

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401
 研究種目：特定領域研究
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19058012
 研究課題名（和文）AAA シャペロン群のタンパク質構造変換機構と品質管理機構の研究
 研究課題名（英文）Mechanisms of remodeling and quality control of proteins by AAA chaperones
 研究代表者
 小椋 光 (OGURA TERU)
 熊本大学・発生医学研究所・教授
 研究者番号：00158825

研究成果の概要（和文）：AAA シャペロンの分子機構を解析し、種々の AAA シャペロンに共通する分子機構や p97/VCP/CDC-48/Cdc48p の D2 ドメインの ATPase 活性の正の協働性の重要性を明らかにしたほか、ATP 依存的 p97 リングの回転運動を高速原子間力顕微鏡で観察した。酵母や線虫を用いた解析により、p97・fidgetin・Bcs1p などの細胞機能や発生における役割を明らかにし、これらが関連するヒト疾患の発症機序への示唆を与えた。

研究成果の概要（英文）：Systematic analysis uncovered the mechanism common to several AAA chaperones. The importance of cooperativity of the ATPase activity of D2 in p97/VCP/CDC-48/Cdc48p has been demonstrated. High-speed atomic force microscopy revealed repeated rotational movements of the p97 ring in the presence of ATP. Using yeasts and nematodes, cellular and developmental roles of AAA chaperones such as p97, fidgetin, and Bcs1p were elucidated. These results shed light on the molecular mechanisms of human diseases related to these AAA chaperones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	14,600,000	0	14,600,000
2008 年度	14,600,000	0	14,600,000
2009 年度	14,600,000	0	14,600,000
2010 年度	14,600,000	0	14,600,000
2011 年度	14,600,000	0	14,600,000
総計	73,000,000	0	73,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：AAA タンパク質、分子シャペロン、ATPase、線虫、酵母、神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

AAA ファミリータンパク質は、タンパク質の立体構造をエネルギー依存的にダイナミックに変換する 6 量体リング構造の分子シャペロンで、基質タンパク質の unfolding、タンパク質複合体の disassembly や凝集体の disaggregation など通常のシャペロンにはない活性を持ち、様々な細胞機能に関わることが報告されてきた。また、AAA タンパク質に起因

するヒト遺伝性疾患が相次いで報告され、医学的観点からも注目されている。

2. 研究の目的

AAA シャペロンの分子機構について、共通のエンジン AAA ATPase の分子基盤に立脚し、異なる AAA タンパク質を比較解析して、様々な機能を支える作動原理を明らかにする。特に、まだ分子機構におい

で不明な点が多い。

unfolding/disassembly/disaggregationに焦点を当てる。また、出芽酵母や線虫をモデル系として、AAA シャペロンによる品質管理機構を解析し、その破綻に起因する疾患モデルを作製し、それらの病態を解析し、予防・治療戦略の確立に寄与する。

3. 研究の方法

AAA シャペロンの分子機構の解析には、精製タンパク質を用いた *in vitro* の生化学的手法や分光学的手法及び高速原子間力顕微鏡 (AFM) による高時空間分解能の構造生物学的手法を用いた。細胞機能の解析には、出芽酵母を用いた遺伝学的・細胞学的手法、発生における機能や病態解析には、線虫を用いた発生物学的・病態生化学的手法を用いた。

4. 研究成果

(1) AAA ファミリーATPase の分子機構の解明

AAA プロテアーゼ FtsH によるモデル基質フラボドキシンの分解効率とフラボドキシンの物理的安定性には、負の相関があることを明らかにした (Ayuso-Tejedor et al., 2010)。微小管切断酵素 spastin・katanin の 6 量体リング構造の中央の孔に位置する保存された芳香族残基や周辺の塩基性残基が機能に重要であることを証明した (Matsushita-Ishiodori et al., 2007; 2009; Ogura et al., 2008)。p97 (ヒトでは VCP、線虫では CDC-48、酵母では Cdc48p) は、N 末端ドメインと 2 つの相同な AAA ATPase ドメイン (D1 と D2) からなるホモ 6 量体である。N 末端ドメインには基質タンパク質やアダプタータンパク質が結合し、D1 ドメインは弱い ATPase 活性を示すが、その ATPase 活性は機能に必須ではなく、6 量体形成に重要である (Esaki & Ogura, 2010)。一方、D2 ドメインは高い ATPase 活性を示し、正の協働性がある。この D2 の ATPase 活性の正の協働性は、D1 のヌクレオチド状態による制御を受け、p97 の機能に重要であることを明らかにした (Nishikori et al., 2011)。

(2) AAA タンパク質の作用のナノ動態観察

AAA タンパク質およびその基質の動的変化を金沢大学の安藤研究室が開発した高速原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観察した (Yamamoto et al., 2010)。ATP 加水分解のサイクルで、p97 がどのような構造変化をするか、高速 AFM で観察したところ、ATP 存在下で、N-D1 リングが D2

リングに対して、25° 時計回りに回転し、すぐに元の位置に戻るといった構造変化を繰り返し起こすことが分かった。変異体を用いた解析から、この構造変化には ATP の結合が必須で、加水分解は必要ないことを明らかにした。

(3) AAA タンパク質の細胞機能

①線虫の p97 ホモログ CDC-48.1 と CDC-48.2 : p97 ホモログは、様々な細胞機能に関与している。多数のアダプタータンパク質が p97 に結合して、これらの多彩な機能が発揮される。ヒト p97 ホモログ VCP は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や骨パジェット病と前頭側頭葉型認知症を伴う封入体筋炎 (IBMPFD) の原因因子として同定されている。線虫の p97 ホモログが、小胞体関連分解 (Sasagawa et al., 2007a)、減数分裂 (Sasagawa et al., 2007b)、性決定 (Sasagawa et al., 2009)、精子形成 (Sasagawa et al., 2010) などにおいて重要な役割をもつことを明らかにした。性決定においては、p97 は CUL-2 複合体と結合し、性決定因子 TRA-1 のポリユビキチン化を促進し、ATP 依存的に複合体を脱会合して、ポリユビキチン化 TRA-1 をプロテアソームに受け渡す。

②線虫の fidgetin ホモログ FIGL-1 : マウスの頭部 (特に内耳や眼) の形成が異常となる *fidget* 変異の原因因子として同定された *fidgetin* の線虫のホモログ FIGL-1 について解析し、FIGL-1 が翻訳後修飾因子 SUMO と特異的に相互作用することを明らかにした (Onitake et al., in press)。Fidgetin と SUMO はともにマウスで口唇裂・口蓋裂、小眼症・無眼症などの発症に関わる因子である。口唇・口蓋、眼や内耳の形成に関わる複数の転写因子が SUMO 化されることが分かっている。Fidgetin は SUMO 化転写因子を制御してこれらの疾患に関わる可能性が示唆された。

③酵母の BCS1L ホモログ Bcs1p と p97 ホモログ Cdc48p : BCS1L はミトコンドリアの呼吸鎖複合体 III の会合に必要で、Rieske 鉄イオウタンパク質を複合体に挿入するシャペロンと考えられている。ヒト BCS1L 変異は、GRACILE 症候群などの重篤な疾患を引き起こす。酵母を用いた遺伝的解析により、Bcs1p の N 末端の膜間配列が機能に重要であることを明らかにした。

酵母の p97 ホモログ Cdc48p が、ミトコンドリア外膜タンパク質の分解系に働き、ミトコンドリアの形態形成と維持に重要であることを見つけた (Esaki & Ogura, in press)。

(4) AAA タンパク質とアミロイド線維

線虫の p97 ホモログ CDC-48.1 が、ハンチンチン断片の凝集を ATP 非依存的に抑制することを明らかにした (Nishikori et al., 2008)。同様に、大腸菌の ClpX が細胞分裂に必須の FtsZ タンパク質に直接相互作用して、その線維形成を抑制することを明らかにし、FtsZ 線維のダイナミクスを高速 AFM で観察した (Sugimoto et al., 2010)。

ヒト p97 ホモログ VCP の変異によって発症する ALS や IBMPFD では、細胞内に RNA 結合核タンパク質 TDP-43 の不定形の凝集体やアミロイド線維が異常に蓄積する。VCP が TDP-43 に直接作用してこれらの凝集体形成を制御している可能性について検討し、ATP 非存在下で VCP が TDP-43 凝集体に結合すること、ATP 存在下では結合しないことを明らかにした。

また、アミロイド線維を形成する細菌の細胞質タンパク質をスクリーニングし、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ PNPase を同定した。PNPase は ADP 存在下でアミロイド線維を形成する。

(5) 得られた成果のインパクト

種々の AAA シャペロンについて、生化学的・分光学的・遺伝学的・細胞生物学的・分子生物学的・生物物理学的手法等を駆使して、多角的に比較解析を進め、当該分野の進展に寄与した。特に、空間分解能と時間分解能の問題を同時に解決する高速 AFM の導入により、従来手法では得ることができなかったデータを取得することが可能となり、分子機能の解明がめざましく進んだ。

(6) 今後の展望

さらに分子機構の解明を進めることで、AAA シャペロンのもつ独特の分子機能が明らかとなり、これらの変異に起因するヒト疾患の発症機序の解明と、予防・治療戦略の確立への道が拓ける。

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 20 件)

1. Onitake, A., Yamanaka, K., Esaki, M., and Ogura, T. *Caenorhabditis elegans* fidgetin homolog FIGL-1, a nuclear-localized AAA ATPase, binds to SUMO. *J. Struct. Biol.* in press. doi:10.1016/j.jsb.2012.04.022 査読有

2. Esaki, M., and Ogura, T. Cdc48p/p97-mediated regulation of mitochondrial morphology is Vms1p-independent. *J. Struct. Biol.* in press. doi:10.1016/j.jsb.2012.04.017 査読有
3. Onitake, A., Matsushita-Ishiodori, Y., Johjima, A., Esaki, M., Ogura, T., and Yamanaka, K. The C-terminal α -helix of SPAS-1, a *Caenorhabditis elegans* spastin homologue, is crucial for microtubule severing. *J. Struct. Biol.* in press. doi:10.1016/j.jsb.2012.04.010 査読有
4. Yamanaka, K., Sasagawa, Y., and Ogura, T. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1823, 130-137, 2012. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.07.001 査読有
5. Nishikori, S., Esaki, M., Yamanaka, K., Sugimoto, S., and Ogura, T. Positive cooperativity of the p97 AAA ATPase is critical for essential functions. *J. Biol. Chem.*, 286, 15815-15820, 2011. doi:10.1074/jbc.M110.201400 査読有
6. Sasagawa, Y., Yamanaka, K., Saito-Sasagawa, Y., and Ogura, T. *C. elegans* UBX cofactors for CDC-48/p97 control spermatogenesis. *Genes Cells* 15, 1201-1215, 2010. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01454.x 査読有
7. Ayuso-Tejedor, S., Nishikori, S., Okuno, T., Ogura, T., and Sancho, J. FtsH cleavage of non-native conformations of proteins. *J. Struct. Biol.* 171, 117-124, 2010. doi:10.1016/j.jsb.2010.05.001 査読有
8. Yamamoto, D., Uchihashi, T., Kodera, N., Yamashita, H., Nishikori, S., Ogura, T., Shibata, M., and Ando, T. High-speed atomic force microscopy techniques for observing dynamic biomolecular processes. *Methods Enzymol.* 475, pp. 541-564, 2010. doi:10.1016/S0076-6879(10)75020-5 査読無
9. Sugimoto, S., Yamanaka, K., Nishikori, S., Miyagi, A., Ando, T., and Ogura, T. AAA⁺ chaperone ClpX regulates dynamics of prokaryotic cytoskeletal protein FtsZ. *J. Biol. Chem.* 285, 6648-6657, 2010. doi:10.1074/jbc.M109.080739 査読有
10. Esaki, M., and Ogura, T. ATP-bound

- form of the D1 AAA domain inhibits an essential function of Cdc48p/p97. *Biochem. Cell Biol.* 88, 109-117, 2010. doi:10.1139/O09-116 査読有
11. Sasagawa, Y., Otani, M., Higashitani, N., Higashitani, A., Sato, K., Ogura, T., and Yamanaka, K. *Caenorhabditis elegans* p97 controls germline-specific sex determination by controlling TRA-1 level in a CUL-2-dependent manner. *J. Cell Sci.* 122, 3663-3672, 2009. doi:10.1242/jcs.052415 査読有
 12. Matsushita-Ishiodori, Y., Yamanaka, K., Hashimoto, H., Esaki, M., and Ogura, T. Conserved aromatic and basic amino acid residues in the pore region of *C. elegans* spastin play critical roles in microtubule-severing. *Genes Cells* 14, 925-940, 2009. doi:10.1111/j.1365-2443.2009.01320.x 査読有
 13. Nishikori, S., Yamanaka, K., Sakurai, T., Esaki, M., and Ogura, T. p97 homologs from *C. 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. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01214.x 査読有
 14. Yamauchi, S., Higashitani, N., Otani, M., Higashitani, A., Ogura, T., and Yamanaka, K. Involvement of HMG-12 and CAR-1 in the *cdc-48.1* expression of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 318, 348-359, 2008. doi:10.1016/j.ydbio.2008.02.057 査読有
 15. Ogura, T., Matsushita-Ishiodori, Y., Johjima, A., Nishizono, M., Nishikori, S., Esaki, M., and Yamanaka, K. 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. doi:10.1042/BST0360068 査読有
 16. Sasagawa, Y., Yamanaka, K., and Ogura, T. ER E3 ubiquitin ligase HRD-1 and its specific partner chaperone BiP play important roles in ERAD and developmental growth in *C. elegans*. *Genes Cells* 12, 1063-1073, 2007. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01108.x 査読有
 17. Matsushita-Ishiodori, Y., Yamanaka, K., and Ogura, T. The *C. elegans* homologue of the spastic paraplegia protein, spastin, disassembles microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359,157-162, 2007. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.086 査読有
 18. Sasagawa, Y., Yamanaka, K., Nishikori, S., and Ogura, T. *Caenorhabditis elegans* p97/CDC-48 is crucial for progression of meiosis I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 920-924, 2007. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.022 査読有
 19. Yamauchi, S., Sasagawa, Y., Ogura, T., and Yamanaka, K. Differential expression pattern of UBX family genes in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 545-552, 2007. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.163 査読有
 20. Sasagawa, Y., Sato, S., Ogura, T., and Higashitani, A. *C. elegans* RBX-2-CUL-5- and RBX-1-CUL-2-based complexes are redundant for oogenesis and activation of the MAP kinase MPK-1. *FEBS Lett.* 581, 145-150, 2007. doi:10.1016/j.febslet.2006.12.009 査読有
- [学会発表] (計 5 7 件)
1. Ogura, T., Noi, K., Arita-Morioka, K., Esaki, M., Murayama, Y., and Yamanaka, K. Multiple aspects of multifunctional p97. 9th International Conference on AAA Protein, 6-11 November, 2011, 熊本市国際交流会館, Kumamoto Japan.
 2. Yamanaka, K., Sasagawa, Y., Murayama, Y., and Ogura, T. Involvement of *C. elegans* p97-cofactor complexes in sex determination. The 3rd International Symposium on Protein Community, 13-16 September, 2010, ホテル日航奈良, Nara, Japan.
 3. Yamanaka, K., Sasagawa, Y., and Ogura, T. *C. elegans* CDC-48/p97 controls germline-specific sex determination. BIT Life Sciences' 3rd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2010), 21-23 March 2010 Beijing, China.
 4. Ogura, T. Roles of p97, a multifunctional AAA chaperone, in *C.*

- elegans* development. Academia Sinica-Kumamoto University Joint Conference on Organogenesis, B1C Auditorium, Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, 8-9 April, 2010 Taipei, Taiwan .
5. Ogura, T., Matsushita-Ishiodori, Y., Yamanaka, K., Nishikori, S., and Esaki, M. : Molecular mechanisms of homologs of spastin and p97/VCP related to human genetic disorders. 8th International Conference on AAA Proteins, 12-16 July 2009 Toronto, Canada.
 6. Ogura, T., Nishikori, S., Yamanaka, K., and Esaki, M.: 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), 2-4 April 2009 Seoul, South Korea.
 7. Ogura, T. : From common molecular basis of the AAA ATPase to various energy-dependent and independent activities of AAA proteins. The 7th International conference on AAA proteins, 9-13 September 2007 Royal Agricultural College, Cirencester, UK.

[図書] (計3件)

1. Okuno, T., and Ogura, T. FtsH protease-mediated regulation of various cellular functions. In General and regulatory proteolysis. D. A. Dougan (ed.) Springer SBM, in press.
2. Ogura, T., Okuno, T., Suno, R., and Akiyama, Y. FtsH protease. In Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd edition, N. Rawlings and G. Salvesen(ed) Elsevier Ltd., in press.
3. Okuno, T., and Ogura, T. FtsH protease, a eubacterial membrane-bound AAA protease. In ATP-dependent proteases (Research Signpost, ed. E. Kutejova) pp.87-114, 2008.

[その他]

ホームページ等

1. http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/molecular_cell_biology/
2. <http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/fukusei/index.html>

3. <http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/AA/aaainfo.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 光 (OGURA TERU)
熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号：00158825

(2) 研究分担者

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

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