

ヒト疾患型 VCP の  
出芽酵母を用いた機能解析

高田 尚寛

# 目次

要旨	2
序論	3
結果	5
考察	13
結果(図)	15
結果(補足図)	25
実験手法	34
文献	40
謝辞	46

# 要旨

VCP は様々な機能を担う必須の 6 量体 AAA<sup>+</sup>-ATPase であり、重要な全ての細胞に豊富に含まれている。加えて、VCP のアミノ酸配列の相同性は真核生物間で高度に保存されている。これまでにヒト VCP の 1 アミノ酸変異は IBMPFD (Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia) とよばれる常染色体優性遺伝形式の神経変性疾患を引き起こすことが報告されていた。さらに、IBMPFD の原因となる VCP の 1 アミノ酸変異と同じ幾つかの変異は、常染色体優性遺伝形式の家族性 ALS との関係も提唱されている。これらの疾患の発症において VCP が重要な役割を担っていることが予想されるが、その詳細は十分には分かっていない。また哺乳類 VCP の出芽酵母ホモログは Cdc48 とされるが、VCP は酵母 Cdc48 の欠損致死変異をレスキューできないことが報告されていた。

そこで、私は野生型 VCP と疾患型 VCPs の差異を解明するべく、出芽酵母 *cdc48* 温度感受性株に疾患型 VCPs を発現させたところ、野生型 VCP よりも疾患型 VCPs の方が制限温度下における *cdc48* の温度感受性を効率的に抑圧することを見出した。そして、疾患型 VCPs だけが *cdc48* 欠損致死変異をレスキューできることを明らかにした。さらに、酵母内で発現させた疾患型 VCPs は Myo2/actin 輸送系により娘細胞へ運ばれて foci を形成し、この foci の形成が *cdc48* 温度感受性の抑圧に必要であることを示した。

以上より、酵母を用いた VCP の変異が原因となる疾患の発症機構解析が可能となり、加えて疾患型 VCPs は機能獲得変異である可能性が示唆された。

# 序論

VCP は AAA(ATPase associated with diverse cellular activities)ファミリーに属し、最も豊富かつ広範に存在する細胞内タンパク質の 1 つである(Jentsch and Rumpf, 2007; Stolz et al., 2011; Yamanaka et al., 2011)。VCP はユビキチン - プロテアソーム系タンパク質分解、小胞関連分解 (ER-associated degradation: ERAD)、小胞体やゴルジ体の膜融合など多様な細胞機能に関わることが知られる。最近では VCP はオートファジーや、リソソーム内のソーティングにも関わることが明らかになった(Ju and Wehl, 2010; Ritz et al., 2011)。VCP は多様な機能を発揮するために異なる補因子を利用し、これまでに約 30 種類の結合タンパク質が報告されている(Madsen et al., 2009; Yeung et al., 2008)。加えて VCP 内の多くのアミノ酸残基は、その機能を制御するために酸化、リン酸化、アセチル化などの翻訳後修飾を受ける(Koike et al., 2010; Mori-Konya et al., 2009; Noguchi et al., 2005)。

このように多様な細胞内の役割に加え、VCP は伸長したポリグルタミンリピートをもつ Machado-Joseph disease (MJD) protein に結合するタンパク質の 1 つとして同定された(Hirabayashi et al., 2001)、続いてポリグルタミン病のキロショウジョウバエモデルを利用した遺伝学的なスクリーニングによりショウジョウバエの VCP ホモログである ter94 が、伸長したポリグルタミンで眼の変性を誘導する修飾因子として同定された(Higashiyama et al., 2002)。加えて、MJD やハンチントン舞踏病、パーキンソン病、運動神経疾患の ALS など幾つかの代表的な神経変性疾患の患者由来の神経内に異常タンパク質の凝集体、あるいはユビキチン陽性の inclusion body と VCP との共局在が見られた(Hirabayashi et al., 2001; Ishigaki et al., 2004; Mizuno et al., 2003)。これらは異なる神経変性疾患において VCP が広く関与することを支持している(Kakizuka, 2008)。さらに、常染色体優性遺伝形式で遅発性ながら最終的には死に至る希少複合疾患の IBMPFD (Inclusion body myopathy associated with Paget's disease of bone (PDB) and frontotemporal dementia (FTD))の患者の VCP 遺伝子にミスセンス変異が発見されたことから(Kimonis et al., 2000; Watts et al., 2004)、この考え方は支持されるものである。これまでに IBMPFD の患者の VCP 遺伝子から 19 種類の単一のミスセンス変異 (I27V, R93C, R95C/G, P137L, R155C/H/P/S/L, G157R, R159H/C, R191Q, L198W, A232E, T262A, N387H, A439S)が報告されている(Ju and Wehl, 2010)。そして近年、VCP における 4 つのミスセンス変異(R155H, R191Q, R159G, D592N) が常染色体優性遺伝形式の家族性 ALS を引き起こすこ

とが報告された(Johnson et al., 2010)。

疾患型 VCPs は様々な細胞障害、例えば ERAD の破綻(Weihl et al., 2006)や、凝集体形成の異常(Ju et al., 2008)や、オートファジーの異常(Ju et al., 2009)や、リソソーム内のソーティング障害(Ritz et al., 2011)を引き起こすことが報告されている。また培養細胞において疾患型 VCPs はその補因子達やユビキチンとの結合能に変化が見られる(Fernandez-Saiz and Buchberger, 2010; Manno et al., 2010)。さらに生化学的な研究から疾患型 VCPs は ATP 依存的に変化した立体構造を取っており、野生型 VCP より ATPase 活性が増加することが報告されている(Halawani et al., 2009; Manno et al., 2010; Tang et al., 2010; Fernandez-Saiz and Buchberger, 2010)。

また、神経における IBMPFD の原因においては TDP-43 が関与するという幾つかの証拠が挙げられているが(Ritson et al., 2010; Weihl et al., 2008)、IBMPFD の詳細な分子メカニズムは未だ殆ど分かっていない。一方で、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の実験系は、遺伝的な操作が簡便なために生物学的なプロセスにおける分子メカニズムを解明するために有効である。さらに哺乳動物 VCP と、酵母のホモログ Cdc48 との間で幾つかの機能は保存されている。そこで、私は酵母の Cdc48 変異体株にヒト疾患型 VCPs を発現させて、誘導される表現系の解析を試みた。

## 結果

疾患型 VCPs は *cdc48* 変異体の温度感受性を野生型 VCP より効率的にレスキューする。

私は疾患型 VCPs の病気に関わる機能を解明するべく、野生型 VCP と疾患型 VCPs(R93C, R95G, R155C, R155H, R155P, R159H, R191Q, A232E)を出芽酵母に発現させようと考えた

(Table.1)。これまでに発芽酵母の Cdc48 とブタの VCP はアミノ酸配列で 70%の相同性があるものの、*cdc48* 欠損変異は相補できないことが報告されている(Madeo et al., 1997)。そこで、Cdc48 の温度感受性株を利用して制限温度下において内在性 Cdc48 の機能を低下させることにより、外来的に発現させた野生型 VCP と疾患型 VCPs の機能の差を評価できるのではないかと考えた。そして、発芽酵母の *cdc48* 高温感受性株である *cdc48-3*、あるいは低温感受性である *cdc48-1* に野生型 VCP と疾患型 VCPs を恒常的な GPD プロモーター制御下で発現させ、制限温度下における増殖能を検証した (ちなみに健全なヒト、野生型のラットやマウスの VCP 間のアミノ酸配列では 100%の相同性があり、ヒトやラット VCP と発芽酵母 Cdc48 のアミノ酸配列では 70%の相同性がある)。

すると、野生型 VCP の発現は *cdc48-3* の高温感受性を部分的に抑圧するが、*cdc48-1* の低温感受性を抑圧しなかった (Fig.1A)。そして驚くべきことに、私が試した 8 つの疾患型 VCPs の全てが *cdc48-3* と *cdc48-1* 変異株を両方の温度感受性をレスキューした (Fig.1A)。同様の現象はガラクトースで誘導される GAL プロモーターの制御下で疾患型 VCPs を発現させた場合でも同様であった (Fig.1B)。GAL プロモーターで誘導される疾患型 VCP(R155C, R155H, R155P, R159H, R191Q, A232E)の全てが、*cdc48-3* 変異体の 34 °C と 37 °C における表現型を効率的にレスキューする一方、野生型 VCP では 34 °C のみレスキューした。また、野生型の酵母に疾患型 VCPs[R155C]を発現させても 25 °C や 37 °C での増殖には影響を与えなかった

(Fig.1C)。野生型 VCP や疾患型 VCPs の発現量は殆ど同等であった (Fig.1D)。これらの結果から、野生型 VCP と疾患型 VCPs の間の差異はタンパク質の量によるものではなく、むしろそれらの内在的な活性によるものと推測された。疾患型 VCPs の ATPase 活性は野生型 VCP のそれよりも高いことが報告されている(Halawani et al., 2009; Manno et al., 2010)。そこで、私は最も高い ATPase 活性をもつ変異体 VCP[T761E] が(Mori-Konya et al., 2009)*cdc48-3* の高温感受性を、疾患型 VCPs より強く抑圧するか否かを検証した(Fig. 1A, B)。しかし、VCP[T761E] は野生型と同様の効果しか得られず、疾患型 VCPs のように効率的に *cdc48-3* の温度感受性

の表現型を抑圧することができなかった。これらの結果は疾患型 VCPs の高い ATPase 活性は *cdc48* の温度感受性株の抑圧に関与しないことを示唆している。

次に、過剰量の疾患型 VCPs によるアーティファクトをみている可能性を除くため、発現量を低くした際にも *cdc48-3* を抑圧効果が見られるかを検証した。疾患型 VCPs (R155C あるいは A232E) を、CDC48 自身のプロモーター(転写開始点から-434 to -1 の位置)の制御下で発現させた場合の発現量は GPD プロモーター下で発現させた場合と比べるとわずか 1/10~1/15 程度であった (Sup.Fig.1B)。しかし、CDC48 プロモーターでの発現による抑圧能は、GPD プロモーターで *cdc48-3* 温度感受性株に発現させた場合と比べると低くなるがレスキューできた(Sup.Fig.1A)。この結果から、疾患型 VCPs による *cdc48-3* の効率的な抑圧効果は過剰量の疾患型 VCPs によるアーティファクトである可能性は低いと考えられる。

また、*cdc48* 変異体は制限温度で細胞周期に異常が生じることが報告されている (Moir et al., 1982)。そこで、疾患型 VCP が *cdc48* 変異体の細胞周期停止に何らかの影響を与えているのではないかと考えた。そして、GPD プロモーター制御下で疾患型 VCP を *cdc48* 変異体に発現させて制限温度における *cdc48* の細胞周期のプロファイルを観察した(Sup.Fig.2)。条件検討の段階で 37 °C の液体培養では野生型 VCP のみならず疾患型 VCPs でも *cdc48-3* 変異株の細胞周期進行に影響を与えなかったため、差異をより明確にするべく液体培養の温度を 32.5 °C と 35.5 °C とした。細胞は 25 °C で培養後にノコダゾールで同調し、その後に 32.5 °C や 35.5 °C へとシフトしてリリースしてから FACS で DNA 含量を測定した。すると 32.5 °C では *cdc48-3* の細胞周期が停止するが、野生型 VCP あるいは疾患型 VCPs[R155C]の発現でレスキューされた。対照的に 35.5 °C では疾患型 VCPs[R155C]の発現で細胞周期停止はレスキューされたが、野生型 VCP ではされなかった(Sup.Fig.2)。これらの結果から疾患型 VCP が *cdc48* 変異体の制限温度における細胞周期の異常に影響を与えていることが示唆された。

疾患型 VCPs は致死性の *cdc48* 欠損変異をレスキューするが、野生型 VCP はしない。

酵母の *cdc48* 欠損変異体は VCP でレスキューできない(Madeo et al., 1997)。そこで、疾患型 VCPs が *cdc48* 温度感受性変異体を制限温度において野生型 VCP より効率的に抑圧したこれまでの結果を踏まえると、疾患型 VCPs は *cdc48* 欠損変異をもレスキューするのではないかと考えた。そして、GPD プロモーター制御下で野生型 VCP もしくは疾患型 VCPs を発現する URA3-plasmid を、2 倍体  $\Delta cdc48$  heterozygote 株 (CDC48/*cdc48::HIS3*) へ導入した後、胞子形成させ 4 分子解析を実施した。すると大抵は Cdc48 が必須遺伝子のため 2 つのコロニ

一のみ  $\Delta cdc48$  heterozygote から生じた。しかし、疾患型 VCPs[R93C, R95G, R155C, R191Q, or A232E]を発現させた 2 倍体の胞子にのみ通常サイズの二つのコロニーに加え小さいコロニーも得られた(Fig. 2A)。その小さなコロニーは全て his<sup>+</sup> ura<sup>+</sup>の表現系を示したので、疾患型 VCPs の plasmid が *cdc48::HIS3* の胞子へと輸送されたために *cdc48::HIS3* の胞子が生存できたことを示唆している。同様の結果は、別の heterozygote である  $\Delta cdc48::kanR/CDC48$  株を用いた場合でも得られた (data not shown)。これら his<sup>+</sup> ura<sup>+</sup>を示す酵母のウエスタンブロット解析から、Cdc48 ではなく疾患型 VCPs が発現していることが確認できた(Fig. 2B)。加えて、これらの酵母から抽出した plasmid の塩基配列を確認すると、各々の疾患型 VCPs 変異が確認できた (data not shown)。一方、野生型 VCP を発現する二倍体からの胞子分離を 40 回行ったが、最大で 2 つのコロニーしか得られなかった。

次に胞子形成の際の減数分裂における plasmid の伝達が野生型 VCP を発現させた酵母で欠失している可能性を除外すべく、ura<sup>+</sup>酵母を殺す化合物の 5-FOA による plasmid swapping assay を実施した。まず Cdc48 を発現する URA3-plasmid でレスキューされている欠損変異体に、野生型 VCP もしくは疾患型 VCPs もしくは Cdc48 を発現する TRP1-plasmid を形質転換した。それをウラシル含有寒天培地で培養して URA3-plasmid を落とさせ、さらに 5-FOA 寒天培地にストリークした。つまり URA3-plasmid のない *cdc48* 欠損変異体のみ、5-FOA 寒天培地で生き残ることができる。すると、期待通りに疾患型 VCPs と Cdc48 は 5-FOA 寒天培地上で増殖できたが、野生型 VCP を発現させた酵母は増殖できなかった(Sup.Fig.3)。この結果より、減数分裂時における plasmid の伝達が野生型 VCP を発現させた酵母で欠失している可能性が除外できた。

CDC48 プロモーターの制御下で疾患型 VCPs を発現させると *cdc48-3* の温度感受性はある程度レスキューされたので(Sup.Fig.1)、私は CDC48 プロモーターによりドライブされる疾患型 VCPs も *cdc48* 欠損変異体をレスキューするか否かを検証した。すると、*cdc48* 欠損変異体の致死性をレスキューしないことが明らかとなった。これらの結果は、十分量の疾患型 VCPs が *cdc48* 欠損変異のレスキューを可能にすることを示唆している。

### 野生型 VCP と疾患型 VCPs の Cdc48 活性には差が無い

Cdc48 が分解する特異的な基質の 1 つに CPY\*が報告されている(Ye et al., 2001)。そこで、疾患型 VCPs が *cdc48* 変異体の制限温度下における増殖障害を野生型 VCP より強くレスキューするのは、*cdc48* 変異に生じる分解能の低下を相補する能力に差があるからではないかと



考えた。そして Cdc48、野生型 VCP、疾患型 VCPs の各々を発現させた *cdc48* 変異体における CPY\*-GFP の分解能を測定した。すると、*cdc48-3* 変異体においては CPY\*-GFP の分解が遅れるが、Cdc48 の発現によりその障害はレスキューされた(Fig.3)。また、野生型 VCP の発現により *cdc48-3* における CPY\*-GFP の分解が部分的にレスキューすることを見出した。さらに、VCP[R155C]や VCP[A232E]においても、野生型 VCP と同じく部分的にレスキューしたが、それらは Cdc48 を発現させた時のレスキューの程度には及ばなかった。これらの結果は、*cdc48* 変異体の増殖障害をレスキューする野生型 VCP と疾患型 VCPs の差異が、Cdc48 の基質を分解する能力に起因していないことを示唆している。

### 疾患型 VCPs は foci を形成する

野生型 VCP と疾患型 VCPs の差異を明らかにするべく、私はこれら VCP の細胞内における局在を観察することにした。まず EGFP と融合させた VCP を作成し、EGFP タグの影響がないかを確認した。するとこれまでと同様に疾患型 VCPs-EGFP は *cdc48-3* の温度感受性を VCP-EGFP より効率的に抑制し(Sup.Fig.4A)、さらに疾患型 VCPs (R155C,R191Q,A232E)-EGFP と CDC48-EGFP は *cdc48* 欠損変異をレスキューする一方で、VCP-EGFP ではレスキューしなかった。つまり EGFP タグの影響はないことが確認できた(Sup.Fig.4C)。そして、興味深いことに *cdc48-3* 変異体において Cdc48-EGFP と VCP-EGFP は diffuse な局在を示したが、疾患型 VCP[R155C]-EGFP は diffuse な蛍光のバックグラウンドの中に幾つかの輝度の強い Foci の局在を示した(Fig.4A)。一方、Hoechst で染色してみたところ、これらの foci は核に局在していなかった (data not shown)。そして、疾患型 VCP[A232E]-EGFP を発現させた酵母細胞においても VCP[R155C]-EGFP と同様の GFP-foci が観察された(Fig.4A)。さらに、GFP-foci は *cdc48-3* にのみ観察されるわけではなく、野生株でも同様に観察された(Fig.4B)。また、EGFP タグによる foci 形成の可能性を排除すべく、VCP[R155C]を発現させた酵母細胞において anti-VCP 抗体を用いた免疫染色を実施すると foci は形成され、野生型 VCP を発現させても foci は形成されなかった。つまり foci 形成は EGFP タグの影響を受けないことが明らかとなった (Sup.Fig.5)。さらに、ATPase 活性が低い変異体 VCP[K524A]-EGFP と ATPase 活性が高い VCP[T761E]-EGFP においては foci を形成しなかった。以上の結果から、出芽酵母における Foci 形成は疾患型 VCPs の変異と関連するが VCP の ATPase 活性の違いと直接的に関連しないことが示唆された。

疾患型 VCPs は ATP 依存的に野生型 VCP とは異なる立体構造をとることが報告されてい

る(Halawani et al.,2009; Tang et al., 2010)。さらに疾患型 VCPs は哺乳動物細胞で疾患型 VCPs とポリグルタミン鎖もしくはプロテアソームインヒビターと共発現させることで野生型 VCP よりもはるかに効率的に凝集体を形成すること(Ju et al., 2008; Manno et al., 2010)、出芽酵母で Cdc48 は aggresome に含まれること等が報告されていた(Wang et al., 2009)。これらの報告から、本研究で観察された foci は疾患型 VCPs を取り込んだ単純な凝集体と推測するのは容易である。しかし、疾患型 VCPs が *cdc48* 変異体の障害を野生型 VCP より効率的に抑圧できることを考慮すると、これらの foci は機能的な複合体、もしくは *cdc48* 変異体に有益なものであるのかもしれない。確かに本研究で観察された foci はノコダゾールやベノミルで処理しても、その形成や局在には影響しないので、これまでに報告されているベノミルで影響をうける aggresome ではないと推測している (Fig.5B and C and data not shown)。また、私は GFP foci を観察しているとしばしば buds に局在していることに気付いた。

#### 疾患型 VCPs の foci 形成にはアクチンケーブルが関与する

出芽酵母において、多くの細胞小器官や分泌小胞がアクチンケーブルを利用した極性化した輸送により bud へ向かうことが知られている(Pruyne et al.,2004b)。そこで、私はアクチンが VCP[R155C]-EGFP foci の形成や bud での局在に関わっているのではないかと考えた。そして、まず VCP[R155C]-EGFP の foci と phalloidin で染色されたアクチンとの局在を比較した。すると、bud において VCP[R155C]-EGFP の foci は部分的ではあるが phalloidin 陽性の構造体と共局在を示した(Fig.5A)。次にアクチンケーブルが foci 形成に関わっているかどうか検証すべく、アクチンモノマーと結合することでアクチンの重合を阻害する Latrunculin B (以下 LatB : Ayscough et al., 1997; Irazoqui et al., 2005)で VCP[R155C]-EGFP の foci を処理した。すると、foci の消失が観察され、その代わりに酵母の細胞全体に沢山の小さな粒状の構造体 punctate が現れた(Fig.5B and 5C)。また、培地から LatB を洗い流したところ、VCP[R155C]-EGFP の foci は再構成され、そして foci は bud へと移動した (Fig.5D and 5E)。これを経時的に観察すると、VCP[R155C]-EGFP の小さな punctae は foci を形成するために融合し始め、次に bud へと移動した(Sup.Fig.6)。また、ノコダゾール、MG132、ツニカマイシンあるいはヒートショック処理したところ foci の様子は変化しなかったことから、LatB の効果が特異的であることが分かった(Fig.5B and 5C)。以上の結果は、foci の形成と bud への輸送にはアクチンケーブルが必要であることを示している。

私は更に詳しくアクチンケーブルの関与を検証することにした。アクチンケーブルは出芽

酵母において極性化された増殖部位から出る繊維状の構造物である(Fig.6A)(Pruyne et al., 2004b)。アクチンケーブルの構築は formins と呼ばれる Bni1 と Bnr1 により制御されている。Bni1 は bud において直鎖状のアクチンケーブルの構築に関わり、Bnr1 は bud neck でアクチンケーブルの構築に関わることが報告されている(Pruyne et al., 2004a)。そこで、私は VCP[R155C]-EGFP の foci 形成には、Bni1 と Bnr1 が関わっているのではないかと考えた。そして、VCP[R155C]-EGFP を *bni1* 破壊株 ( $\Delta bni1$ ) や *bnr1* 破壊株 ( $\Delta bnr1$ ) に発現させて、その foci の様子を観察した。すると LatB 処理した時と同様に  $\Delta bni1$  や  $\Delta bnr1$  の酵母細胞においては VCP[R155C]-EGFP の GFP の蛍光は punctae を示した(Fig.6B and 6C)。GFP パターンの変化は  $\Delta bnr1$  細胞より、 $\Delta bni1$  の方がより明確であった。対照的に、VCP-EGFP と Cdc48-EGFP を発現させた  $\Delta bni1$  や  $\Delta bnr1$  の酵母細胞において GFP の蛍光は diffuse なままであった。また、出芽酵母における VCP[R155C]-EGFP の foci 形成について Bni1、Bnr1 以外の変異体で検証したところ、プロテアソームサブユニットの Pre9 変異体、小胞体関連分解における ubiquitin ligase の Doa10 変異体や、ubiquitin 鎖を組み立てる因子の Ufd2 変異体では foci の形成を損わなかったため、UPS machinery は foci 形成に関与していないことが示唆された(Fig.6C)。

疾患型 VCPs が *cdc48* 温度感受性変異体をより効率よく抑圧したこと、またアクチン依存的に foci を形成して bud へ輸送されたことを踏まえ、疾患型 VCPs foci が bud に輸送されることで *cdc48* 温度感受性変異体をより効率よく抑圧するのではないかと考えた。そして *cdc48-3Δbni1* と *cdc48-3Δbnr1* の二重変異株を作成し、それらに VCP[R155C]-EGFP を発現させて制限温度における増殖能を検証した。すると VCP[R155C]-EGFP の増殖障害における抑圧効果は 37 °C と 34 °C の制限温度において *cdc48-3Δbni1* と *cdc48-3Δbnr1* の両方とも部分的に失われていた(Fig.6D)。また  $\Delta bni1$  の単一変異体では 25 °C と 37 °C のどちらでも生育し、そして  $\Delta bni1$  株の増殖能は野生型 VCP、VCP[R155C]や CDC48 の発現により影響を受けなかった (Sup.Fig.7)。以上の結果は、buds での VCP[R155C]-EGFP の foci 形成にはアクチンケーブルの構築に関わる Bni1 や Bnr1 が関わり、それらは疾患型 VCPs による *cdc48* の温度感受性の抑圧に必要であるという考えを示唆している。

#### 疾患型 VCPs の foci 形成には Myo2 が関与する

出芽酵母には 5 つの Myosin が存在し、その中の V 型ミオシン (Myo2 と Myo4) はモータータンパク質とされ、アクチン繊維のプラス端に向かう積荷を輸送する籠である。積荷には液胞、小さな細胞小器官、分泌小胞、そしてトランスゴルジネットワーク (TGN) の成分等

が含まれる (Trybus,2008)。Myo4 は mRNA や小胞体 tubule の移動の輸送を仲介し、一方で Myo2 は分泌小胞、液胞、膜結合した細胞小器官を分配する際の輸送において主要な役割を担うことが知られている (Matsui,2003)。そこで、私は疾患型 VCPs の foci 形成や輸送にアクチンケーブル上を移動する Myo2 が関わるのではないかと推測した。そして、温度感受性を示す 2 種類の myo2 変異体 (*myo2-66* と *myo2-20*) における VCP[R155C]-EGFP の foci 形成とその動きを観察した。ちなみに *myo2-66* 変異体は Myo2 のアクチン結合ドメインに欠陥があり、そして *myo2-20* 変異体は Myo2 の tail ドメインである積荷との結合ドメインに欠陥がある(Johnston et al., 1991; Schott et al., 1999)。すると、両方の変異体において

VCP[R155C]-EGFP を発現させると沢山の小さな構造物 punctae が現れ、それは  $\Delta bni1$  や  $\Delta bnr1$  酵母細胞、また酵母細胞を LatB 処理した際の現象と似ていた(Fig.7A and 7B)。また buds における foci の局在する頻度も両方の *myo2* 変異体において有意に減少していた(Fig.7A and 7C)。さらに、Myo2 と相互作用するキネシン関連タンパク質の Smy1(Beningo et al., 2000)破壊株においても沢山の小さな punctae が観察された(Fig.7A-7C)。そして、小さな punctae が形成されることに関連して、制限温度の 37 °C で *cdc48-3* $\Delta$ *smy1* 株では VCP[R155C]-EGFP による抑圧が部分的に失われた(Fig.6D)。対照的に *myo1* 変異体、あるいは Myo4, Myo3, Myo5 に必要な機能の SHE4 の破壊株である  $\Delta she4$  変異体においては VCP[R155C]-EGFP の foci 形成は影響を受けず、Myo2 の特異的な関与が確認された(Fig.6C and 7A-7C)。また *myo2-66* と *cdc48-3* あるいは *myo2-20* と *cdc48-3* の二重変異株の作成を試みたが成功しなかった(data not shown)。

加えて、私は野生株の酵母細胞において Myo2 と VCP[R155C]-EGFP の部分的ではあるものの共局在を確認しており(Fig.7D)、これは Myo2 が VCP[R155C]-EGFP そのものか、あるいは VCP[R155C]-EGFP を含む積荷を輸送しているという考えを支持するものである。興味深いことに、野生型の酵母細胞と *myo2-66* 細胞ではアクチンそのものの局在に変化はないけれども、*myo2-66* 変異体において VCP[R155C]-EGFP とアクチンは共局在しない(Fig.7E)。これらの結果は、VCP[R155C]-EGFP の foci とアクチンの相互作用は直接ではなく、むしろ Myo2 を介した相互作用であるということを示唆している。以上の結果から、疾患型 VCPs は Myo2-actin 輸送系により娘細胞である bud に運ばれて foci を形成することが示唆された。

次に私は VCP[R155C]-EGFP と Myo2 の間の生理学的な相互作用を免疫共沈降法により確認した (Sup.Fig.8)。しかしながら、VCP[R155C]-EGFP と Ufd1-6HA と Shp1-6HA が効率的に相互作用する条件下において、VCP[R155C]-EGFP と Myo2 の間の相互作用を明確に検出できなかった。このように VCP[R155C]-EGFP と Myo2 は明らかに共局在するけれども、それ

らの相互作用は直接的ではなく、VCP[R155C]と Myo2 を繋いでいるタンパク質、もしくはその複合体が存在するのかもしれない。

## 考察

本研究で私はヒトにおいて最終的に有害となる疾患型 IBMPFD VCP に観察される変異が、出芽酵母 *cdc48* 変異体においては有利に働くことを示した。これは、疾患型 VCPs は *cdc48* 変異体の増殖に必要な幾つかの機能をもつが、野生型 VCP はもたないということを示唆している。この観点からすると IBMPFD にみられる様々なアミノ酸置換が VCP を Cdc48 の機能に近くなるように変化させているのかもしれない。この考え方は検討した全ての疾患型 VCPs が *cdc48-1* や *cdc48-3* の温度感受性のみならず *cdc48* 欠損変異の致死性をもレスキューする結果とも一致する。しかし、これは次の理由から当てはまらないかもしれない。

第一に、本研究で検討した全ての疾患型 VCPs の変異は、ヒト野生型 VCP と出芽酵母の Cdc48 で保存されているアミノ酸残基 (R93, R95, R155, R159, R191, A232) で生じているため、野生型 VCP から疾患型 VCP への変異によって酵母 Cdc48 との間のアミノ酸の相同性は低下してしまっていることが挙げられる。第二に、疾患型 VCPs と野生型 VCP の酵母における基質分解の機能については同程度であったこと、さらには酵母 Cdc48 よりも低かったことが挙げられる。第三に、最も重要なことは *cdc48* 変異酵母株の増殖阻害を相補するために疾患型 VCPs は Myo2/actin 輸送系を必要とするが、野生酵母株における内因性 Cdc48 タンパク質はその輸送系を増殖には必要とはしていないことが挙げられる。以上の結果から、疾患型 VCPs が野生型 VCP や酵母 Cdc48 にはない幾つかの新しい機能を取得していることを暗に意味していると推測する。

制限温度における *cdc48-1* と *cdc48-3* の増殖停止は G2/M 期で生じ (Moir et al., 1982)、最も明らかな変化は有糸分裂の進行の停止である。興味深いことに疾患型 VCPs は明瞭な foci を形成して出芽開始地点に蓄積しやすい。これが *cdc48-1* と *cdc48-3* 変異体における有糸分裂の進行や、細胞周期を進行させる要因と推測している。これらの表現系を示すのに疾患型 VCPs は Myo2/actin を利用した輸送系、つまり myosin V family のうち Myo2 が bud に向かうアクチン繊維に沿って疾患型 VCPs を輸送するのではないかと考えている。さらに、疾患型 VCPs と Myo2 には未知のタンパク質を介した結合親和性があり bud へと輸送されるのではないかと考えている。

出芽酵母 *cdc48-1* や *cdc48-3* 変異体タンパク質の機能が制限温度において低下し、有糸分裂の進行をサポートするのに十分でないレベルとなる。しかしこの条件下でさえ、多量の疾患型 VCPs や、もしくはその複合体が Myo2/actin 輸送系を介して bud へと運ばれると、機能が

低下した *cdc48-1* と *cdc48-3* タンパク質の機能を相補することができる。この結果を踏まえて、私は哺乳動物細胞で疾患型 VCPs と Myo2/actin 輸送系が作用しているか否かを検証した。疾患型 VCP をトランスフェクションした哺乳動物細胞は MG132 の存在下で foci を形成することが知られていたため、これらの foci が市販の myosin V 抗体で陽性を示すかどうかを検証したが、この抗体では検出できなかった。したがって、未だ出芽酵母で観察されたものと同様の構造物が哺乳動物細胞で存在する明確な証拠は得られていない。

興味深いことに、VCP の構造解析から多くの変異アミノ酸残基が N-domain と 1st ATPase domain の D1-domain との間に位置することが明らかになっている(Tang et al., 2010; Fernandez-Saiz and Buchberger, 2010)。そして疾患型 VCPs では変異により N-domain の動きに変化が生じ、それはおそらく変異体の ATP 加水分解サイクルを変化させるという考えが提唱されている(Tanget al., 2010)。これらの報告は共通する構造の変化が疾患型 VCPs に生じるかもしれないという考えを支持しており、この構造の変化は疾患型 VCPs が酵母 *cdc48* 変異体を相補する能力と同じく foci を形成する能力にも関与するかもしれない。

VCP は細胞内に豊富にあるタンパク質であり多くのタンパク質と相互作用するため、疾患型 VCPs は哺乳動物細胞において多くの細胞機能に影響を与えると思われる。それにも関わらず、疾患型 VCPs に起因する IBMPFD や ALS は常染色体優性遺伝性疾患であるため、疾患型 VCPs には野生型 VCP を超える優性の機能があると推測される。本研究で検討した全ての疾患型 VCPs が *cdc48-1* や *cdc48-3* 変異体、つまり内因性の *cdc48* 変異タンパク質の存在下においても、それら変異体の増殖障害をレスキューできることを示した。この優性の表現系が IBMPFD や ALS に関連する症状を示すことは現在明らかにはできていないが、この表現型の根底にあるメカニズムの更なる解明がこれらの疾患の病態の理解に役立つかもしれない。さらに疾患型 VCPs を発現させた出芽酵母の実験系は、簡便な薬剤スクリーニングになりえる可能性がある。例えば温度感受性の抑圧、致死性のレスキュー、あるいは foci 形成を抑制する観点から化合物スクリーニングが可能であるだろうし、このスクリーニングが IBMPFD と ALS の治療のための新薬候補の開発にも貢献するかもしれない。

## 結果 (図)

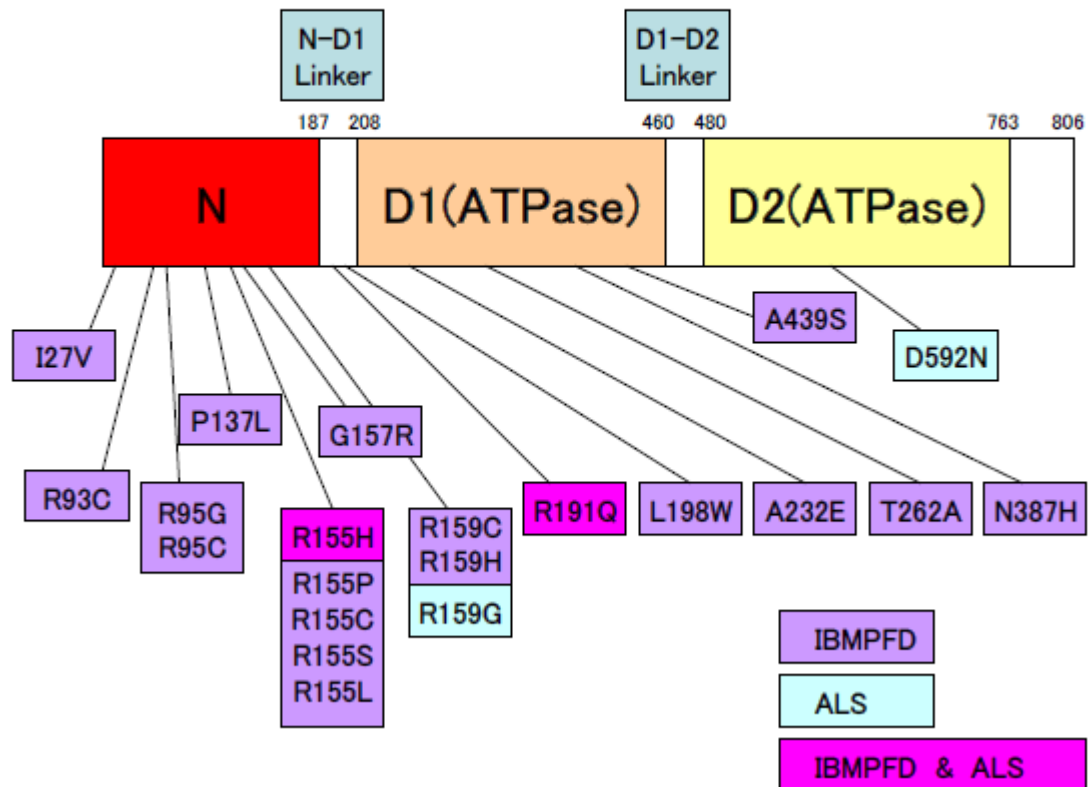


Table.1. IBMPFD や ALS の原因となる VCP の変異

これまでに VCP の 19 コの異なる単一のミスセンス変異が IBMPFD の患者から報告されており、一方で VCP の 4 コの異なる単一のミスセンス変異が ALS の患者から報告されている。このうち 2 つの変異は IBMPFD と ALS で共通している。また、構造解析から変異箇所のは多くは N-domain と D1-domain の間に位置することが明らかとなっている。



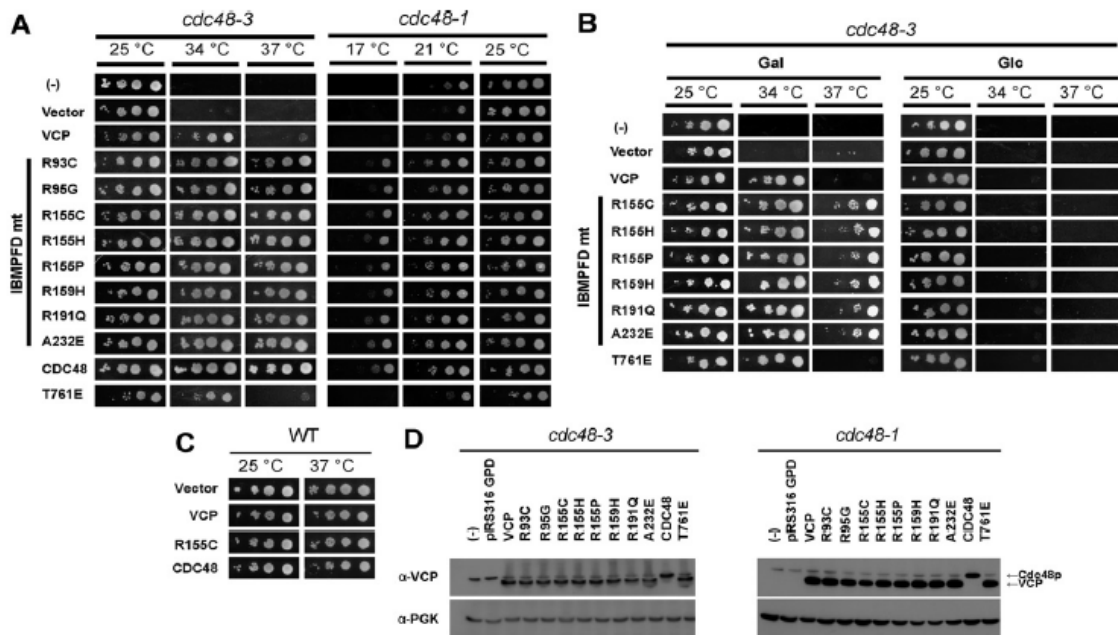


Fig.1. 疾患型 VCPs は高温感受性株 *cdc48-3* や低温感受性株 *cdc48-1* を野生型 VCP より効果的に抑制する

- (A) *cdc48-3* と *cdc48-1* に GPD プロモーターで様々な VCP を発現させた際の生育に与える効果。各々の変異株の希釈系列を作成、SD-uracil 寒天培地上にスポットして 3 日間、表示の温度で生育させた。
- (B) *cdc48-3* と *cdc48-1* に GAL プロモーターで様々な VCP を発現させた際の生育に与える効果。各々の変異株の希釈系列を作成、SGal-uracil 寒天培地上にスポットし、3 日間、表示の温度で生育させた。
- (C) 野生株に GPD プロモーターで VCP, VCP[R155C] や CDC48 を発現させた生育に与える効果
- (D) *cdc48-3* と *cdc48-1* における様々な VCP や Cdc48 タンパク質の発現レベル。細胞は 25 °C で培養し、anti-VCP 抗体による Western blot で解析された。PGK は loading control とした。酵母 Cdc48 は図のように anti-VCP 抗体と cross-react する。

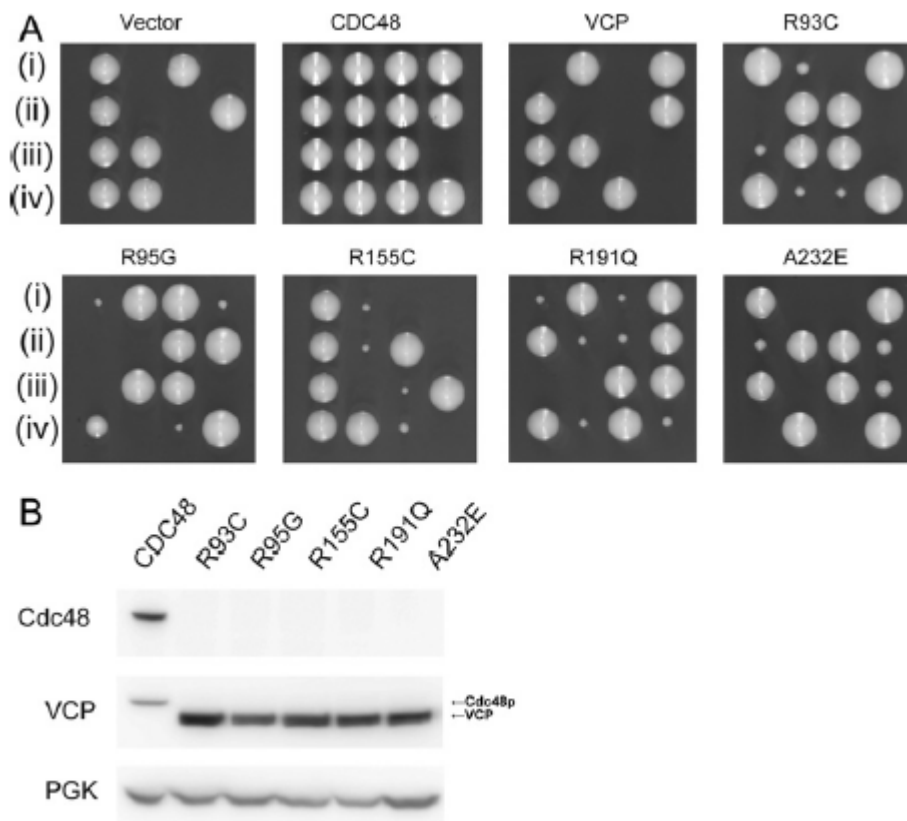


Fig.2. 疾患型 VCPs による致死性 *cdc48* 欠損変異体の相補

- (A) URA3 を含む vector もしくは Cdc48、wtVCP、VCP[R93C]、VCP[R95G]、VCP[R155C]、VCP[R191Q]、VCP[A232E]が形質転換された 2 培体株 ( $\Delta cdc48::HIS/CDC48$ ) の四分子解析を実施した。これらの実験において Cdc48 は自身のプロモーター下で発現され、そして、野生型 VCP と疾患型 VCPs は GPD プロモーター下で発現させた。各々の四分子解析において、分離胞子の 4 セットが(i)-(iv)に示されている (各々の解析は水平に表示される)。
- (B) 各々の四分子解析において  $his^+, ura^+$ を示す分離胞子の VCP や Cdc48p の発現量を確認した。PGK を loading control とした。

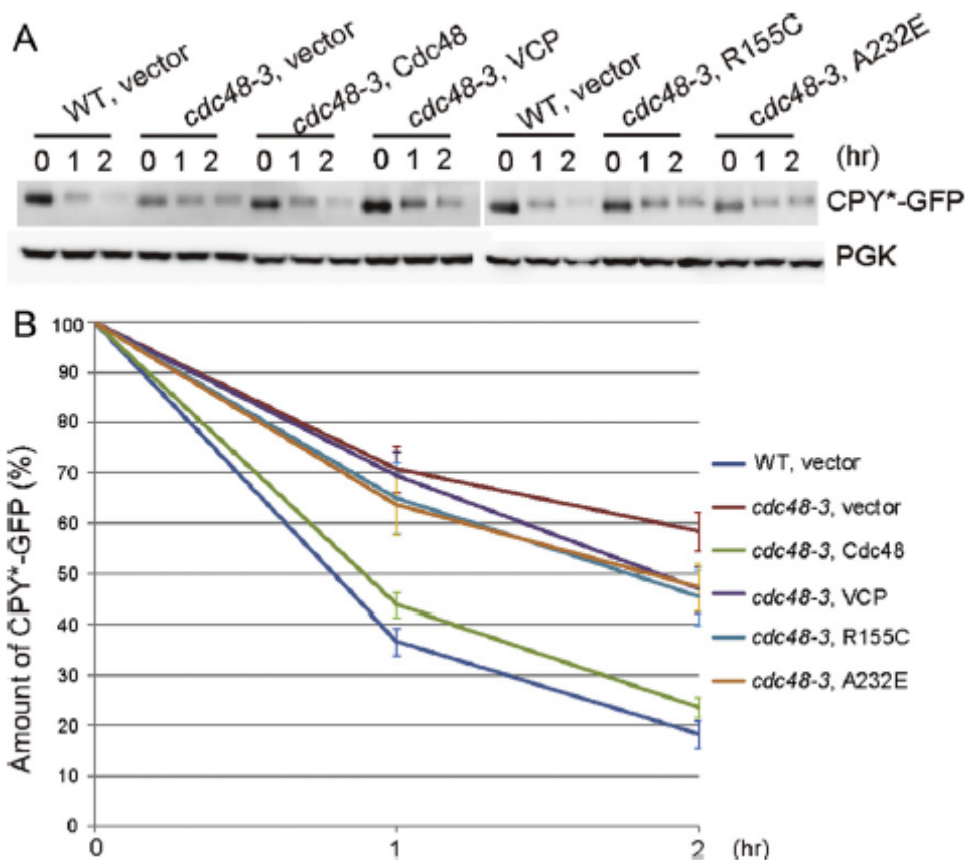


Fig.3. CPY\*-GFP の分解

- (A) Vector もしくは Cdc48、wtVCP、VCP[R93C]、VCP[R95G]、VCP[R155C]、VCP[R191Q]、VCP[A232E]を plasmid で発現させた野生株、あるいは *cdc48-3* に CPY\*-GFPplasmid を発現させ 30 °C、mid-log phase で培養した。
- (B) (A)の CPY\*-GFP 量の定量化。タンパク量は(A)に示されるバンドから定量化された。データは独立した三回の実験の標準誤差値を意味する。各々の実験において time 0 の CPY\*-GFP 量を 100 と定義した。

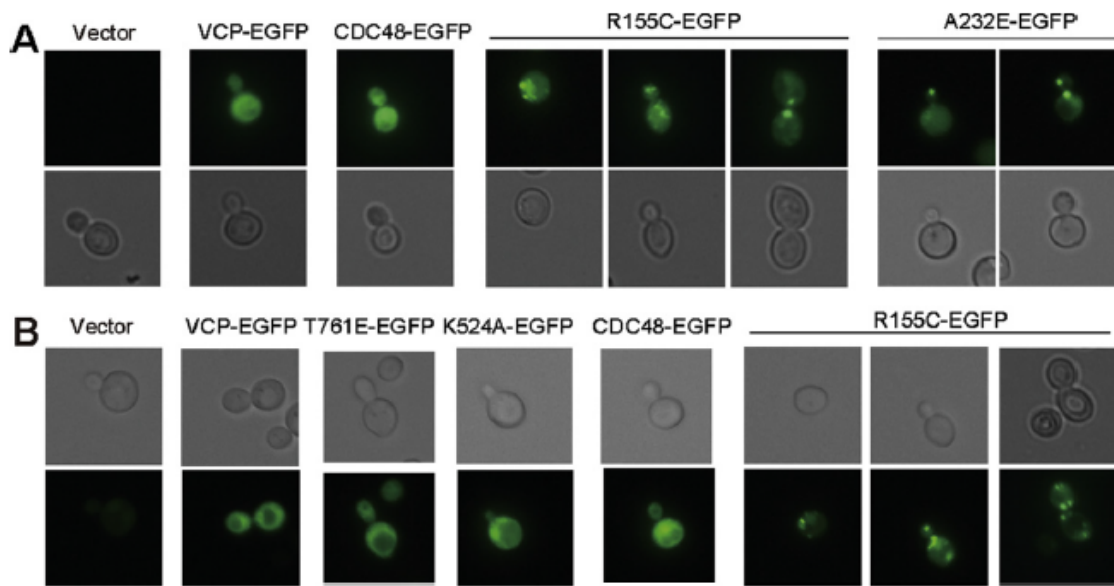


Fig.4. 疾患型 VCPs の foci 形成

- (A) VCP[R155C]-EGFP または VCP[A232E]-EGFP を発現させた *cdc48-3* で foci の形成が見られたが、wtVCP-EGFP または Cdc48-EGFP を発現させた *cdc48-3* では foci の形成が見られなかった。表示の plasmid を発現させた *cdc48-3* を early log phase まで培養し、蛍光顕微鏡により観察した。
- (B) VCP[R155C]-EGFP を発現させた野生株では foci の形成が見られたが、wtVCP-EGFP、VCP[T761E]-EGFP、VCP[K524A]-EGFP、Cdc48-EGFP を発現させた野生株では foci の形成は見られなかった。

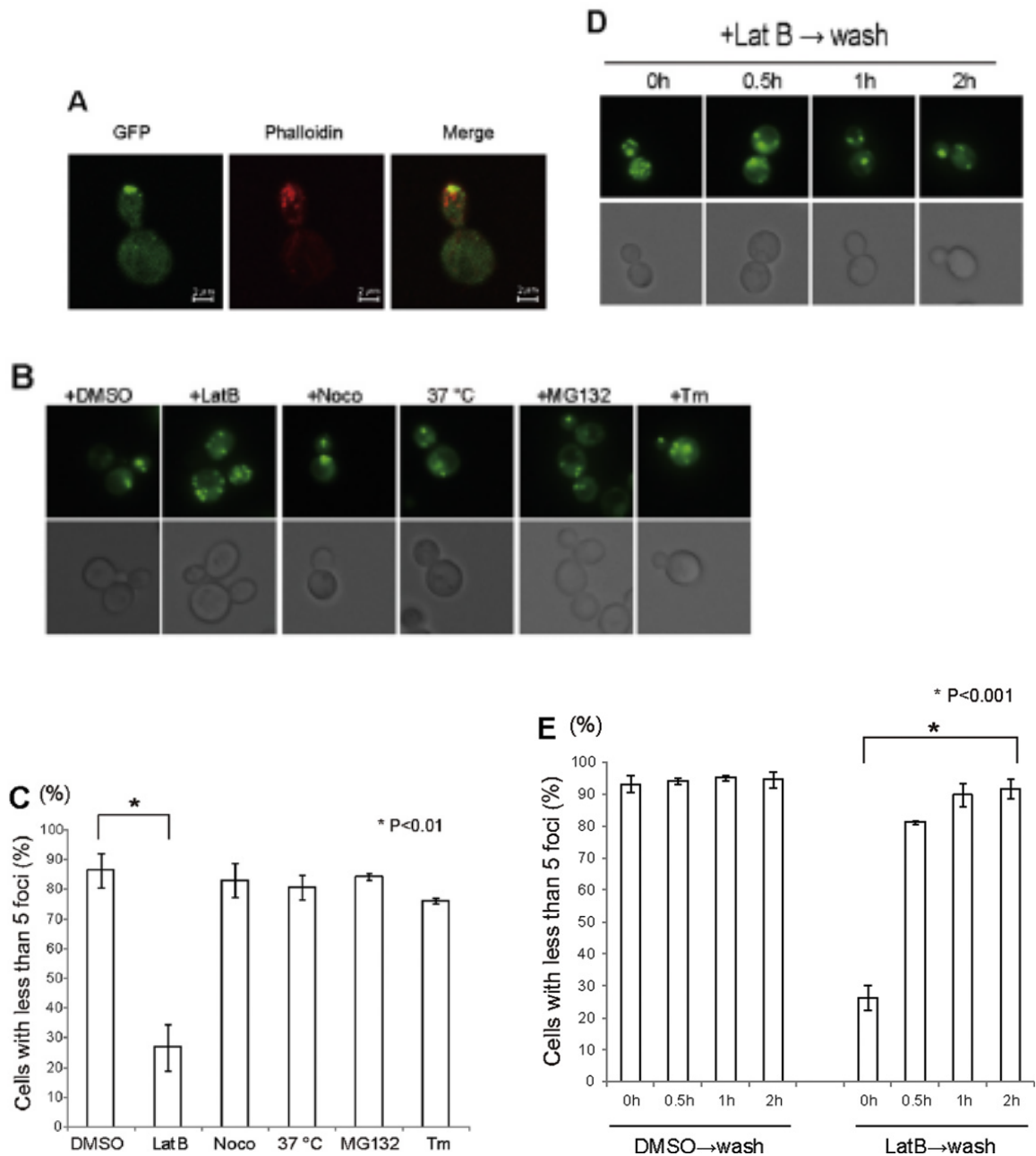


Fig.5. buds における VCP[R155C] の foci 形成と局在におけるアクチンケーブルの関与

(A) Phalloidin 染色。VCP[R155C]-EGFP を発現させた野生株(Y1043)を early log phase まで培養して固定し、rhodamine-phalloidin 染色し、コンフォーカル顕微鏡で観察した。

(B) Latrunculin B、nocodazole、heat shock、MG132、tunicamycin 処理。VCP[R155C]-EGFP を発現させた野生株に Latrunculin B(25 $\mu$ g/ml)で 2h、nocodazole(15 $\mu$ g/ml)で 2h、heat shock(37 °C)で 2h、MG132(200 $\mu$ M)で 4h、tunicamycin(2 $\mu$ g/ml)で 4h、25 °C 処理を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

- (C) (B)の定量化。(B)で 100 コの細胞中に輝度の強い GFP foci が 5 コ未満ある細胞数を計測した。3 回の実験の平均値が示され、標準偏差はバーで示す。5 つ未満の foci をもつ細胞の減少は、5 以上の多数の punctae をもつ細胞の逆数増加を示している。
- (D) Latrunculin B を洗い流した後の VCP[R155C]-EGFP の foci の再構成。VCP[R155C]-EGFP を発現させた野生株を Latrunculin B(25 $\mu$ g/ml in DMSO)で 2h 処理し、1% DMSO で 2 回洗った後、1% DMSO の培地で incubate し、蛍光顕微鏡により表示の時間で観察した。
- (E) (D)の定量化。結果の見方は(C)に同じ。

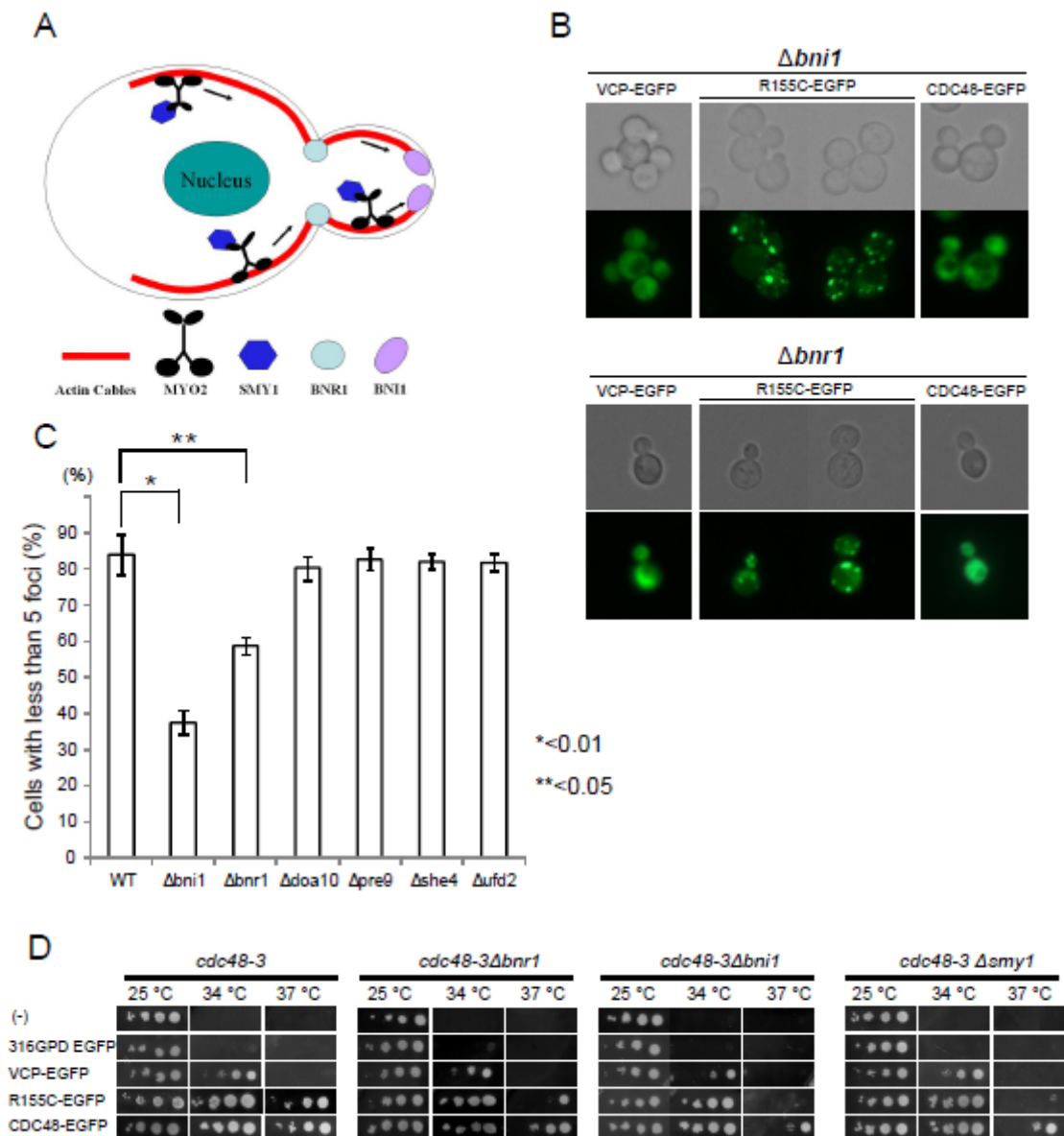


Fig.6. BNI1 と BNR1 の効果

- (A) 出芽中の細胞におけるアクチンを介した輸送機構の模式図を示す。
- (B)  $\Delta bni1$  と  $\Delta bnr1$  変異体における wtVCP-EGFP、VCP-R155C-EGFP、CDC48-EGFP の GFP 蛍光画像を示す。
- (C) 様々な変異体における foci 形成を定量化した。結果の見方は Fig.5C に同じ。
- (D) EGFP、wtVCP-EGFP、VCP[R155C]-EGFP、Cdc48-EGFP を発現した *cdc48-3*、*cdc48-3Δbnr1*、*cdc48-3Δbni1*、*cdc48-3Δsmy1* の各温度における増殖を示す。

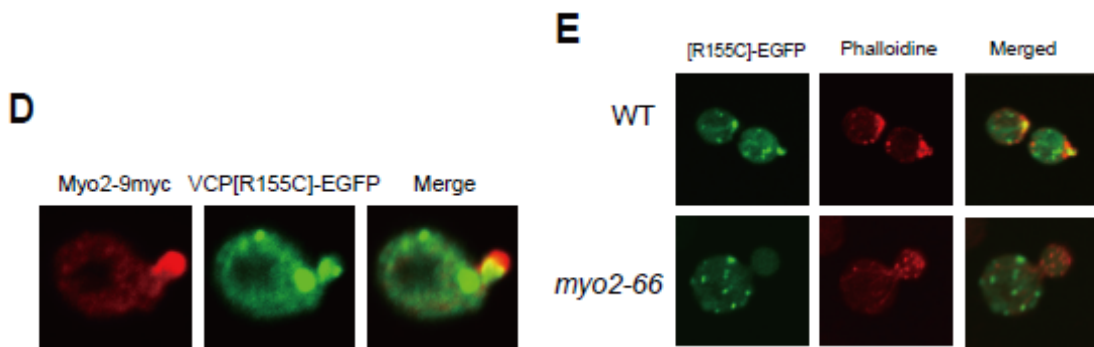
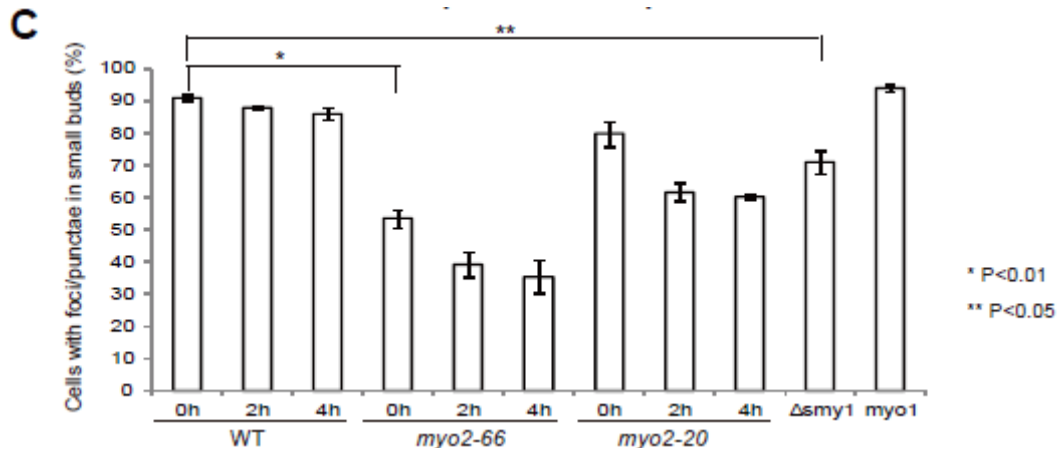
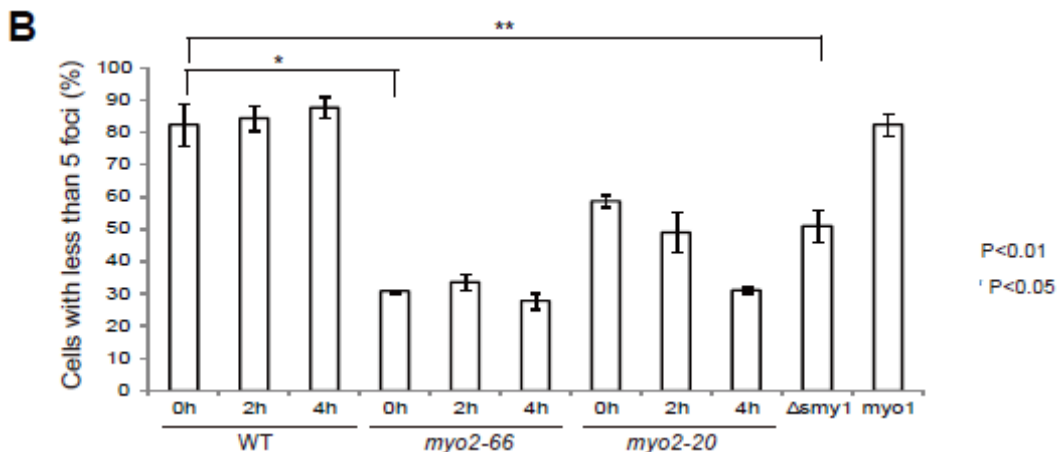
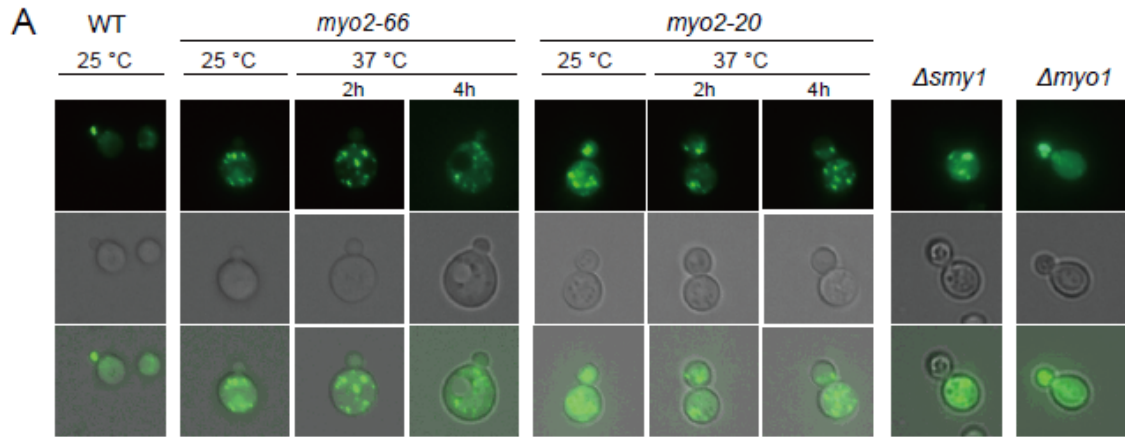
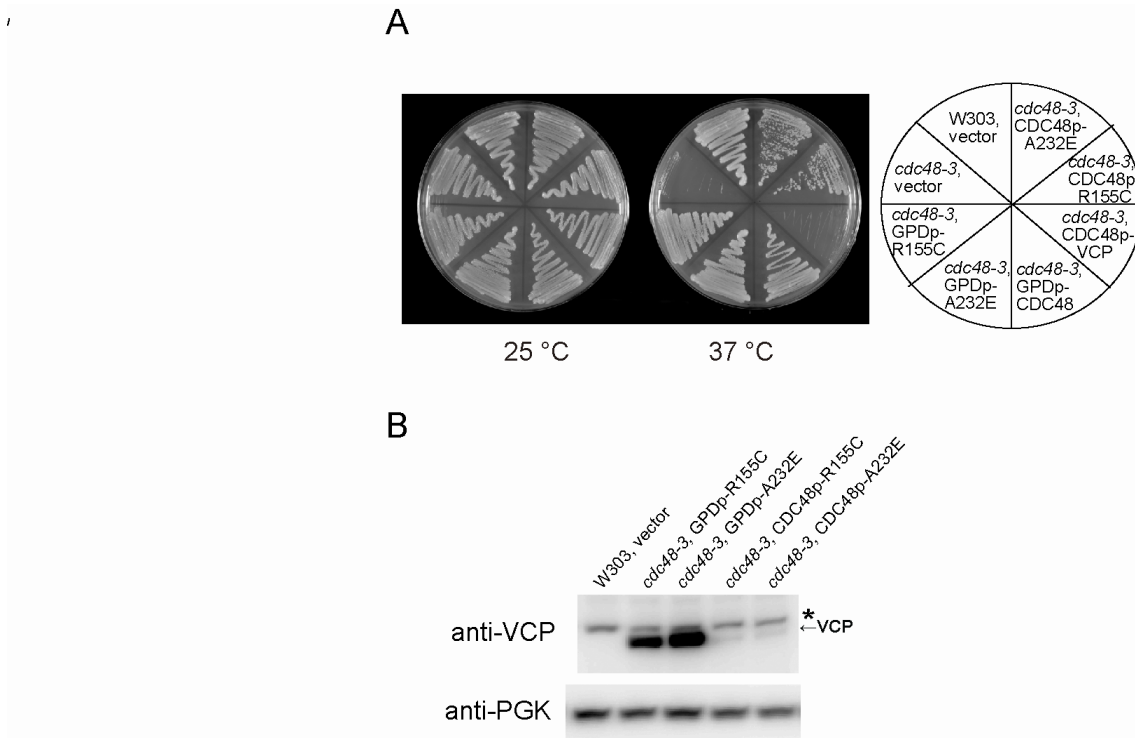




Fig.7. Myo2 依存的な VCP[R155C]の foci とその buds への輸送

- (A) VCP[R155C]-EGFP の GFP 蛍光画像。VCP[R155C]-EGFP を発現させた野生株、*myo2-66*、*myo2-20*、 $\Delta$ *smy1*、 $\Delta$ *myo1* は 25 °C で培養した。*myo2-66* と *myo2-20* 変異体においては、37 °C で 2h、4h と温度をシフトさせた。上部パネルは GFP 蛍光、中部パネルは phase contrast、下部パネルは merge を示す。
- (B) (A)の細胞全体に foci をもつ細胞の個数を定量化した。結果の見方は Fig.5C に同じ。
- (C) (A)の buds 内に foci あるいは punctae をもつ細胞の定量化。母細胞の半分以下のサイズ bud 内に foci あるいは punctae があるかどうかをスコアー化した。3 回の実験の平均値が示され、標準偏差をバーで示す。Buds に foci あるいは punctae がある細胞の減少は、Buds で foci あるいは punctae をもたない細胞の増加の逆数を示す。
- (D) 野生株における Myo2-9myc と VCP[R155C]-EGFP の共局在。細胞を 25 °C で培養し、anti-myc と anti-GFP 抗体で染色し、コンフォーカル顕微鏡で観察した。
- (E) VCP[R155C]-EGFP を発現させた野生株と *myo2-66* 変異株における GFP 蛍光と phalloidin 染色画像。コンフォーカル顕微鏡で観察した。

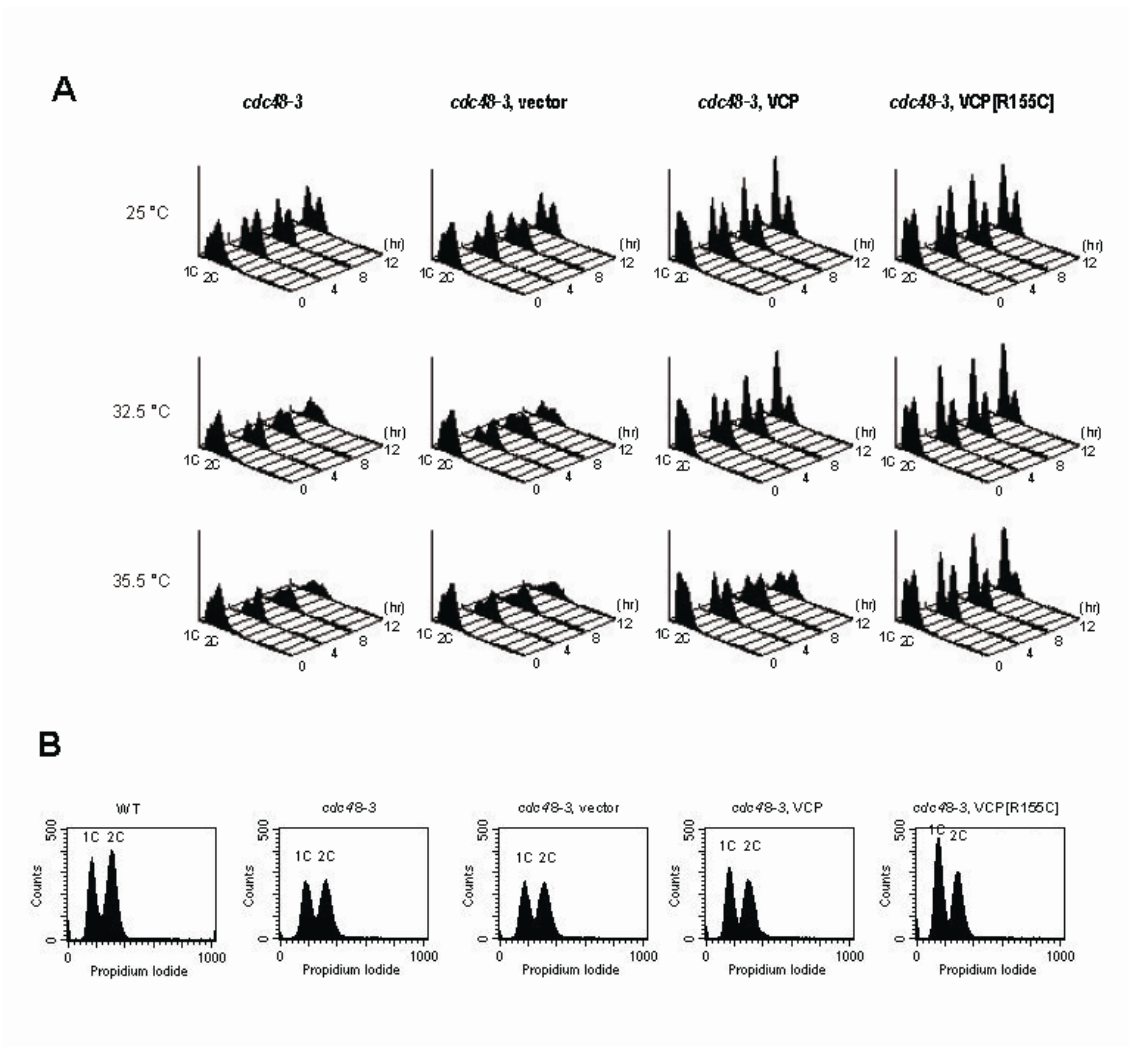
## 結果（補足図）



Sup.Fig.1 *CDC48* promoter の制御下における VCP[R155C]あるいは VCP[A232E]の過剰発現による *cdc48-3* の温度感受性のレスキュー。

(A) *cdc48-3* に *CDC48* あるいは *GPD* promoter 制御下で発現させた wtVCP あるいは疾患型 VCPs (R155C や A232E)の増殖に与える影響を示す。空ベクターを含む野生株 (W303)をコントロールとして示す。酵母を SC-uracil(-) 寒天培地にストリークし、記載の温度で3日間生育させた。

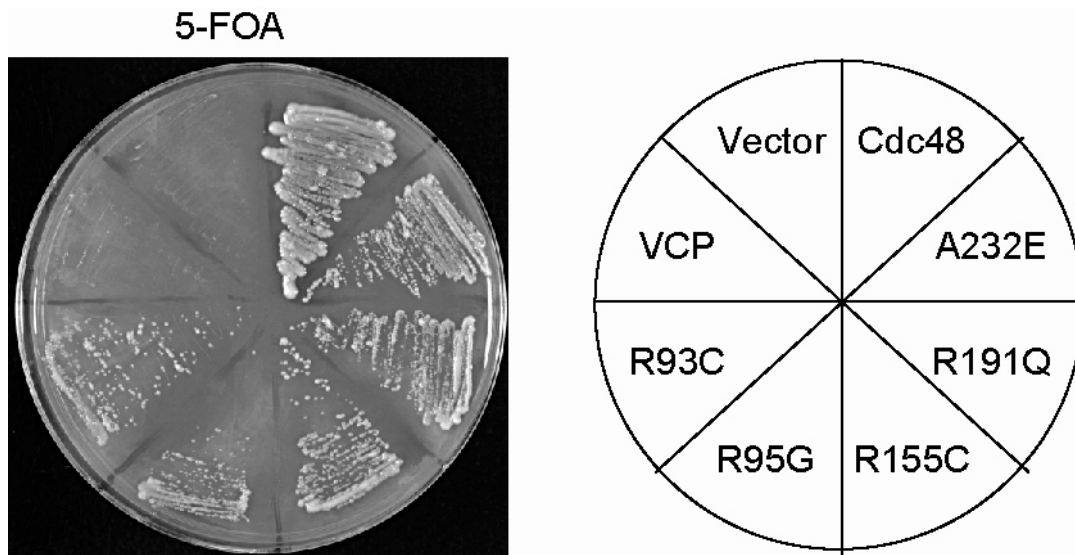
(B) VCP や internal control の1つである PGK の発現量を示す。\*は内因性の Cdc48 を示し、それは anti-VCP 抗体とも交差する。



Sup.Fig. 2 細胞周期解析

(A) Wild-type、*cdc48-3* 変異体、*cdc48-3* 変異体+空ベクター、*cdc48-3* 変異体+野生型 VCP、*cdc48-3* 変異体+VCP[R155C]は 25 °C で増殖させ、ノコダゾール処理後、洗浄し、25 °C、32.5 °C、35.5 °C に温度シフトさせた。温度シフトして 4hr、8hr、12hr 後に DNA 含量を FACS で測定した。

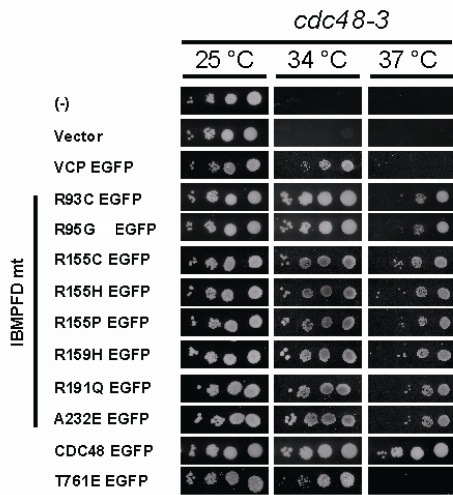
(B) 未処理 25 °C における(A)に用いた株の DNA 含量を FACS で測定した。



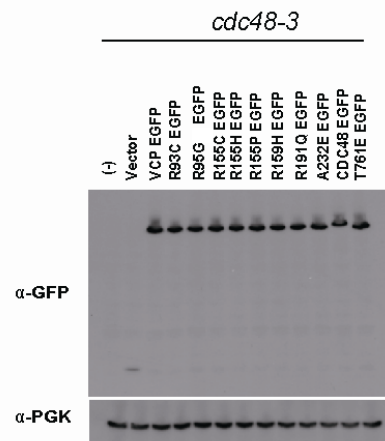
Sup.Fig. 3 *cdc48* 欠損変異株では疾患型 VCPs あるいは Cdc48 の発現により 5-FOA からレスキューするが、wtVCP ではレスキューしない

Cdc48 を発現させる URA3-plasmid をもつ *cdc48* 欠損変異体に wtVCP, Cdc48, あるいは疾患型 VCPs (R93C, R95G, R155C, R191Q, or A232E) を発現させる TRP1-plasmid を形質転換した。この実験では Cdc48 は自身の promoter 制御下で発現させており、wtVCP や疾患型 VCPs は GPD promoter 制御下で発現させた。SC-tryptophan (-) 寒天培地に 3 回ストリークした後、5-FOA 寒天培地にストリークして 5 日間、25 °C で生育させた。

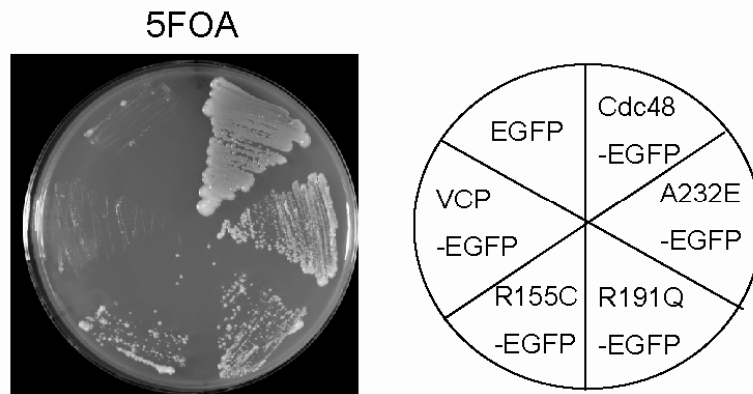
**A**



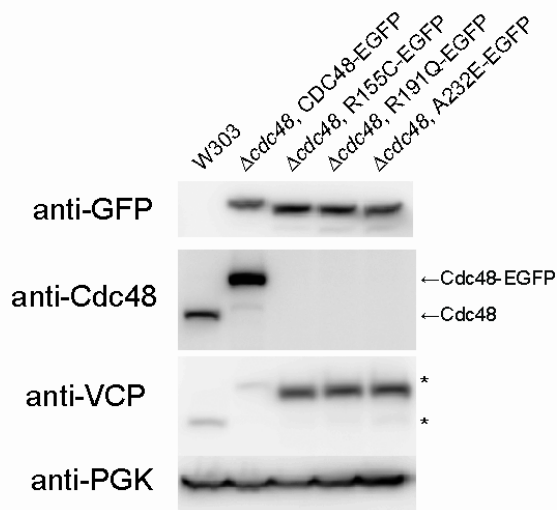
**B**



**C**

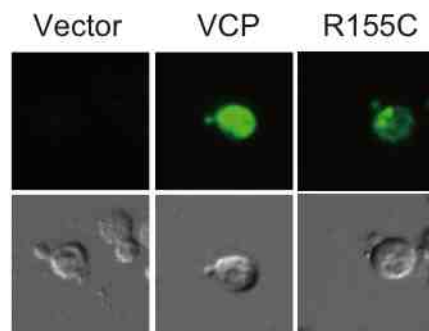


**D**



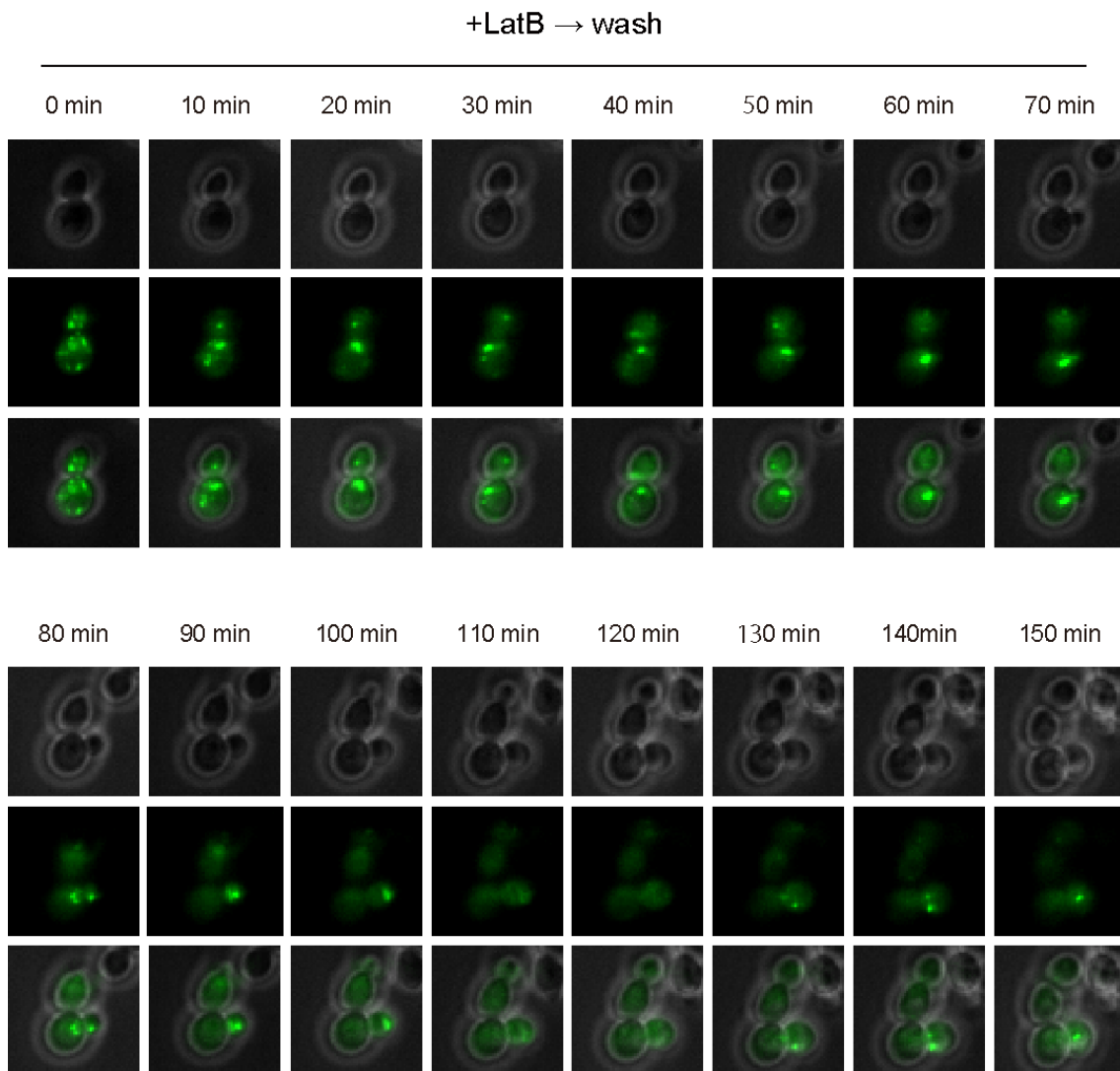
Sup.Fig.4 EGFP と融合させた疾患型 VCPs による *cdc48* 変異体の抑圧効果

- (A) *cdc48-3* の増殖における様々な VCP-EGFP の発現による効果。様々な VCP の発現ベクターをもつ、あるいはもたない *cdc48* 変異体の 10 倍毎の希釈系列を作成し、SC-uracil (-)寒天培地にスポットし、記載温度で 3 日間生育させた。
- (B) *cdc48-3* における VCP-あるいは CDC-EGFP の発現量。変異体を 25 °C で生育させて anti-GFP 抗体を用いて western blot 解析をした。PGK を loading control とした。
- (C) *cdc48::HIS3* 変異体において疾患型 VCPs あるいは Cdc48-EGFP によって 5-FOA からレスキューするが、wtVCP あるいは EGFP 単独ではレスキューしなかった。Cdc48 を発現させる URA3-based vector をもつ *cdc48* 変異体に、EGFP を融合させた wtVCP, Cdc48, 疾患型 VCPs (R155C, R191Q, or A232E), あるいは EGFP のみを発現させる TRP1-based plasmid を形質転換した。SC-tryptophan (-)に 3 回ストリークした後、5-FOA 寒天培地にストリークし、8 日間 25 °C で生育させた。
- (D) EGFP, Cdc48, VCP, and PGK proteins の発現量を野生株(W303)と、(C)で得られた 5-FOA 耐性株で調べた。これら 5-FOA 耐性株は全て his<sup>+</sup>, trp<sup>+</sup>, ura<sup>-</sup>を示した(data not shown)。\*は Cdc48 を示し、それは anti-VCP 抗体とも交差する。



Sup.Fig. 5 出芽酵母に発現させた VCPs の免疫染色

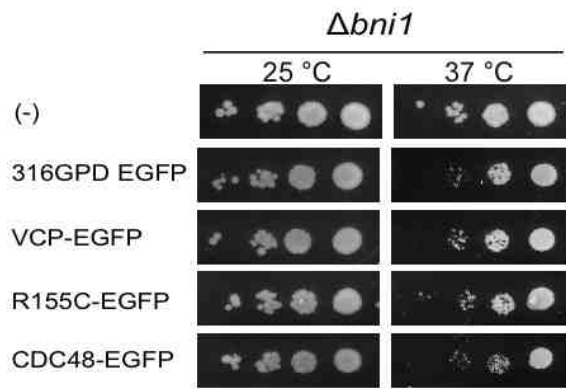
wtVCP あるいは VCP[R155C]を発現させた野生株を anti-VCP 抗体を用いて免疫染色を行った。



Sup.Fig.6 Latrunculin B を洗淨除去した後の VCP[R155C]-EGFP の foci 再形成における経時的な画像

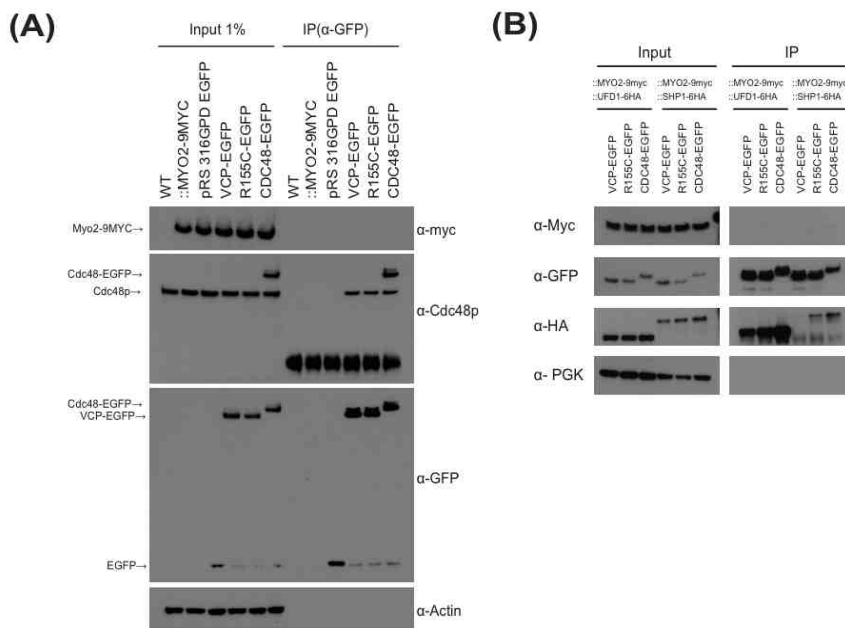
画像は Latrunculin B を洗淨除去した後、10 分毎に撮影した。上のパネルは phase contrast の画像、中央のパネルは GFP の蛍光画像、下のパネルは各々のパネルをマージさせた画像を示す。





Sup.Fig.7 EGFP、wtVCP-、VCP[R155C]-、あるいは Cdc48-EGFP を発現させた BNI1 欠失株の生育

GPD promoter 制御下で EGFP, wtVCP-, VCP[R155C]-、あるいは Cdc48-EGFP を *Δbni1* 変異体に発現させたにも関わらず 25 °C と 37 °C の両方で生育可能であった。



Sup.Fig.8 免疫共沈降解析

(A) EGFP, wtVCP-, VCP[R155C]-, VCP[A232E]-あるいはCDC48-EGFPを発現させた野生株とMYO2-9MYCをノックインした株をbuffer B (50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 10% glycerol, 2 mM PMSF, 2 mM benzamidine and Complete protease inhibitors)の中でガラスビーズにより破碎溶解させ、12,000 rpm、4 °Cで10分間遠心した。溶解液はbuffer Bの中でProtein A sepharose beads(Nakarai Tesque)に結合するrabbit polyclonal anti-GFP抗体、あるいはコントロールのrabbit IgGでovernightインキュベートした。結合したタンパク質はanti-myc, Cdc48, GFP, and actin各々に対する抗体を用いたimmunoblotで解析した。免疫共沈降法においてinputレーンは抗体添加前のlysateを1%ロードした。Immunoprecipitatedレーンは抗体添加後のlysateを10%相当量ロードした(Schuberth and Buchberger, 2005)。

(B) 記載のplasmidを発現させたMYO2-9MYCとUFD1-6HAをノックインした株とMYO2-9MYCとSHP1-6HAをノックインした株においてanti-GFP抗体を用いて免疫沈降法を行った。結合タンパク質はmyc, GFP, HAやPGKに対する抗体を用いたimmunoblotで解析した。

# 実験手法

**Yeast strains-** Sup. Table1に本研究で使用されたyeast strainsのリストを示す。 *cdc48-1* strain (Y255) はDBY2030(*cdc48-1*) にW303を2回交雑することで作られ(Moir et al., 1982)、 *cdc48-3* strain(Y202)は以前にW303をbackgroundとして作られた(Kimura et al., 2009)。W303 ADE+(Y1043)はADE2と隣接する上流と下流300bpを含む領域をPCRで増幅し、そのDNA断片を形質転換することで得られた。  $\Delta bni1$ ,  $\Delta doa10$ ,  $\Delta pre9$ ,  $\Delta she4$ ,  $\Delta ufd2$ ,  $\Delta smy1$ , and  $\Delta bni1$ を作成するため、pYM1を鋳型としたPCR-based methodによる遺伝子破壊法を用いた(Janke et al., 2004; Knop et al., 1999)。 $\Delta bnr1$ を作成するための遺伝子破壊にはFA6a-natNT2を用いた。またMyo2のC末に9xmyc tag、Ufd1あるいはShp1のC末に6xHA tagを挿入するためにpYM18、pYM16を用いた。CDC48の破壊には、まず、HIS3を含む XhoI 断片をplasmidから切り出し、BSIIのSalI site にCDC48 (nt - 434 to +2585)が挿入された後、得られたplasmidを線状化してW303 diploid cellsへ形質転換することで作られた。

Sup Table1 Saccharomyces cerevisiae strains used in this study.

Strain	Descriptions	Source/reference	Back ground
W303	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	Rothstein	W303
Y202	<i>cdc48-3 MATa ade2-1 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	Kimura et al.(2009)	W303 × DBY4060
Y255	<i>cdc48-1 MATa ade2-1 leu2-3,112 ura3-1, his3-12,16</i>	This study	W303 × DBY2030
TT001	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ bni1::kanR</i>	This study	W303
TT002	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ bnr1::natNT2</i>	This study	W303
TT003	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ doa10::kanR</i>	This study	W303
TT004	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ pre9::kanR</i>	This study	W303
TT005	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ she4::kanR</i>	This study	W303
TT006	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ ufd2::kanR</i>	This study	W303
TT007	<i>cdc48-3 MATa ade2-1 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ smy1::kanR</i>	This study	Y202
TT008	<i>cdc48-3 MATa ade2-1 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ bni1::kanR</i>	This study	Y202
TT009	<i>cdc48-3 MATa ade2-1 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ bnr1::natNT2</i>	This study	Y202
BY22281	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1</i>	NBRP	YPH499
TT010	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1 MYO2-9myc::kanR</i>	This study	YPH499
TT011	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1 MYO2-9myc::kanR UFD1-6HA::hph</i>	This study	YPH499
TT012	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1 MYO2-9myc::kanR SHP1-6HA::hph</i>	This study	YPH499
BY24093	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1 myo2-66</i>	NBRP	YPH499
TT013	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1 myo2-66 myo2-9myc::kanR</i>	This study	YPH499
YKT801	MATa <i>ura3-52 lys2-801 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 myo2-20::HIS3</i>	Kazuma Tanaka	ABY530
DY24054	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1 Δ smy1::HIS3</i>	NDRP	YPH499
BY23665	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1 LEU2</i>	NBRP	YPH501
Y189	MATa <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ 63 his3-Δ 200 leu2-Δ 1 /ura3-1 cdc48::HIS3/CDC48</i>	Noguch et al (2005)	W303
Y1019	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS316GPDp-CDC48)</i>	This study	W303
Y1021	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS316GPDp-VCP[R93C])</i>	This study	W303
Y1023	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS316GPDp-VCP[R95G])</i>	This study	W303
Y1025	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS316GPDp-VCP[R155C])</i>	This study	W303
Y1027	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS316GPDp-VCP[R191Q])</i>	This study	W303
Y1029	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS316GPDp-VCP[A232E])</i>	This study	W303
Y1080	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS316CDC48)</i>	This study	W303
Y1043	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ADE2</i>	This study	W303
Y1049	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cdc48::HIS3 (pRS314GPDp-CDC48-EGFP)</i>	This study	W303
Y1050	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cdc48::HIS3 (pRS314GPDp-R155C-EGFP)</i>	This study	W303
Y1051	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cdc48::HIS3 (pRS314GPDp-R191Q-EGFP)</i>	This study	W303
Y1052	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cdc48::HIS3 (pRS314GPDp-A232E-EGFP)</i>	This study	W303
Y1082	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS314CDC48)</i>	This study	W303
Y1083	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS314GPDp-VCP[R93C])</i>	This study	W303
Y1084	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS314GPDp-VCP[R95G])</i>	This study	W303
Y1085	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS314GPDp-VCP[R155C])</i>	This study	W303
Y1086	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS314GPDp-VCP[R191Q])</i>	This study	W303
Y1087	MATa <i>ade2-1 can1-100 his3-12,16 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1, cdc48::HIS3 (pRS314GPDp-VCP[A232E])</i>	This study	W303
23823	MATa <i>ura3-52 lys2-801 leu2Δ 0 /leu2Δ 0 /LYS2/lys2Δ 0 met15Δ 0 /MET15 ura3Δ 0 /ura3Δ 0 cdc48::kanR/CDC48</i>	Open Biosystems	BY4743

**抗体** – アフィニティー精製されたrabbit polyclonal anti-VCPとrabbit polyclonal anti-Cdc48p抗体は以前に作られた (Hirabayashi et al., 2001; Noguchi et al., 2005)。本研究で使用された次の抗体は購入したものである。Western blotにはmouse monoclonal anti-yeast PGK抗体(Molecular Probes, Eugene, OR社製)とmouse monoclonal anti-actin (Chemicon社製)とmouse monoclonal anti-GFP(Roche社製)とmouse monoclonal anti-HA (Roche社製)とmouse monoclonal anti-c-myc (9E10, Santa-Cruz社製)が用いられ、二次抗体はSheep polyclonal anti-mouse IgG-HRPとdonkey anti-rabbit IgG-HRP (GE Healthcare社製)が用いられた。免疫沈降法にはRabbit polyclonal anti-GFP (Molecular Probes社製)が用いられた。免疫染色法にはmouse monoclonal anti-GFP(Invitrogen社製)とrabbit polyclonal anti-c-myc(CM100, Gramsch Laboratories社製)が、二次抗体はAlexa Fluor 488 goat anti-mouse IgGとAlexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (MolecularProbes社製) が用いられた。

**Plasmids** - Sup. Table 2に本研究で使用されたplasmidのリストを示す。pRS316GPD-VCPあるいはpRS316GPD pathogenic VCPなどのVCPの発現plasmidはpRS316のGPD promoter下にVCPあるいはpathogenic VCPを繋いでおり、次の方法で作られた。まず、GPD promoterを含むBamHI –EcoRIの断片をpRS316のBamHI –EcoRIサイトに挿入して316-GPDを作った。次に、pBS II KS(+) VCPsからのVCPあるいはpathogenic VCPを含むBamHI–NotI断片を、316-GPD のBamHI–NotIサイトに挿入した(Mori-Konya et al., 2009)。VCP-EGFP plasmidはpEGFP-N-VCPからBglII–NotI断片として切り出し、316-GPDのBamHI–NotIサイトに挿入した。CDC48 promoterの制御下でのVCP発現plasmidのために、CDC48 promoter領域(from - 434 to – 1)を、次のprimerを使いゲノムDNAを鋳型としたPCRで増幅することで使用された。

(AATTGTCGACCAGCCCAAGAAACGGACTTCGATAAGTTGG, AATTGGATCCGATTTGTATATCTGTCTTGTAGTTGAGCCA)。PCR断片はSalIとBamHIで切られ、pRS316 GPD-VCPあるいはpRS316 GPD-pathogenic VCPのBamHI–SalIサイトへと連結された。CPY-GFPの発現plasmidはY. Saekiの好意で分譲して貰った。TRP1に基づくvectorの作成はpRS316の代わりにpRS314が使われている。当初、VCP[R95G]のタンパク質の発現が酵母において検出できなかったが、それはおそらくglycineを指定するGGCのcodon usageの影響と考えた。そこでGGCをGGTへ変更したところVCP[R95G]のタンパク質の発現が観察された。

Sup Table2 Plasmids used in this study.

Plasmid	Characteristics	Source/reference
pRS316	URA3, CEN	Sikorski and Hieter (1989)
pRS316 GAL	URA3, CEN	This study
pRS316 GAL VCP	URA3, CEN	This study
pRS316 GAL VCP[R155C]	URA3, CEN	This study
pRS316 GAL VCP[R155H]	URA3, CEN	This study
pRS316 GAL VCP[R155P]	URA3, CEN	This study
pRS316 GAL VCP[R159H]	URA3, CEN	This study
pRS316 GAL VCP[R191Q]	URA3, CEN	This study
pRS316 GAL VCP[A232E]	URA3, CEN	This study
pRS316 GAL VCP[T761E]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP[R93C]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP[R95G]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP[R155C]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP[R155H]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP[R155P]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP[R159H]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP[R191Q]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP[A232E]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD CDC48	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP[T761E]	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD VCP-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD R93C-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD R95G-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD R155C-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD R155H-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD R155P-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD R159H-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD R191Q-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD A232E-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD CDC48-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD T761E-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS316 GPD K524A-EGFP	URA3, CEN	This study
pRS314 GPD	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD VCP	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD VCP[R93C]	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD VCP[R95G]	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD VCP[R155C]	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD VCP[R191Q]	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD VCP[A232E]	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD CDC48	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD VCP-EGFP	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD R155C-EGFP	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD R191Q-EGFP	TRP1, CEN	This study
pRS314 GPD A232E-EGFP	TRP1, CEN	This study
pRS316 CDC48p VCP	URA3, CEN	This study
pRS316 CDC48p VCP[R155C]	URA3, CEN	This study
pRS316 CDC48p VCP[R191Q]	URA3, CEN	This study
pRS316 CDC48p VCP[A232E]	URA3, CEN	This study
pRS316 CDC48	URA3, CEN	This study
pRS314 CDC48	TRP1, CEN	E305, Noguchi et al. (2005)
pRS314 CDC48p VCP[R155C]	TRP1, CEN	This study
pRS314 CDC48p VCP[A232E]	TRP1, CEN	This study
CPY*-GFP	URA3, CEN	Yasushi Saeki

**Growth assay of yeasts** - 酵母細胞の濃度をOD600 = 1.0に調節し、10倍毎の希釈系列を連続的に作成した。それらをプレート上にスポットし、示された温度で3日インキュベートした。

**Immunoblotting** - Fig. 1DとSup. Fig. 4Bでは、Western blotting 用にwhole-cell extractが前述の方法(Kushnirov, 2000)で用意されており、他の実験では前述の別の方法(Kimura et al., 2001)で用意された。CPY\*-GFPの量を測定するため、酵母を30 °C でmid-log phaseまで培養して50 µg/mlのcycloheximideで処理した。酵母はさらに30 °C でインキュベートされ、指定の時間で回収された。Western blotting解析はanti-GFPとanti-PGKを用いて行われた。

**FACS analysis** – 酵母細胞は15 µg/ml nocodazoleで120 min処理され、水で2回洗浄され、培地に懸濁して温度をシフトさせた。指定の時間で細胞は70% ethanolで固定され、再度 Tris–citrate buffer (180 mM Tris–HCl (pH 7.5), 180 mM NaCl, 70 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM sodium citrate)で懸濁された。短く超音波処理した後、0.25 mg/ml RNaseで50 °C で1時間処理した。DNAは50 µg/ml propidiumiodideで染色され、各々のサンプルにつき50,000コの細胞をFACScan flow cytometer(BD Biosciences)でFL2H = 37(Threshold)の条件で測定した。

**EGFP-fusionタンパク質の顕微鏡解析** - Figs. 4、5B–E、6Bと6C、7A–C においてEGFP-fusion タンパク質を観察するために、酵母細胞は室温でOLMPUS UIS2 uPlan SApo 40X/0.90 1/0.11-0.23/FN26.5を装備したOLY-PUS BX51 顕微鏡によってイメージングされた。

**Rhodamine–phalloidin 染色** – 酵母はearly log phase ( $1-3 \times 10^6$ /ml, 10 ml)まで培養され、formaldehydeを終濃度3.7% となるように添加して25 °Cで30minインキュベートして固定された。酵母を回収し、3000 rpmで2 min遠心してPBSで2回洗浄し、200 µl のPBSに懸濁され、短く超音波処理された。その半量の酵母を5 U of rhodamine–phalloidin (Molecular Probes)で10 min処理した後、PBSで3回洗浄し、50 µlのPBSで懸濁した。酵母細胞はPlan-Apochromat 100× oil objective lensesを装備したコンフォーカル顕微鏡を使い室温でイメージングされた (LSM510; Carl Zeiss)。イメージは0.37 µmのz sectionsで得ら

れた。イメージはLSM image browser で処理され、明るさとコントラストはAdobe Photoshop CS4で調節された。

**免疫染色解析**- 酵母細胞はearly log-phaseまで培養され終濃度3.7%のformaldehydeで1 h 処理して固定され、buffer B (20 mM potassium phosphate pH 7.4, 1.2 M sorbitol)で2回洗浄された。細胞はbuffer Bに0.17% 2-mercaptoethanolを加えた溶液中にZymolyase (final 0.5 mg/ml)を入れて、30 °Cで10 minインキュベートされた。細胞は5000 rpmで1 min遠心され、次にbuffer B で3回洗浄した。Swelling buffer (20 mM MES pH 6.0, 150 mM potassium acetate, 5 mM magnesium acetate, 750 mM sorbitol)が細胞に加えられ室温で20 minインキュベートした。細胞は5min、cover slipにマウントされ、次に5 minメタノールで処理し、そしてアセトンで5min処理された。Mount blocking solution (2% skim milk, 0.1% Tween20 in PBS) がカバーガラスに加えて30min置き、anti-GFPとanti-myc 抗体を含むblocking bufferで4 °Cでovernightインキュベートされた。二次抗体(Alexa488 anti-rabbit IgG, Alexa594 anti-mouse IgG)を加え室温で2 h インキュベートされ、終濃度0.01 mg/ml BSA 含むPBSで2回洗浄された。細胞はPlan-Apochromat 100 ×oil objective lensを装備したコンフォーカル顕微鏡(LSM510; Carl Zeiss)を用いてイメージング化された。イメージは0.37 μmのz sectionsで得られた。

**Time-lapseイメージング** - 細胞の形態やGFPシグナルは、倒立蛍光顕微鏡(Axiovert 200M; Carl Zeiss)を用いて10 min毎に記録された。イメージの解析および処理はZeiss AxioVision 4.5 softwareによって行われた。

**統計分析** - 各々の実験では一貫した結果が得られ少なくとも3回行われた。本研究におけるGelやblot解析の結果は各々の実験について代表的な結果が示されている。統計的な有意差については、野生型に対応する値に対してStudent's t testを用いて解析された。

**培地**- 酵母は YPAD 培地 (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose, and 0.004% adenine)で培養され、完全合成培地(SD; 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose supplemented with amino acids)、あるいはカザミノ酸加合成培地(SC; 0.67% yeast nitrogen base and 2% glucose, 0.5% casamino acids, 必要に応じて tryptophan、uracil あるいは adenine を添加)。

SGal の作成には、SD の組成において glucose と galactose を置き換えた。URA3 plasmid を取り除くため 5-fluoroorotic acid (5FOA) を終濃度 0.5 mg/ml で培地に加えた。



## 参考文献

Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., Drubin, D.G., 1997. High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J. Cell Biol.* 137, 399–416.

Beningo, K.A., Lillie, S.H., Brown, S.S., 2000. The yeast kinesin-related protein Smy1p exerts its effects on the class V myosin Myo2p via a physical interaction. *Mol. Biol. Cell* 11, 691–702.

Fernandez-Saiz, V., Buchberger, A., 2010. Imbalances in p97 co-factor interactions in human proteinopathy. *EMBO Rep.* 11, 479–485.

Halawani, D., LeBlanc, A.C., Rouiller, I., Michnick, S.W., Servant, M.J., Latterich, M., 2009. Hereditary inclusion body myopathy-linked p97/VCP mutations in the NH2 domain and the D1 ring modulate p97/VCP ATPase activity and D2 ring conformation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4484–4494.

Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y.H., Fujikake, N., Matsukage, A., Kakizuka, A., 2002. Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 9, 264–273.

Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A.H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Uchiyama, Y., Hori, S., Kakizuka, A., 2001. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 8, 977–984.

Irazaqui, J.E., Howell, A.S., Theesfeld, C.L., Lew, D.J., 2005. Opposing roles for actin in Cdc42p polarization. *Mol. Biol. Cell* 16, 1296–1304.

Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka,

K., Sobue, G., 2004.

Physical and functional interaction between Dorsin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J. Biol. Chem.* 279, 51376–51385.

Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M., 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947–962.

Jentsch, S., Rumpf, S., 2007. Cdc48 (p97): a “molecular gearbox” in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem. Sci.* 32, 6–11.

Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., Ding, J., McCluskey, L., Martinez-Lage, M., Falcone, D., Hernandez, D.G., Arepalli, S., Chong, S., Schymick, J.C., Rothstein, J., Landi, F., Wang, Y.D., Calvo, A., Mora, G., Sabatelli, M., Monsurro, M.R., Battistini, S., Salvi, F., Spataro, R., Sola, P., Borghero, G., Galassi, G., Scholz, S.W., Taylor, J.P., Restagno, G., Chio, A., Traynor, B.J., 2010. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68, 857–864.

Johnston, G.C., Prendergast, J.A., Singer, R.A., 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell. Biol.* 113, 539–551.

Ju, J.S., Weihl, C.C., 2010. Inclusion body myopathy, Paget’s disease of the bone and fronto-temporal dementia: a disorder of autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 19, R38–R45.

Ju, J.S., Miller, S.E., Hanson, P.I., Weihl, C.C., 2008. Impaired protein aggregate handling and clearance underlie the pathogenesis of p97/VCP-associated disease. *J. Biol. Chem.* 283,

30289–30299.

Ju, J.S., Fuentealba, R.A., Miller, S.E., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., Baloh, R.H., Weihl, C.C., 2009. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J. Cell Biol.* 187, 875–888.

Kakizuka, A., 2008. Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 105–108.

Kimonis, V.E., Kovach, M.J., Waggoner, B., Leal, S., Salam, A., Rimer, L., Davis, K., Khardori, R., Gelber, D., 2000. Clinical and molecular studies in a unique family with autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy and Paget disease of bone. *Genet. Med.* 2, 232–241.

Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., Fujita, T., 2001. Initial process of polyglutamine aggregate formation in vivo. *Genes Cells* 6, 887–897.

Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., 2009. An inhibitor of a deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. *Cell* 137, 549–559.

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., Schiebel, E., 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963–972.

Koike, M., Fukushi, J., Ichinohe, Y., Higashimae, N., Fujishiro, M., Sasaki, C., Yamaguchi, M., Uchihara, T., Yagishita, S., Ohizumi, H., Hori, S., Kakizuka, A., 2010. Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. *J. Biol. Chem.* 285, 21736–21749.

Kushnirov, V.V., 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16, 857–860.

Madeo, F., Schlauer, J., Frohlich, K.U., 1997. Identification of the regions of porcine VCP preventing its function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 204, 145–151.

Madsen, L., Seeger, M., Semple, C.A., Hartmann-Petersen, R., 2009. New ATPase regulators – p97 goes to the PUB. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2380–2388.

Manno, A., Noguchi, M., Fukushi, J., Motohashi, Y., Kakizuka, A., 2010. Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Genes Cells* 15, 911–922.

Matsui, Y., 2003. Polarized distribution of intracellular components by class V myosins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. Rev. Cytol.* 229, 1–42.

Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A., Okamoto, K., 2003. Vacuole-creating protein in neurodegenerative diseases in humans. *Neurosci. Lett.* 343, 77–80.

Moir, D., Stewart, S.E., Osmond, B.C., Botstein, D., 1982. Cold-sensitive cell-division cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* 100, 547–563.

Mori-Konya, C., Kato, N., Maeda, R., Yasuda, K., Higashimae, N., Noguchi, M., Koike, M., Kimura, Y., Ohizumi, H., Hori, S., Kakizuka, A., 2009. P97/valosin-containing protein (VCP) is highly modulated by phosphorylation and acetylation. *Genes Cells* 14, 483–497.

Noguchi, M., Takata, T., Kimura, Y., Manno, A., Murakami, K., Koike, M., Ohizumi, H., Hori, S., Kakizuka, A., 2005. ATPase activity of p97/valosin-containing protein is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved cysteine 522 residue in Walker A motif. *J. Biol. Chem.* 280, 41332–41341.

Pruyne, D., Gao, L., Bi, E., Bretscher, A., 2004a. Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* 15, 4971–4989.

Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., Bretscher, A., 2004b. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 559–591.

Ritson, G.P., Custer, S.K., Freibaum, B.D., Guinto, J.B., Geffel, D., Moore, J., Tang, W., Winton, M.J., Neumann, M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Forman, M.S., Taylor, J.P., 2010. TDP-43 mediates degeneration in a novel *Drosophila* model of disease caused by mutations in VCP/p97. *J. Neurosci.* 30, 7729–7739.

Ritz, D., Vuk, M., Kirchner, P., Bug, M., Schutz, S., Hayer, A., Bremer, S., Lusk, C., Baloh, R.H., Lee, H., Glatter, T., Gstaiger, M., Aebersold, R., Wehl, C.C., Meyer, H., 2011. Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations. *Nat. Cell Biol.* 13, 1116–1123.

Schott, D., Ho, J., Pruyne, D., Bretscher, A., 1999. The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J. Cell Biol.* 147, 791–808.

Schuberth, C. and Buchberger, A. 2005. Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7: 999-1006.

Stolz, A., Hilt, W., Buchberger, A., Wolf, D.H., 2011. Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends Biochem. Sci.* 36, 515–523. Tang, W.K., Li, D., Li, C.C., Esser, L., Dai, R., Guo, L., Xia, D., 2010. A novel ATPdependent conformation in p97 N-D1 fragment revealed by crystal structures of disease-related mutants. *EMBO J.* 29, 2217–2229.

Trybus, K.M., 2008. Myosin V from head to tail. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1378–1389.

Wang, Y., Meriin, A.B., Zaarur, N., Romanova, N.V., Chernoff, Y.O., Costello, C.E., Sherman, M.Y., 2009. Abnormal proteins can form aggresome in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery. *FASEB J.* 23, 451–463.

Watts, G.D., Wymer, J., Kovach, M.J., Mehta, S.G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M.P., Kimonis, V.E., 2004. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet.* 36, 377–381.

Weihl, C.C., Dalal, S., Pestronk, A., Hanson, P.I., 2006. Inclusion body myopathy associated mutations in p97/VCP impair endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum. Mol. Genet.* 15, 189–199.

Weihl, C.C., Temiz, P., Miller, S.E., Watts, G., Smith, C., Forman, M., Hanson, P.I., Kimonis, V., Pestronk, A., 2008. TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 1186–1189.

Yamanaka, K., Sasagawa, Y., Ogura, T., 2011. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 130–137.

Ye, Y., Meyer, H.H., Rapoport, T.A., 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652–656.

Yeung, H.O., Kloppsteck, P., Niwa, H., Isaacson, R.L., Matthews, S., Zhang, X., Freemont, P.S., 2008. Insights into adaptor binding to the AAA protein p97. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 62–67.

# 謝辞

本研究にあたり修士課程および博士課程の間、加えて認定退学後も御指導と御鞭撻を賜りました 垣塚 彰教授に、深く感謝の意を表します。また、実験にあたり多くの教示と助言をくださった堀 清次先生と大泉 宏先生に心から感謝致します。さらに、酵母の遺伝学的な解析や顕微鏡解析の実施、論文執筆など幅広く御助力を頂きました、田中 啓二教授、木村 洋子博士、川脇 順子氏、柿山 幸恵氏に謹んで感謝致します。また、タンパク質分解の解析に使用した CPY\*-GFP を提供して頂いた佐伯 泰博士、蛍光顕微鏡観察に使用した *myo2* 変異体を提供して頂いた田中 一馬教授、標的遺伝子の *cdc48* 温度感受性株を提供して頂いた David Botstein professor、CDC48-plasmids を提供して下さった Kai-Uwe Frohlich professor、論文原稿について critical reading 頂いた James A. Hejna professor に感謝致します。

本研究は出芽酵母をモデル生物として用いており、大沼 洋平氏には酵母の基本的な取り扱いに始まり、多くのことをご指導して頂き誠にありがとうございました。博士課程の間、互いに刺激し合い、励まし合ってきた同級生の鎧坂 将史氏、村上 克洋氏、萬野 篤博士、岡本 暁彦博士、大滝 佳代氏に感謝致します。並びに生命科学研究科の先生方にお礼申し上げます。修士から博士課程の間、大変お世話になった垣塚研の皆様、小林 妙子先生、安田 邦彦博士、前田 良太氏、野口 昌克博士、福士 順平氏、東前 直樹氏、小池 雅昭博士、野村 礼博士、中谷 恵美氏、大久保 裕介氏、秘書の福浜 悦子氏や技官の黒岩氏に心より感謝の意を表します。

また、絶えず研究生活を支えてきてくれた祖父 高田 勇、祖母 幸子、祖父 佐藤 政憲、祖母 美代子、父 高田 正信、母 正美、長男 匠、三男 直秀、そして、常に体調を気遣い支えてくれた妻 奈香、子 桐吾に心より感謝致します。