

令和元年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：2016～2018

課題番号：16K08594

研究課題名(和文) AAA型シャペロンCDC-48の新規制御機構「クリップモデル」の検証

研究課題名(英文) Analysis of a novel regulatory mechanism "CLIP Model" of CDC-48, a AAA chaperone

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CDC-48との相互作用にはUBXN-6のNドメインとPUBドメインの両方が必要であり、特にPUBドメインが重要であることが明らかとなった。PUBドメインを欠失した変異体では、変異UBXN-6タンパク質は検出されなかったが、この線虫をプロテアソーム阻害剤で処理すると検出された。これらの結果から、PUBドメインを欠くことによりCDC-48への結合が弱まり、フリーで存在しているUBXN-6はプロテアソームで分解されている可能性が考えられた。これは「クリップモデル」を支持している。また、UBXN-6は飢餓によって発現が促進され、後期エンドソーム形成に重要な因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UBXN-6とCDC-48の相互作用様式を明らかにし、提唱した「クリップモデル」を支持する結果を得た。UBXN-6欠損株は短寿命を示すことも観察しており、これは細胞内タンパク質品質管理不全が一因となっている可能性が示唆された。CDC-48の変異に起因するヒト遺伝性疾患ALSやIBMPFDも知られており、タンパク質品質管理という観点からも今回得られた結果は、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期待される。

研究成果の概要(英文)：I found that both N and PUB domains, especially the PUB domain, of UBXN-6 are important for the interaction with CDC-48. In the mutant worms containing the PUB-domain-lacking UBXN-6, mutant UBXN-6 was not detected by Western blotting. Interestingly, it was however detected when the worms were treated with the proteasome inhibitor. These results suggested that the PUB-domain-lacking UBXN-6 can not properly interact with CDC-48 and free UBXN-6 molecules were degraded by the proteasome. This notion strongly supports the Clip model. I also found that the amount of UBXN-6 was increased upon starvation and that UBXN-6 is involved in the formation of late endosomes.

研究分野：分子生物学

キーワード：分子シャペロン 線虫

1. 研究開始当初の背景

細胞内には実に多数のタンパク質がユビキチン修飾系で認識され、選択的なユビキチンコードでユビキチン修飾を受け、それによりユビキチン化タンパク質は分解・シグナル伝達・DNA 修復・膜タンパク質輸送などの運命付けを受ける。しかしながら、望むべきときに、望むべき場所で、適切なユビキチン修飾がなされるだけでは、運命付けが適切に実行されることが保証されたことにはならない。効率よく運命付けを執行するには、仕分け役のような因子が必要であり、このような因子として CDC-48 は機能している。すなわち CDC-48 は、極めて多岐にわたる細胞機能に参与しているユビキチン選択的 AAA 型シャペロンである。この多機能性は、結合するアダプターにより規定されており、N 末端アダプターがどの基質に結合するかという「基質特異性」に関わり、C 末端アダプターが基質をどうするかという「運命決定」に関わると考えられている。UFD-2 はタンパク質分解に向かわせ、UFD-3 は凝集体形成を促進させることを報告している (Murayama Y, Yamanaka K, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 459: 154-160, 2015)。

さて UBXM-6 は、CDC-48 の N ドメインにも C 末端にも結合するユニークなアダプターであることを報告している (Sasagawa Y, Yamanaka K, et al., Genes Cells, 15: 1201-1215, 2010) (図 1)。ATP 加水分解によって N ドメインを動かすことが CDC-48 の機能に必須であることから、UBXM-6 は CDC-48 の N ドメインと C 末端に結合して、クリップのように N 末端と C 末端をつなぎ止めて CDC-48 不活性型プール形成に関わり、CDC-48 の総活性量を調節しているという新規制御機構「クリップモデル」をたてるに至った (図 2)。

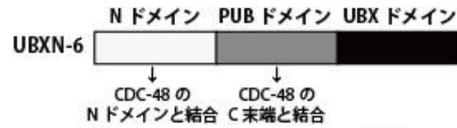


図 1. UBXM-6 のドメイン構造

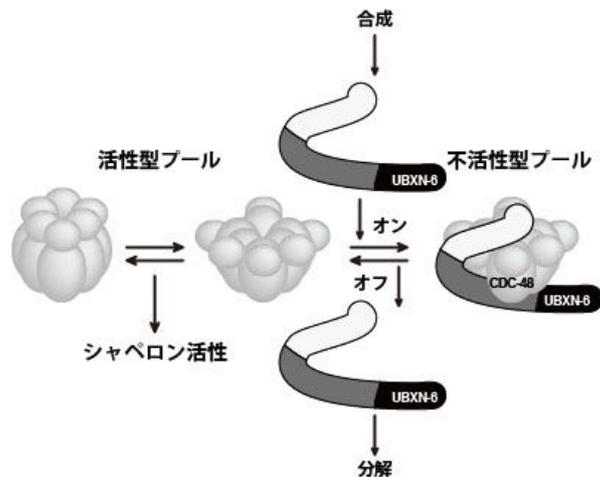


図 2. UBXM-6 による「クリップモデル」

2. 研究の目的

p97(ヒト CDC-48 ホモログ)に UBXD1(UBXM-6 ホモログ)が結合すると、その ATPase 活性が低下することは (Trusch et al., 2015), このモデルを支持している。UBXM-6 の CDC-48 への結合をオンまたはオフに制御することにより CDC-48 の活性型・不活性型の量比を調節している。「クリップモデル」に則って考えると、疾患型 CDC-48 では N ドメインと C 末端の相対的位置が野生型と異なっているので UBXM-6 はクリップの役割を果たせず、活性型プールの増大につながる。実際、疾患型 CDC-48 では ATPase 活性が亢進していることが報告されている (Halawani et al., 2009; Manno et al., 2010)。また、ショウジョウバエ Armless(UBXM-6 ホモログ)は Ter94(CDC-48 ホモログ)に結合することにより Ter94 の細胞内機能 (プロテアソームと協調して β -catenin を分解) を抑制していることも報告されている (Reim et al., 2014)。すなわち CDC-48 アダプターは単に「特異的基質の運命決定」に関わるだけでなく、CDC-48 全体の活性制御にも重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。本研究では、この「クリップモデル」を検証することを目的とする。また、CRISPR/Cas9 法を用いて作製した UBXM-6 欠損体を分子遺伝学的・細胞生物学的に解析し、UBXM-6 の生体内機能を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

UBXM-6 が CDC-48 をクリップしていることを示すために、まず UBXM-6 と CDC-48 の相互作用に関わるドメインを明らかにする。

これをもとに CRISPR/Cas9 法を用いて種々の UBXM-6 変異体を作製し、これまでに明らかにしてきた CDC-48 の機能にどう影響を及ぼすかを解析する。

V5 タグを付加した UBXM-6 発現線虫も作製し、免疫沈降により共沈してくるタンパク質を明らかにする。

作製した UBXM-6 欠損体を分子遺伝学的・細胞生物学的に解析し、UBXM-6 の生体内機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 酵母ツーハイブリッド法により、CDC-48 との相互作用に関わる UBXN-6 のドメインを明らかにするために、UBXN-6 の各ドメイン (N ドメイン、PUB ドメイン、UBX ドメイン) を欠失するコンストラクトを作製した (図3)。その結果、UBX ドメイン欠失は CDC-48 との相互作用に影響を及ぼさなかった。N ドメイン欠失は相互作用が弱くなった。PUB ドメインを欠失させると、CDC-48 との相互作用は観察されなくなった。また、N ドメイン単独および PUB ドメイン単独の発現では、CDC-48 との相互作用はほとんど観察されなかった。これらのことから、UBXN-6 の CDC-48 との相互作用には、N ドメインと PUB ドメインの両方が必要であり、特に PUB ドメインが重要であることが明らかとなった。

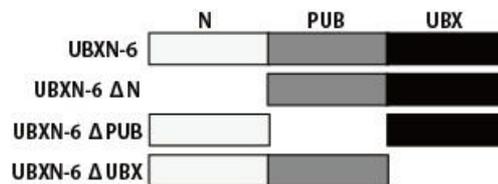


図3. UBXN-6 の種々のドメイン欠損変異体

(2) 次にこれらのドメインの生体内での役割を明らかにするために、CRISPR/Cas9 系を用いてこれらのドメインを欠失した変異 UBXN-6 を発現する線虫を作製した。N ドメインを欠失させると変異 UBXN-6 の mRNA が検出されなかった。N 末領域を欠失させたことにより、転写が阻害されたか mRNA の安定性が著しく低下したためと考えられる。残念ながら N ドメイン欠失 UBXN-6 変異体は解析には用いることができなかった。一方、PUB ドメインを欠失した変異体では、mRNA は検出できたが、変異 UBXN-6 タンパク質は検出されなかった。ところが、この線虫をプロテアソーム阻害剤で処理すると検出されるようになった。これらの結果を酵母ツーハイブリッド実験の結果と併せて考えると、PUB ドメインを欠くことにより CDC-48 への結合が弱まり、フリーで存在している UBXN-6 はプロテアソームで分解されている可能性が考えられた。これはまさに「クリップモデル」で想定している仮説と良くあっている。

(3) UBXN-6 による CDC-48 の活性および機能調節を明らかにするためには、CDC-48 および UBXN-6 の細胞内 (生体内) 絶対量を知ることは極めて重要である。大槻教授 (熊本大学薬学部) の指導のもと、定量的質量分析実験を開始した。これまでに野生型線虫生体内において、CDC-48 6 量体と UBXN-6 はモル比で 6 : 1 であるとの予備的結果を得ている。

(4) UBXN-6 の CDC-48 への結合を制御する因子の同定を試みる目的で、V5-UBXN-6 を発現する線虫を CRISPR/Cas9 法を用いて作製した。この線虫から抽出液を調製し、抗 V5 抗体で免疫沈降してくる因子の探索を試みたが、これまでのところ目的の因子は得られていない。試料調製法を含め免疫沈降法の再検討が必要である。

(5) UBXN-6 の細胞内機能を明らかにする目的で、様々なストレス (熱、酸化、飢餓、小胞体ストレスなど) 応答時の細胞内 UBXN-6 量の変化をウエスタンブロッティングにより定量した。飢餓ストレスをかけた時のみ UBXN-6 量が増加することを見出した (図4)。この条件下では、他の CDC-48 C 末端アダプターである UFD-2 や UFD-3 には量的変化は観察されなかった (図4)。これらのことから、飢餓ストレス時の応答は、UBXN-6 特異的であると示唆される。

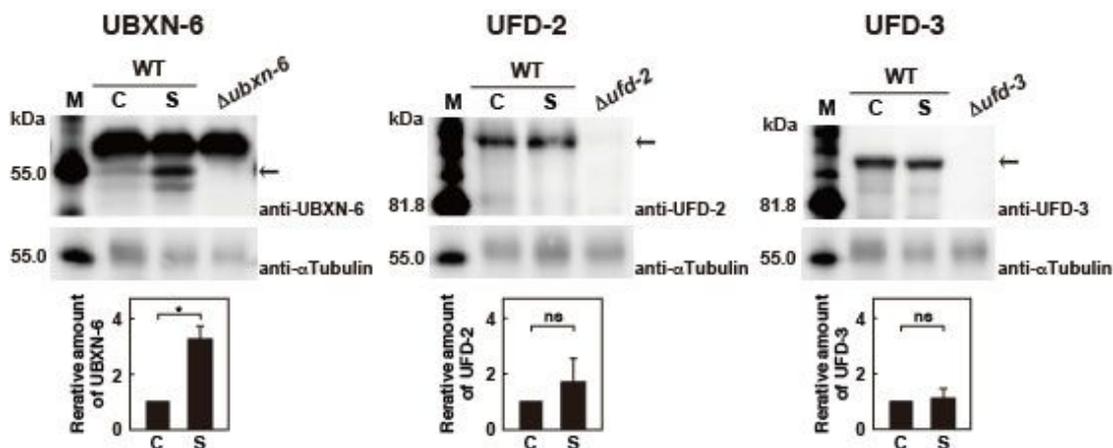


図4. UBXN-6, UFD-2 および UFD-3 の飢餓誘導

(6) 飢餓ストレス時の重要性が示唆されたことを受けて、オートファジーとの関連を知るために、飢餓ストレス時の GLO-1::GFP の挙動を野生株と UBXN-6 欠損株とでコンフォーカル顕微鏡観察やウエスタンブロッティングにより比較した。GLO-1::GFP は、エンドソームーリソソーム輸送のマーカとして用いられる。その結果、UBXN-6 欠損株では、飢餓ス

トレス応答時における GLO-1::GFP のクリアランスが遅れることがわかった。また、RAB-5::GFP (初期エンドソームマーカー) や RAB-7::GFP (後期エンドソームマーカー) を用いてオートファジーのどの過程に参与しているかを調べたところ、後期エンドソーム形成に参与していることも明らかとなった (図5)。これらのことから、UBXN-6 は後期エンドソーム形成に関わる因子であり、飢餓ストレス時にその機能が強く要求されることがわかった。また、UBXN-6 欠損株は短寿命を示すことも観察しており (図6) これは細胞内タンパク質品質管理不全が一因となっている可能性が示唆される。これを受けて、細胞内凝集体のクリアランスにおける関与を明らかにするために、ポリグルタミン断片 (Yamanaka K, et al., J. Struct. Biol. 146: 242-250, 2004) や易凝集性トランスサイレチン断片 (Tsuda Y, Yamanaka K, et al., Sci. Rep. 8: 17884, 2018) の挙動に UBXN-6 が与える影響を観察することを開始した。

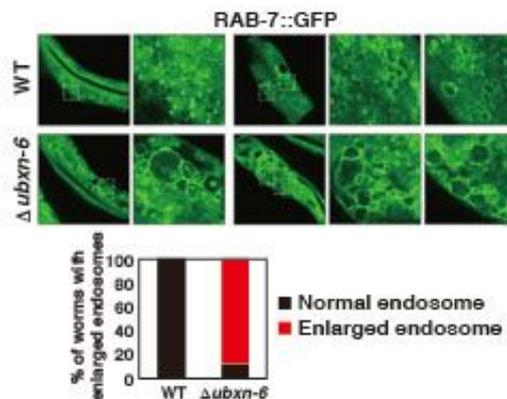
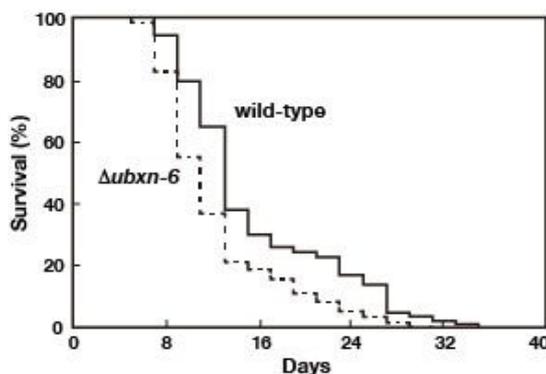


図5. UBXN-6 欠損による後期エンドソーム形成阻害



Strain	N	Restricted mean lifespan (days \pm S.E.)	Maximum days	P value
wild-type	157	15.43 \pm 0.54	35	
$\Delta ubxn-6$	154	12.19 \pm 0.43	31	<0.0001

図6. UBXN-6 欠損体は短寿命である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Suman Mojumder, Rie Sawamura, Yuki Murayama, Teru Ogura, and Kunitoshi Yamanaka. Functional characterization of UBXN-6, a C-terminal cofactor of CDC-48, in *C. elegans*. Biochemical and Biophysical Research Communications, (2019) 509: 462-468. 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2018.12.155

〔学会発表〕(計 1 件)

Suman Mojumder, Rie Sawamura, Teru Ogura, and Kunitoshi Yamanaka. Elucidation of UBXN-6 function in CDC-48-regulated ERAD in *C. elegans*. 第40回日本分子生物学会年会 (ConBio 2017)、12月6日-9日、2017、神戸

〔その他〕

ホームページ等

<http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/fukusei/index.html>

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。