



TITLE:

# p97/VCPのATPase活性調節機構の 解析( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

紺谷(森), 千穂

---

CITATION:

紺谷(森), 千穂. p97/VCPのATPase活性調節機構の解析. 京都大学, 2009,  
博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2009-07-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/126585>

RIGHT:

(論文内容の要旨)

p97/VCPはAAA (ATPase Associated with diverse cellular Activities) super familyに属するATPaseで、family名の通りATPase活性を利用して様々な重要な機能に関与することが示されている。VCPは、構造上4つの領域(N-末端領域、D1領域、D2領域、C-末端領域)から構成される。VCPの機能調節はATPase活性の調節機構と密接に関わることが推測されるが、その調節機構がどのようなものなのかはこれまでに明らかにされていなかった。

申請者はVCPの翻訳後修飾に着目し、質量分析(LC/MS/MS)を行うことによってVCPがこれまでに報告されているアミノ酸修飾よりさらに多くのリン酸化やアセチル化修飾を受けている事を明らかにした。すなわち、すでに同定されている6ヶ所のリン酸化修飾部位以外に、14ヶ所のセリン、14ヶ所のスレオニン、6ヶ所のチロシンを新たなリン酸化修飾部位として、また、22ヶ所のリジンをアセチル化修飾部位として同定した。これら修飾残基の中にはD1とD2 ATPase domain内のWalker A motif中に存在し、VCPがATPと結合するのに不可欠なアミノ酸である251番目と524番目のリジンが含まれていた。また、各domainを比較すると、D2  $\alpha$  domain (646番目のプロリンから765番目のグリシン)に最も多い16ヶ所の修飾部位を同定した。D2  $\alpha$  domainは、主なATPase活性を持つD2 領域内の D2 ATPase domainに隣接するが、その機能はこれまで明らかになっていなかった。

申請者はD2  $\alpha$  domain内の修飾アミノ酸の中で、生物種間で保存性の高い696番目のアルギニンと761番目のスレオニンに注目した。そしてそれらのアミノ酸に対し、修飾や非修飾を疑似するアミノ酸に置換した変異体を作成し、それらの精製タンパク質のATPase活性を測定した。その結果、696番目のアルギニンのアセチル化修飾疑似体と761番目のスレオニンのリン酸化修飾疑似体において、ATPase活性がそれぞれ亢進していることを明らかにした。実測値から得られたKmおよびVmaxより、両者の変異体ともKmおよびVmaxが野生型に比して約2倍になっていることが判明し、これらの修飾はATP結合とATP加水分解の両者に影響したことが示唆された。さらに761番目のスレオニンのリン酸化修飾によるATPase活性の亢進はVCPの6量体構造内でのイオンの相互作用によることが示唆された。これらの結果から、申請者はD2  $\alpha$  domainがVCPのATPase活性調節ドメイン(VCP ATPase Regulatory domain/VAR domain)としての機能を有することを提案した。VAR domain含め、VCPの翻訳後修飾は細胞周期や異常タンパク質の蓄積といった異なる細胞環境で変化し、それらによって引き起こされるATPase活性の変化がVCPの機能を調節していることが推測された。

## (論文審査の結果の要旨)

p97/VCP は細胞の様々な機能に関与しており、その多機能性は VCP の ATPase 活性の調節機構と密接に関わることが推測されるが、その調節機構がどのようなものなのかはこれまでに明らかにされていなかった。申請者は、VCP 内に 56ヶ所の新たな翻訳後修飾部位の同定を行い、その内、D2 $\alpha$  domain 内の 2ヶ所の修飾と ATPase 活性との関連性を解析した。この解析により、VCP はアミノ酸修飾、特に D2 $\alpha$  domain 内のアミノ酸修飾によって、その ATPase 活性が調整される可能性が初めて示された。

申請者は LC/MS/MS を用いて、詳細な VCP のアミノ酸修飾の解析を行った。そして、これまでに同定されている 6ヶ所のリン酸化修飾部位以外に、14ヶ所のセリン、14ヶ所のスレオニン、6ヶ所のチロシンを新たなリン酸化修飾部位として、また、22ヶ所のリジンをアセチル化修飾部位として同定した。VCP のアセチル化修飾は、申請者の実験で初めて明らかになった修飾である。VCP の修飾は、検出ができなかった C-末端領域を除く VCP 全体に存在し、その内 16ヶ所が D2 $\alpha$  domain(646番目のプロリンから 765番目のグリシン)に存在することが判明した。D2 $\alpha$  domain の機能は、これまで全く不明であった。

続いて、申請者は D2 $\alpha$  domain に存在し種間で保存の高い 696番目のリジンのアセチル化修飾と 761番目のスレオニンのリン酸化修飾の意義を解析するために、これらのアミノ酸を置換した変異体を作成し、それらの ATPase 活性を測定した。その結果、両アミノ酸の修飾疑似変異体では、どちらも ATPase 活性が亢進することを見いだした。また 761番目のスレオニンのリン酸化修飾によって、隣のプロトマーの 741番目のアルギニンとの間で分子間イオン結合が形成され ATPase 活性の上昇が引き起こされる可能性を実験によって示した。これらのことから、申請者はこれまで機能が未知であった D2 $\alpha$  domain は VCP の ATPase 活性調節ドメイン(VCP ATPase Regulatory domain/VAR domain)としての機能を有することを提案するに至った。この調節機構は、D2 $\alpha$  domain が主な ATPase 活性を担う D2 領域に含まれること、さらには、近年発表されている VCP の結晶構造解析結果ともよく符号している。本研究は、VCP 蛋白質のアミノ酸修飾の基本的な情報を総括的に提供するものであり、今後益々展開されるであろう VCP の機能調節機構の研究に対して、極めて重要な役割を果たすことが推測される。

申請者によって明らかにされた以上の成果は高く評価できるものであり、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 21 年 6 月 15 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。