

「モジュレータ・プロテアーゼ」カルパインと細胞内膜系との新たな展開

秦 勝志、反町 洋之

(財)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

113-8613 東京都文京区本駒込 3-18-22

TEL/FAX: 03-3823-2181

New biology of calpain in relation with intracellular membrane systems

Shoji Hata and Hiroyuki Sorimachi

Department of Enzymatic Regulation for Cell Functions (Calpain Project),
The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science (Rinshoken)

3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613

(ショートタイトル)

細胞内膜系におけるカルパインの局在・機能

(ダイジェスト)

活性にカルシウムを必要とする細胞内システインプロテアーゼ、カルパインは、基質の限定分解により様々な細胞機能を調節する「モジュレーター」として、厳密な活性制御のもと、細胞内のあらゆる場で機能する。活性化の際の膜移行などカルパインが有する特質から、細胞内膜系はカルパインの重要な機能の場であることが示唆されてきたが、膜系でカルパインが活性化・機能する具体的なメカニズムは不明であった。ところが近年、膜系をめぐるカルパイン研究は急速に進展、新展開を見せつつある。本稿では、最新の知見を交えてこれらについて概説する。

1. はじめに

カルパインは活性に Ca^{2+} を必要とする細胞内システインプロテアーゼで、基質の限定分解により様々な細胞機能を調節するモジュレータとして機能する。即ち、細胞内「モジュレータ・プロテアーゼ」の代表である。

細胞質内で直接基質と相互作用するため、活性は幾重にも厳重に制御されている。その一つとして、膜系との相互作用は古くから注目されていた。リン脂質がカルパインに直接作用して Ca^{2+} 要求性を低下させる事、活性化したカルパインが細胞膜へ移行する事、多くの膜／膜結合タンパク質が基質となる事など、多くの重要な研究がなされてきた(総説 1, 2 を参照)。しかし、カルパインが膜で活性化する具体的な分子メカニズムについては、不明な点が多い。

そのような中、ミトコンドリア・小胞体(ER)・ゴルジ体・多胞性エンドソーム(MVB)など細胞内膜系へのカルパインの局在、及び膜輸送系(membrane trafficking)関連分子とカルパインとの相互作用が明らかになってきた(図 1)。細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスを司る細胞内膜系が、カルパインにとっても重要であるのは論を待たないが、新たに見出された細胞内膜系を介したカルパイン機能は、難渋する生理機能解明へのブレイクスルーとして期待が寄せられる。本稿では、最近の研究成果を中心に、これらの新展開について紹介する。

2. カルパインの構造・機能^{1,2)}

カルパインは、既知の全多細胞生物の他、一部の酵母や細菌など単細胞生物にも存在し、多種多様なサブクラスからなる ^{スーパーファミリー} 超 族 を形成する。哺乳類では発現様式の異なる 14 遺伝子、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では 1 遺伝子のみが存在する(図 2)。活性サブユニットの典型的構造は、N 末端の調節ドメイン(I)及び Ca^{2+} 結合能を有する 3 ドメイン(プロテアーゼ活性ドメイン(II)、リン脂質・ Ca^{2+} と相互作用する C2 様ドメイン(III)、5 つの EF-ハンドモチーフを持つ PEF ドメイン(IV))から構成される。C2 様又は PEF ドメインが重複、或いは他に置換した分子種も存在する。後述する μ -及び m-カルパインの活性サブユニット(μ CL/カルパイン 1 及び mCL/カルパイン 2)、nCL-2/カルパイン 8a は前者に、酵母 Cpl1/Rim13 とその哺乳類ホモログ PalBH/カルパイン 7 は後者に属す。カルパインのモジュレータ機能の重要性は、mCL 遺伝子(*Capn2*)欠損マウスが胚性致死となる事、ヒト p94(カルパイン 3a)遺伝子(*CAPN3*)変異が肢帯型筋ジストロフィー 2A 型を引き起こす事、ヒトカルパイン 10 遺伝子(*CAPN10*)多型が 2 型糖尿病発症危険度に関与する事、酵母 *CPL1* 欠損でアルカリ・塩耐性不全となる事などから、遺伝学的に明確である。即ち、カルパインの機能不全が病態と密接に関係し、治療・診断面でも注目されている。

近年解明されたカルパインの立体構造などから、カルパインの厳密な活性制御の一部が明らかとなった。カルパインは通常、活性ドメインが開裂した不活性状態で存在するが、活性ドメインへの 2 分子の Ca^{2+} の結合により構造を変化させ、活性中心を形成して活性化する。活性型カルパインは、内在性カルパイン阻害タンパク質カルパスタチンなどによる制御のもと、細胞内のあらゆる場で機能すると考えられているが、その時空間的な制御機構は不明確である。

3. オルガネラにおけるカルパインの局在

3-1. ER・ゴルジ体

細胞接着・移動時の細胞骨格の再構成や形態変化にカルパインが関与することから、この時の

細胞内局在が検討された。その結果、グリオーマ細胞のラミニン処理により、PIP₂ 生合成量増加に伴い、m-カルパインの擬足及び ER・ゴルジ体への移行が観察された³⁾。また、A-549 細胞ミクローム画分の解析の結果、μ-カルパインはゴルジ体膜に、m-カルパインは ER・ゴルジ体膜の両側に存在することが判明した⁴⁾。m-カルパインには一次配列上のシグナル配列はない。可能性として、構造変化等に伴う内在性シグナル配列形成により内腔へ局在し、ER に標的される基質の切断を行う事が考えられる。重要な点は、カルパインが ER・ゴルジ体を介して機能を発揮するだけでなく、少なくとも一部は ER・ゴルジ体膜に常在することが明らかにされたことである。

3-2. ミトコンドリア

ミトコンドリアにおけるカルパインの存在は、AIF(apoptosis inducing factor)や Bax がカルパインの基質であること、シクロスポリン A 処理により外膜と内膜を結ぶ膜透過性遷移孔を阻害するとカルパイン活性も阻害されることから示唆されていた^{5,6)}。SHSY-5Y 細胞の BAPTA-AM 処理により、不活性状態のμ-カルパインもミトコンドリアに局在することが示された⁷⁾。Bax は膜細胞質側で、AIF は膜間腔で切断されることから、ミトコンドリア内のカルパインの存在も示唆された。これらの結果は、カルパインが AIF や Bax の限定分解を介してアポトーシスを調節するという可能性を支持した。

ER は Ca²⁺を貯蔵し、ミトコンドリアでは膜を介したダイナミックな Ca²⁺の流出入が起こることから、これらの細胞内膜系とその近傍は、局所的にカルパインが活性化するのに適した環境と考えられる。よって、カルパインがこれらを足場として機能するというのは合理的であり、様々なカルパイン分子種の膜系での分布に関する今後の解析が興味深い。

4. カルパインのメンブレントラフィックへの関与

4-1. ER-ゴルジ体-細胞膜間

筆者らは、胃におけるカルパインの機能及び病態との関連の解明を目的に、哺乳類カルパインで唯一胃特異的に発現する nCL-2 の解析を行ったところ、小胞輸送への関与を示唆する結果を得た⁸⁾。胃は様々な特異的機能を持つ細胞で構成されるが、nCL-2 は胃粘膜の表層粘液細胞(pit 細胞)に限局的に発現する。pit 細胞の機能は主に粘液分泌による粘膜防御であり、他の胃細胞に比べ極めて短時間のターンオーバーを特徴とする。一方、μ-及び m-カルパインは胃粘膜全体に弱く発現することから、nCL-2 が pit 細胞特有の機能に中心的役割を果たすと考えられた。

そこで、nCL-2 相互作用因子の探索を行ったところ、ER-ゴルジ体間の逆輸送を主に担う COP-I 小胞のコートタンパク質(コートマー)複合体のサブユニットβ-COPを同定した。COS7 細胞発現系を用いて解析を行ったところ、①nCL-2 と内在性β-COP がゴルジ体で共局在する、②Ca²⁺イオノフォア刺激した細胞ではβ-COP が N 末端ドメインとリンカー部分との間で 1 箇所限定分解される、③このβ-COP 限定分解断片を発現させると細胞質全体に拡散して存在する、事が明らかとなった。COP-I 小胞コートマーは7種存在し、2種のサブ複合体を形成する。COP-I 小胞の出芽あるいは融合時に、ADP-ribosylation factor-1(ARF-1)等の作用によりサブ複合体の会合・解離が起こるが、詳細は不明である。筆者らは、nCL-2 によるβ-COP 限定分解が COP-I 小胞からコートマー複合体を解離させるというモデル(図 3A)を提唱した。ホルモン分泌顆粒成熟過程において内分泌系細胞のゴルジ体-細胞膜間のコートタンパク質クラスリン・アダプチンが m-カルパインによる限定分解を介して解離するとの報告⁹⁾もあり、同様のシステムが広く膜輸送系に関与する可能性がある。nCL-2 による COP-I 輸送系制御と pit 細胞特異的機能とがどのように結びつくのか、さらに解析す

る必要がある。

4-2. エンドソーム-リソソーム/液胞間

MVB は、積み荷タンパク質(cargo)をエンドソーム内に取り込む際にエンドソーム膜から小胞が出芽・陥入することで形成される。その際、酵母では Vps ファミリータンパク質から成る ESCRT-I (Vps23, 28, 37), -II (Vps22, 25, 36), -III (Sfn7, Vps2, 20, 24)と呼ばれる3種の複合体が重要な役割を果たす。詳しくは総説^{10,11)}に譲るが、ユビキチン化された cargo が Vps27 に認識され、エンドソーム膜上で ESCRT-I, -II, Sfn7-Vps20 ESCRT-III サブ複合体の順に受け渡された後、もう一方の ESCRT-III サブ複合体(Vps2-Vps24)がこれに結合することで、小胞へソートされ则认为られている。

酵母カルパイン Cpl1 は、アルカリ環境において、転写因子 Rim101 の C 末端部分を限定分解して活性化させ、アルカリ環境適応に関係する遺伝子の発現を制御する(Cpl1 経路)。その際、機能未知の上流因子 Dfg16, Rim8, 9, 21 の作用により、Cpl1 は、Rim101 の C 末端側結合因子 Rim20 と共に Snf7 ヘリクルートされる。ESCRT-I, -II の各因子、Snf7, Vps20 を欠失させると Rim101 の限定分解が抑制されアルカリ感受性になることから、Cpl1 経路と MVB 経路は ESCRT-I, -II、及び Snf7, Vps20 を共通の足場とし、エンドソーム膜上において制御されることが明らかとなった¹²⁻¹⁴⁾(図 3B)。酸性区画であるエンドソームや液胞はアルカリ環境に曝されると機能を損なうため、これらの経路が協力して制御し合うことでうまく外界に適応すると考えられている。

Cpl1 には哺乳類ホモログ PalBH が存在し、Rim, ESCRT 各分子にもホモログが存在して同様の相互作用が明らかになっている^{15,16)}。これは哺乳類においても、エンドソーム膜を介した類似の経路の存在を示唆するものであり、Cpl1, MVB 両経路の制御機構の詳細と共に解明が待たれる。

5. 終わりに

上記以外にも神経細胞死において、カルパインとカテプシンとの協働の報告や、リソソーム膜破壊への関与の報告もある。カルパインによる基質切断の時空間的な制御機構は、上述の通り未だ縹緲としているが、膜系のあらゆる場にカルパインが存在するという事実は、これを解明する重要な鍵となるだろう。また、Cpl1 と MVB、nCL-2 と COP-I 小胞との相互作用から、メンブレントラフィック制御という膜系へのカルパイン機能の一端が明らかになってきた。こうしたカルパインと膜系をめぐる展開は、未知の機能だけではなく、カルパインを細胞内膜系へと導く様々な未同定の足場タンパク質の存在も予感させ、今後も注目される。

本稿ではスペースの関係で、ごく一部の論文しか紹介できなかった事をお詫びします。ここで紹介した筆者らのデータは、東京大学農学生命科学研究科生物機能開発化学研究室と都臨床研カルパインプロジェクトにおいて阿部啓子博士をはじめ研究室の全ての方々の協力と、東京大学分子細胞生物学研究所前田達哉博士、川原裕之博士(現・北海道大学大学院薬学研究科)、鈴木紘一博士(現・東レ先端融合研究所)、及び国立国際医療センター研究所反町典子博士との共同研究によるものであり、この場をお借りして深謝いたします。また、いつも心優しく慰めてくださる頼もしい同僚の都臨床研村上誠博士に心よりお礼申し上げます。

1) Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003) *Physiol. Rev.* **83**, 731-801.

2) Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004) *Diabetes* **53**, S12-S18.

3) Hood, J.L., Logan, B.B., Sinai, A.P., Brooks, W.H., & Roszman, T.L. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**,

1200-1212.

- 4) Hood, J.L., Brooks, W.H., & Roszman, T.L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 43126-43135.
- 5) Gao, G. & Dou, Q.P. (2000) *J. Cell. Biochem.* **80**, 53-72.
- 6) Polster, B.M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., & Nicholls, D.G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 6447-6454.
- 7) Garcia, M., Bondada, V., & Geddes, J.W. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1241-1247.
- 8) Hata, S., Koyama S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., & Sorimachi, H. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 11214-11224.
- 9) Ohkawa, K., Takada, K., Asakura, T., Hashizume, Y., Okawa, Y., Tashiro, K., Ueda, J., Itoh, Y., and Hibi, N. (2000) *Neuroreport* **11**, 4007-4011.
- 10) Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerioo, T., & Emr, S.D. (2002) *Dev. Cell* **3**, 271-282.
- 11) Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., & Emr, S.D. (2003) *J. Cell Biol.* **160**, 413-423.
- 12) Xu, W., Smith, F.J., Subaran, R., and Mitchell, A.P. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 5528-5537.
- 13) Hayashi, M., Fukuzawa, T., Sorimachi, H., & Maeda, T. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9478-9490.
- 14) Boysen, J.H., & Mitchell, A.P. (2006) *Mol. Biol. Cell* **17**, 1344-1353.
- 15) Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T., & Maki, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39104-39113.
- 16) Katoh, K., Suzuki, H., Terasawa, Y., Mizuno, T., Yasuda, J., Shibata, H., & Maki, M. (2005) *Biochem. J.* **391**, 677-685.

(図説明)

(図 1) 明らかになったカルパインと細胞内膜系との関係

(図 2) ヒト及び酵母で同定されているカルパイン分子種。

μ -, m-カルパインは触媒サブユニット μ CL, mCLと制御サブユニット(30K, CAPNS1)とのヘテロ二量体である。ドメイン I は活性化の際に自己消化され、 Ca^{2+} 要求性を制御する制御ドメインである。*CAPN3*, *CAPN8*, *CAPN10* などからは数種のスプライスバリエントが生成するため、a, b, ... で区別されるが、ここでは代表的分子種のみを挙げた。カルパイン 6 の活性中心 Cys は Lys に置換しており、カルパイン 14 の N/C 末端には 100 残基程の非相同配列が存在する。T/C2: C2ドメインを含む TRA-3 C 末端ドメイン相同領域、PBH 及び SOH: 各々 PalB 及び SOL ホモログ間で保存されたドメイン。

(図 3) カルパインのメンブレントラフィックへの関与

A. nCL-2 による β -COP 限定分解の意義についてのモデル(文献 8 より引用)。B. 酵母アルカリ環境適応における Cpl1 経路と MVB 経路のクロストーク(文献 10,13,14 より一部改変して引用)のモデル。

図1

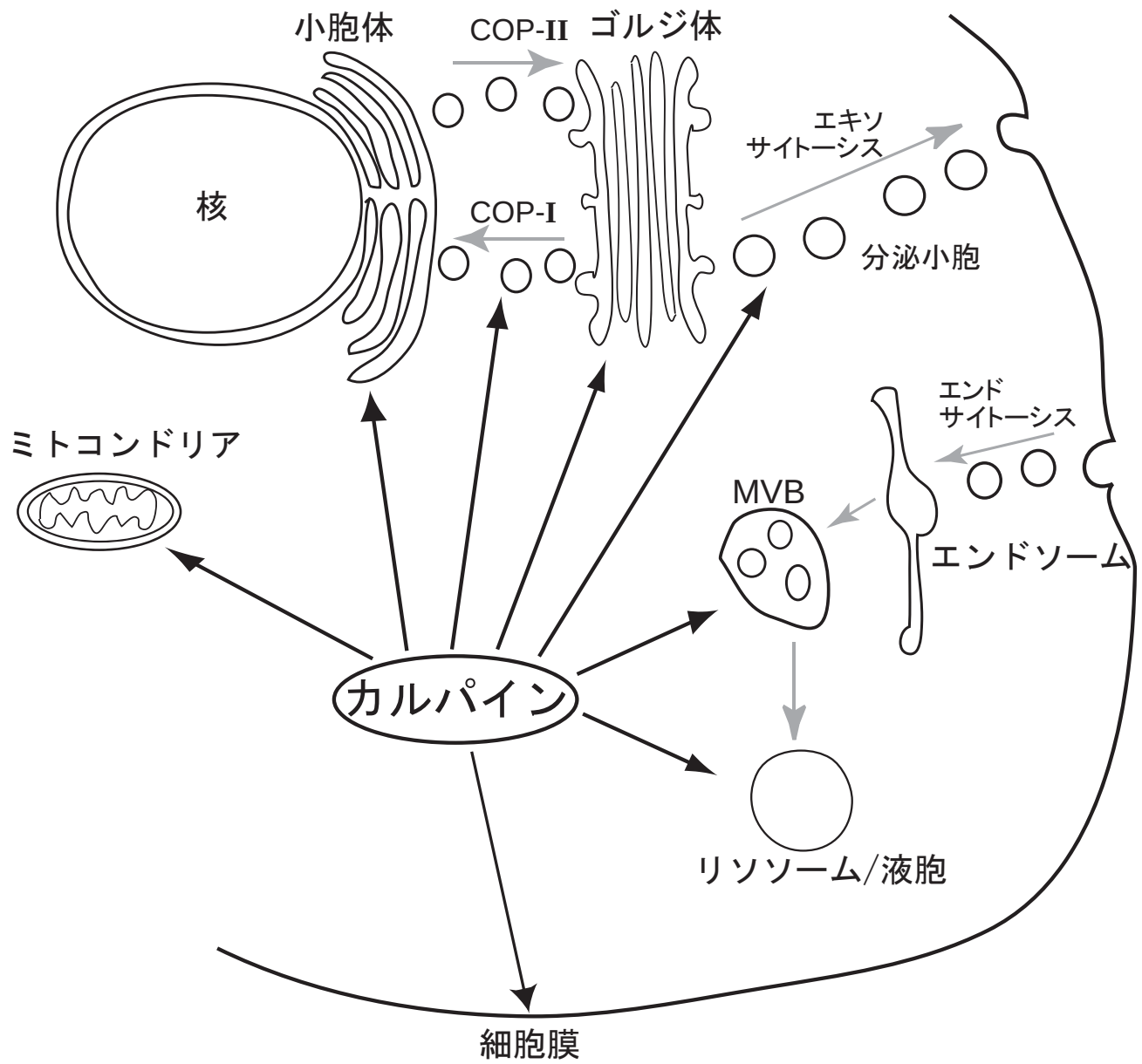


図2

ヒト

[普遍的カルパイン]

カルパイン制御サブユニット-1 (30K-1, CAPNS1)
カルパイン制御サブユニット-2 (30K-2, CAPNS2)

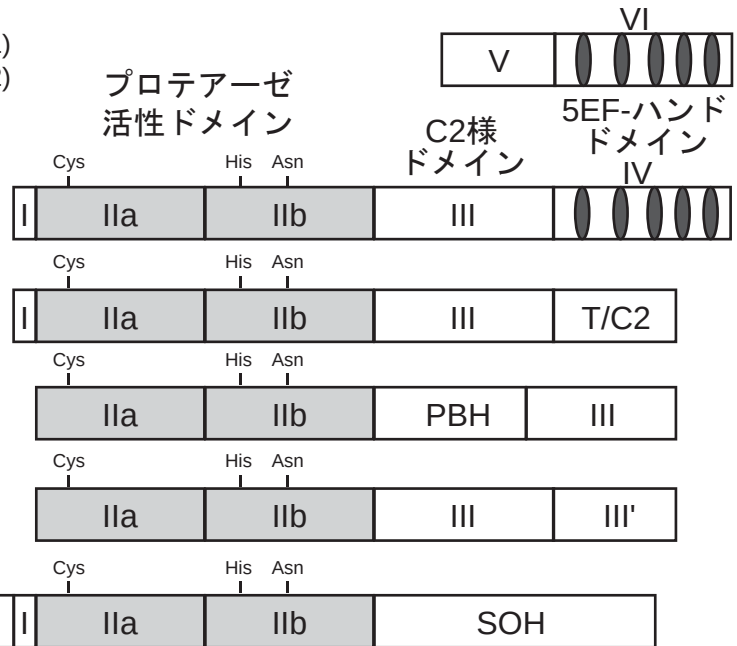
m-カルパイン活性サブユニット (mCL, CAPN1)
m-カルパイン活性サブユニット (mCL, CAPN2)
CAPN13, CAPN14

hTRA-3 (CAPN5)

PalBH (CAPN7)

CAPN10a

SOLH (CAPN15)



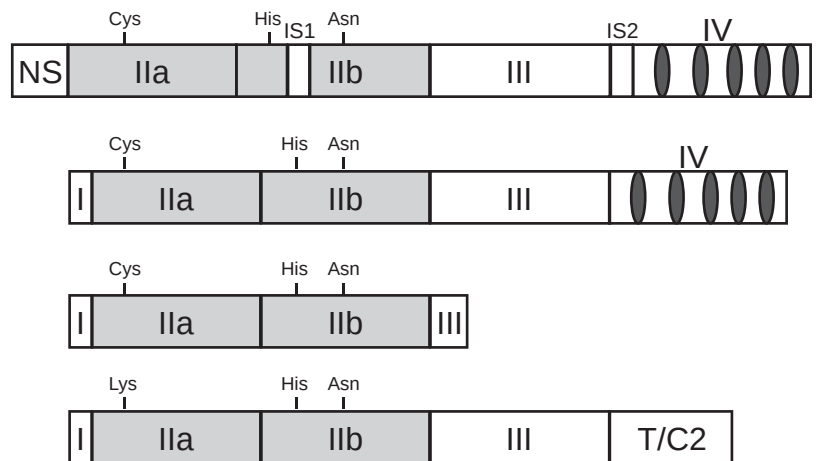
[組織特異的カルパイン]

p94 (CAPN3a)

nCL-2 (CAPN 8a)
nCL-4 (CAPN 9)
CAPN11, CAPN12

nCL-2' (CAPN8b)

CAPN6 (CANPX)



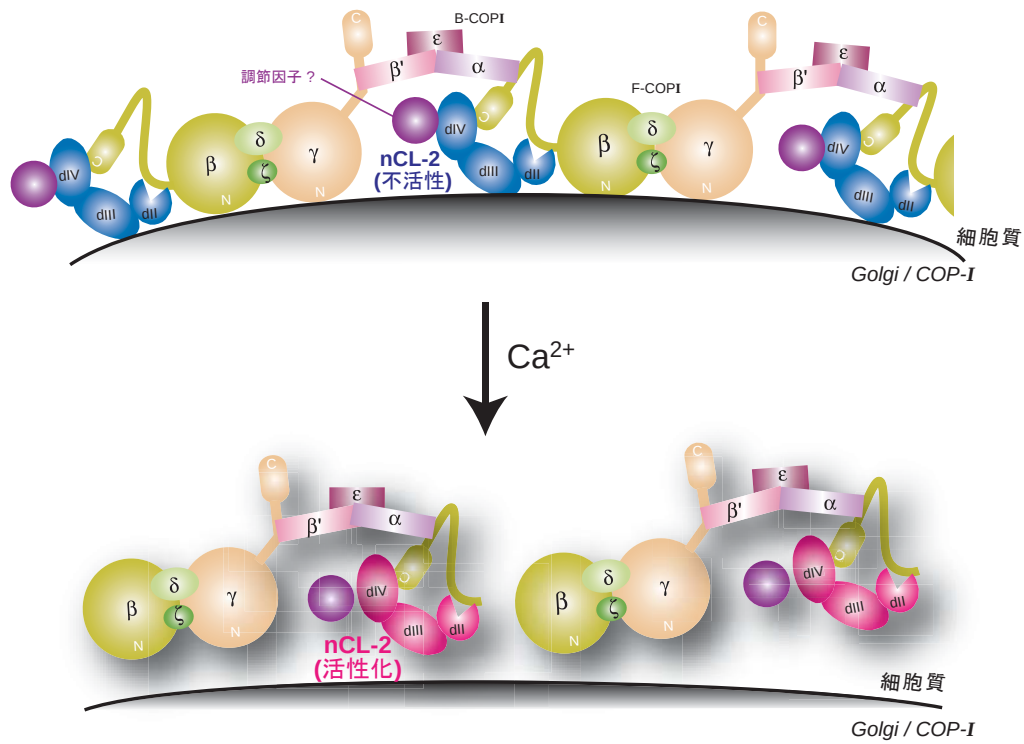
酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

Cpl1 (Rim13)



図3

A



B

