial morphology in yeast. ConBio2017, 神戸, 平成 29 年 12 月 6 日
4. Md Tanvir Islam, 小椋 光, 江崎 雅俊. AAA molecular chaperone Cdc48 functions with

the 20S proteasome to maintain protein homeostasis. ConBio2017, 神戸, 平成 29 年 12 月 8 日

[図書](計1件)

1. Masatoshi Esaki. Cdc48 AAA ATPase regulates protein dynamics and turnover in mitochondria. AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection and Aging (Editor M.A. Hayat, Elsevier). Vol. 12, Chap. 5, 164-175, 2017

[産業財産権]

なし

[その他]

HP における研究成果発表

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np82/>

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np92/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

江崎 雅俊 (ESAKI MASATOSHI)

熊本大学発生医学研究所・助教

研究者番号 : 70437911

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Abhijit Chowdhury

熊本大学発生医学研究所・大学院生

Tanvir Md. Islam

熊本大学発生医学研究所・大学院生