

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770106
 研究課題名（和文）多機能 AAA タンパク質 p97 の機能解析 ～各ドメインの生体内機能と生化学的機能
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms of a multifunctional AAA protein, p97

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

研究成果の概要（和文）：p97 は細胞内の様々な反応に関与している必須な AAA ATPase であり，優性進行性疾患である骨パジェット病と前頭側頭葉型認知症を伴う遺伝性封入体筋炎の原因因子である。p97 には 2 つの AAA ドメインがあるが，疾患を引き起こす変異は N 末端側半分に集中している。本研究では，各ドメインの ATPase 活性を失った変異体を作製し，その機能を調べた。その結果，C 末端側の AAA ドメインは p97 の機能に必須であり，その活性は N 末端側の AAA ドメインによって調節されていることが分かった。

研究成果の概要（英文）：P97 is an essential AAA ATPase that is required for many cellular processes, and is identified as a causative gene for an autosomal dominant human disorder, inclusion body myopathy associated with Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia. P97 possesses two AAA domains, in which disease-related mutations are mostly found in the N-terminal half. In this study, effects of mutations defective in ATPase activity in each AAA domain on the function of yeast p97 were analyzed. In this result, it is found that the C-terminal AAA domain is essential for p97 functions, which is modulated by the N-terminal AAA domain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：AAA, ATPase, 分子シャペロン, 出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

p97 は、全ての真核細胞にみられる、良く保存された AAA タンパク質である。AAA タンパク質は、ATP の加水分解によるエネルギーを利用して、基質タンパク質のアニフォールディングや分解、複合体の脱会合、脱凝集などを行う分子シャペロンである。p97 は、家族性優性疾患である骨パジェット病と前頭側頭葉型認知症を伴う遺伝性封入体筋炎 (IBMPFD) の原因因子としても同定されている。p97 の細胞機能は多岐にわたり、小胞体の品質管理、膜融合、細胞分裂、アポトーシスなどへの関与が明らかとなってきた。一方、p97 がどのようにしてこれらの反応を担っているのか、その詳細については不明な点が多い。

p97 は、200 アミノ酸程度の N 末端領域と 2 つの AAA ドメインからなり、6 量体でダブルリング構造を形成する。N 末端側の AAA ドメイン (D1) は 6 量体形成に必須であり、C 末端側の AAA ドメイン (D2) は高い ATPase 活性を示す。また、ATP の加水分解に伴って D2 は大きな構造変化をおこすこと、D2 の ATPase 活性は小胞体関連分解に必須であり、ある基質タンパク質と直接相互作用することなどから、D2 が主要な機能ドメインであると考えられる。一方、D1 の役割については意見が別れており、D1 の ATPase 活性を失うと D2 の ATPase 活性に影響を与えるという報告と与えないという報告とがある。しかし、IBMPFD を引き起こす p97 変異は主に N 末端ドメインと D1 ドメインとから見つかったことから、D1 ドメインもなんらかの重要な役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

in vivo での変異体スクリーニングおよび精製タンパク質を用いた *in vitro* 解析によって、D1 および D2 の ATPase 活性の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* 変異体スクリーニングには、遺伝学的解析が容易な出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いた。出芽酵母の染色体上の p97 ホモログ (*CDC48*) 遺伝子を欠失させ、プラスミドから Cdc48p 変異体を発現する酵母株を作製した。*CDC48* は必須遺伝子であることから、酵母の増殖能を指標として、変異体 Cdc48p が機能しているかどうか、評価した。

(2) *in vitro* 解析には、既に精製方法が確

立している線虫の p97 ホモログ (CDC-48.1) を用いた。様々な変異体を作製し、その ATPase 活性を詳細に調べた。

4. 研究成果

(1) *in vivo* 変異体スクリーニング

D2 に ATP が結合できない変異体 (K534A, K534T) および D2 が ATP を加水分解できない変異体 (E588Q) を発現する酵母はいずれも致死であった (図 1)。また、D2 の ATPase 活性が低下した変異株 (E588D) は著しい増殖阻害を示した。したがって、D2 の ATPase 活性は必須であることがわかった。



図 1 D2 変異株

一方、D1 に ATP が結合できない変異体 (K261A, K261T) を発現する酵母は致死ではなかった (not shown)。さらに、D1 が ATP を加水分解できない変異株 (N358A, R369A) も増殖可能であった (図 2)。したがって、D1 の ATPase 活性は必須ではないことがわかった。

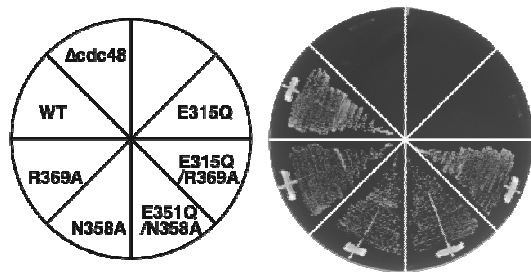


図 2 D1 変異株

しかしながら、D1 が ATP を加水分解できない別の変異体 (E315Q) は致死であった (図 2)。E315Q は、活性部位のグルタミン酸残基を置換した変異体であり、水を活性化することができないため ATP を加水分解できない。一方、N358A および R369A では、ATP のリン酸基に結合し ATP を正しく配置するのに寄与する残基に変異を持っているため、ATP が正しい配座にならないと考えられる。致死変異である E315Q と N358A または R369A との二重変異株を作製したところ、致死にならなかった。したがって、D1 に ATP が結合し、正しい立体配座にあるが加水分解できない状態は、p97 の機能を阻害することが分かった。

(2) *in vitro* 解析

D1 の ATPase 活性は必須ではなく、D2 の ATPase 活性は必須であることから、E315Q 変異体では、D2 の ATPase 活性が阻害されている可能性が考えられる。そこで、線虫の p97 ホモログである CDC-48.1 について、それぞれの変異体を作製し、ATPase 活性を測定した。CDC-48.1 の ATPase 活性を室温で測定すると、D1 の ATPase 活性は著しく低く、D2 のみが ATPase 活性を示す。そこで、酵母 E315Q 変異体に相当する CDC-48.1 (E311Q) 変異体を精製し、室温で ATPase 活性を測定したところ、野生型の 30% 程度の ATPase 活性を示した。しかし、致死ではない酵母 E315D 変異体(置換残基の特性が似ているため、弱い ATPase 活性を持つためであると考えられる)に相当する CDC-48.1 (E311D) を作製したところ、同様に野生型の 30% 程度の ATPase 活性しか示さなかった。したがって、ATPase 活性の低下は、致死となった原因ではないと考えられる。

そこで、さらに詳細に ATPase 活性を検討したところ、野生型では D2 の ATPase 活性は 6 量体のサブユニット間で正の協同性を示すことが分かった。さらに、CDC-48.1 (E311Q) 変異体は協同性を失っていたが、CDC-48.1 (E311D) は、野生型と同程度の協同性を示すことが分かった。したがって、酵母 E315Q 変異の致死性は、D2 の ATPase 活性の正の協同性を失ったことに起因すると考えられる。

(3) *in vivo* 解析と *in vitro* 解析との相関性

さらに、D2 の ATPase 活性の協同性と機能との関連性を調べるため、様々な変異体を作製し、*in vitro* で ATPase 活性を測定し、*in vivo* で発現株の増殖速度を測定した。その結果、ATPase 活性と増殖速度との相関性は低かったのに対して、協同性の指標である Hill 係数と増殖速度は高い相関を示した(図3)。

これらの結果から、p97 の機能には D2 の ATPase 活性、特にその協同性が非常に重要であり、D1 のヌクレオチド結合状態の変化によって D2 の活性が制御されていると考えられる。IBMPFD を引き起こす変異は N 末端側に集中していることから、これらの変異によって、D1 を含む N 末端側領域と活性部位である必須な D2 とのコミュニケーションが影響を受け、それによって疾患が発症する可能性が考えられる。

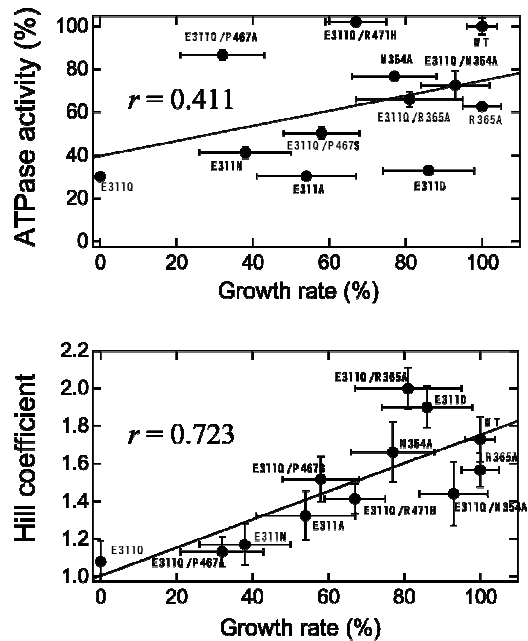


図3 ATPase 活性と増殖速度

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7件)

1. Masatoshi Esaki* and Teru Ogura*
ATP-bound form of the D1 AAA domain inhibits an essential function of Cdc48p/p97.
Biochem. Cell Biol., 88, 109-117, 2010
査読有り
2. Yuka Matsushita-Ishiodori, Kunitoshi Yamanaka, Hiroshi Hashimoto, Masatoshi Esaki, and Teru Ogura*
Conserved aromatic and basic amino acid residues in the pore region of *Caenorhabditis elegans* spastin play critical roles in microtubule severing.
Genes Cells, 14, 925-940, 2009
査読有り
3. Hayashi Yamamoto, Kenji Fukui, Hisashi Takahashi, Shingo Kitamura, Takuya Shiota, Kayoko Terao, Mayumi Uchida, Masatoshi Esaki, Shuh-ichi Nishikawa, Tohru Yoshihisa, Koji Yamano, and Toshiya Endo*
Roles of TOM70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins.

J. Biol. Chem., **284**, 31635-31646 2009
査読有り

4. Koji Yamano, Yoh-ichi Yatsukawa, Masatoshi Esaki, Alyson E.A. Hobbs, Robert E. Jensen, and Toshiya Endo*
Tom20 and Tom22 share the common recognition pathway in mitochondrial protein import
J. Biol. Chem., **283**, 3799-3807, 2008
査読有り
5. Teru Ogura*, Yuka Matsushita-Ishiodori, Ai Johjima, Masayo Nishizono, Shingo Nishikori, Masatoshi Esaki, and Kunitoshi Yamanaka (review)
From the common molecular basis of the AAA protein to various energy-dependent and -independent activities of AAA proteins.
Biochem., Soc., Trans., **36**, 68-71, 2008
査読無し
6. Shingo Nishikori, Kunitoshi Yamanaka, Toshihiko Sakurai, Masatoshi Esaki, and Teru Ogura*
p97 homologs from *Caenorhabditis elegans*, CDC-48.1 and CDC-48.2, suppress the aggregate formation of huntingtin exon1 containing expanded polyQ repeat.
Genes Cells, **13**, 827-838, 2008
査読有り
7. Koji Yamano, Mika Kuroyanagi-Hasegawa, Masatoshi Esaki, Mihoko Yokota, and Toshiya Endo*
Step size analyses of the mitochondrial HSP70 import motor reveal the brownian ratchet in operation.
J. Biol. Chem., **283**, 27325-27332, 2008
査読有り

(*corresponding author)

[学会発表](計12件)

1. 江崎 雅俊, 錦織 伸吾, 山中 邦俊, 小椋 光
Positive Cooperativity of the p97 AAA ATPase is Critical for Cell Viability
第32回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2009年12月9-12日
2. 鬼武 彰宣, 江崎 雅俊, 山中 邦俊, 小椋 光

SUMO化タンパク質と特異的に相互作用する線虫 fidgetin ホモログ FIGL-1 の細胞機能

第32回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2009年12月9-12日

3. 山野 晃史, 長谷川(畔柳) 美香, 江崎 雅俊, 横田 三穂子, 遠藤 斗志也
ミトコンドリアマトリクスのインポートモーター mtHsp70 の作動機構の解析
第47回日本生物物理学会大会, アステイ 徳島, 徳島, 2009年10月30日-11月1日
4. Masatoshi Esaki, Shingo Nishikori, Kunitoshi Yamanaka, Teru Ogura
Positive cooperativity of the p97 AAA ATPase is critical for cell viability.
8th International Conference on AAA Proteins, Kingbridge Conference Centre & Institute, Toronto Canada, July 12-16 2009
5. Teru Ogura, Yuka Matsushita-Ishiodori, Kunitoshi Yamanaka, Shingo Nishikori, Masatoshi Esaki
Molecular mechanisms of homologs of spastin and p97/VCP related to human genetic disorders.
8th International Conference on AAA Proteins, Kingbridge Conference Centre & Institute, Toronto Canada, July 12-16 2009
6. Shingo Nishikori, Masatoshi Esaki, Kunitoshi Yamanaka, Shinya Sugimoto, Teru Ogura
Positive cooperativity of the p97 AAA ATPase is critical for the function.
23rd annual symposium of the protein society "PROTEINS IN MOTION", Boston Marriott Copley Place, Boston USA, July 25-29 2009
7. 江崎 雅俊, 錦織 伸吾, 山中 邦俊, 小椋 光
p97/VCP とタンパク質凝集体
第9回日本蛋白質科学年会, ワークショップ AAA ファミリー蛋白質と疾患, 熊本全日空ホテルニュースカイ, 熊本, 2009年5月20-22日
8. Teru Ogura, Shingo Nishikori, Kunitoshi Yamanaka, Masatoshi Esaki
Roles of p97/VCP, a multifunctional AAA chaperone, in protein oligomerization and aggregation in neurodegenerative diseases.

BIT Life Sciences' 2nd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2009), COEX, Seoul Korea, April 2-4 2009

9. Masatoshi Esaki, Shingo Nishikori, Kunitoshi Yamanaka, Teru Ogura
Positive Cooperativity of the p97 AAA ATPase Is Critical for Cell Viability, 48th ASCB Annual Meeting, Moscone Convention Center, San Francisco USA, December 13-17 2008
10. Yuka Matsushita-Ishiodori, Masatoshi Esaki, Kunitoshi Yamanaka, Teru Ogura
Analysis of microtubule severing by the *C. elegans* homologue SPAS-1, a member of AAA proteins.
48th ASCB Annual Meeting, Moscone Convention Center, San Francisco USA, December 13-17 2008
11. 松下 (石躍) 由佳, 江崎 雅俊, 山中 邦俊, 小椋 光
AAA タンパク質 spastin の線虫ホモログ SPAS-1 による微小管切断機構の解析
BMB2008, 神戸ポートアイランド, 神戸, 2008 年 12 月 9-12 日
12. 錦織 伸吾, 山中 邦俊, 江崎 雅俊, 小椋 光
線虫由来 p97 ホモログ CDC-48.1 の ATP 加水分解機構の解析
第 8 回日本蛋白質科学会年会, タワーホール船堀, 東京, 2008 年 6 月 10-12 日

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