

第四章 概論

Recent progress on researches in other proteolytic systems

反町 洋之

Hiroyuki Sorimachi

財団法人 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 カルパインプロジェクト

Department of Enzymatic Regulation for Cell Functions (Calpain Project)

The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science (Rinshoken)

Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research

サマリー

生物現象との関連の興味深い研究としても、創薬の対象としてもユビキチン・プロテアソームとオートファジー系は、現在まさにプロテオリシスのスタープレイヤーである。しかし、例えばヒトでは、これらと直接関係しない 500 種類以上のプロテアーゼとそれが担うプロテオリシス系が存在し、日々粛々と仕事を行っていること、しかし、全てのプロテオリシス系は膜を越えてクロストークしうることを忘れてはならないだろう。

キーワード： カルパイン、カスパーゼ、カテプシン、プロテアソーム以外、ユビキチン以外、細胞膜

略語： なし

①はじめに

言うまでもないが本章の題で、「今話題の」は「重要なプロテオリシス」に対する制限的修飾であり、「重要な」は「プロテオリシス」と同格（非制限的修飾）であって、後者は省略しても意味は（ほとんど）変らない。即ち、今話題になっているもの以外にも重要なプロテオリシスは無数に存在する。プロテオリシスは、毎日の食物消化から細胞機能制御まで、あらゆる場面・スケールで重要だが、本特集はマクロなレベルでの消化プロテアーゼやその現象などについては含めていない。プロテアーゼの生化学的発展は、消化プロテアーゼの研究に多くを負っていたにもかかわらず、今話題の多くは、本特集で扱われるいわゆる“regulatory”なプロテオリシスに偏ってはいる。本特集の他の概論でもふれられているように、また本特集に限らず、いわゆる“regulatory”なプロテオリシスに関して次々と目眩くような新発見が続いていることは事実であり、多くの人の興味を強く惹き付けているのも確かではある。そもそも、生物が生命を全うするときに重要なプロテオリシスと重要なプロテオリシスがあるわけではなく、どの一つのシステムを失っても生物は多くの問題を抱えることになり、また単純そうに見えるどのシステムをとっても、実は人間が理解しているのはほんの一部に過ぎない。

ユビキチン、プロテアソーム、オートファジー、とその他、という分類は、昨今の話題性を考えれば至極もつともではあるが、これは筋ジストロフィーがかつてデュシェンヌ型、ベッカー型、先天型、そして肢帯型に分類されたのと類似して、その項目は同格ではあり得ない。よって、本概論で「その他」全てを論じ尽くすことは不可能である。さらに、専門外の分野について森羅万象を既述することも不可能である。延々と言いつつ綴ったが、この概論を含め第四章に記述できなかつたトピックが、『『重要なプロテオリシス』でない』わけでは決してなく、さらに『『今話題』でない』というわけですらなく、紙面のスペースの都合以外の何ものでもない、という点を確認したかっただけである。とはいえ、第四章では、第三章まで以外のプロテオリシス系について、世界を先導している第一線の研究者の方々にその最先端のトピックスを、一節が一章に相当するような濃い内容で紹介していただいている。それらをここで紹介するよりも、本概論では、むしろそこに入りきらなかつたいくつかのトピックスについて紹介したい。

②本文

1. その前に日本におけるプロテオリシス研究小史

「プロテオリシス」という言葉を使うとき、実は言外に「単なる『消化』ではなくもっと高次なもの」という想いが含まれているようだ。高次かどうかは別として、いわゆる regulatory なプロテオリシスと他の蛋白質分解を区別するため、proteolysis の良い訳語を作ろうという議論が蛋白分解研究者の間で盛り上がった時期がある。英語の proteolysis という言葉の響きは良いが、これを「蛋白分解」と訳すとどうも負のイメージがあつて生命科学研究領域に幅広くインパクトを与え得ない、と危惧されたからである。蛋白に続いて切断、変身、分活、改編、再編、編纂、更新、再新、輪廻、裁断、創世、創出、切新など、様々な案が出されたが、決定打となるものはなく、現在ではカタカナ表記に落ち着いたようだ。もちろん、今では当初懸念された「負のイメージ」も払拭され、世界中に蛋白分解の重要性は悉く滲透した。以上の議論はたかだか 10 年前の事だが、当時プロテオリシス研究は黎明期にあつた。日本の研究班組織などにより大きく発展し、この間にユビキチン・プロテアソーム・オートファジーに関する文字通り画期的な発見を含め、数々の偉大な研究成果が日本の研究者から発表された。プロテオリシスとは関係ない（と思つていた）生物現象の研究者が遍く、その研究過程でプロテオリシスと遭遇し、研究に参入してきた。おそらくこの 10 年間で、最も成長した分野の一つといえる。当時、特定領域研究班（鈴木紘一代表）が「ぷろておりしす」という名の広報誌を出版していた（実は上記議論は於当誌）（図 1）。今日全盛の〇×ニューズレターなどの走りとも言えるもので、本特集の編者の田中らがエディターとして運営していた。この広報誌は、もちろん無料配布で原稿料もなしであつたが、学術誌の総説にも勝るクオリティの高い解説や国際学会での最新トピックスなどが掲載され、日本のプロテオリシス研究を大いに盛り上げた。そこでは、分野を問わずプロテオリシス研究に関係するものは全て仲間という気風があり、世界でも例を見ない日本独自

の素晴らしいプロテオリシス研究の土壌ができていった。

2. いくつかのトピックス

哺乳類の細胞質内プロテアーゼと言え、プロテアソームを除くと、少なくとも量的には、カスパーゼとカルパインがメジャーである。カスパーゼは、周知の通りプログラム細胞死との関係について爆発的な研究の発展があった。しかし、その当初から筆者を含めて一部の者は、生物が細胞を死に至らしめるためだけに、分子をこれほどまでに進化させるだろうかと考えていた。「生きる」ことこそ極めて困難かつ多大なエネルギー消費を伴う奇跡的事象であり、「死」は生きるためのシステムのどれ一つを取り外しても、簡単に実現する。この点に見事な解答を出したのが倉永・三浦らによる研究である（詳細は「カスパーゼ研究の新展開」参照）^{1,2}。やはりカスパーゼはただ自殺のためのプロテアーゼではなかった。一方カルパインは作用機序が複雑なため、世界中の研究者が苦勞している。しかし、*Capn2* ノックアウトマウスは8細胞期以降発生不能なこと³、長期記憶増強への関与^{4,5}、2型糖尿病^{6,7}・筋ジストロフィー・虚血性疾患・腫瘍など様々な疾患への関与、など極めて多彩な生命現象と関係する。そんな中、酵母で大きな進展があった。酵母はカルパイン遺伝子を一つ (*CPL1/RIM13*) だけ持つ。コードされる Cpl1 は他のいくつかの遺伝子産物と共に、酵母の苦手な中性～アルカリ性の環境に適応生存するためのシグナル経路のモジュレーターである。林らはこの経路を遺伝学的に解析し、膜蛋白質が pH 変化を感知しカルパイン Cpl1 をエンドソーム膜上で活性化して転写因子の限定分解による活性化の結果、アルカリ適応に必要な遺伝子が発現する、というシグナルフローのほぼ全貌を明らかとした⁸。エンドソームなどの膜輸送に関与する ESCRT 複合体のサブユニットが関与しており、Cpl1 を含めホモログは他の酵母やカビ、そしてヒトにも存在する⁹⁻¹¹。

ここから得られる重要なメッセージが 4 つある。まず、カルパインが細胞質のモジュレーター（調節・変換）プロテアーゼであること、即ち、蛋白質の消去を目的としない限定分解により基質に新たな機能を与える作用が *in vivo* で実証されたことである。さらに、哺乳類の研究では *in vivo* の基質はまだ数えるほどしか無いが、この系では、Cpl1 が転写因子 Rim101 の C 末端を切断して活性化することが *in vivo* で示された。また、広く真核生物に（その目的はともかく）この経路の主要構成蛋白質が保存されており、酵母の系がヒトの研究の大きな力となる。最後に、カルパインは膜構造・膜輸送系蛋白質と密接に機能連関することが今後の新しい方向性として提示された。

最後の点は、線虫の神経細胞壊死の遺伝学的研究からも興味深い結果が得られている。 Na^+ チャネルの機能獲得型変異により線虫の触覚神経細胞は壊死を起こす。その経路の遺伝学的解析から、2種のカルパイン (TRA-3 と CLP-1) と 2種のアスパラギン酸プロテアーゼ (ASP-3, -4) の関与が明らかとなった^{12,13}。カスパーゼは一切関与していない。また、ASP-3, -4 はカルパインの下流にあたることも判明した。ASP-3, -4 は、ヒトではエンドソームに局在するカテプシン E に最もよく似ていることから、哺乳類脳虚血時の細胞死において提唱

されていた「カルパインーカテプシン経路」が線虫でも存在し、ネクロシス機構もアポトーシス同様、線虫から哺乳類まで保存されているらしいことが、明らかとなった。細胞死の過程で V-ATPase 依存的な細胞質内の酸性化が起こる¹⁴ ため、カルパイン活性化→V-ATPase を介したリソソーム膜崩壊→酸性成分放出→細胞質酸性化→アスパラギン酸プロテアーゼ活性化、という図式が提唱された。未解決部分も多いが、細胞内の存在位相が異なると考えられるカルパインとカテプシンのコラボレーションは極めて興味深い。

哺乳類のカテプシン E といえば、ノックアウトマウスにアトピー性皮膚炎の発症が示され、非常に興味深い展開を見せている¹⁵。一方、カテプシン L は、シグナルペプチド部分が選択的スプライシングによって他の配列に置き換わったものも少量細胞質内に発現しており、細胞周期制御への関与¹⁶ とダイナミン切断による蛋白尿性腎臓症への関与¹⁷ が示され、カテプシンの機能に新概念が導入されたのみならず、カルパインをはじめとする細胞質プロテアーゼとの機能連携も今後興味深い。

連携といえば、哺乳類の筋原線維再構築にカルパインがユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) の上流で機能するという報告もある¹⁸。また、線虫の性決定に関与する TRA-2 は、上記 TRA-3 の基質となることが遺伝学・生化学的に示されていたが、UPS によっても分解を受けるという興味深い事実も示された¹⁹。ごく最近、前述の Cpl1 のカビのオルソログである PalB が、これも Rim101 のオルソログである PacC を切断する時、PalB→UPS と 2 段階で行われ、PalB による切断が UPS の作動に必要であることが示された²⁰。他にもいくつか報告はあるが、まだ明確に両者の関係が示されたと言うには時期尚早のようではある。しかし、UPS に限らず、細胞という同一コンパートメントに存在するプロテアーゼ同士は、機能的に関連していないはずが無く、今後ますますその協同性は注目されるであろう²⁰。

③ おわりに

最初にも断ったように、以上はほんの氷山の一角であり、様々な生物の、また細胞外のプロテアーゼも含めて興味深いプロテオリシスは山のようにある。

ユビキチンリガーゼを除いてヒトは約 1,000 個のプロテアーゼ及びそのホモログの遺伝子を持ち、全遺伝子の約 4% に当たる (MEROPS the Peptidase Database: <http://merops.sanger.ac.uk/> 参照)²¹。活性があると考えられるものだけで 611 遺伝子ある。UPS 関係を除いても 500 以上あり、これらが全て第四章の守備範囲である。構造的には 67 ファミリーに分類でき、さらに活性中心を指標に Asp (3), Cys (19), Metallo (24), Ser (17), Thr (3) の 5 種に大別される。プロテアソームの活性中心が N 末端の Thr であり、第 5 の新規ファミリーとして驚きと共に認知されたのは 1995 年のことであるが、2004 年には、ヒトには存在しないが、Glu を活性中心に持つプロテアーゼの存在も明らかとなった^{22,23}。

このように構造的にも多彩なプロテアーゼが細胞内外で織りなすプロテオリシス劇場において、今は確かに UPS とオートファジーが主役であるが、それは時代と共に移り変わり、様々なプロテオリシスが順繰りに注目されていくことであろう。今の主役がそうであった

ように、そのためには地道なロングテールの脇役としての研究が必要不可欠である。

1. Kuranaga, E. & Miura, M.: Trends Cell Biol., 17:135-144, 2007
2. Kuranaga, E. et al.: Cell, 126:583-596, 2006
3. Dutt, P. et al.: BMC Dev. Biol., 6:3, 2006
4. Hawasli, A.H. et al.: Nat. Neurosci., 10:880-886, 2007
5. Shimizu, K. et al.: Cell, 128:1219-1229, 2007
6. Harris, F. et al.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 1084:452-480, 2006
7. Horikawa, Y.: Endocr. J., 53:567-576, 2006
8. Hayashi, M. et al.: Mol. Cell. Biol., 25:9478-9490, 2005
9. Boysen, J.H. & Mitchell, A.P.: Mol. Biol. Cell, 17:1344-1353, 2006
10. Penas, M.M. et al.: Eukaryot. Cell, 6:960-970, 2007
11. Horii, M. et al.: Biochem. J., 400:23-32, 2006
12. Golstein, P. & Kroemer, G.: Trends Biochem. Sci., 32:37-43, 2007
13. Artal-Sanz, M. et al.: J. Cell Biol., 173:231-239, 2006
14. Syntichaki, P. et al.: Curr. Biol., 15:1349-1254, 2005
15. Yanagawa, M. et al.: J. Biol. Chem., 282:1851-1862, 2007
16. Goulet, B. et al.: Mol. Cell, 14:207-219, 2004
17. Sever, S. et al.: J. Clin. Invest., 117:2095-2104, 2007
18. Kramerova, I. et al.: Hum. Mol. Genet., 14:2125-2134, 2005; Partial retraction, 16:1006, 2007
19. Shimada, M. et al.: Mol. Biol. Cell, 17:5356-5371, 2006
20. Hervás-Aguilar, A. et al.: J. Biol. Chem., 282:34735-34747, 2007
21. Mizushima, N.: Autophagy, 3:179-180, 2007
22. Rawlings, N.D. et al.: Nucleic Acids Res. 34:D270-D272, 2006
23. Fujinaga, M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101: 3364-3369, 2004
24. Pillai, B. et al.: J. Mol. Biol., 365: 343-361, 2007

重点領域研究

「蛋白分解のニューバイオロジー」ニュース

ぷろておりしす



第1号（平成8年6月発行）

文部省科学研究費重点領域研究「細胞内蛋白分解」事務局

図 1 特定領域研究「蛋白分解のニューバイオロジー」ニュース機関誌『ぷろておりしす』の第一号表紙

『ぷろておりしす』は、平成8年6月から平成12年3月まで年3回、毎回100ページ近い厚さで、計12冊が出版され、最新の話題に関する総説、学会や研究員の成果の紹介など、今読んでも勉強になる話題に溢れている。最終号の班長の巻頭言にもあるように、プロテオリシスの研究が著しく進展した時期とこの期間は完全に一致していた。