

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07371

研究課題名(和文) ASPS-1によるCDC-48のデフォルト化の解析と新規線虫糖尿病モデルの確立

研究課題名(英文) Analysis of CDC-48 defaulting by ASPS-1 and establishment of a novel nematode diabetes model

研究代表者

山中 邦俊 (Yamanaka, Kunitoshi)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：90212290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：線虫ASPS-1はCDC-48とin vivo, in vitroともに相互作用していることを確認したが、ヘテロ4量体形成は観察されなかった。ASPS-1欠損株は長寿命であるが、DAF-18 (PTENホモログ) 欠損、もしくはPDZドメインタンパク質MPZ-1欠損を導入することにより長寿命性が抑制された。この結果は、ASPS-1が基質を捕捉するのに足場タンパク質であるPDZドメインタンパク質を利用していることを示唆している。ASPS-1欠損株では、匂い物質ジアセチルに対する走化性が消失すること、ARR-1欠損変異を導入すると走化性が回復することも新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回明らかにした寿命との関連、細胞増殖制御因子PTENとの相互作用ならびに匂い感知経路との関連などは、いまだに報告されていない極めてユニークかつ重要な機能である。p97の発現(活性)とがんの予後との関連性が報告されている。ASPS-1と相互作用するDAF-18/PTENは、細胞増殖を制御する極めて重要な因子である。CDC-48は、ALSやIBMPFDなどのヒト遺伝性疾患の原因因子でもある。これらを総合すると、CDC-48をベースにした種々のヒト疾患の診断・予防・治療戦略の確立や創薬研究の基盤となることが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：C. elegans ASPS-1 was found to interact with CDC-48 both in vivo and in vitro, but no heterotetramer formation was observed. ASPS-1-deficient strains were long-lived, but longevity was inhibited by introduction of DAF-18 (PTEN homologue) deficient mutation or MPZ-1 (PDZ domain protein) deficient mutation, suggesting that ASPS-1 utilizes PDZ domain proteins, which are scaffold proteins, to capture substrates. We also newly found that ASPS-1-deficient strains lost chemotaxis to diacetyl, while introduction of an ARR-1-deficient mutation restored chemotaxis.

研究分野：分子生物学

キーワード：AAAシャペロン 線虫 寿命

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CDC-48 は、極めて多岐にわたる機能に関わる AAA 型シャペロンである。CDC-48 は、N ドメインと 2 つの ATPase ドメインからなり、リング状の 6 量体構造をしている。ATP の加水分解エネルギーを N ドメインに伝えその位置を上下させることにより機械的エネルギーに変換し、それを基質に伝えることによって基質の大きな構造変化をもたらす。これにより複合体から基質の抽出・解離や複合体そのものの脱会合を促している。N ドメイン結合アダプター群 (20 数種類) がそれぞれに特異的な基質を認識し、C 末端結合アダプター (数種類) がそれらをどのように処理するかを規定している。これらのアダプターは役割を終えた後は解離されなければ、機能が固定され、ストレス応答時などのシャペロン機能に支障をきたすと考えられる。

極めてユニークな N ドメインアダプター ASPS-1 (ヒトでは ASPL や TUG と呼ばれる) が最近わかってきた。ASPS-1/ASPL/TUG は、N 末端にユビキチン様ドメイン、中央付近に UBX ドメインを有しており、この UBX ドメインを介して p97 (ヒト CDC-48 ホモログ) の N ドメインに結合する。p97 と ASPL を作用させると、6 量体 p97 は解離し、p97 と ASPL の安定なヘテロ 4 量体が形成されることが報告された (Arumughan et al., 2017; Rijial et al., 2016)。ASPL は、p97 と安定なヘテロ 4 量体を形成することで、不活性型 p97 プールを形成しているのだろうか？ これは p97 総活性量の制御システムの 1 つであろうか？

2. 研究の目的

線虫には 2 つの極めてよく似た CDC-48 ホモログ (CDC-48.1 と CDC-48.2) が、ほぼ 2:1 の量比で存在している (Yamauchi, Yamanaka et al., 2006)。CDC-48.1 欠損株、すなわち CDC-48 量が野生株の 1/3 になる株では、産子数が約半分に減少することを報告している (Sasagawa, Yamanaka et al., 2009)。ASPS-1 が不活性型 CDC-48 プールの形成に関わっているのであれば、CDC-48.1 欠損株に ASPS-1 欠損を導入すれば総 CDC-48 活性量が増加し、減少した産子数が回復すると期待される。しかし結果は、胚性致死となり二重欠損株を得ることすらできなかった。産子数に差異がない CDC-48.2 欠損株に ASPS-1 欠損を導入すると、二重欠損株は得られたが産子数の減少が観察された。この結果は、CDC-48 が十分量存在する野生株では ASPS-1 は見かけ上必要でないが、CDC-48 量が減少すると、その程度に合わせて ASPS-1 の要求性も強くなることを示唆しており、ASPS-1 は単に不活性型 CDC-48 プールの形成に関わっているのではないと考えられる。

ASPS-1 の機能に関して、これまで知られている N ドメインアダプターの「基質特異性」を担っている機能とは異なり、もしくはそれに加えて次の 2 つの可能性を提唱する (図 1)。1 つ目は、線虫 ASPS-1 は CDC-48 の不活性型プールの形成に関わるのではなく、役割を終えた CDC-48 を解体し新たな CDC-48 を再会合する過程に働く CDC-48 のデフォルト化因子である。すなわち、CDC-48 と ASPS-1 のヘテロ 4 量体は、デフォルト化過程の中間体である。2 つ目は、CDC-48 と ASPS-1 のヘテロ 4 量体は例えば糖輸送・利用などに関わる新規機能を獲得する。これらの可能性を明らかにするのが、本申請課題の目的である。

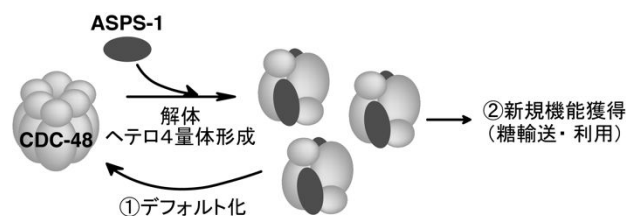


図1 ASPS-1によるCDC-48のデフォルト化と新規機能(糖輸送・利用)獲得モデル

3. 研究の方法

タグ付きタンパク質を発現する線虫を CRISPR/Cas9 により作製する。
種々の線虫ライセートを調製し免疫沈降後、ウエスタンやマス解析により共沈タンパク質の解析を行う。
種々の変異体を作製し、寿命・産卵数・化学走性などを測定する。
線虫から RNA を抽出し、RNA-seq 解析や定量 PCR 法により個々の遺伝子発現量を比較解析する。

4. 研究成果

(1) まず線虫 ASPS-1 が CDC-48 と相互作用することを調べた。GFP 融合 ASPS-1 を発現する線虫を CRISPR/Cas9 で作製し、抗 GFP 抗体で免疫沈降させると CDC-48 が共沈してくることを確認した。GST を融合した ASPS-1 を大腸菌を用いて発現・精製を行い、先に昆虫細胞を用いて精製した CDC-48 と混合し GST プルダウンをおこなうと CDC-48 が共沈してくることも確認した。GFP を融合した ASPS-1 を発現する線虫を観察したところ、ASPS-1 (GFP シグナル) は細胞質と核に観

察された。これは CDC-48 の細胞内局在様式と極めてよく似ていた。これらの結果より、確かに線虫 ASPS-1 は CDC-48 と in vivo でも in vitro でも相互作用していることを明らかにした (図 2)。ところがゲル濾過カラムを用いた実験からは、調べた条件下では ASPS-1 と CDC-48 のヘテロ 4 量体形成は観察されなかった。これは線虫 ASPS-1 結合による CDC-48 の解体活性は無いもしくは条件が異なることを示唆している。今後は in vivo での ASPS-1 と CDC-48 の結合状態を明らかにする必要がある。

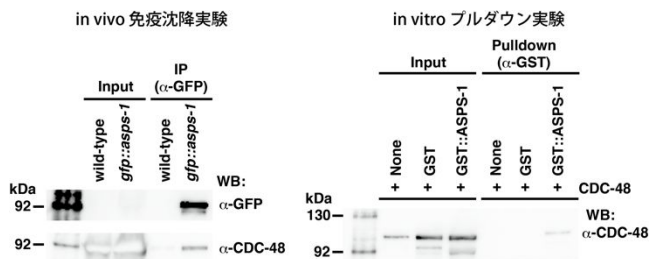


図 2. CDC-48 と ASPS-1 は in vitro でも in vivo でも相互作用する

(2) ASPS-1 欠損株は野生株に比べて長寿命であるが、DAF-18 (PTEN ホモログ) 欠損を導入すると、長寿命性は完全に抑制され、DAF-18 欠損株と同じ短寿命を示した (図 3)。また、ASPS-1 欠損株では、DAF-16 (FOXO ホモログ) の核局在が極めて顕著であった。これらの結果は、CDC-48-ASPS-1 が DAF-18 のフォスファターゼ活性を負に調節し、インスリン経路を制御している因子であることを示唆している。ASPS-1 と DAF-16 で逆の発現制御を受けている遺伝子を同定する目的でそれぞれの欠損変異株を用いて RNA-seq 解析を行なった。現在 5 つの遺伝子に着目し、それらがどのように寿命に関わっているかを解析している。また CDC-48-ASPS-1 複合体の作用点を明らかにする目的で、FLAG タグを付加した ASPS-1 を発現する線虫を構築し、免疫沈降後、現在マス解析を行なっている。1 つには DAF-18 が同定できると想定しているが、酵素・基質の相互作用での結合が一過的であり同定できなければ、架橋を試みることも検討する。

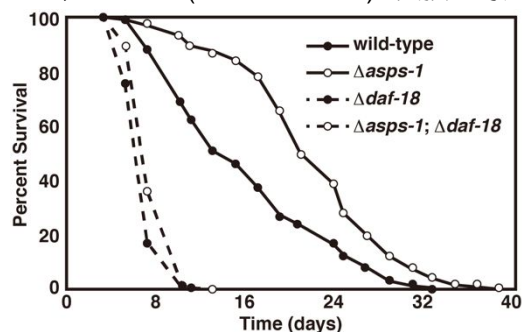


図 3 ASPS-1 欠損株の長寿命は DAF-18 欠損の導入で消失

(3) DAF-18 は、PTEN と同様に C 末端に PDZ ドメインと相互作用する配列を持っている。CDC-48-ASPS-1 複合体は PDZ ドメイン含有タンパク質とそれに相互作用するタンパク質 (DAF-18 を含む) の結合状態を制御しているとの仮説を立てた。種々の PDZ ドメイン含有タンパク質欠損株を用いて調べた結果、MPZ-1 欠損変異が ASPS-1 欠損変異株の長寿命性を抑制することを見出した (図 4)。これは、ASPS-1 が基質を捕捉するのに足場タンパク質である PDZ ドメインタンパク質を利用していることを示唆していると考えられる。DAF-18 が相互作用する PDZ ドメイン含有タンパク質を同定する目的で、DAF-18 に HA タグを付加する事により現在マス解析中である。また上記の FLAG タグを付加した ASPS-1 を用いた免疫沈降・マス解析から、種々の PDZ ドメインを有する足場タンパク質が同定できることも期待している。これにより CDC-48-ASPS-1 複合体の新規基質が明らかになり、制御している生体内反応の解明につながる。

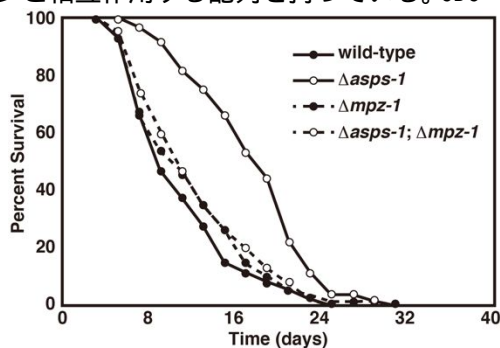
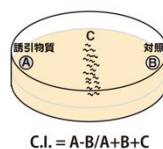


図 4. ASPS-1 欠損株の長寿命は MPZ-1 欠損の導入で消失

(4) 線虫は、ジアセチル、ベンズアルデヒドやイソアミルアルコールなどの誘因物質に集まる走化性を示す事が知られている。ASPS-1 欠損株では、ジアセチルに対する走化性が消失することを新たに見出した (図 5)。これはジアセチルに対するレセプター ODR-10 欠損株と同程度であった。ベンズアルデヒドやイソアミルアルコールに対する走化性には変化がなかった。



$$C.I. = \frac{A-B}{A+B+C}$$

誘因物質	線虫株	C.I.
ジアセチル	野生株	0.750 ± 0.068
	ASPS-1 欠損株	0.073 ± 0.030
	ODR-10 欠損株	0.021 ± 0.017
ベンズアルデヒド	野生株	0.853 ± 0.025
	ASPS-1 欠損株	0.220 ± 0.069
	ARR-1 欠損株	0.878 ± 0.033
	ASPS-1; ARR-1 二重欠損株	0.893 ± 0.052

図 5. ASPS-1 欠損は化学走化性にも影響を及ぼす

ASPS-1 と ARR-1 との相互作用が線虫データベースに記載されている。匂い感知のジアセチルシグナル伝達経路にも ARR-1 が含まれている。そこで ARR-1 欠損変異を ASPS-1 欠損変異株に導入すると、ジアセチルに対する走化性が回復することがわかった (図 5)。ARR-1 欠損変異株のジアセチルに対する走化性は野生株と同程度であった。これらの結果は当初全く予想していなかった発見であり、ジアセチル感知に関わるシグナル伝達経路に CDC-48-ASPS-1 複合体が関与していることを強く示唆している。

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 1件）

1. 発表者名 山中 邦俊、小椋 光
2. 発表標題 線虫を用いたCDC-48のNドメイン結合アダプターASPS-1の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanaka K. and Ogura T.
2. 発表標題 Functional analysis of ASPs-1, an N-domain binding adaptor of CDC-48, in C. elegans.
3. 学会等名 Keystone Symposia on “AAA+ Proteins: from Atomic Structures to Organisms” (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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