

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370056

研究課題名(和文) 生化学的解析と高速原子間力顕微鏡観察によるAAAタンパク質の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of AAA proteins revealed by biochemical analyses and high-speed atomic force microscopic observations

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) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：6量体構造のAAA型シャペロンp97のATP 依存的回転を高速AFM観察で明らかにし、p97の作動モデルを提唱した。ヒトp97ホモログVCPがTDP-43アミロイド線維に結合することを明らかにした。線虫p97ホモログCDC-48のC末端アダプターUFD-3が、ポリグルタミン凝集体形成を制御することを明らかにした。酵母p97ホモログCdc48の変異に起因するミトコンドリア形態の異常について詳細な構造解析を行った。26Sプロテアソーム及びその基質複合体を高速AFM観察した。Kataninの微小管切断機構を解析し、新しいモデルを提唱した。ミトコンドリア局在Bcs1のN末端領域の重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：AAA family chaperones/proteases form a hexameric ring structure. ATP-dependent rotation of the AAA chaperone p97 was analyzed by high-speed AFM, and a novel model for the p97 action against substrate has been proposed. It has been found that VCP, a human p97 homolog, binds to amyloid fibrils of TDP-43. UFD-3 is an adapter of CDC-48, a C. elegans p97 homolog, and has been revealed to regulate polyglutamine aggregate formation. Abnormal mitochondrial morphology caused by a mutation of Cdc48, a yeast p97 homolog, was precisely analyzed by advanced microscopic techniques. Dynamics of the 26S proteasome and its complex with a substrate were analyzed by high-speed AFM. Microtubule severing by katanin was analyzed, and a novel model for the mechanism of katanin has been proposed. Functional importance of mitochondrial Bcs1 was revealed.

研究分野：生物学

キーワード：AAAタンパク質 分子シャペロン プロテアソーム p97/VCP/CDC-48/Cdc48 Katanin 高速原子間力顕微鏡 ミトコンドリア 微小管

1. 研究開始当初の背景

AAA タンパク質は6量体のリング構造をとり、ATP加水分解のエネルギーを利用して、基質タンパク質のアンフォールディングやタンパク質凝集体の脱凝集、タンパク質複合体の脱会合など、通常のシャペロンとは異なる活性をもったシャペロンであり、様々な細胞機能に関連し、それらの機能不全は種々の疾患を引き起こす。申請者は、これまで種々のAAA タンパク質を研究対象として、それらの分子機構、細胞機能、発生における役割等の解明を行ってきたが、なお未解明の問題が山積している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、p97/VCP/CDC-48/Cdc48を中心に、当研究室が研究を進めてきたAAAタンパク質の作動原理・分子機構を生化学的・分光学的手法に加え、生体分子を高空間・高時間分解能で画像化できる高速原子間力顕微鏡(AFM)を駆使して解明することである。高速AFMは、従来の手法では到達しえなかった画期的イメージングを可能にし、タンパク質の構造変換の分子機構の研究分野において新規な概念の確立やパラダイムシフトが実現することが期待できる。これらのAAAタンパク質の分子機構の解析は、これらに起因するヒト疾患の原因解明と予防・治療法の確立にも資する。

3. 研究の方法

解析技術の進歩と革新が、基礎科学の研究において重要であることは、様々な例から明らかである。タンパク質科学の研究においては、構造と機能の解析が重要で、その2つを同時に実現する手法の開発が望まれてきた。その1つの解答が、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)である。申請者は、科学振興機構CREST課題「タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発(代表者 安藤敏夫)」に、分担課題「AAAタンパク質の研究」で参画し、高速AFMによる観察と解析を行い、継続して解析してきた。生化学的手法と高速AFM観察により、AAAタンパク質の分子機構を解明した。

4. 研究成果

(1) p97のATP依存的構造変化: AAA型シャペロンp97は、N末端側から、N、D1、D2ドメインからなり、D1とD2がATPaseドメインで、安定なリング状6量体構造をとる。ATP存在下で、N-D1ドメインがD2ドメインに対して、約23°時計回りに回転し、また元の位置に戻る(図1; Structure, 2013)。このATP依存的回転にはATPのD2ドメイ

ンへの結合が重要で、ATPの加水分解は必要ないことを、変異体を用いた解析で明らかにし、p97の作動モデルを提唱した。D2ドメインの構造変化を詳細に解析するため、修飾した基板上にN末端にHisタグを付けたp97のN末端側を固定することに成功し、ATP依存的ポアの開閉を観察した。

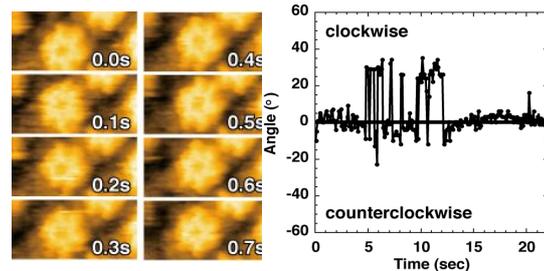


図1. p97のATP依存的回転運動の高速AFM観察。高速AFM連続画像(左)と継時的回転角度(右)。

(2) p97のアミロイド線維への結合と脱凝集: ヒトp97ホモログVCPの変異により、筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症を発症し、患者ではTDP-43凝集体が蓄積する。TDP-43アミロイド線維にVCPが結合することを生化学的解析で証明し、その様子を高速AFMで観察した。TDP-43アミロイド線維に及ぼすVCPの効果を検討し、ATP依存的線維の脱凝集について再現性のある結果を得た。

(3) ポリグルタミン凝集体形成におけるp97の機能: 線虫のp97ホモログCDC-48のC末端アダプターUFD-2、UFD-3の機能を解析した結果、生体内ではCDC-48にUFD-3が優先的に結合し、UFD-2はほとんど結合していないことを明らかにした。ufd-3欠失変異体においては、精子数の減少、減数分裂異常、オートファジー阻害剤に対する感受性などの表現型を認めた。さらに、伸長ポリグルタミン鎖発現株において、ufd-3欠失はポリグルタミン凝集体形成能、運動能が低下し、寿命も短縮した。UFD-3は凝集体形成を促進し、中間体オリゴマーの細胞毒性を軽減する因子と考えられる(BBRC, 2015)。

(4) ミトコンドリアの形態維持におけるp97の機能: 酵母のp97ホモログCdc48の変異により、ミトコンドリアの形態異常が起こることを見つけ、SEM断面連続観察による詳細な解析を行った(JSB, 2014)。また、走査透過型超高压電子顕微鏡による細胞構造解析を行った(Ultramicroscopy, 2014)。

(5) 26Sプロテアソームの基質分解機構: 当初、膜結合型AAAプロテアーゼFtsHの高速AFM解析を予定していたが、同じくAAA型プロテアーゼである26Sプロテアソ

ームの方がその細胞機能の多様性や多数のサブユニットから成る構造などから、学術的重要性が高く、より挑戦的であるため、26Sプロテアソームを高速 AFM 解析することにした。その結果、観察速度は1フレーム/秒とまだ十分でないが、クライオ電顕の解像度に近い26Sプロテアソーム画像を取得できた。また、ポリユビキチン鎖が26Sプロテアソームの制御ユニット上でフラフラと動く様子の観察に成功した。これにより26Sプロテアソームによる基質分解過程の一部始終を高速AFM観察できる可能性が見えてきた。

(6) AAA タンパク質 katanin の微小管切断機構：微小管を切断する活性のある AAA タンパク質 katanin について、ポア領域にある塩基性残基の機能的な重要性を明らかにした。また、katanin の認識に必要な微小管構成サブユニット α -および β -チューブリンの酸性残基に富む C 末端領域の重要性について、酵母組換え体を利用して、それぞれの C 末端領域を欠失した微小管を調製して検討した結果、 α / β -チューブリン両方の C 末端領域が切断活性に必要であることを明らかにし、6量体リング構造の katanin 1 分子が α / β -チューブリン両方の C 末端領域を同時に引っ張ることでチューブリン α / β ヘテロ 2 量体を微小管から引き抜くというモデルを提唱した (JBC, 2015)。

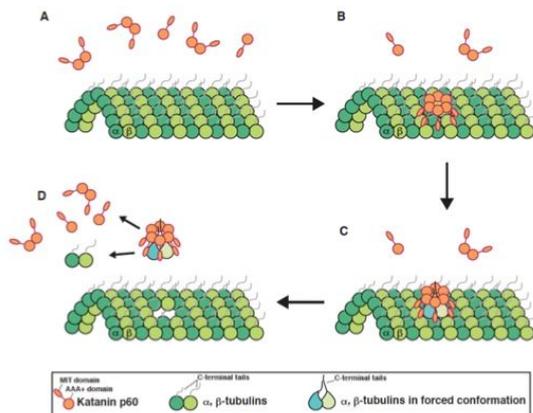


図2. Kataninによる微小管切断モデル。(A) 単量体あるいは2量体の katanin 分子が、(B) 微小管上で6量体を形成し、(C) α / β 両チューブリン分子の C 末端領域をポアに引き込み、(D) α / β チューブリン2量体を微小管格子から外す。

(7) ミトコンドリアに局在する Bcs1 の機能ドメインの解析：酵母のミトコンドリア内膜に局在し、呼吸鎖複合体形成に関与する AAA タンパク質 Bcs1 の機能解析を行い、膜間部に位置する N 末端 α ヘリックス領域の機能的な重要性を明らかにした (BBRC, 2014)。

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11件)

- Johjima, A., Noi, K., Nishikori, S., Ogi, H., Esaki, M., and Ogura, T. Microtubule severing by katanin p60 AAA+ ATPase requires the C-terminal acidic tails of both α - and β -tubulins and basic amino acid residues in the AAA+ ring pore. *J. Biol. Chem.*, in press, 2015. 査読有. doi:10.1074/jbc.M114.614768.
- Murayama, Y., Ogura, T., and Yamanaka, K. Characterization of C-terminal adaptors, UFD-2 and UFD-3, of CDC-48 on the polyglutamine aggregation in *C. elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459, 154-160, 2015. 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.088. Epub 2015 Feb 24.
- Miyazaki, N., Esaki, M., Ogura, T., and Murata, K. Serial block-face scanning electron microscopy for three-dimensional analysis of morphological changes in mitochondria regulated by Cdc48p/p97 ATPase. *J. Struct. Biol.*, 187, 187-193, 2014. 査読有. doi: 10.1016/j.jsb.2014.05.010. Epub 2014 Jun 2.
- Murata, K., Esaki, M., Ogura, T., Arai, S., Yamamoto, Y., and Tanaka, N. Whole-cell imaging of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* by high-voltage scanning transmission electron tomography. *Ultramicroscopy*, 146, 39-45, 2014. 査読有. doi: 10.1016/j.ultramic.2014.05.008. Epub 2014 Jun 2.
- Sawamura, R., Ogura, T., and Esaki, M. A conserved α helix of Bcs1, a mitochondrial AAA chaperone, is required for the Respiratory Complex III maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 997-1002, 2014. 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.084. Epub 2013 Dec 19.
- Noi, K., Yamamoto, D., Nishikori, S., Arita-Morioka, K., Kato, T., Ando, T., and Ogura, T. High-speed atomic force microscopic observation of ATP-dependent rotation of the AAA+ chaperone p97. *Structure* 21, 1992-2002, 2013. 査読有.

[学会発表](計 29 件)

1. Okuno, T., Noi, K., Okawa, A., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Takahashi, K., Inobe, T., Yamanaka, K., and Ogura, T. Visualization of dynamics of the 26S proteasome and proteasome-substrate complexes by high-speed AFM. Key Forum: From Stem Cells to Organs, 4-5 September, 2014, Kumamoto Japan.
2. 鈴木 香於里、大枝 弘明、加藤 裕介、有田 (森岡) 健一、野井 健太郎、原 怜、山本 亘、小椋 光、久堀 徹、天野 豊己: ホウレンソウ由来天然FtsHの精製と解析、日本生体エネルギー研究会 第40回討論会、12月12日-13日、2014、松山。
3. 澤村 理英、江崎 雅俊、山中 邦俊、小椋 光: ヒト疾患関連AAAタンパク質BCS1Lの酵母ホモログBcs1pの機能解析、第37回日本分子生物学会年会。11月25日-27日、2014、横浜。
4. 村山 佑樹、小椋 光、山中 邦俊: ポリグルタミン凝集体形成における線虫CDC-48 C末端アダプターの役割、第37回日本分子生物学会年会。11月25日-27日、2014、横浜。
5. 城島 愛、野井 健太郎、錦織 伸吾、荻 博次、江崎 雅俊、小椋 光: AAAタンパク質kataninによる微小管切断におけるAAAドメインのpore領域の残基とtubulin C末端配列の重要性、第37回日本分子生物学会年会。11月25日-27日、2014、横浜。
6. 江崎 雅俊、宮崎 直幸、村田 和義、小椋 光: Cdc48/p97はFzo1の分解促進によってミトコンドリア融合反応を制御する、第37回日本分子生物学会年会。11月25日-27日、2014、横浜。
7. 山本 大輔、野井 健太郎、有田 (森岡) 健一、小椋 光: 高速原子間力顕微鏡によるAAAシャペロンp97の主要ATPase(D2)リングの構造変化の直接観察、第52回 日本生物物理学会年会。9月25日-27日、2014、札幌。
8. 山本 大輔、野井 健太郎、有田 (森岡) 健一、小椋 光: 高速原子間力顕微鏡によるAAAシャペロンp97の主要ATPase(D2)リングの直接観察、第14回 日本蛋白質科学会年会。6月25日-27日、2014、横浜
9. Ogura, T., Noi, K., Okuno, T., Arita-Morioka, K., Yamamoto, D., Okawa, A., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Ando, T., Esaki, M., and Yamanaka, K. 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, 15-19 September, 2013, Neuss, Germany. 招待講演
10. Yamanaka, K., Murayama, Y., and Ogura, T. Functional analysis of disease-associated mutant CDC-48/p97/VCP in C.elegans. EMBO Workshop on AAA+ Proteins: from mechanism and disease to targets, 15-19 September, 2013, Neuss, Germany.
11. Esaki, M., and Ogura, T. Non-conservation of the aromatic residue in the D1 pore loop of yeast Cdc48 is essential for cell viability. EEMBO Workshop on AAA+ Proteins: from mechanism and disease to targets, 15-19 September, 2013, Neuss, Germany.
12. Noi, K., Arita-Morioka, K., Ogi, H., Hirao, M., and Ogura, T. Biochemical analysis of molecular mechanisms of the interaction between VCP/p97 and amyloid fibrils of TDP-43. EMBO Workshop on AAA+ Proteins: from mechanism and disease to targets, 15-19 September, 2013, Neuss, Germany.
13. Sawamura, R., Esaki, M., and Ogura, T. 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, 15-19 September, 2013, Neuss, Germany.
14. Ogura, T., Noi, K., Arita-Morioka, K., Yamamoto, D., Ando, T., Nishikori, S., Esaki, M., and Yamanaka, K. AAA chaperones, focusing on the molecular mechanism of p97. EMBO Conference The biology of molecular chaperones: From molecules, organelles and cells to misfolding diseases, 17-22 May, 2013, Santa Margherita de Pula, Italy. 招待講演
15. Yamanaka, K., Murayama, Y., and Ogura, T.: Adaptors of p97 and disease-associated p97 mutations. 231st IMEG seminars & Minisymposium, February

- 20-21, 2014, Kumamoto University IMEG. Kumamoto.
16. Esaki, M., Noi, K., and Ogura, T. : Yeast Cdc48-20S proteasome complex in vitro and in vivo. 231st IMEG seminars & Minisymposium, February 20-21, 2014, Kumamoto University IMEG. Kumamoto.
 17. Okuno, T., Noi, K., Okawa, A., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Takahashi, K., Inobe, T., Yamanaka, K., and Ogura, T. : High-speed AFM imaging of the 26S proteasome dynamics. 231st IMEG seminars & Minisymposium, February 20-21, 2014, Kumamoto University IMEG. Kumamoto.
 18. Yamamoto, D., Noi, K., Arita-Morioka, K., Ando, T., and Ogura, T. : Observation of AAA chaperone p97 by high-speed AFM. 231st IMEG seminars & Minisymposium, February 20-21, 2014, Kumamoto University IMEG. Kumamoto.
 19. Karata, K., and Ogura, T. : Clamp loading by Gamma complex. 231st IMEG seminars & Minisymposium, February 20-21, 2014, Kumamoto University IMEG. Kumamoto.
 20. Ueda, E., Noi, K., Arita-Morioka, K., Ogura, T., Sakamoto, W., Hisabori, T., and Amano, T. : Biochemical properties of FtsH protease from plants. 231st IMEG seminars & Minisymposium, February 20-21, 2014, Kumamoto University IMEG. Kumamoto.
 21. Noi, K., Yamamoto, D., Arita-Morioka, K., Ando, T., and Ogura, T. : High-speed AFM observation of ATP-dependent rotation of the AAA chaperone p97 and its interaction with TDP-43 amyloid fibrils. 231st IMEG seminars & Minisymposium, February 20-21, 2014, Kumamoto University IMEG. Kumamoto.
 22. 斉藤 勝広, 植田 依里, 柿本 衿菜, 鈴木 香於里, 原 怜, 久堀 徹, 加藤 裕介, 坂本 亘, 野井 健太郎, 有田 健一, 小椋 光, 天野 豊己 : 植物由来FtsHプロテアーゼの分子機構. 日本生体エネルギー研究会 第39回討論会、12月18日-20日 2013、静岡市.
 23. 山中 邦俊, 村山 佑樹, 小椋 光 : 線虫を用いた疾患型変異CDC-48/p97/VCPの機能解析. 第36回日本分子生物学会年会、12月3日-6日 2013、神戸市.
 24. 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、12月3日-6日 2013、神戸市.
 25. 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、12月3日-6日 2013、神戸市.
 26. 奥野 貴士, 野井 健太郎, 大川 阿紀子, 土屋 光, 佐伯 泰, 高橋 一暢, 伊野部 智由, 山中 邦俊, 小椋 光 : 高速AFMによる26Sプロテアソームのダイナミクス解析. 第36回日本分子生物学会年会、12月3日-6日 2013、神戸市.
 27. 野井 健太郎, 有田一森岡 健一, 小椋 光 : 分子シャペロンVCP/p97とTDP-43アミロイド線維の相互作用の分子機構の解析. 第13回日本蛋白質科学会年会、6月12日-14日 2013、鳥取市.
 28. Noi, K., Yamamoto, D., Arita-Morioka, K., Nishikori, S., Ando, T., and Ogura, T. : High-speed atomic force microscopy of ATP-dependent rotational movements of p97/VCP and its interaction with amyloid fibrils of TDP-43. 3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop, 5-8 November, 2012, Kanazawa, Japan. 招待講演
 29. 野井 健太郎, 有田一森岡 健一, 小椋 光 : 分子シャペロンVCP/p97とTDP-43アミロイド線維の相互作用の分子機構の解析. 第85回日本生化学会大会、12月14日-16日 2012、福岡.
- [図書](計2件)
1. Okuno, T., and Ogura, T. FtsH protease-mediated regulation of various cellular functions. *Subcell. Biochem*, 66, 53-69, Regulated proteolysis in microorganisms. D. A. Dougan (ed.) Springer, 2013.
 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., pp 685-692, 2013.
- [その他]
熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野のホームページ
<http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/fukusei/index.html>

熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野
AAA ホームページ

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

熊本大学発生医学研究所のホームページ

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

(3)連携研究者

奥野 貴士 (OKUNO TAKASHI)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：80411031

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