



Lunapark ubiquitinates atlastin-2 for the tubular network formation of the endoplasmic reticulum

Anggrandariyanny, Putri Chynthia

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8480号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482228>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Lunapark ubiquitinates atlastin-2 for the tubular network
formation of the endoplasmic reticulum

Lunapark が atlastin-2 をユビキチン化することで、
小胞体チューブネットワークを形成する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

膜動態学

(指導教員：匂坂 敏朗 教授)

PUTRI CHYNTHIA ANGGRANDARIYANNY

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) has two membrane structures, ER sheets and ER tubules. One of the tubular ER membrane-shaping proteins is reticulon (RTN) family. RTN family supports the formation of high membrane curvature of the ER tubules. The ER tubules undergo homotypic fusion to generate the three-way junctions, thereby forming a reticular network. The homotypic fusion is mediated by a membrane-anchor GTPase, atlastin (ATL). ATLS form a *trans*-dimer in the opposing ER tubules and promote membrane fusion of the ER tubules in a GTP hydrolysis-dependent manner.

The three-way junction mediated by ATL family is not stable; therefore, other proteins are needed to stabilize the three-way junction. Lunapark (Lnp), a tubular ER membrane protein, localizes to and stabilizes the three-way junction. The N-terminal cytoplasmic domain in Lnp has a ubiquitin ligase activity. However, the substrates of Lnp have not been identified yet. In this study, we examined whether Lnp ubiquitinates tubular ER membrane proteins and whether the ubiquitin ligase activity of Lnp is involved in the tubular ER network formation.

Results

1. Lnp ubiquitinates ATL1 and ATL2.

We examined whether Lnp ubiquitinates tubular ER membrane proteins by *in cell* ubiquitination assay. Myc-ATL or RTN family, along with HA-ubiquitin and Lnp-FLAG, were transfected into human embryonic kidney HEK293 cells. The transfected cells were incubated with proteasomal inhibitor MG132 for 4 hours before being harvested. The cells were then lysed, followed by immunoprecipitation by the anti-myc antibody and immunoblotting. The ubiquitination of myc-ATL1 and ATL2 was increased by the expression of Lnp-FLAG. By contrast, ubiquitination of myc-ATL3 and RTN family was not increased by the expression of Lnp-FLAG (except in myc-RTN2B, which was slightly increased). ATL1 is mainly expressed in the brain, while ATL2 is expressed ubiquitously. We decided to continue our research focusing on ATL2.

To further characterize that ATL2 is the substrate for ubiquitination by Lnp, we performed *in vitro* ubiquitination assay with the purified recombinant proteins. Hexa histidine-tagged cytoplasmic fragment of ATL family (His-cytATL) containing the GTPase domain and the middle domain has been widely used for examining the function of the ATL family proteins *in vitro*. His-cytATL2 was incubated with His-tagged ubiquitin-activating enzyme (E1), His-UBE2D1 as a ubiquitin-conjugating

enzyme (E2), Lnp-FLAG, HA-Ub and magnesium/ATP. The samples were pulled down by Ni-agarose resin, followed by immunoblotting. Lnp-FLAG increased the ubiquitination of His-cytATL2. These results indicate that ATL2 is the substrate ubiquitinated by Lnp.

2. Lnp is involved in the degradation of ATL2.

We reasoned that if Lnp ubiquitinates ATL2 for proteasomal degradation, Lnp knockdown would reduce the ubiquitination and degradation of ATL2. To examine this reasoning, we examined the protein amount of ATL2 in the Lnp knocked-down cells. The control siRNA or two independent siRNAs targeting Lnp (siLnp #1 and #2) was transfected into African green monkey kidney COS-7 cells. The protein amount of ATL2 in the siLnp #1 and #2-transfected cells was increased compared to the control siRNA-transfected cells.

We next examined the time-dependent degradation of ATL2. COS-7 cells were transfected with siLnp #1 or the control siRNA and incubated with MG132 or its solvent DMSO, along with cycloheximide to inhibit protein biosynthesis. The protein amount of ATL2 was decreased in a time-dependent manner in the absence of MG132, whereas it was not altered in the presence of MG132 in the control siRNA-transfected cells. By contrast, the protein amount of ATL2 was not altered irrespective of MG132 treatment in the siLnp-transfected cells. These results indicate that Lnp knockdown decreases the proteasomal degradation of ATL2, further supporting that Lnp ubiquitinates ATL2.

3. The localization of lunapark at the three-way junctions is important for ubiquitination of atlastin-2.

ATL2 mediates the nascent three-way junction formation, and Lnp stabilizes it. Both ATL2 and Lnp localize at the three-way junction, raising the possibility that localization of Lnp at the three-way junction would be required for ubiquitination of ATL2. A previous study has shown that the amphipathic helix of Lnp is important for its localization at the three-way junction. The amphipathic helix mutants Lnp I25D and L28D failed to localize at the three-way junction and were distributed evenly throughout the tubular ER network. Based on this, Lnp WT, I25D or L28D-FLAG was co-transfected with myc-ATL2 into human osteosarcoma U2OS cells, followed by immunostaining. Lnp WT-FLAG colocalized with myc-ATL2 at the three-way junctions more efficiently than Lnp I25D or L28D-FLAG.

We performed *in cell* ubiquitination assay using the Lnp mutants I25D and L28D. Lnp I25D and L28D ubiquitinated ATL2 less efficiently than Lnp WT did. To exclude the possibility that the reduced ubiquitination of ATL2 by Lnp I25D and L28D in the cells was attributed to the reduction of their own ubiquitin ligase activities, we performed *in vitro* ubiquitination assay. Lnp I25D and L28D did not decrease the ubiquitin ligase activity compared to Lnp WT. Collectively, these results indicate that the localization of Lnp at the three-way junctions is important for the ubiquitination of ATL2.

4. Lysine 56, 57, 282 and 302 in ATL2 are the potential ubiquitination sites by Lnp.

We sought to identify the amino acid(s) in ATL2 that are ubiquitinated by Lnp. We constructed the truncated mutant of ATL2 encoding N-terminal 342 amino acids (N342) and performed *in cell* ubiquitination assay. The ubiquitination of myc-ATL2 N342 was increased by the expression of Lnp-FLAG. This result suggests that the amino acid(s) in ATL2 ubiquitinated by Lnp is located within the N-terminal 342 amino acids. Generally, ubiquitin is attached to a lysine residue of substrate proteins. We have shown that ATL1 and ATL2 are ubiquitinated by Lnp, whereas ATL3 is not, suggesting that lysine residue(s) conserved in ATL1 and ATL2 but not in ATL3 would be the candidate(s) ubiquitinated by Lnp. According to the criteria, we generated an ATL2 mutant in which lysine 56, 57, 282 and 302 were substituted with arginine (ATL2 KR).

We performed *in cell* ubiquitination assay using myc-ATL2 WT and KR. Myc-ATL2 KR was less ubiquitinated than myc-ATL2 WT by the expression of Lnp-FLAG. We also performed *in vitro* ubiquitination assay using His-cytATL2 WT and KR. Consistent with *in cell* ubiquitination assay, His-cytATL2 KR was less ubiquitinated compared to His-cytATL2 WT in the presence of Lnp-FLAG. These results indicate that lysine 56, 57, 282 and 302 in ATL2 are the potential ubiquitination sites by Lnp.

5. The expression of the ATL2 KR mutant fails to rescue the decrease of the number of the three-way junctions in the ATL2 knocked-down cells.

Previous studies have shown that the depletion of ATL2 decreases the number of the three-way junctions, resulting in unbranched ER tubules. These results indicate that ATL2 is important for the formation of the proper tubular ER network. We reasoned that if ubiquitination of ATL2 by Lnp is important for the tubular ER network formation, the exogenous expression of the ATL2 KR mutant would fail to rescue the

decrease of the number of the three-way junctions in the ATL2 knocked-down cells. To examine the above reasoning, we transfected an siRNA targeting ATL2 (siATL2) into U2OS cells. Two days after the first transfection, myc-tagged siRNA-resistant ATL2 WT or KR was co-transfected with GFP-Sec61 β , an ER marker. The number of three-way junctions was counted from the peripheral reticular fluorescence signals of GFP-Sec61 β . The number of the three-way junctions was decreased in the ATL2 knocked-down cells relative to the control siRNA-transfected cells. The expression of siRNA-resistant myc-ATL2 WT rescued the decrease in the number of the three-way junctions. By contrast, the expression of siRNA-resistant myc-ATL2 KR failed to rescue the decrease. This result indicates that ubiquitination of ATL2 by Lnp is important for tubular ER network formation.

Conclusions

In this study, we demonstrated that ATL2 is a novel ubiquitination substrate of Lnp. The localization of Lnp at the three-way junctions was important for the ubiquitination of ATL2. Lysine 56, 57, 282 and 302 in ATL2 are the potential ubiquitination sites by Lnp. Ubiquitination of ATL2 was important to rescue the decrease of the number of the three-way junctions in the ATL2 knocked-down cells. These results suggest that Lnp ubiquitinates ATL2 at the three-way junctions for the proper tubular ER network formation.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3223 号	氏 名	PUTRI CHYNTHIA ANGGRANDARIYANNY
論文題目 Title of Dissertation	Lunapark ubiquitinates atlastin-2 for the tubular network formation of the endoplasmic reticulum Lunapark が atlastin-2 をユビキチン化することで、小胞体チューブネットワークを形成する		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner	鈴木 聡 勝 = 郁夫 内匠 透	

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

(目的)

小胞体は酵母から哺乳動物まで全ての真核生物に保存された最も大きい細胞内小器官である。小胞体は核膜、シート構造、チューブ構造が連続した特徴的な形状を持つ。チューブ構造の高い曲率は膜変形タンパク質 reticulon (Rtn)ファミリーが脂質二重膜に外挿することで保持されている。Atlastin (ATL)ファミリーにより連結されたチューブ構造は細胞内で網目状のチューブネットワークを形成している。Three-way junction と呼ばれるこの連結部分に膜変形タンパク質 lunapark (Lnp)が局在して安定化することで、小胞体のチューブネットワーク形成を制御している。近年、我々は Lnp がユビキチンリガーゼ活性を持つことを報告した。しかし、このユビキチンリガーゼ活性が小胞体のチューブネットワーク形成に関わるのかは不明である。本研究では、Lnp がユビキチン化する小胞体の膜変形タンパク質を同定し、このユビキチン化が小胞体のチューブネットワーク形成に関与するかを解析した。

(方法)

・ *in cell* ユビキチン化実験

HEK293 細胞に myc タグをつけた ATL ファミリーおよび Rtn ファミリーと FLAG タグをつけた Lnp、HA タグをつけたユビキチンをトランスフェクションした。NP-40 抽出液に抗 myc 抗体を加えて免疫沈降した。免疫沈降画分を抗 myc 抗体、抗 HA 抗体でイムノブロットし、ユビキチン化の程度を検討した。

・ *in vitro* ユビキチン化実験

リコンビナントタンパク質である His タグをつけた ATL2 の細胞質領域(HA-cytATL2)、E1 および E2 (UBE2D1)、FLAG タグをつけた Lnp、HA タグをつけたユビキチン、および ATP を混合して 37°C で反応させた。反応物をニッケルアガロースでプルダウンした画分を抗 His 抗体、抗 HA 抗体でイムノブロットし、ユビキチン化の程度を検討した。

・ Lnp ノックダウン細胞の解析

COS-7 細胞にコントロール siRNA または Lnp siRNA をトランスフェクションした。これらの細胞をシクロヘキシミド処理によりタンパク質の合成を阻害した条件で、プロテアソーム阻害剤 MG132 または DMSO で 0~8 時間処理した。細胞のトータルライセートを抗 ATL2 抗体、抗 actin 抗体でイムノブロットし、ATL2 の分解の程度を検討した。

・ ATL2 ノックダウン細胞の解析

U2OS 細胞に ATL2 siRNA をトランスフェクションして ATL2 ノックダウン細胞を調製した。ATL2 ノックダウン細胞に GFP-Sec61 β および myc-ATL2 の野生型または 56, 57, 282, 302 のリジンをアルギニンに置換した変異体(KR 体)をトランスフェクションし、GFP 蛍光を観察することで、three-way junction 数に与える効果を解析した。

(結果)

1. Lnp による ATL2 のユビキチン化

ATLファミリーとRtnファミリーを用いて *in cell* ユビキチン化実験を行なったところ、ATL1 と ATL2 は Lnp の発現によってユビキチン化が増加した。ATL1 は脳に特異的に発現することから ATL2 についてさらに解析を進めた。*in vitro* ユビキチン化実験をおこなったところ、ATL2 のユビキチン化は Lnp の添加により増加した。

2. Lnp ノックダウンによる ATL2 の分解の抑制

Lnp ノックダウン細胞では ATL2 のタンパク質量が増加した。また、Lnp ノックダウン細胞ではプロテアソーム依存的な ATL2 の分解が抑制された。

3. ATL2 のユビキチン化部位の同定

ATL2 の N 末端側の細胞質領域の *in cell* ユビキチン化実験を行なったところ、Lnp の発現によりユビキチン化が増加した。この領域内で ATL1 と ATL2 に保存されているリジン(56, 57, 282, 302 番目)をアルギニンに置換した変異体 ATL2 KR 体を作製したところ、*in cell*、*in vitro* ユビキチン化実験で Lnp によるユビキチン化が ATL2 野生型に比べて減少した。

4. ATL2 KR 体による ATL2 ノックダウン細胞へのレスキュー

ATL2 ノックダウン細胞では three-way junction の数が減少する。ATL2 ノックダウン細胞に ATL2 野生型を発現すると three-way junction の数が回復した。一方、ATL2 KR 体を発現しても three-way junction の数が回復しなかった。

(結論)

Lnp は ATL2 をユビキチン化してプロテアソームによる分解を亢進することで three-way junction の形成を制御し、小胞体のチューブネットワーク形成を制御していることが明らかとなった。

本研究は、Lnp がユビキチン化する小胞体膜変形タンパク質の同定とそれによる小胞体のチューブネットワーク形成への影響を解析したものである。その結果、Lnp が小胞体チューブ連結タンパク質 ATL2 をユビキチン化し分解することにより、three-way junction の形成ひいては小胞体のチューブネットワーク形成を制御していることを証明した点において、価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。