

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770189

研究課題名(和文)ミトコンドリア動態制御におけるAAA ATPase Cdc48pの機能

研究課題名(英文)Functional analysis of AAA ATPase Cdc48p on regulation of mitochondrial morphology

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) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、融合と分裂を頻繁に繰り返すことによって、ヒモ状のネットワーク構造を維持していると考えられている。私たちは、サイトソルのAAAシャペロンであるCdc48pの機能欠損によって、ミトコンドリア形態が著しく変化することを見出した。この形態変化を詳細に解析したところ、ミトコンドリア融合反応に欠損があることがわかった。また、Cdc48pと強調して機能する因子を検索したところ、Shp1pの欠失によってミトコンドリア形態変化が見られたことから、Cdc48p-Shp1p複合体によって、ミトコンドリア融合反応が制御されていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria undergo continuous fusion and fission, which maintain dynamic tubular morphology. We have shown that loss-of-function mutations of Cdc48p, a cytosolic AAA chaperone, induce mitochondrial aggregation. Further analyses revealed that mitochondrial fusion seems to be perturbed in Cdc48p mutants. Moreover, we explored partner proteins functioning together with Cdc48p in mitochondrial morphology regulation, and found that deletion of Shp1p induces aberrant mitochondrial morphology. These results suggest that the Cdc48p-Shp1p complex regulates the mitochondrial fusion event.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：AAAシャペロン ミトコンドリア ATPase Cdc48 融合

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、ATPの合成やカルシウムの貯蔵などを担うオルガネラである。2重の生体膜によって囲まれているが、細胞内では枝分かれした細長いチューブ状のネットワーク形態を通常としている。このネットワークは固定的なものではなく、分裂と融合を繰り返しながら動的に維持されている(図1)。なぜ、このように動的に形態を変化させるのか、その生理的な意義については不明な点が多いが、内容物を交換し均一性を保つことや活性酸素などによって致命的なダメージを受けたミトコンドリアをネットワークから排除し分解することなどに寄与していると考えられる。また、ミトコンドリアの分裂・融合に欠損を持つ細胞は、ATP産生能が低下し、様々な神経変性疾患の原因となることもわかってきた。したがって、正常なミトコンドリアの動態制御は、生命にとって必須である。しかし、分裂・融合反応がどのように制御されているのか、その詳細なメカニズムには不明な点が多い。

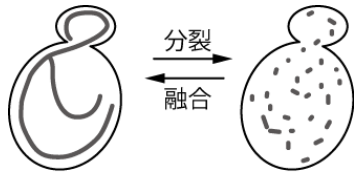


図1 ミトコンドリア形態
ミトコンドリア形態は、分裂と融合のバランスで維持される。

私たちは、サイトゾルの Cdc48p (p97 および VCP と呼ばれる AAA 型シャペロン) が、このようなミトコンドリア動態を制御することを見出した。AAA 型シャペロンは、AAA ドメインと呼ばれる共通の ATPase カセットをエンジンに持ち、基質タンパク質のアンフォールディングや複合体の脱会合などを仲介する。Cdc48p は、2つ AAA ドメインを持ち、C 末端側の AAA ドメインの活性は細胞の増殖に必須である。この ATPase 活性を失った酵母細胞において、著しく凝集したミトコンドリアが観察されることを私たちは見出した。

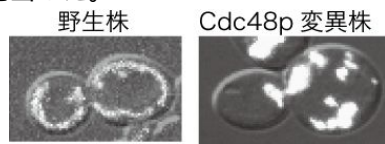


図2 ミトコンドリアの形態
Cdc48p 変異株では凝集したミトコンドリアが観察された。

Cdc48p はどのようにして、ミトコンドリア動態制御に関わるのだろうか？ミトコンドリア外膜および内膜に存在する GTPase 群は全ての真核生物に保存されており、ミトコンドリア融合反応および分裂反応において中心的な役割を果たしている。一方、Cdc48p はサイトゾルのプロテアソームによるタンパク質分解系に参与することが知られてい

る。そこで、ミトコンドリア外膜に局在し膜融合反応に必須な GTPase である Fzo1p の安定性を調べたところ、Cdc48p 変異株ではその半減期が長いことがわかった。したがって Cdc48p は、Fzo1p の分解反応を促進することによってミトコンドリア動態制御に関わっていることが示唆される。

2. 研究の目的

Cdc48p 依存的なミトコンドリア形態制御のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として用いた。遺伝学的手法が確立されており、変異株の作製が容易である。そこで、様々な遺伝子を欠失した酵母株を作製し、これらのミトコンドリア形態を観察することによって、Cdc48p 依存的なミトコンドリア形態制御に関わる因子の探索を行った。

4. 研究成果

Cdc48p の機能欠損によって引き起こされるミトコンドリアの形態変化を詳細に調べるため、電子顕微鏡観察を行った。その結果、Cdc48p の機能欠損株において凝集したミトコンドリアは、小さな粒状のミトコンドリアの集まりであり、それぞれは融合していないことがわかった。したがって、Cdc48p はミトコンドリア融合反応に必須であると考えられ、Fzo1p の分解反応との相関性が注目される。

Cdc48p は、基質特異性を決める様々なアダプタータンパク質と協調して機能していると考えられている。これらのアダプタータンパク質は、UBX や VIM と呼ばれるドメインを持つことが知られている。そこで、UBX または VIM ドメインを持つ 9 種類のタンパク質を欠失した酵母株を作製し、ミトコンドリア形態を観察した。その結果、shp1 欠失株において、Cdc48p の機能欠損株と同様なミトコンドリア形態異常が観察された。

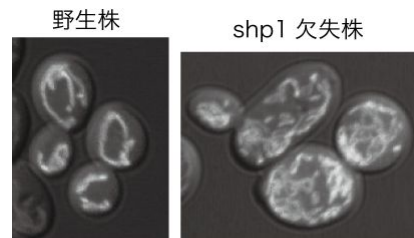


図3 ミトコンドリアの形態
shp1 欠失株では異常なミトコンドリアが観察された。

さらなる解析を行うため、Cdc48p の機能欠損株の改良を行った。従前の手法では、野生型 Cdc48p および変異 Cdc48p を共に発現する株を作製し、野生型 Cdc48p の発現を抑制することによって変異 Cdc48p のみを発現している状況を作り、その表現型を調べてい

た。この手法では、変異 Cdc48p の表現型が表出するまで 14 時間程度かかり、その間に起こりうる現象による二次的影響を排除することが困難であった。さらに、野生型 Cdc48p の発現抑制のために、培地に含まれる炭素源を変更する必要がある、それによってミトコンドリア形態が変化するという欠点もあった。そこで、野生型 Cdc48p のみを選択的に分解し、さらに変異 Cdc48p の発現量を増大させることによって、変異 Cdc48p の影響を評価する実験系の構築を行った。今後、この新しい実験系を用いることによって、Cdc48p によるミトコンドリア形態制御機構の全容を解明していく。

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 6 件)

1. Rie Sawamura, Teru Ogura, and Masatoshi Esaki* (2014) (*: corresponding author)
A conserved helix of Bcs1, a mitochondrial AAA chaperone, is required for the Respiratory Complex III maturation.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **443**, 997-1002
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.084
査読有り
 2. Nike Bharucha, Yang Liu, Effrosyni Papanikou, Conor McMahon, Masatoshi Esaki, Philip D. Jeffrey, Frederick M. Hughson, and Benjamin S. Glick (2013)
Sec16 influences transitional ER sites by regulating rather than organizing COPII.
Mol. Biol. Cell, **24**, 3406-3419
DOI: 10.1091/mbc.E13-04-0185
査読有り
 3. Takuya Shiota, Miyuki Maruyama, Mami Miura, Yasushi Tamura, Koji Yamano, Masatoshi Esaki, and Toshiya Endo (2012)
The Tom40 assembly process probed using attachment of different intramitochondrial sorting signals.
Mol. Biol. Cell, **23**, 3936-3947
DOI: 10.1091/mbc.E12-03-0202
査読有り
 4. Masatoshi Esaki* and Teru Ogura (2012) (*: corresponding author)
Cdc48p/p97-mediated regulation of mitochondrial morphology is Vms1p-independent.
J. Struct. Biol., **179**, 112-120
DOI: 10.1016/j.jsb.2012.04.017
査読有り
5. Akinobu Onitake, Kunitoshi Yamanaka, Masatoshi Esaki, and Teru Ogura (2012)
Caenorhabditis elegans fidgetin homolog FIGL-1, a nuclear-localized AAA ATPase, binds to SUMO.
J. Struct. Biol., **179**, 143-151
DOI: 10.1016/j.jsb.2012.04.022
査読有り
 6. Akinobu Onitake, Yuka Matsushita-Ishiodori, Ai Johjima, Masatoshi Esaki, Teru Ogura, and Kunitoshi Yamanaka (2012)
The C-terminal α -helix of SPAS-1, a *Caenorhabditis elegans* spastin homologue, is crucial for microtubule severing.
J. Struct. Biol., **179**, 138-142
DOI: 10.1016/j.jsb.2012.04.010
査読有り
- [学会発表](計 7 件)
1. Masatoshi Esaki, Kentaro Noi, and Teru Ogura
Yeast Cdc48-20S proteasome complex in vitro and in vivo.
231st IMEG seminars & Minisymposium.
2014 年 2 月 20 日 - 21 日
熊本大学発生医学研究所(熊本市)
 2. 江崎 雅俊, 野井 健太郎, 佐伯 泰, 小椋 光
In vivo において Cdc48 は 20S プロテアソーム複合体と相互作用する
第 36 回日本分子生物学会年会
2013 年 12 月 3 日 - 6 日
神戸国際展示場(神戸市)
 3. 澤村 理英, 江崎 雅俊, 小椋 光
呼吸鎖複合体 III 形成における AAA 分子シャペロン Bcs1p の N 末端の機能解析
第 36 回日本分子生物学会年会
2013 年 12 月 3 日 - 6 日
神戸国際展示場(神戸市)
 4. Teru Ogura, Kentaro Noi, Takashi Okuno, Ken-ichi Arita-Morioka, Daisuke Yamamoto, Akiko Okawa, Hikaru Tsuchiya, Yasushi Saeki, Toshio Ando, Masatoshi Esaki, and Kunitoshi Yamanaka
Dynamics of p97 and the 26S proteasome in action revealed by high-speed atomic force microscopy.
EMBO Workshop on AAA+ Proteins: from

mechanism and disease to targets
2013年9月15日- 19日
Commundo Hotel Neuss (Neuss, Germany)

5. Masatoshi Esaki and Teru Ogura
Non-conservation of the aromatic residue in the D1 pore loop of yeast Cdc48 is essential for cell viability. EMBO Workshop on AAA+ Proteins: from mechanism and disease to targets
2013年9月15日- 19日
Commundo Hotel Neuss (Neuss, Germany)

6. Rie Sawamura, Masatoshi Esaki, and Teru Ogura
The N-terminal region of Bcs1p is important for the respiratory chain complex III assembly. EMBO Workshop on AAA+ Proteins: from mechanism and disease to targets
2013年9月15日- 19日
Commundo Hotel Neuss (Neuss, Germany)

7. Teru Ogura, Kentaro Noi, Ken-ichi Arita-Morioka, Daisuke Yamamoto, Toshio Ando, Shingo Nishikori, Masatoshi Esaki, and Kunitoshi Yamanaka
AAA chaperones, focusing on the molecular mechanism of p97. EMBO Conference The biology of molecular chaperones: From molecules, organelles and cells to misfolding diseases
2013年5月17日- 22日
Hotel Flamingo Resort (Santa Margherita di Pula, Italy)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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