

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21471

研究課題名(和文)ミトコンドリア外膜のAAA-ATPase Msp1によるタンパク質品質管理機構

研究課題名(英文)Quality control mechanism by AAA-ATPase Msp1 on the outer mitochondrial membrane

研究代表者

松本 俊介 (MATSUMOTO, Shunsuke)

京都産業大学・タンパク質動態研究所・研究員

研究者番号：70704295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア外膜に誤局在したテイルアンカー型(TA)タンパク質の分解に関わる因子の同定とそれら因子の働きについて解析を行った。ミトコンドリア外膜のAAA-ATPase Msp1は、ミスターゲットTAタンパク質を小胞体-ミトコンドリアコンタクト部位にリクルートとし、小胞体に局在するユビキチンリガーゼDoa10によるユビキチン化を促進する働きがあることが分かった。そして、ミトコンドリア外膜上でユビキチン化されたミスターゲットTAタンパク質は、サイトゾルのAAA-ATPase Cdc48によってサイトゾルに引き抜かれ、プロテアソームによって分解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

近年、パーキンソン病を始めとする神経変性疾患や糖尿病、発がんや腫瘍の悪性化などの病態とミトコンドリア機能・品質管理の関連が明らかとなっている。本研究の成果は、ミトコンドリアの機能破綻や品質管理異常が原因となって引き起こされる難治性疾患の治療法開発の基盤を与える事も期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to reveal the degradation pathway of mistargeted tail-anchored (TA) proteins on the outer mitochondrial membrane (OM). We identified protein factors involved in the degradation of the mistargeted TA proteins and analyzed roles of these factors by using yeast as a model system. We found that Msp1, an AAA-ATPase on the OM recruits the mistargeted TA proteins at contact site between endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria, and promotes ubiquitination of the mistargeted TA proteins by Doa10, an ER-localized E3 ligase. Then, ubiquitinated mistargeted TA proteins on the OM were extracted by an another AAA-ATPase in cytosol, Cdc48 and were degraded by the proteasome.

研究分野：分子生物学・細胞生物学

キーワード：Msp1 品質管理 ミトコンドリア ミスターゲット Cdc48 Doa10 コンタクトサイト

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

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞には、生体膜で仕切られた様々なオルガネラが高度に発達し、細胞機能の発現を支えている。そして、オルガネラが正常に機能するためには、合成されたタンパク質が正確に各オルガネラへ配送される必要がある。シグナル配列と呼ばれる N 末端に付加された行き先を指定するアミノ酸配列を持つタンパク質は、リボソームの翻訳反応と同時に、あるいは直後に適切なオルガネラに配送される。一方、C 末に 1 本の膜貫通配列をもつタンパク質 (テイルアンカー (TA) タンパク質) は翻訳反応が完了した後、小胞体膜やミトコンドリア外膜に送られ、膜に挿入される。小胞体の TA タンパク質は、出芽酵母から高等真核生物まで進化的に保存された GET システムによって、ATP 依存的に各膜系に挿入される [1, 2]。GET システムを構成する遺伝子を欠損した細胞では、本来小胞体膜等に挿入されるはずの TA タンパク質はミトコンドリア外膜に誤配送される (ミスターゲッティング)。2014 年に、ミトコンドリア外膜に局在する AAA-ATPase ファミリータンパク質 Msp1 がミスターゲットした TA タンパク質をミトコンドリア外膜から速やかに分解・除去することが報告されたが [3, 4]、ミトコンドリア外膜にミスターゲットした TA タンパク質がどのようにして分解されるのか、その分子機構はまだほとんどわかっていなかった。 [1] Schuldiner *et al.*, (2008) *Cell*, **134**, 634. [2] Stefanovic and Hegde, (2007) *Cell*, **128**, 1147. [3] Okreglak and Walter, (2014) *PNAS* **III**, 8019. [4] Chen *et al.*, (2014) *EMBO J.*, **33**, 1548.

2. 研究の目的

本研究ではミトコンドリア膜に誤って局在した不良なタンパク質を速やかに分解・除去する仕組みを解明することを目的とする。出芽酵母を用いた細胞生物学・分子遺伝学的手法により、Msp1 と連携して基質タンパク質の分解に関わる因子を同定し、Msp1 を介したミスターゲット TA タンパク質の分解経路の全貌を解明する。

3. 研究の方法

ミトコンドリア外膜へミスターゲットする TA タンパク質のモデル基質として Pex15 Δ 30 を用いた。Pex15 は GET システムによって ER 膜へ挿入し、ペルオキシソーム膜へ運ばれる TA タンパク質であるが、Pex15 の C 末端側の 30 残基を欠失させた Pex15 Δ 30 はミトコンドリアに局在し、Msp1 依存的に除去されることが報告されている [3]。3xFLAG タグを N 末端に付加した Pex15 Δ 30 をガラクトース誘導プラスミドから発現する酵母株を樹立した。そして、Pex15 Δ 30 の安定性は、シクロヘキシミドチェイス実験によって評価した。この実験系を用いて、26S プロテアソーム、ユビキチンリガーゼ (E3) そして分解を促進する分子シャペロンの関与を酵母欠損株および温度感受性株を用いて Pex15 Δ 30 の steady state level の蓄積量および半減期を指標にし、候補因子を探索した。また、Pex15 Δ 30 の分解に関与する因子と Pex15 Δ 30 との相互作用を共免疫沈降実験、Split-GFP 法による蛍光顕微鏡観察によって解析した。

4. 研究成果

(1) Pex15 Δ 30 は、プロテアソームによって分解される。

本分解系は、サイトゾルで起こることが予想されたため、プロテアソーム経路とオートファジー経路のどちらかで起こるのかを検討した。多剤排出ポンプ遺伝子をコードする *PDR5* を欠損した酵母株を用い、プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理すると Pex15 Δ 30 の分解は阻害されたことから、26S プロテアソームによる分解であることが示唆された。一方で、*ATG8* および *ATG32* 欠損株では、Pex15 Δ 30 の分解は阻害されなかったため、オートファジー経路による Pex15 Δ 30 の可能性は低いと考えられた。

(2) Doa10 が Pex15 Δ 30 の E3 リガーゼである。

Pex15 Δ 30 をユビキチン化する分子を特定するために、ユビキチン・プロテアソーム系に関係する遺伝子の単一遺伝子欠損酵母株ライブラリー (110 個) の中から探索を行った。その結果、小胞体に局在する E3 リガーゼ Doa10、Doa10 の E2 である Ubc6 および Ubc7 が Pex15 Δ 30 のユビキチン化に関与することが示唆された。*DOA10*、*UBC6*、*UBC7* 欠損株では、Pex15 Δ 30 の分解は非常に強く阻害されることがわかった (図 1A)。さらに、Ubc7 を活性化する因子である *CUE1* 欠損株においても、Pex15 Δ 30 の分解が大きく阻害されることがわかった。Pex15 Δ 30 のユビキチン化はシグナルが弱く、スマア状に検出された。エピトプタグが付加されたユビキチンの過剰発現系を用いて、ユビキチン化のシグナル増強を試みたが、Doa10 非依存的なユビキチン化が引き起こされることが問題となった。そこで、Pex15 のリジン残基をアルギニンに置換した変異体 Pex15KR Δ 30 を用いることで、Doa10 依存的なユビキチン化を検出することができた (図 1B)。

(3) サイトゾルの AAA-ATPase Cdc48 が Pex15 Δ 30 の分解に関与する。

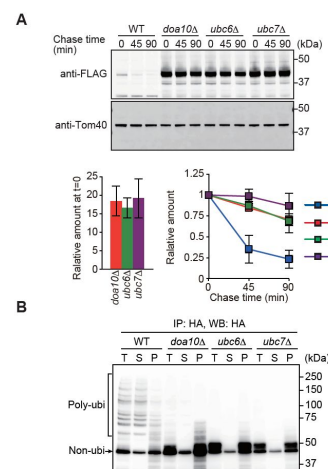


図 1 Doa10 が Pex15 Δ 30 の E3 リガーゼである。

Cdc48 は、プロテアソーム依存的分解に関与するサイトゾルの AAA-ATPase であることが知られている。そこで、CDC48 温度感受性株 (*cdc48-3*) を用いて、Pex15 Δ 30 の分解を調べたところ、*cdc48-3* の非許容温度 (37 度) において、分解が強く阻害されたことから Cdc48 が本分解系に関与することが示唆された (図 2)。さらに、*cdc48-3* に *MSP1* を欠損させた二重変異株を作製し、Pex15 Δ 30 の分解を調べたところ、Pex15 Δ 30 の steady state level は、*cdc48-3* と同程度であり、*MSP1* 単一欠損株と分解速度が変わらないことから、Msp1 と Cdc48 は同一の経路で働くことが示唆された (図 2)。*cdc48-3* における Pex15 Δ 30 の分解阻害を *MSP1* 過剰発現で相補できるのかを調べたところ、野生型 Msp1 の過剰発現では Pex15 Δ 30 の分解阻害は回復せず、Msp1 E193Q 変異体の過剰発現では、Pex15 Δ 30 の分解はより強く阻害された。この実験結果からも、Msp1 と Cdc48 は同一の経路で働くということが支持された。Cdc48 は複数の補因子と直接的に結合し、プロテアソーム依存的分解を中心とする様々な活性を發揮する。そこで、Pex15 Δ 30 の分解において、どの Cdc48 補因子が関与するのかを調べたところ、Ufd1, Npl4 そして Ubx2 が Pex15 Δ 30 の分解に特に必要な因子であることがわかった。

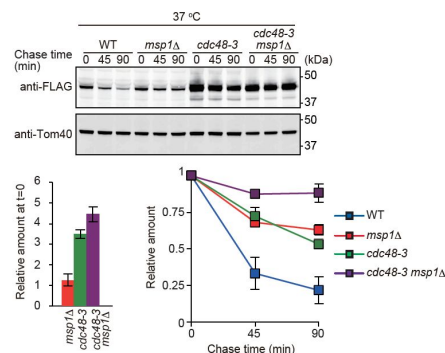


図 2 Cdc48 が Pex15 Δ 30 の分解に関与する。

(4) Msp1 と Cdc48 は、Pex15 Δ 30 の分解において異なるステップで働く。

MSP1 欠損株で、Pex15KR Δ 30 のユビキチン化を調べたところ、野生株と比べて Pex15KR Δ 30 のユビキチン化シグナルが大きく低下することがわかった。一方で、*cdc48-3* において Pex15KR Δ 30 のユビキチン化を調べると、ミトコンドリア膜上にユビキチン化された Pex15KR Δ 30 が蓄積した。共免疫沈降実験の結果から、Msp1 はユビキチン化されていない Pex15KR Δ 30 と結合し、Cdc48 はポリユビキチン化された Pex15KR Δ 30 と結合することがわかった。さらに、*MSP1* 欠損株で、Cdc48 とポリユビキチン化 Pex15KR Δ 30 との結合を調べると、野生型と比べて Cdc48 と結合する Pex15KR Δ 30 の量が大きく低下することがわかった。これらの結果から、Msp1 は基質のユビキチン化を促進するために働き、Cdc48 はユビキチン化された基質をミトコンドリア膜から引き抜くために働くことが示唆された。すなわち、Msp1 と Cdc48 という 2 つの AAA-ATPase が異なるステップで働くことで、効率的に基質を分解していることがわかった。

(5) Msp1 と Pex15 Δ 30 の Split GFP は小胞体-ミトコンドリアコンタクト部位と共局在する。

Msp1 がどのようにして Doa10 による Pex15 Δ 30 のユビキチン化を促進するのかを調べるために、Split-GFP を用いて、Msp1 と Pex15 Δ 30 の相互作用を解析した。Split-GFP とは、GFP タンパク質を 2 つに分断し、蛍光を出せなくした 2 つのタンパク質断片であり、これらのタンパク質断片が十分に近い距離に近づいた時に GFP 分子が再構成され、蛍光を発するようになる性質がある [5]。それぞれ Split-GFP 断片を融合させた Msp1 と Pex15 Δ 30 を酵母細胞に発現させ、蛍光顕微鏡観察をした結果、Msp1 と Pex15 Δ 30 で再構成される Split-GFP は、ミトコンドリア上にドット状のシグナルを示すことがわかった (図 3A 上)。このドットは、小胞体膜と結合し、小胞体-ミトコンドリアコンタクト部位 (出芽酵母では ERMES と呼ばれるタンパク質複合体) と近接していることがわかった (図 3A 下, 3B)。A この観察結果から、Msp1 が Pex15 Δ 30 を小胞体-ミトコンドリアコンタクト部位にリクルートすることで Doa10 によるユビキチン化を促進している可能性が考えられた。以上の結果をもとに、ミトコンドリアにミスターゲットした TA タンパク質は、ミトコンドリア、サイトゾルそして小胞体の因子と連携しながら、速やかに分解するというモデルを提唱した。[5] Kakimoto *et al.*, (2018) *Sci. Rep.* 8, 6175.

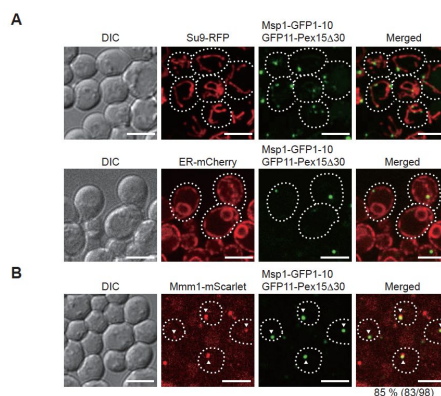


図 3 Msp1 と Pex15 Δ 30 の Split-GFP は、小胞体-ミトコンドリアコンタクト部位を共局在する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Ueda, E., Tamura, Y., Sakaue, H., Kawano, S., Kakuta, C., Matsumoto, S., Endo, T. Myristoyl group-aided protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Scientific Reports*, 9:1185., Feb 4 2019 doi: 10.1038/s41598-018-38016-1, 査読有

Matsumoto, S., Taguchi, Y., Shimada, A., Igura, M., Kohda, D. Tethering an N-glycosylation sequon-containing peptide Creates a catalytically competent oligosaccharyltransferase complex.

〔学会発表〕(計2件)

松本俊介: Degradation pathway mediated by the two AAA-ATPase Msp1 and Cdc48 for the mistargeted tail-anchored proteins on the mitochondrial outer membrane: 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会: 2018年

松本俊介: 2つのAAA-ATPアーゼによるミトコンドリア外膜に誤局在したテイルアンカータンパク質の分解機構: 第42回日本分子生物学会年会(招待講演): 2018年

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。