

令和元年5月28日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04764

研究課題名(和文) リング状AAA型シャペロンの基質への作用機構のin vitro系による解明

研究課題名(英文) Elucidation of substrate-processing mechanisms of ring-shaped AAA chaperones by in vitro systems

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：AAA型シャペロンp97/Cdc48/CDC-48が20Sプロテアソームと会合して、Sod1など一群の基質タンパク質を分解することを明らかにした。Cdc48は、基質タンパク質をポアループ依存的にほどいて、20Sプロテアソームに送り込むという機能が推定された。酵母ミトコンドリアの形態と外膜タンパク質の代謝において、Cdc48の補因子Ubx2はミトコンドリア外膜の膜融合因子Fzo1の代謝を促進し、Ubp3はミトコンドリアの形態維持に必要であることを明らかにした。線虫UBXN-6は、後期エンドソーム形成に関わるCDC-48の補因子で、飢餓によって発現が誘導され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

AAA型シャペロンp97/Cdc48/CDC-48が20Sプロテアソームと会合して、新規プロテアソームとして機能し、Sod1などを分解することを明らかにしたが、Sod1の変異及びヒトp97ホモログVCPの変異は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因として報告されていることから、ALSの発症にこの新規プロテアソームが関与する可能性が示唆された。p97が他のAAA型シャペロンでも提唱されているようにポアループ依存的に基質タンパク質をほどくことが示され、共通分子機構の解明が進んだ。ミトコンドリアの維持やエンドソームの形成に関わる補因子が同定され、これらの分子機構の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：We have found that a AAA chaperone p97 (also called VCP in mammals, Cdc48 in yeast, and CDC-48 in nematodes) associates with the 20S proteasome, and the p97-20S proteasome degrades a subset of cellular proteins such as Sod1. It has been suggested that p97 threads substrates through its pore to unfold and translocate them to the 20S proteasome. In maintenance of mitochondrial morphology and turnover of mitochondrial proteins in yeast, we have revealed that a Cdc48 cofactor Ubx2 is involved in the turnover of a mitochondrial fusion factor Fzo1, and that another cofactor Ubp3 is essential for maintenance of mitochondrial morphology. UBXN-6 is a cofactor, which binds to both the N domain and C-terminus of *C. elegans* CDC-48. We have revealed that UBXN-6 is induced upon starvation, and that its mutant shows defective formation of late endosomes and short lifespan.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：分子シャペロン タンパク質分解 タンパク質の品質管理 プロテアソーム 神経変性疾患 ミトコンドリア オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AAA 型シャペロン p97 (ヒトでは VCP、酵母では Cdc48、線虫では CDC-48) は ATP 依存的な多機能分子シャペロンで、6 量体リング状ホモオリゴマーを形成する。多くの AAA 型シャペロンは基質タンパク質をリングの孔に通すことでほどくが、このとき、リング孔に突き出たポアモチーフが必須である。p97/Cdc48/CDC-48 が持つ 2 つ (D1 と D2) の AAA ドメインのうち、D1 ドメインはポアモチーフに保存された芳香族残基がない。p97/Cdc48/CDC-48 は、やはり基質タンパク質を孔に通してほどくのか、あるいはそれとは異なる様式で基質に作用するのか明らかになっていない。また、p97/Cdc48/CDC-48 の多機能性は、様々な補因子が結合することによって規定されると考えられているが、その分子機構もほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

(1) p97/Cdc48/CDC-48 のポアモチーフが機能に重要であるか否か、重要である場合にはどのような機能を持つか、変異体を用いた *in vitro* 解析等により明らかにする。

(2) 特定の細胞機能に関わる補因子を同定する。特定の補因子の細胞機能を明らかにする。これらの解析により、補因子による p97/Cdc48/CDC-48 の機能制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 酵母 Cdc48 の D1 ポアモチーフに変異のある M288Y 変異 Cdc48 が引き起こす致死性を抑制する変異を解析し、酵母 Cdc48 のタンパク質分解系における役割とその具体的な分子機構を明らかにする。

(2) M288Y 変異 Cdc48 を発現する株のプロテオーム解析により、変異 Cdc48 の発現により細胞内量が変動するタンパク質を同定し、それらのタンパク質精製標品を用いた *in vitro* 系で、分解活性を確認する。

(3) 酵母ミトコンドリアの形態と機能の維持には、ミトコンドリア外膜タンパク質の代謝が重要であり、これに Cdc48 が関わるということが分かっているが、この機能に必要な補因子を探索するため、補因子変異株の網羅的解析を行う。

(4) 線虫の CDC-48 の補因子 UBXN-6 は、CDC-48 の N ドメインと C 末端に同時に結合するユニークな補因子であることが分かっているが、UBXN-6 を必要とする細胞機能についてはよく分かっていないので、UBXN-6 欠損変異体の表現型を詳しく解析する。

4. 研究成果

(1) M288Y 変異の致死効果は、20S プロテアソームとの結合に重要と推定される Cdc48 の C 末端配列の変異により抑制され、また、20S プロテアソームのサブユニットの変異によっても抑制されることから、M288Y 変異 Cdc48 が 20S プロテアソームと複合体を形成し、新規プロテアソームとして機能すること、この Cdc48-20S プロテアソームにより細胞増殖に必須のタンパク質が過剰に分解されて致死となる可能性が示唆された (図 1)。

(2) M288Y 変異 Cdc48 により分解が促進されるタンパク質を、質量分析法により探索し、Sod1 (superoxide dismutase) など複数の候補タンパク質を同定した。精製標品による *in vitro* 再構成系において Sod1 が M288Y 変異 Cdc48-20S プロテアソームにより、ATP 依存的に分解されることを明らかにした (図 2)。現在、この *in vitro* 反応系を用いて、詳細な分子機構を解明している。さらに、M288Y 変異による致死に関与する Cdc48 の補因子を探索し、Ufd2 と Shp1 を同定した。これらの結果から、M288Y 変異 Cdc48 は Ufd2 などと協調して基質タンパク質を認識結合し、これをほどいて、リング孔を通し、20S プロテアソームで分解するというシナリオが推定される。すなわち、他の AAA 型シャペロンと同様に、Cdc48 は基質タンパク質をほどいて孔に通すメカニズムが強く示唆された。

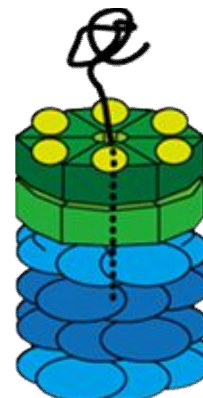


図 1. Cdc48-20S プロテアソームによる基質タンパク質分解のモデル図。

(3) 新規 p97-20S プロテアソームの Sod1 以外の複数の基質候補タンパク質を精製し、*in vitro* 再構成系においてそれらの分解を検討したが、新規プロテアソームが確実に分解しているとの結論に至った Sod1 以外の基質はない。また、Sod1 が過剰に分解されても致死にはならないので、M288Y 変異による致死に関わる基質の同定にも至っていない。

(4) ヒトでは、p97/VCP 及び Sod1 の変異により筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を発症することが知られており、p97-20S プロテアソームによる Sod1 の分解が ALS と関連するかどうかを明らかにすることは興味深い。新規 p97-20S プロテアソームに関連する研究成果をまとめた総説を発表し、その中で ALS の新しい発症機構の可能性について考察した。

(5) ミトコンドリアの形態と外膜タンパク質の代謝における Cdc48 の補因子の変異体を解析した結果、Ubx2 がミトコンドリア外膜の膜融合因子 Fzo1 の代謝を促進するのに対して、Ubp3 はミトコンドリアの形態維持に必要であるが、Fzo1 の代謝には影響しないことが明らかとなり、これらの補因子はそれぞれ別々にミトコンドリアの形態と膜タンパク質の代謝に働くことが分かった。

(6) 線虫の UBXN-6 は、CDC-48 の N ドメインと C 末端の両方に結合するユニークな補因子である。UBXN-6 の細胞機能を明らかにするため、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 UBXN-6 の量を定量したところ、飢餓ストレス時にのみ増加することを見出した。そこで、オートファジーとの関連を明らかにするため、飢餓ストレス時のエンドソーム-リソソーム輸送のマーカー GLO-1::GFP の挙動を解析したところ、UBXN-6 欠損変異株では、GLO-1::GFP のクリアランスが遅れることが分かった。さらに詳しい解析から、UBXN-6 は後期エンドソーム形成に関与していることを明らかにした。また、UBXN-6 欠損変異株では、寿命が有意に短縮することも明らかにした。

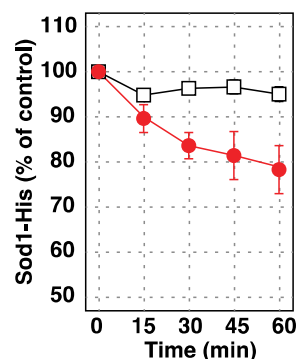


図 2. Cdc48-20S プロテアソームによる Sod1 の分解。
野生型 Cdc48-20S プロテアソーム、M288Y 変異 Cdc48-20S プロテアソーム。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Esaki, M., Islam, Md. T., Tani, N., and Ogura, T. Deviation of the typical AAA substrate-threading pore prevents fatal protein degradation in yeast Cdc48. *Scientific Reports*, 査読有、7, 2017, Article 5475
doi:10.1038/s41598-017-05806-y
2. Esaki, M., Johjima-Murata, A., Islam, Md. T., and Ogura, T. Biological and pathological implications of an alternative ATP-powered proteasomal assembly with Cdc48 and the 20S peptidase. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 査読有、5, 2018, Article 56
doi: 10.3389/fmolb.2018.00056
3. Chowdhury, A., Ogura, T., and Esaki, M. Two Cdc48 cofactors Ubp3 and Ubx2 regulate mitochondrial morphology and protein turnover. *The Journal of Biochemistry*, 査読有、164, 2018, pp349-358
doi: 10.1093/jb/mvy057
4. 小椋 光、江崎雅俊、蛋白質分解経路のキープレーヤーp97/Cdc48、*医学の歩み*、267, 2018, pp1041-1047
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetail.aspx?BC=286610>
5. Mojumder, S., Sawamura, R., Murayama, Y., Ogura, T., and Yamanaka, K. Functional characterization of UBXN-6, a C-terminal cofactor of CDC-48, in *C. elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有、509, 2019, pp462-468
doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.155

[学会発表] (計 3 件)

1. 江崎雅俊、Islam, Md. T.、小椋 光、多機能 AAA タンパク質 Cdc48 はいかにして基質タンパク質に作用するのか?、第 39 回日本分子生物学会年会、2016。
2. Islam, Md. T., Kaneko, S., Esaki, M., and Ogura, T. AAA molecular chaperone Cdc48 functions with the 20S proteasome to maintain protein homeostasis. 第 40 回日本分子生物学会年会 (ConBio2017)、2017

3. 江崎雅俊、Islam, Md. T.、大石宙人、小椋 光、Cdc48-20S プロテアソームによるタンパク質分解、第 41 回日本分子生物学会年会、2018.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/molecular_cell_biology/

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

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/np92/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：江崎雅俊

ローマ字氏名：ESAKI, Masatoshi

所属研究機関名：熊本大学

部局名：発生医学研究所

職名：助教

研究者番号（8桁）：70437911

研究分担者氏名：山中邦俊

ローマ字氏名：YAMANAKA, Kunitoshi

所属研究機関名：熊本大学

部局名：発生医学研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90212290

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。