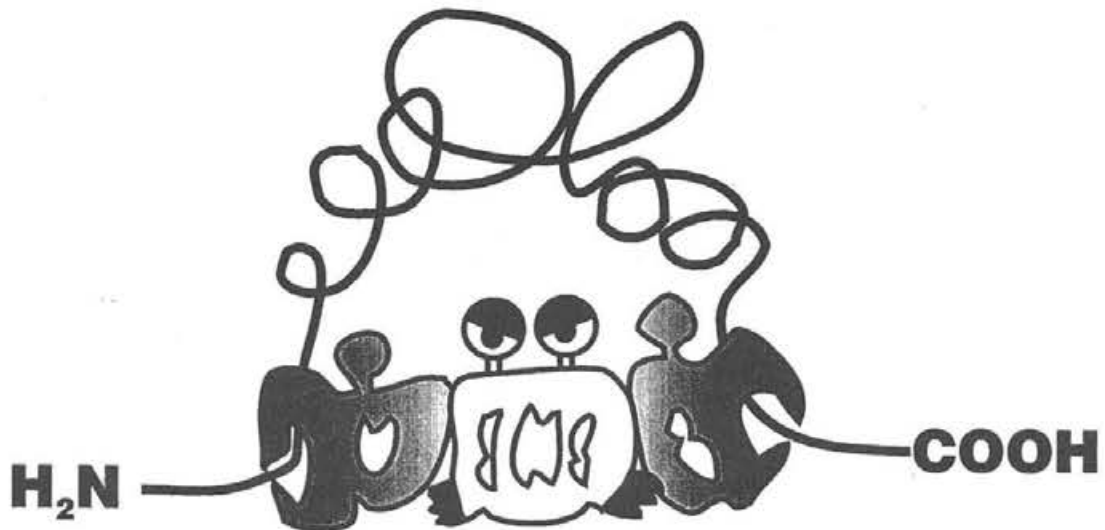


特定領域研究

「蛋白分解のニューバイオロジー」ニュース

ぷろておいしす



第10号（平成11年6月発行）

文部省科学研究費特定領域研究「細胞内蛋白分解」事務局

目次

- (1) 巻頭言
- (2) 平成11年度特定領域研究班・会議日程
- (3) 活動および関連事業
 - 1 班員名簿発行
 - 2 特定領域ニュース誌“ぶろておりしす”発行
 - 3 出版案内
 - 4 学会・集会案内
- (4) 学会・集会報告
 - 1 Third Workshop on Proteasomes に参加して
 - 2 千里ライフサイエンスセミナー「細胞内シグナルの制御ーユビキチンとプロテアソーム」の報告
 - 3 CSH-Symposium "Biology of Proteolysis" の内容案内
- (5) ミニレビュー
 - 1 Wee1 ‘小’ 事件
 - 2 インテグリンを介した細胞接着とカルパイン
- (6) トピックス
 - 1 "カテプシンS" KOされる
- (7) 掲示板コーナー
伝言板、その他インフォメーション
- (8) 編集後記
- (9) 発表論文の概要紹介：巻末添付

(1) 巻頭言

最終年度にあたって

平成8年度に始まったこの特定領域研究「蛋白分解のニューロバイオロジー」(略称:「細胞内蛋白分解」)は、早いもので4年間の全体計画の最終年度を迎えることになりました。

この間蛋白質分解の研究の進展は実にめざましく、蛋白分解を伴う細胞機能の制御が生物科学の中心的テーマになってきた感があります。蛋白分解に関係した論文が一流国際誌に毎号掲載されるだけでなく、最も注目を集める研究としてマスコミが紹介する話題にも蛋白分解のことがしばしば取り上げられています。これは、バイオロジーにおける蛋白分解の研究が遅れていたことの証明かもしれません。

これまでの蛋白分解の研究はプロテアーゼの研究が中心でした。蛋白分解の最も重要な基盤である「プロテアーゼの研究」は必要不可欠で、これからも研究の重要性は増すことはあ

ても薄れることはありません。しかし、一方では、基盤研究であるプロテアーゼの研究成果を利用した「蛋白分解の生物機能の研究」が推進されなくてはなりません。この特定領域研究は日本が世界に先駆けて蓄積してきた「プロテアーゼの研究」の成果を基盤にして、発足当時まだ黎明期にあった「蛋白分解の生物機能」の研究を推進することを主な目的として発足しました。この3年間のうちに世界の状況は「蛋白分解の生物機能」の研究が大きな脚光を浴び、「プロテアーゼの研究」に代わって確実に主役の座を獲得しつつあります。本特定領域研究を中心とした日本の研究の流れはどうでしょうか。この点を十分に意識しながら最終年度の研究に全力を挙げて取り組まなければならないと思います。4年間の研究をまとめることも重要ですが、この研究を基礎に次の研究に繋がる新しい種をつくり、苗を育てることもそれ以上に必要です。最終年度の開始にあたり改めてこれまでの研究を振り返ると共に、様々な点に思いを巡らせ、一人一人が最善を尽くしたいと思います。

この小冊子「ぷろておりしす」は、「蛋白分解」の研究領域全体の推進と関係領域の研究に携わる研究者の交流を図るため、本研究班の班員だけでなく、「蛋白分解」に興味を持つ研究者に広く配布してきました。本特定領域研究は本年度で終了しますが、来年度以降も何らかの形でこのような研究班が存続する必要性を痛感しています。「蛋白分解」の研究の発展性と得られた成果からみても当然のことです。来年度以降のことに関しては幾つかの取り組みが計画され、実行に移されているものもあるようです。日本、広くは世界の蛋白分解の研究の推進のためにも、多くの関係研究者の協力で来年度以降の計画が実現することを心から期待しています。

平成11年6月

文部省科学研究費特定領域研究（A）

[蛋白分解のニューバイオロジー]

領域代表者 鈴木 紘 一

(2) 平成11年度特定領域研究班・会議日程

1 第4回「細胞内蛋白分解」ワークショップ

日時：平成11年7月14日（水）18:00～16日（金）13:00

場所：定山溪ビューホテル 札幌市南区定山溪温泉（TEL：011-598-3223； FAX：011-598-3222）

(1) ミニシンポジウム発表

割当時間：発表、討論、交代時間を含めて一人30分（発表25分、討論4分、交代時間1分）

発表内容：ワークショップですので、総説的にご発表下さい

(2) 平成11年度新班員の研究計画発表

割当時間：発表、質問、交代時間を含めて一人15分（発表12分、討論2分、交代時間1分）

発表内容：自己紹介をかね、本特定領域研究の課題研究に関する研究の背景と、本特定領域研究で行う研究計画の概要の紹介

(3) 特別講演：発表、討論を含めて一人約60分（発表50分、討論9分、交代時間1分）

発表方式：スライド（OHPは会場施設の関係で使用できません）。

プリントを使用する場合、参加予定人数分（85名）のコピーをご用意下さい

プログラム

7月14日（水曜）午後

受付	午後	4:00～	6:00
食事	午後	6:00～	7:15
領域代表者挨拶	午後	7:15～	7:30
<u>ポスターセッション</u>	午後	7:30～	10:00
自由討論	午後	10:00～	

7月15日（木曜）午前

食事	午前	7:00～	8:15
<u>特別講演：蛋白分解研究の活性化を目指して（1-3）</u>	午前	8:30～	11:30
食事	午前	11:30～	1:30

7月15日（木曜）午後

<u>特別講演：蛋白分解研究の活性化を目指して（4）</u>	午後	1:30～	2:30
<u>ミニシンポジウム「プロテオリシス研究の新展開」</u>	午後	2:30～	5:30
懇親会	午後	6:00～	8:30
自由討論	午後	8:30～	

7月16日（金曜）午前

食事	午前	7:00～	8:50
<u>平成11年度新班員：紹介と研究計画</u>	午前	9:00～	12:00
領域副代表者挨拶	午後	12:00～	12:15
食事	午前	12:15～	1:30
解散	午後	1:30	

7月14日(水曜)午後

ポスターセッション

午後 7:30~10:00

- (1) ○島山鎮次、北川正敏、中山啓子、白根道子、松本雅紀、服部公彦、奥村康、中山啓一
(九州大学・生体防御医学研究所、CREST、順天堂大学医学部免疫学)
「I κ B α のユビキチン依存性分解は新規ユビキチンリガーゼSCF^{FWD1}によって仲介される」
- (2) 北川正敏、○島山鎮次、白根道子、松本雅紀、服部公彦、石田典子、中道郁夫、菊池章、
中山啓一、中山啓子(九州大学・生体防御医学研究所、CREST、広島大学医学部第一生化学)
「 β -カテニンのユビキチン依存性分解を制御する新規F-ボックス蛋白、FWD1」
- (3) ○友田紀一郎、加藤順也(奈良先端科学技術大学院大学)
「Jab1による、サイクリン依存キナーゼ阻害蛋白質p27の分解制御」
- (4) ○西山敦哉、立花和則、安田秀世、田中啓二、岸本健雄(東京工業大学大学院・生命理工学研究
科・生命情報専攻)「M期終了時におけるサイクリンB・Cdc2の不活性化機構」
- (5) ○高田耕司¹、大川 豊²、大川 清²(¹慈恵医大・生化学第一講座、²同内科学第三講座)
「白血病細胞から単離された17kDa核ユビキチン化蛋白質の一次構造」
- (6) ○川原裕之^{1,7}、後藤徹哉²、西山敦哉²、大隅圭太²、佐伯泰³、新原直樹^{4,7}、笠原正典^{5,7}、横澤英良³、
岸本健雄^{2,7}、鈴木絃一¹、田中啓二^{6,7}(¹東大・分生研、²東工大・生命理工、³北大・薬、⁴住友電工、
⁵総研大、⁶都臨床研、⁷CREST)「発生段階特異的脳型26Sプロテアソームとユビキチンレセプター
の分子多様性」
- (7) ○村上安子¹、村井法乃¹、棚橋伸行²、田中啓二²(¹慈恵医大生化学第2、²都臨床研・分子腫瘍学)
「オルニチン脱炭酸酵素の分解調節機構」
- (8) ○木村弥生、平野 久(横浜市立大学・木原生物学研究所)
「酵母20SプロテアソームのN^ε-アセチル化とプロテアーゼ活性」
- (9) ○水島 昇、野田健司、大隅良典(基礎生物学研究所)
「オートファジーに必須なApg12-Apg5/Apg16複合体」
- (10) ○高橋芳充¹、岩瀬政行¹、田中真人²、東江昭夫¹、菊池淑子¹(¹東京大学大学院・理学系研究科、
²三菱化学生命研究所)
「SUMO-1ホモログ、出芽酵母 Smt3はセプチン構成因子 Cdc3に共有結合している」
- (11) ○秦勝志¹、李漢俊²、反町洋之^{1,3}、石浦章一⁴、鈴木絃一¹)
(¹東大分生研、²理化学研究所、³東大大学院・農学生命科学研究科、⁴東大大学院・
総合文化研究科)「胃特異的カルパイン nCL-2、-2' の遺伝子構造の解析」
- (12) ○西下一久¹、坂井英昭¹、加藤有三¹、山本健二²(¹長崎大学・歯学部・薬理、²九州大学・歯学部・
薬理)
「細胞内レドックス環境変化に呼応したラットカテプシンEの局在変化」

- (13) ○西川毅^{1,2}、矢野環¹、小林綾子¹、名取俊二² (¹東京大学大学院・薬学系研究科、²理化学研究所)
「センチニクバエ変態期におけるカテプシンBの翻訳制御機構の解析」
- (14) ○前川洋一、張 天甄、姫野國祐 (徳島大学医学部・寄生虫学講座)
「卵白アルブミン免疫マウスにおいてカテプシンBは抗原処理によって、カテプシンDはli鎖分解によって免疫応答を調節する」
- (15) ○白浜佳苗、山本章嗣、西村幹夫、西村いくこ (基礎生物研究所)
「エンドソーム・リソソーム系に局在するシステインプロテアーゼ、マウスVPE/legumainの解析」
- (16) ○江崎淳二、谷田以誠、江崎光江、金羽木伸生、木南英紀 (順天堂大学・医学部・生化学第一)
「Tripeptidyl peptidase I 欠損によるリソソーム蛋白質蓄積症：遅幼児型神経性セロイドリポフスチン蓄積症」
- (17) ○大久保岩男、杜 培革、李 堯華、前田利長、山根拓也、山本好男、西 克治 (滋賀医科大学・生化学第二講座) 「Jansky-Bielsdowsky病 (CLN2) の原因タンパク質としての Tripeptidyl peptidase I」
- (18) ○野中 隆、桑江朝臣、笹川千尋、大海 忍 (東京大学医科学研究所・細菌感染研究部)
「赤痢菌 (Shigella flexneri) 感染によるマクロファージの細胞死と Caspase の活性化」
- (19) ○藤田恵理子¹、浦瀬香子¹、伊勢原京子¹、内山安男²、本山 昇³、桃井 隆¹ (¹国立精神神経センター、²大阪大学大学院・医学研究科、³国立長寿センター) 「カスパーゼ9活性化抗体の作成と Bcl-xL欠損マウスの神経系におけるカスパーゼ3, 9の活性化」
- (20) ○山口光峰¹、神林 弾¹、土屋幸弘¹、川上博子¹、戸田 潤²、佐野武弘²、豊島 聡³、北條博史¹
(¹昭和薬科大学・衛生化学研究室、²同薬品化学研究室、³星薬科大学・生化学研究室)
「Acylpeptide hydrolase阻害物質 (ALCK) により誘起されるU937細胞の細胞死について」
- (21) ○日和佐隆樹¹、勝沼信彦² (¹千葉大学・医学部・生化学第一講座、²徳島文理大学・健康科学研究所)
「シスタチンαの高発現による多剤耐性の獲得」
- (22) ○宮本洋一、赤池孝章、前田 浩 (熊本大学医学部・微生物学講座)
「ニトロソ化α1-プロテアーゼインヒビター：α1-プロテアーゼインヒビターの新しい機能」
- (23) ○森田隆司¹、阿刀田英子¹、藤本瑞¹、水野洋² (¹明治薬科大学・生体分子学、²農水省生物資源研)
「血液凝固因子Xa因子Gla-domain とその結合タンパク質複合体の結晶構造」

7月15日(木曜)午前

特別講演：蛋白分解研究の活性化を目指して(座長：鈴木・木南)

- | | | | | |
|-----------|--------------------------------|----|---------|-------|
| (1) 御子柴克彦 | (東大・医)
「カルシウムと細胞機能」 | 午前 | 8:30 ~ | 9:30 |
| (2) 浅島 誠 | (東大・総合文化研究科)
「動物のボディープラン」 | 午前 | 9:30 ~ | 10:30 |
| (3) 大野 茂男 | (横浜市大・医)
「細胞の極性とプロテインキナーゼC」 | 午前 | 10:30 ~ | 11:30 |

7月15日(木曜)午後

- | | | | | |
|-----------|---------------------------------|----|--------|------|
| (4) 石川 冬木 | (東工大・生命理工)
「我々はなぜ線状染色体をもつのか」 | 午後 | 1:30 ~ | 2:30 |
|-----------|---------------------------------|----|--------|------|

ミニシンポジウム 「プロテオリシス研究の新展開」(座長：田中・横沢)

- | | | | | |
|-----------|---|----|--------|------|
| (1) 山本 健一 | (金大・ガン研)
「転写因子活性化におけるプロテアソームの役割とその制御」 | 午後 | 2:30 ~ | 3:00 |
| (2) 東江 昭夫 | (東大・理学研究科)
「酵母26Sプロテアソームの遺伝学」 | 午後 | 3:00 ~ | 3:30 |
| 休憩 | 午後 | 午後 | 3:30 ~ | 4:00 |
| (3) 永淵 昭良 | (京大・医学研究科)
「 α および β カテニンの分解機構とその生理的役割」 | 午後 | 4:00 ~ | 4:30 |
| (4) 岸本 健雄 | (東工大・生命理工)
「M期制御における蛋白分解」 | 午後 | 4:30 ~ | 5:00 |
| (5) 小椋 光 | (熊大・医)
「FtsHプロテアーゼの細胞機能とAAA ATPaseの分子機構」 | 午後 | 5:00 ~ | 5:30 |

7月16日（金曜）午前

平成11年度新班員：自己紹介と研究計画（座長：川島・山尾）

1. 本多 玲子（東京薬科大学・生命科学部） 午前 9:00～9:15
「細胞機能を制御する蛋白質ユビキチン化の機構解明」
2. 小南欽一郎（九州大学・生体研） 午前 9:15～9:30
「サイクリン依存性キナーゼ阻害分子P27の分解因子の同定及び解析」
3. 久永 真一（東京都立大学・理学系） 午前 9:30～9:45
「神経細胞におけるCDK5活性化サブユニットP35の選択的分解機構の解析」
4. 内匠 透（神戸大学・医学部） 午前 9:45～10:00
「光による時計蛋白TIMELESSの分解機構の解明」
5. 服部 信孝（順天堂大学・医学部） 午前 10:00～10:15
「パーキンソン病におけるユビキチン様蛋白質の意義」
- 休憩 午前 10:15～10:45
6. 貝淵 弘三（奈良先端科学技術大学院大学） 午前 10:45～11:00
「蛋白分解による細胞間接着の制御メカニズムの解析」
7. 大野 博司（千葉大学・医学系研） 午前 11:00～11:15
「蛋白質のリソソームへの輸送の分子機構」
8. 横田 正幸（兵庫医科大学・医学部） 午前 11:15～11:30
「局所脳虚血におけるカルパイン-カルパスタチン系の役割の解析」
9. 遠藤 昌吾（理化学研究所） 午前 11:30～11:45
「シナプス可塑性に関与するプロテアーゼに関する研究」
10. 赤池 孝章（熊本大学・医学部） 午前 11:45～12:00
「フリーラジカルによるマトリックスメタロプロテアーゼの活性化」

2 平成11年度：第1回 総括班会議

日時：平成11年7月15日

(午前7時30分から8時15分)

場所：定山溪ビューホテル

- 議題：
1. 経過報告
 2. 本年度の研究組織と活動計画, 総務, 研究・企画など
 3. 来年度の活動計画
 4. その他

3 第4回 公開シンポジウム

日時：平成11年12月20日(月)

場所：東京ガーデンパレス

テーマ：仮題「シグナル伝達とプロテオリシス」

4 平成11年度：第1回班会議

日時：平成11年12月21日(火)～22日(水)

場所：東京ガーデンパレス

総括班メンバー

- 鈴木 紘一 東京大学分子細胞生物学研究所教授：領域代表・第一班班長
- 木南 英紀 順天堂大学医学部教授：領域副代表・第二班班長
- 岩永 貞昭 九州大学名誉教授：研究評価, チェック・レビュー
- 大島 泰郎 東京薬科大学生命科学部教授：研究評価, チェック・レビュー
- 勝沼 信彦 徳島文理大学健康科学研究所所長：研究評価, チェック・レビュー
- 志村 令郎 生物分子工学研究所所長：研究評価, チェック・レビュー
- 中西 重忠 京都大学大学院医学研究科教授：研究評価, チェック・レビュー
- 村上 和雄 筑波大学応用生物化学系教授：研究評価, チェック・レビュー
- 矢崎 義雄 東京大学名誉教授：研究評価, チェック・レビュー
- 矢原 一郎 東京都臨床医学総合研究所副所長：研究評価, チェック・レビュー
- 川島 誠一 東京都臨床医学総合研究所部長：研究企画, 調整
- 田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所部長：研究企画, 調整
- 石浦 章一 東京大学大学院総合文化研究科教授：研究企画, 調整
- 上野 隆 順天堂大学医学部講師：研究企画, 調整

(3) 活動および関連事業

1 班員名簿（平成11年度）発行：平成11年6月作成予定

2 特定領域ニュース誌“ぷろておりしす”発行

本ニュース誌は班員間の連絡事項のみならず、ミニレビュー・トピクス等、蛋白分解に関する最新の情報を満載して年3回発行します。また、班員以外にも積極的に配布して、本重点研究の進捗状況などを宣伝してゆきたいと考えています。したがって、班員以外の定期配布を希望する研究者にも無料で送付しますので、送付先を事務局（研究代表者鈴木紘一研究室）に連絡するようにお勧め下さい。

3 出版案内：（本重点研究の期間：平成8～11年度に発行された蛋白分解関連の出版物を毎号記載しますので情報をお寄せ下さい）

"Intracellular Protein Catabolism" (Eds. Suzuki, K. and Bond, J.S.), Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 389, Plenum Press, New York, 306pp (1996)

"Biology of the Lysosome" (Eds. Lloyd, J.B. and Mason, R.W.) Subcellular Biochemistry, Vol. 27, Plenum Press, New York, 416pp (1996)

"Proteasomes and Related Complexes" : Mol. Biol. Rep. Special issues (Guest editors: Schmid, H.-P. and Briand, Y.), Vol. 24, 138pp (1997)

"Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors" (Eds. Katunuma, N., Kido, H., Fritz, H., and Travis, J.), IOS Press, 205pp (1997)

"Proteolysis in Cell Function" (Eds. Hopsu-Havu, V.K., Jarvinen, M., and Kirschke, H.), IOS Press, 576pp (1997)

"Ubiquitin and the Biology of the Cell" (Eds. Peters, J.-M., Harris, J.R., and

Finley, D.), Plenum Publishing, London, 462pp (1998)

組織培養 特集号“プロテアソーム” 1996年3月号 (編集: 田中啓二)

細胞工学 特集号“ユビキチンとプロテアソーム” 1996年7月号 (監修:
田中啓二)

蛋白質核酸酵素 “プロテオリシス: 蛋白質分解の分子機構とバイオロジー”

1997年10月臨時増刊号 (編集: 鈴木絃一、木南英紀、田中啓二)

実験医学 特集“プロテアーゼと疾患” 1997年11月号 (編集:

鈴木絃一)

細胞工学 特集号“ユビキチンシステムと細胞周期制御” 1999年5月号

発行 (監修: 田中啓二)

蛋白質核酸酵素 特集号“新しい細胞機能変換システムとしてのユビキチン

ワールド” 1999年5月号 (編集: 横沢英良・田中啓二)

実験医学 特集“プロテアーゼによる生体機能制御と疾患” (仮題)

1999年10月号発行予定 (編集企画: 木南英紀)

シュプリンガー・フェアラーク社発行「蛋白質分解—分子機構と細胞機能」

平成12年春出版予定 (編集: 鈴木絃一、木南英紀、田中啓二)

バイオサイエンスの世紀 (企画: 日本生化学会) 第2巻「タンパク質の

一生: タンパク質の誕生、成熟から死まで」 (中野明彦・遠藤斗志也 編)

発行: 共立出版 平成12年春出版予定

4 学会・集会案内

国内学会

(1) 第4回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会。

平成11年8月20日(金)～21日(土) ウィルあいち (名古屋市

東区上堅杉街1) (代表世話人 青柳高明)。

詳細は掲示板参照のこと。

- (2) 癌学会 (平成11年9月29～10月1日) 広島
シンポジウム「蛋白質分解の分子機構とがん」
(座長・田中啓二、菊池章)
- (3) 生化学会 (平成11年10月6～9日) 横浜
ワークショップ「プロテオリシスによる細胞機能のモジュレーション」
(反町洋之・前田達哉)
- (4) 免疫学会 (平成11年12月1～3日) 京都
シンポジウム「Molecular Mechanisms of MHC-peptide Complex Generation」
演者 P. Cresswell, G. Hammerling, H. Ploegh, K. Tanaka (座長・K. Tanaka)
- (5) 分子生物学会 (平成11年12月7～10日) 福岡
ワークショップ「新しい細胞機能制御系” ユビキチンワールド”」
(座長・山尾文明、中山敬一)

国際学会

- (1) Vth International Symposium on "**Proteinase Inhibitors and Biological Control**" June 9-13, 1999, Brdo, Slovenia (V. Turk, H. Hritz, B. Sloane)
- (2) "**Second International Serpin Conference**" June 27-July 1, 1999, Queens' College, Cambridge, UK (R. Carrell)
- (3) FASEB Summer Research Conference on "**The Calpain System in Health & Disease**" June 20-25, 1999, Copper Mtn, Colorado, USA (D. Goll et al.)
- (4) 5th FASEB Summer Research Conference on "**Ubiquitin and Protein Degradation**" July 31 -August 3, 1999, Saxtons River, Vermont, USA (C. Pickart and G. DeMartino)
- (5) **The First General Meeting of the IPS** (International Proteolysis Society) September 25-30, 1999, the Mission Point Resort on Mackinac Island, Michigan,

USA (J. Bond et al.)

- (6) **"Matrix Metalloproteinases"** Gordon Res. Confs., August 8-13, 1999,
Colby-Sawyer, New London, NH, USA
- (7) VIIth International Workshop on **"Molecular & Cell Biology of
Plasminogen"** September 4-9, 1999, Les Diablerets, Switzerland (D. Belin)
- (8) VIIth **"International Aspartic Proteinsae Conference"** September 7-12,
1999, Madeira Carlton Hotel, Funchal Madeira, Portugal (C. Faro)
- (9) **"The 2nd International Conference on Protease Inhibitors"**
December 3-6, 1999, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
(Ben M. Dunn) 詳細は掲示板参照のこと。

(4) 学会・集会報告

1 Third Workshop on Proteasomes に参加して

フランスのClermont-Ferrandで2年に1度開かれているプロテアソームワークショップも今年で3回目になる。いつも3月末(今年は、3月24日~27日)に、同じ会議場(Maison des Congres)で開催される。今回は34題の口頭発表(一人20-30分)と58題のポスター発表があった。参加者は招待者を含めておよそ150人で、プロテアソーム研究のトップランナーの多くが招待されている。ただ、残念ながらユビキチン関連の研究者が例年いつも少ない。

筆者は第2回のワークショップには参加していないので、今回は2回目になるが、だんだんこのワークショップも定着してきた感じがする。これからも続けられるであろう。同じ年の夏にFASEB Summer Research Conferenceが米国Vermont州で開かれるので、内容的にかなり重複することが予想される。両方参加するのは大変なので、どちらに参加しようか迷うのだが、今回はフランスに行ってよかったと感じた。FASEBとは異なり、何となく雰囲気や和やかだし(FASEBの時は未発表データの探り合いといった感じで、とても親睦を深めるという感じではない)、格安のホテル(小生の泊まったホテルは会場にも近く、バスタブ付で3泊1万円程度であった)に泊まれたということもあり、満足している。FASEB meetingだと、どうしても同室の人(特に外国人の場合)に気を使ったり、バス・トイレに入るタイミングをいつも気にしなければいけない、というのがどうも疲れる。

さて、ワークショップの内容だが、初日午前は、プロテアソームの構造に関する発表があった。Baumeister (Max-Planck Inst.)からは26Sプロテアソームの電子顕微鏡観察とその解析像が示され、Rechsteiner (Univ. Utah)研究室のポスドクのGorbeaからは制御サブユニット(特にATPase)間のトポロジーについてin vitroの翻訳系を用

いた解析が紹介された。すべてではないが、少しずつATPaseサブユニット間のトポロジーが判ってきた。続いて、Finley (Harvard Med. Sch.)がRptとRpnの構造と機能、lidとbaseの説明、lid部分がeIF3やCOP9/signalosomeに類似していて進化的に共通の祖先粒子から由来している可能性があることについて、(時の流れを忘れさせる)発表があった。Mayerは昆虫筋、ヒト脳、ヒト胎盤に、S10b(SUG2)-S6'(TBP1)複合体(220 kDa : DeMartino のmodulatorに相当)が存在し、26Sのキモトリプシン活性を2-4倍活性化することを報告。しかし、赤血球由来のmodulatorとは異なりp27サブユニットを含んでいないという。続いて、Hendil (Univ. Copenhagen)によりモノクローナル抗体を用いた26Sプロテアソームの構造解析(隣接サブユニット解析)の結果が示された。

午前の講演が終わると、ワインを飲みながらゆっくりお食事をして、午後3時からKloetzel (Humbolt Univ.), Wilk (Mt. Sinai Sch. Med.), Wojcik (Warsaw Med. Univ.), Monaco (Howard Hughes Med. Inst.), Dubiel (Humbolt Univ.), Wei (Yale Univ.)の話題提供である。Kloetzelはインターフェロン γ で誘導されるプロテアソームサブユニット(特にLMP7)の抗原提示における役割について、WilkはPA28 α , PA28 γ のプロテアソーム活性化とモジュレーションの機構について、またWojcikはPA28の細胞内局在について発表した。Monacoは20Sプロテアソームの構築機構について、またDubielとWeiはCOP9/signalosomeの構造と機能について発表した。また、この複合体が26Sのlidと進化的に関連がある、というデータが示された。

初日午後のセッションが終わると、City Hallで恒例の市長招待の晩餐会である。食前の長い挨拶の後で、プロテアソーム研究に貢献した科学者として、今回はRivettとCicchanoverが選ばれ、メダルが授けられた。受賞者は、いつもの厳しい面もちとは異なり、さすがに嬉しそうであった。

2日目の朝は、主にプロテアソームの病態生理機能に関連する発表があった。Mitch (Emory Univ.)は、筋肉におけるユビキチン・プロテアソームシステムの活性化に、グルココルチコイドが中心的な役割を果たすこと、Dahlman (Diabetes Forschungs

Inst.)は、糖尿病誘発時にプロテアソームの活性が変化することを示し、Hasselgren (Univ. Cincinnati)は肺血症(Sepsis)時にユビキチン・プロテアソームシステムが亢進(ユビキチンとプロテアソームサブユニットの遺伝子発現が亢進)し、筋原繊維蛋白質の分解が促進されることを示した。ミオシンやアクチンがプロテアソームによって分解される詳細な機構は不明だが、Ca²⁺によってカルパインが活性化され、それにより蛋白質が限定分解され、その後にN末端則に従って、ユビキチン化されて分解される機構を考えている。Attaix (INRA)は、癌のcachexia(吉田肉腫をラットの片足に移植し、もう一方の足の蛋白質分解を解析)にユビキチン・プロテアソーム系が関与すること、またその蛋白分解におけるホルモンやサイトカイン等の影響について報告した。またニトロソウレアを投与すると、健常および癌化した動物において、ユビキチン・プロテアソーム系がdown-regulationされることを示した。Crew (Yale Univ.)は、天然に存在する新規プロテアソーム阻害剤Epoximicinを同定し、その酵素学的、薬理的性質を調べた。本阻害剤はラクタシスチン(ちなみに、ポスター発表で別のグループから、ラクタシスチンはプロテアソームに特異的ではないという発表があったが)よりも速く不可逆的に結合するという。プロテアソームのCLE, TLE, PGPHの3つのサブユニットのいずれに対しても共有結合修飾するが、CLE活性に対する阻害が強い。アルデヒド性阻害剤、ビニルスルホン誘導体、ホウ酸誘導体と異なり、特異性が非常に高いという。in vitroではNF-κBの分解を阻害するし、in vivoでは抗炎症剤としての薬理効果を示す。市販されると利用範囲が広がりそうである。Groettrup (Cantonal Hospital)は、AIDS患者に広く投与されているHIV-1プロテアーゼ阻害剤RitonavirがLLnLと同程度にプロテアソームのキモトリプシン活性を阻害することを発表した。Ritonavir投与患者においては、HIV-1ウイルスの力価が低下しているにも関わらず、免疫監視機構が改善されないことが指摘されていた。今回、その理由の一つとして、プロテアソームに対する阻害を介したMHC Class-1拘束性抗原提示機能の低下が挙げられることを報告した。Margottin (Inst. Cochin)は、Hiv-1ウイルスのVpu蛋白質が感染細胞からのウイルス粒子の放出と

CD4の分解亢進の2つの機能をもつことから、その分子機構を探索。Vpuと相互作用する蛋白質を酵母2-hybrid法でスクリーニングし、Xenopus β -TrCP(F-box protein)に対するヒトホモログを単離した。この蛋白質のVpuとの結合にはVpuのSer52とSer56のリン酸化が必須である。Schmid (Univ. Blaize Pascal)からは、プロテアソームに会合しているRNAとRNaseの機能について発表があった。Groll (Max-Planck Inst.)は20Sプロテアソームの自己活性化機構について、Rivett (Bristol Univ.)は20Sプロテアソームと制御サブユニット複合体の細胞内での局在と、リン酸化されるサブユニットに関して発表した。DeMartino (Univ. Texas)は中心体にプロテアソームが会合していること、ミスフォールドしたCFTRやラクタシスチンを加えると中心体が大きくなること、ミスホールドしたCFTRを発現すると、ユビキチンプール、プロテアソーム成分、Hsp70が中心体に集まることを示した。Gordon (MRC)は分裂酵母における26Sプロテアソーム(GFP融合蛋白質として発現)の局在性を免疫蛍光法で解析した。

2日目の午後のセッションが終わると、お楽しみのCongress Dinnerである。バスによって、郊外にあるお城(中はレストランに改築してある)に連れて行かれる。日本ならバンケットが始まるのが6時頃で終わるのが8時半頃、というのが相場だが、ヨーロッパではとても遅い。午後9時頃からおもむろに前菜が配られ、食事が終わるのは12時過ぎである。バスで懇親会場(お城)に来ているので途中で帰ることも出来ない。最後まで皆さんがエンジョイできて大変すばらしい企画である。ホテルに着くと1時半頃であった。翌朝は9時からセッションが始まるというのに。

3日目。Braun (Humbolt Univ.)はクエン酸シンターゼをモデル基質とし、26Sプロテアソームにシャペロン活性があることを示した。Cicchano (Technion Israel Inst. Technol.)はNF- κ B前駆体p105の限定分解により生じるp50サブユニットのC末端にあるGlyに富む領域がプロセッシングシグナルとなることを示した。特にLys441とLys442はユビキチン化部位で、446-454はユビキチンリガーゼの認識部位として重要。Piechaczyk (Inst. Genet. Mol.- CNRS)は線維芽細胞を用いてc-Fosとc-Junの分解機構について、またFigliore-D-Pereira (Hunter Col. Cuny)は亜鉛、カドミウム、過酸化水素

により誘導される酸化ストレスがユビキチン・プロテアソーム系のどこに障害を与えるかについて示した。Hershko (Technion Israel Inst. Technol.) は、未発表データには触れず、サイクロソームのcdc2による活性化をSuc1が促進することを述べた。Tanaka (Tokyo Metropol. Inst. Med. Sci.)はPA28-20S-PA700といったハイブリッド型のプロテアソーム複合体の存在と、そのODC-AZの分解における重要性を示した。Wolf (Univ. Stuttgart) はERルメン内の可溶性蛋白質CPYと膜蛋白質Pdr5をとりあげ、その逆行性分解機構の異同について述べた。CPYの場合、Pdr5とは異なり、ルメン内のHSP70 Kar2が蛋白質の運搬に関与するが、いずれもUbc6,Ubc7によりユビキチン化され分解される。CPYの場合、ルメンからの輸送にもユビキチン化に関わるらしい。逆行性輸送に、新規ER膜蛋白質Der1, Der3/Hrd1, Hrd3が関わることも示した。Enenkel (Humbolt Univ.) は20S α サブユニットのPre6とATPaseサブユニットのCim5(Rpt1)にGFPのタグをつけて酵母内で発現させ、細胞内の挙動を解析。26Sプロテアソームが核膜/粗面小胞体膜のネットワークに局在することを示した。Sawada (Hokkaido Univ.) は新規ユビキチン・プロテアソーム系がマボヤの受精（特に精子の卵黄膜通過）に必須の役割を果たすことを示した。最後に、Mykles (Colorado State Univ.)が、ロブスタープロテアソームの構造-活性相関についてと、ショウジョウバエの変異体（ZとC5）を利用した解析について報告した。

上記のような口頭発表の他にも、多くの興味深いポスター発表があったが、ここでは省略させていただく。

6年前、このワークショップで、Baumeisterが古細菌の20SプロテアソームのX線構造解析の結果をきれいなスライドで示し、感激した記憶は今でも鮮明に残っている。そして、2回目のワークショップでは、Huberが酵母の20SプロテアソームのX線構造解析結果を示し、多くの聴衆を魅了した、と聞いている。そして今回の目玉として、筆者は26Sプロテアソームの構造解析が発表されるのではないかと期待して来たのだが、なかなかそう簡単ではないらしい。Baumeisterは電子顕微鏡観察の結果から予想される立体構造モデルを示したが、どの程度本当の形を反映してい

るのか、どうも判りにくい。X線構造解析の結果がないと安心できないのは筆者だけだろうか。なぜそんなに結晶化が困難なのだろうか？その理由を考えてみるに、おそらく制御蛋白質複合体が均一なサブユニット構成をしていないからではないか、と想像する。不均一であるが故に結晶化されてにくいのかも知れない。ベースとリップ部分に分けて結晶解析される可能性も考えられる。今後の研究の発展に大いに期待したい。

(北海道大学大学院薬学研究科 沢田 均)

2 千里ライフサイエンスセミナー「細胞内シグナルの制御ー ユビキチンとプロテアソーム」の報告

平成11年5月17日に、千里ライフサイエンスセンターにて、千里ライフサイエンスセミナーが上記のタイトルで10時から17時まで開催された。コーディネータの田中啓二先生（都臨床研）がはじめのご挨拶でも述べられたように、現在、生命現象の制御機構としてプロテオリシスの重要性が認識され、その中でも、ユビキチンとプロテアソームが、細胞内シグナルの制御のキーワードとして、今まさに注目を集めている。本セミナーは、演者の講演時間を比較的長くとり、二つのキーワードについての最新の研究成果をゆとりを持って聞けるように企画されていた。そのためか、焦点が絞られていたにもかかわらず、会場を埋め尽くした参加者から活発な質問・討論があり、また、セミナー後のアンケート結果でも好評であったと聞く。講演時間が短いと消化不良気味な気持ちを味わうことがしばしばあるが、本セミナーではじっくり聞いてよくわかったという満足感が残った。

最初の4つの話題は、ユビキチンが織りなす世界についてであった。山尾文明（国立遺伝研）は、ユビキチンシステムの概論のあと、細胞周期制御におけるユビ

キチンシステムに関する研究成果（分裂酵母のE2酵素であるUbcP4と、出芽酵母のE3酵素であるSCF複合体）について述べた。さらに、最近のユビキチンワールドの研究動向にも触れた。概論もゆっくり聞くとより理解が深まると実感した。また、いつ聞いても、全ゲノムが判明している出芽酵母にG2/M期で機能する必須E2酵素が見つからないのは不思議である。戸所一雄（理研）は、細胞周期のM期で機能するE3酵素であるAPCと、スピンドル形成チェックポイント機構について、研究成果を述べた。初めに、細胞分裂に重要な役割を果たすと考えられている中心体や動原体に、APCが存在することをきれいなスライドで示した。polo-kinaseもそこに存在するという。プロテアソームも細胞分裂装置の極周辺や染色体周辺に存在することから、ユビキチン依存的蛋白分解システム関連のすべての因子がそこに局在しているのであろうか（そして、その意味は？）。引き続き、APCに対する正と負のリン酸化について、また、APCに結合して基質蛋白質を認識するCdc20とCdh1の活性がリン酸化・脱リン酸化を介して制御され、その制御機構が逆（前者はリン酸化で活性化され、後者は脱リン酸化で活性化される）であることの意味づけについて述べた。さらに、Cdc20とMad2との相互作用を介するスピンドル形成チェックポイント機構について述べた。細かいことはともかく、APCを介するM期進行の制御機構はほとんど説明され尽くされた感があり、これからは細胞分裂が起きる場でのより深い理解へと研究が進むのであろう。安田秀世（東京薬大）は、癌抑制遺伝子産物p53のhct domain protein family (E6-APとMdm2)を介するユビキチン依存的分解機構について、研究成果を述べた。E6-APとMdm2の相同性から後者をE3酵素と考えたとのお話には、なるほどと納得させられた。Mdm2がring boxを有することから、他の因子との相互作用が十分期待できそうである。また、Mdm2はユビキチン化されるという。APCのCdc20やSCFのF-box蛋白質がユビキチン依存的に分解される様に、hct domain protein familyも分解されるのであろうか。さらに、p53は、I κ Bの場合とは異なり、同時にSUMO化もユビキチン化も受ける興味深い蛋白質と言えよう。それらのライゲーションのタイミングはどのようになっているのであろうか。中山敬一（九大生

医研)は、SCF複合体を介するカテニンとI κ Bのユビキチン化について、研究成果を述べた。今年に入って、両蛋白質のユビキチン化に関与するSCF複合体(特にF-box蛋白質)の同定に関する論文が怒濤のごとく報告されている。いずれも、ショウジョウバエのSlimbの機能解析の報告がきっかけという。その激しい競争の中で、SlimbホモログであるFWD1(他の報文では β -TrCPと記載されている)と名付けられたF-box蛋白質のクローニング、それを含むSCFの機能解析、さらには、そのknock-outもやってしまうという早業は、ただただ感嘆の一言である。SCFは、定義のように、3つの成分から構成されているだけなのか、あるいは、APCの様に、もっと多成分から構築されている複合体であろうか。SCFの分子多様性と多機能性との関連に興味を尽きない。

ユビキチンシステムに関する話題提供のあと、分解マシーンであるプロテアソームの関連で2つの話題が取り上げられた。横沢英良(北大院薬)は、プロテアソームと受精・発生制御に関して、研究成果を述べた。二つの生殖細胞が相互作用する受精の過程において、精子表面に存在するユビキチンと活性化された26Sプロテアソームにより、卵黄膜がユビキチン化され分解されるという魅力的な仮説を提案したが、ユビキチンの存在状態やマルチユビキチン化機構など、未解決な問題が山積している。また、卵の細胞分裂の進行に伴うプロテアソームの活性化機構とその意味づけについて、さらに、形態形成(脊索形成)に対するNF- κ B/Relの役割に関する興味深い仮説を述べた。いずれも今後の詰めの実験が必要である。田中啓二(都臨床研)は、プロテアソームの分子細胞生物学というタイトルで、拡大の一途をたどるプロテアソーム世界の全体像の説明と、プロテアソームに関する様々な研究成果について述べた。プロテアソーム制御サブユニットの中で、ユビキチン認識サブユニットについては、衆人が注目しながらまだ未解決な部分が多い。初めに、それに分子多様性があることと、発生過程でのプロテアソームの不均一性を示唆する結果が示されたが、embryonic proteasomeともいふべきプロテアソームの存在は極めて興味深い。続いて、ユビキチン非依存的なODCの分解機構について述べたが、その分

解に関与するアンチザイムの作用をユビキチンと類似の作用とも考えられるという説明は、理にかなっているように思える。さらに、血管新生、アポトーシス、あるいは、品質管理機構に関与するプロテアソームの機能について触れ、最後に、抗原提示におけるプロテアソームの機能に関する最新の知見を述べた。ユビキチンシステムの研究と比較すると、プロテアソームの研究はかなりの部分がわかった段階にきていると言えなくもないが、実は、解析手段が難しく未解決な重要な課題が残っているのが実状である。上記のユビキチンレセプターの課題、プロテアソームが有すると考えられているunfoldase活性の問題、あるいは、プロテアソームの構築原理の課題も、詳細は闇の中である。

今回のセミナーをゆったりとした気分で聞きながら、いろいろな空想が頭の中をよぎっては消えていった。今後の、ユビキチンシステムとプロテアソームシステムの両者の研究のさらなる進展によって、ユビキチン依存的蛋白分解の生物学的意義がより明確になることを願ってやまない。最後に、このようなセミナーを企画された田中啓二先生と山尾文明先生に深く感謝いたします。

(北大院薬・横沢英良)

3. CSH-Symposium "Biology of Proteolysis" の内容案内

Cold Spring Harbor Laboratoryが主催するCSHシンポジウムは大変に有名であり、これまで生物化学の様々な分野の発展に大きく寄与してきたことは周知の通りである。一昨年に、"Biology of Proteolysis"の第1回CSH会議が開催されたので、今回は2回目である。筆者は前回の会議に参加しなかったので側聞するに、第1回CSH会議は大変に盛況であったらしく、その中のトピックスが"Ubiquitin and the Cell Biology"と言う図書として出版され好評を博しているとのことである。今回は、Signal Transduction, Complexes and Cascades, Chaperones & Quality Control, Development, Cell Cycle, Infectious Diseases-Pathogen Interaction, Neoplasia, Cell Deathの

セッションの講演とポスター発表で構成されていた。発表は多岐の領域に亘っているため、個別の内容を解説することは困難である（時差と飽食で十分聴講していなかったのが一因でもある）。そこで、発表者と演題のリストを末尾に列記したので、興味ある方は参照されたい。筆者が最も興味を惹かれたのは、ユビキチンリガーゼとして作用するSCF (Skp1, Cullin-1, F-box protein) Complexに関する発表で、約20題あり、全体の約15%にも達していた。その研究の進展はすさまじく、長らく不明であったユビキチンリガーゼの大半はSCFで説明できる時代が間もなくやってくるとの印象を覚えた。なにしろ、F-box proteinは数百、Cullinは少なくとも6種、Skp1もおそらく機能的ファミリーを形成すると考えられており、SCFのみで1000種を凌駕する分子多様性が存在する可能性が指摘されているのである。本シンポジウムにおける最大のトピックスは、このSCFを構成する3分子複合体に第4番目の役者、即ち酵母のRbx1 (Ring box factor-1)および哺乳動物のRoc1 (Regulator of cullin-1) が加わったことである。筆者らは、会議に参加する直前に出版されたScienceとMolecular Cell誌のRbx1とRoc1に関する4論文をニューヨークまでの長い飛行機の中で読んでいたのでさほど驚かなかったが、それでも突然に登場したこれらの分子群に関する発表は、会議の中で一際注目された。筆者が驚いたのは、ヒトに存在する6種のCullinが全てSCFユビキチンリガーゼのコンポーネントとして作用することを示唆した講演であった(Ohta, T.らの発表)。これまでにSkp1はCullin-1としか相互作用しないことから、SCFの中でCullin-1のみがSCFの役者になり得ると考えられていた。事実、I κ B α や β -CateninのSCFとして作用するのはこのCullin-1であることがごく最近明かになったところである(本年度に入って十数編の論文が発表された: SCFに関しては“ぷろておりしす”9号の畠山のミニレビュー及び細胞工学5月号の小南の総説を参照されたい)。また、Cullin-2がElonginB/CやpVHLと複合体を作ることの発見もこの複合体がSCF様のユビキチンリガーゼとして作用する可能性を示唆している。しかし、発表した内容では、ターゲットが同定されておらず、実験的証明としては必ずしも確実であるとの印象は持たなかったが、筆者等は

別のCullinのパートナー分子を同定中のこともあって、この推定はおそらく正しいと推測している。SCFは今後の発展が期待される最も刺激的なテーマである。もう一つ驚いたことは、CDKインヒビターであるp27のユビキチンリガーゼが同定されたことである。Paganoらは、そのリガーゼがSCF^{Skp2}であると発表した。Skp2はSkp1と同様に癌細胞で強く発現している分子として数年前にD. Beach等が同定していたが、このSkp2もF-box蛋白の一種であることから話としては頷ける。Paganoの講演の何となく負のイメージは、彼らがp27がユビキチンシステムで分解されることを報じた数年前のScienceの論文が眉唾ものであることを多くの聴衆が知っているからである。即ち、p27のユビキチン化には、サイクリンE/CDC2キナーゼによるリン酸化が必須であることが判明しているが、Science誌の論文ではこの観点が欠如しており、また網状赤血球ラーゼトでのユビキチン化の実験系の追試が概ね不可能になっていたからである（しかし、今回の発表データは完璧のように思えた）。さらに驚いたことに、ごく最近、このSCF^{Skp2}はE2F1のユビキチン化を触媒することが、本年度創刊のNature Cell Biol. (1, 14-19, 1999) に発表されたことである。このように、SCFの研究はこれまで不明であった多くの蛋白質の分解機構の解明に大きく貢献することが期待されている。筆者らはもはやどのような蛋白質がSCFによってユビキチン化されても驚かない時代に入ったと認識している。今後、SCFに関する論文は洪水のように溢れ出すであろう（筆者の知る限り、すでに十数編の論文が発表予定とのことである）。そして、細胞周期やシグナル伝達におけるSCFの役割の重要性は、今後、増加の一途を辿ると考えられる。しかし、SCFが普遍的に重要な役割を担っていることが明らかになるにはもう少し時間が必要であるかも知れない。このような状況を省みると、2年後の第3回CSH会議においてSCF研究がどのように進展しているかを今から大いに期待せずにはいられない。あるいはSCF研究の熱は冷めて新しい話題が出現しているのであるだろうか？ 時代の流れは激しいが、それに翻弄されることなく地道にしかし時代を切り開くような魅力あるテーマに取り組みたいものである。本CSHシンポジウムにおいては、他にも多くの興味深い話題が多数

発表されたが、それらは全て割愛させて頂いた（冒頭に述べた理由により）。

さて、会議の総参加者数は約200名強といったところで、日本からは欧米に留学している若手研究者を含めて約10名程度が参加していた。CSHシンポジウムに参加したことのある研究者はご存じのように、本会議は早朝から夜10～11時に至るまで食事時間を除いてほとんど休憩無しの過酷なスケジュールで営まれる（ピアノコンサートとロブスターを食する晩餐会を除いて）。しかし、個人的に休息するのは勿論自由であり、この特権を生かす参加者が後半には随分と増えたように思えた。もっともCSHは逃避すべき場所もない僻地であるので、否応なしに会議への参加を強制される（実際、CSHLは一日がかりでマンハッタンまで出かけるより他には遊ぶ場所はない）。やむなく筆者は毎晩、会議の終了を待ちかねて深夜までビールを楽しんでいた。しかし、情報収集・情報交換と言った意味では、このCSH会議に参加することの大切さを十分に認識した。ご存知のようにProteolysisのBiology研究は時代の寵児になりつつあり、生命科学の発展に深く貢献することに疑念の余地はないであろう。この意味では、「本特定研究」はまさに時代を先取りしたテーマに先鞭をつけたと言っても過言でないと思われる。この特定研究の班員の中から「世界を驚愕させるような大発見してCSH会議の花形になるような活きのいい若手」が出現することを切望したい。

（田中啓二・都臨床研分子腫瘍学部門）

CSHシンポジウムの発表Title (Presenting Author)

1. **A functional link between the yeast DOA4 deubiquitinating enzyme and the vacuolar protein sorting (Amerik, A.Y.)**
2. **Roles for 20S proteasome β -subunit propeptides in prevention of active site catalytic inactivation (Arendt, C.S.)**
3. **Peptidyl diazomethylketones effectively inhibit the HRV 3C protease and prevent virus replication by blocking viral polyprotein processing in infected cells (Babe, L.M.)**
4. **Proteasomal degradation of the tumor suppressor Rb in cervical**

- carcinoma cells (Bagchi, S.)
5. **The 26S proteasome-A molecular machine designed for controlled proteolysis** (Baumeister, W.)
 6. **Proteolysis of storage proteins in the seeds of higher plants** (Belozersky, M.)
 7. **Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase** (Ben-Neriah, Y.)
 8. **Granzyme A loading induces rapid cytolysis and DNA damage independently of caspase activation** (Beresford, P.J.)
 9. **Transtranslation in *E. coli*** (Binet, E.)
 10. **Characterization of Eupaulysin, a multifunctional collagenolytic serine proteinase or brachyurin from Antarctic krill (*E. superba*)** (Bjarnason, J.B.)
 11. **Targeted disruption of C-CBL leads to dysregulated cell surface receptor expression, and perturbed receptor ubiquitination and degradation** (Bowtell, D.D.)
 12. **Discovery of a new family of thiol proteases related to nitrilases in a conserved animal tumor suppressor pathway** (Brenner, C.)
 13. **Active-site labeling of cathepsin S in dendritic cells** (Bryant, R.A.R.)
 14. **Identification of in vivo substrates of the DnaK chaperone system** (Bukau, B.)
 15. **Interaction of HCV NS3 proteinase domain and NS4A-(1)Resoration of NS4A cofactor activity by N-biotinylation of mutated NS4A and (2)Cross-genotype comparisons** (Butkiewicz, N.J.)
 16. **Elastase substrate specificity tailored through substrate-assisted catalysis and phage display** (Carter, P.)
 17. **Identification of six novel human F-box proteins and involvement of FBP1/b -TRCP in the regulation of β -catenin stability** (Cenciarelli, C.)
 18. **The conformational behavior of heparin-papain interactions** (Chagas, J.R.)
 19. **A regulatory switch for induction of monocytic differentiation and apoptosis of a myeloid progenitor cell line** (Chang, Z.)
 20. **Activation of an MDM2-specific caspase by p53 in the absence of apoptosis** (Chen, J.)
 21. **Covalent modification of all members of human cullin family proteins by a new NEDD8-ligating system** (Chiba, T.)
 22. **Genetic analysis of the F-box family of proteins in *S. cerevisiae*-Specificity factors of the SCF ubiquitin ligase** (Chu, C.)
 23. **Structure of bacterial signal peptidase-A protease involved in protein secretion** (Dalbey, R.E.)
 24. **The role of an F-box protein in *Dictyostelium* development** (Dao, D.)
 25. **Characterization of the vertebrate SUMO-1 conjugation pathway**

(Dasso, M.C.)

26. **Ubiquitin-mediated destruction of the Ras/Rac exchange factor Ras-GRF2** (de Hoog, C.L.)
27. **Bacterial plasminogen activator and host hemostatic factors contro the local inflammatory response and determine the virulence of pestis** (Degen, J.L.)
28. **Identification of novel murine cysteine proteases of the papain family** (Deussing, J.M.)
29. **The role of regulated proteolysis in budding yeast DNA replication** (Diffley, J.)
30. **Three modes of degradation for Cdc6p in budding yeast** (Drury, L.S.)
31. **Extracellular proteolysis in filamentous fungi-Secreted proteases as main participants of the process, regulation of their synthesis** (Dunaevsky, Y.)
32. **Proteasome inhibitors alter the orderly progression of DNA synthesis during S phase in Hela cells and lead to re-replication of DNA** (Dutta, A.)
33. **More efficient MHC class-I restricted, proteasome-dependent presentation with antigen located in the exocytic compartment (ER) vs. the cytosol** (Eisenlohr, L.C.)
34. **Proteinases and proteinaceous proteinase inhibitors from the midgut of the cockroach *N. cinerea*** (Elpidina, E.N.)
35. **Distinctive subcellular localization of endopeptidases EP24.15 (EC 3.4.24.15) and EP25.16 (EC 3.4.24.16) in the rat brain** (Ferro, E.S.)
36. **Regulation of signaling pathways controlling patterning and cell-fate decisions in Dictyostelium by ubiquitin-mediated protein degradation** (Firtel, R.)
37. **The Skp1 and Cull1 ubiquitin ligase components localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle** (Freed, E.)
38. **Functional significance of disintegrin domains and cystein-rich domain in meltrin α and β , ADAM metalloproteases** (Fujisawa-Sehara, A.)
39. **Activity of multicorn, a new large proteolytic complex from fission yeast, is regulated by its oligomerization** (Gaczynska, M.E.)
40. **A proteasomal targeting pathway (xMEL) controls pineal melatonin production** (Gastel, J.A.)
41. **How membrane proteases control membrane lipids** (Goldstein, J.L.)
42. **Lon-mediated proteolysis of the E. coli UmuD mutagenesis protein-*In vitro* degradation and identification of residues required for proteolysis** (Gonzalez, M.)
43. **Regulated degradation of RpoS** (Gottesman, S.)
44. **Fractionation of an MDM2/p300-dependent p53 ubiquitinating**

- activity** (Grossman, S.R.)
45. **Expression of a multifunctional krill protease** (Gudmundsdottir, A.)
 46. **A footprint of the protein-protein interactions in a ubiquitin-E2 thiol ester by NMR spectroscopy** (Hamilton, K.S.)
 47. **Combinatorial methods used to define the biological function of serine proteases involved in cytotoxic lymphocyte mediated cell death** (Harris, J.L.)
 48. **Activation of an extracellular serine protease cascade required for dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo** (Hashimoto, C.)
 49. **The eukaryotic proteasome catalyzes the maturation of caspase-1 in *S. flexneri*-induced macrophage apoptosis** (Hilbi, H.)
 50. **Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases** (Hill, C.)
 51. **A novel family of cysteine proteases responsible for cleaving the SUMO-1 and Smt3 ubiquitin-like proteins from substrates** (Hochstrasser, M.)
 52. **Revealing the subunit composition of the 19S regulatory complex of the *Drosophila* 26S proteasome** (Hoelzl, H.)
 53. **A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly** (Hoppe, T.-.)
 54. **Regulation of the SRC family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination** (Howley, P.M.)
 55. **Functional domains and cellular functions of WW-hect ubiquitin-protein ligases** (Huibregtse, J.M.)
 56. **Intracellular formation of aggresomes** (Johnston, J.A.)
 57. **Crystal structure of human bleomycin hydrolase, a self-compartmentalizing cystein protease with significance for cancer chemotherapy and Alzheimer's disease** (Joshua-Tor, L.)
 58. **Intrinsic high steady-state turnover rate of the heat shock s factor σ^{32} at high temperature-Implications on the heat shock regulation in *E. coli*** (Kanemori, M.)
 59. **Pest sequences mediate the auto-ubiquitination and degradation of the E6-associated protein (E6AP)** (Kao, W.H.)
 60. **Genetic and biochemical characterization of fission yeast SCF-ubiquitin ligase** (Katayama, S.)
 61. **The roles of proteases in the regulation of cell cycle** (Kirschner, M.)
 62. **An essential function of Grr1 for the degradation of Cln2 is to act as a binding core that links Cln2 to Skp1** (Kishi, T.)
 63. **Different proteolytic sites in mammalian proteasomes allosterically regulate each other's activities, suggesting an ordered ("bite-chew")**

- mechanism for protein breakdown (Kisselev, A.F.)
64. An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin (Kitagawa, M.)
 65. Destruction of cyclin E is dependent on the SCF complex (Koepp, D.M.)
 66. Hedgehog signaling regulates the proteolytic conversion of the *Drosophila Cubitus interruptus* protein to a functional repressor (Kornbert, T.)
 67. Cysteine proteinase inhibitors stefins A, B and cystatin C-Suppressive or promotive factors in tumor progression? (Kos, J.)
 68. Caspase activation and mitochondrial changes are blocked by gelsolin in Fas-mediated apoptosis of Jerkat cells (Koya, R.C.)
 69. Generation and analysis of meltrin α -deficient mice (Kurisaki, T.)
 70. Mutations in the yeast *scf4* gene identify a new subunit of the SCF ubiquitin ligase complex (Lammer, D.)
 71. Biochemical analysis of the budding yeast anaphase promoting complex (Leng, X.)
 72. Granzyme A activates a novel Dnase (Lieberman, J.)
 73. Activation of proteinase activated receptor-3 by gingipain-K from *P. gingivalis* leads to platelet aggregation (Lourbakos, A.)
 74. Retinoblastoma protein-dependent step in regulating protein stability of mitotic cyclins (Lukas, J.)
 75. Proteasome mutants *pre4-2* and *umpl-1* suppress the unknown essential function but not the mitochondrial RNA processing function of the multi functional yeast gene, RPM2 (Lutz, M.S.)
 76. Pleiotropic defects caused by loss of the proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 (Madura, K.)
 77. Parasite proteases-New biological insights from very old enzymes (McKerrow, J.)
 78. The role of subtilisin-type proteases in invasion by *T. gondii* tachyzoites (Miller, S.A.)
 79. Proteasome-dependent degradation of Cdc25A (Molinari, M.)
 80. Characterization of the physiological role of bleomycin hydrolase through knockout mice (Montoya, S.E.)
 81. Accelerated turnover mutations in pyruvate dehydrogenase (PDH) deficiency and mutation targeted treatments (Morten, K.J.)
 82. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation, and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S-deficient mice (Nakagawa, T.Y.)
 83. Identical ubiquitin system mediates the degradation of topoisomerase

- Ila in both of the cell cycle and the E1A-induced apoptosis** (Nakajima, T.)
84. **Ubiquitin-dependent degradation of IκBα is mediated by a novel ubiquitin ligase SCF^{FWD1}** (Nakayama, K.)
 85. **A novel ATPase complex, homologous to the ATPases in the eukaryotic 26S, activates protein breakdown by 20S proteasomes from *archaeobacteria*** (Ng, D.)
 86. **Cell-free degradation of p27^{Kip1}, a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor is dependent on CDK2 activity and the proteasome** (Nguyen, H.)
 87. **A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome** (Niedermann, G.)
 88. **ROC1 and APC11 represent a family of ubiquitin ligases** (Ohta, T.)
 89. **Ubiquitination of p27 is regulated by CDK-dependent phosphorylation and trimeric complex formation** (Pagano, M.)
 90. **Concurrent chaperone and protease activities of ClpAP and the requirement for the N-terminal ATP binding site for chaperone activity** (Pak, M.)
 91. **Human Cdc34 and Rad6 ubiquitin-conjugating enzymes target bZIP transcriptional repressors for proteolysis-Implications for spermatogenesis** (Pati, D.)
 92. **Catabolism of c-Fos and c-Jun proto-oncoproteins in serum-stimulated fibroblasts** (Piechaczyk, M.)
 93. **Distribution of thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in the male reproductive system** (Pierotti, A.R.)
 94. **Regulation of expression of the thimet oligopeptidase gene** (Pierotti, A.R.)
 95. **Mapping of the polyubiquitin proteolytic signal** (Piotrowski, J.S.)
 96. **Proteolysis of AT-III within the reactive site loop results in an anti-angiogenic molecule** (Pirie-Shepherd, S.R.)
 97. **Thimet oligopeptidase a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation** (Portaro, F.V.)
 98. **A structural basis for ubiquitin conjugating enzyme evolution** (Ptak, C.)
 99. **Ubiquitin-mediated proteolysis is essential for development of *D. discoideum*** (Pukatzki, S.U.)
 100. **Ump1p prevents premature processing and activation of proteasomal precursor complexes** (Ramos, P.C.)
 101. **Processing of Notch ligands** (Rand, M.D.)
 102. **Organization of functional and structural domains in *E. coli* Lon protease** (Rasulova, F.)
 103. **Identification of a novel *Xenopus* SCF ubiquitin ligase complex required for cell cycle progression** (Regan, J.D.)

104. **Proteolytic steps in the generation of MHC class I-presented peptides**
(Rock, K.L.)
105. **Proteolysis is a key regulatory mechanism in a bacterial cell cycle**
(Ryan, K.R.)
106. **Caspase 8 is required for polyglutamine-induced cell death** (Sanchez, I.)
107. **Sequential ubiquitination and deubiquitination is required for the proteolytic processing of the NF- κ B1 p105 protein** (Sears, C.P.)
108. **Serine proteases regulate epithelial and stromal remodeling during mammary gland involution** (Selvarajan, S.)
109. **The role of meltrin β /ADAM19 metalloprotease in the processing of neuregulin** (Shirakabe, K.)
110. **Function of Cdc20 in budding yeast** (Shirayama, M.)
111. **Polypeptide activators of the Lon protease** (Shrader, T.E.)
112. **Stability of ClpA and ClpAP oligomeric states during cycles of ATP hydrolysis and proteolysis** (Singh, S.K.)
113. **Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination by an SCFGRR1 complex requires a new SCF component Rbx1** (Skowyra, D.)
114. **Antitumor activity of KF25706, radicicol 6-oxime, via selective depletion of Hsp90-associated signaling molecules** (Soga, S.)
115. **TIMP-2 is needed for efficient MMP-2 activation *in vivo*** (Soloway, P.D.)
116. **Control of complement-dependent immunity by the TIMP-1/MMP axis involves three mechanisms** (Soloway, P.D.)
117. **Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA-protease in mitochondria** (Steglich, G.)
118. **Regulation of meiotic nuclear division by Mct1p, a new component of a meiosis-specific APC** (Strich, R.)
119. **I κ B α ubiquitination is catalyzed by an SCF-like complex containing Skp1, cullin-1, and two F-box/WD40-repeat proteins β TrCP1 and β TrCP2**
(Suzuki, T.)⁴
120. **Proteolysis of mitochondrial precursor proteins-Isolation and characterization of a novel protease from *S. oleracea*** (Szigyarto, C.)
121. **Effect of the engineered disulfide bonds on the thermostability and catalysis of *B. subtilis* subtilisin E** (Takagi, H.)
122. **Characterization of a membrane-type serine protease implicated in prostate cancer and development** (Takeuchi, T.)
123. **Ste24p, a dual function integral membrane zinc metalloprotease, required for maturation of the yeast mating pheromone α -factor** (Tam, A.)
124. **Isolation and characterization of a novel high molecular weight peptidase complex from *P. furiosus*** (Tamura, T.)

125. **Biochemical and immunological characterization of the PA28 proteasome activator family proteins** (Tanahashi, N.)
126. **Transcriptional activation domains that signal ubiquitin-mediated proteolysis** (Tansey, W.P.)
127. **Selective degradation of deamidated (aged) and APO-calmodulin by the 26S proteasome is independent of ubiquitination** (Tarcza, E.)
128. **Caspases and their roles in apoptosis** (Thornberry, N.A.)
129. **Detecting and measuring cotranslational protein degradation *in vivo*** (Turner, G.)
130. **Differential estrogen dependent expression of MMP-2 and MMP-13 in the RUCA-I endometrial tumor cells *in vitro* and *in vivo*** (Tuhaus, L.)
131. **Anaphase is triggered by proteolytic cleavage of the cohesin subunit Scc1p in *S. cerevisiae*** (Uhlmann, F.)
132. **Translational attenuation at the initiation level of chloroplast-encoded ClpP in *C. reinhardtii*-Effect on the degradation of thylakoid membrane protein** (Vallon, O.)
133. **NEDD8-modification and Von Hippel-Landau syndrome** (Wada, H.)
134. **Matrix metalloproteinases in the initiation and progression of cancer** (Werb, Z.)
135. **The enhanced proteolytic activity in cells adapted to grow in the presence of proteasome inhibitors contributes to the processing of a proteasome independent CTL epitopes** (Wherry, E.J)
136. **The role of ClpA in protein remodeling and protein degradation** (Wickner, S.)
137. **Non-hydrolyzable polyubiquitin chain analogs as specific inhibitors of ubiquitin-dependent processes** (Wilkinson, K.)
138. **Activation of a UBC4-dependent pathway of ubiquitin conjugation during postnatal development of the rat testis** (Wing, S.S.)
139. **Mammalian SCF ubiquitin ligases-SCF ^{β -TRCP} binds phosphorylated destruction motifs in I κ B α and β -catenin and stimulates I κ B α ubiquitination *in vitro*** (Winston, J.T.)
140. **Chaperone rings in protein folding and degradation** (Woehl, E.)
141. **Maturation of human cyclin E requires folding by the eukaryotic chaperonin CCT** (Won, K.)
142. **Modulation of a deubiquitination enzyme by incorporation into the PA700 (19S) proteasomal regulatory complex** (Xu, W.)
143. **Components of the I κ B α -ubiquitination machinery** (Yaron, A.)
144. **Dynamic SCF ubiquitin-protein ligases and degradation of cellular non-SCF substrates** (Zhou, P.)

(5) ミニレビュー

1. Wee1 ‘小’ 事件

細胞周期の分野はプロテオリシス研究の宝庫であり、cyclin, 諸Cdk阻害因子(CDI), APCなど蛋白分解関係の因子の枚挙にいとまがない。このミニレビュー(?)では、最近遭遇したWee1に関する小さな事件について少しお話ししたい。

私達はこの数年、ツメガエル初期発生における様々な細胞周期制御因子の発現や機能を解析しているが、多くの制御因子が卵成熟(減数分裂)や初期胚発生で大きな量的変動(すなわち合成と分解)を示すのに驚かされてきた。このような因子の中にWee1があった。Wee1は周知の通りCdc2のY15をリン酸化するCdc2阻害キナーゼであるが、昨年末に、ツメガエル卵内のWee1の量が受精直後20-30分に激減することを見つけたのである。もしこれが積極的な分解によるとすると、Wee1はcyclinBやMosに次ぐ「受精で分解される稀有な蛋白質」ということになり、柳の下のドジョウ(?)をねらったいろんな実験を即座に組んだのである。

ところが、その計画を実行に移そうとした矢先、Science誌にツメガエル卵無細胞系を使ったWee1の分解に関する論文が発表されたのである(Science, 1998年12月号, 282, 1886-1889)。この論文では、Wee1がCdc34ユビキチンリガーゼ/SCF複合体依存的に分解され、この分解がDNA複製チェックポイントによって阻害されることが示されていた。すなわち、Wee1はS期の終了(G2期)にCdc34/SCF経路で特異的に分解され、この分解がM期への移行に重要であることが述べられていたのである。実はこの論文では、5ヶ所ものFigure(主にウェスタンブロット)が脱落していて、とてもその内容を正確に評価できる状態ではなかった。しかし、言わんとするところは明白であって、それは私達にとってまさに青天の霹靂であった。

そこでやむなく、受精におけるWee1の分解の問題は半ばあきらめた。その代わ

り、卵減数分裂でのWee1の機能に関してデータが集まりつつあったので、論文執筆のために関連論文を調べはじめたのである。そうすると、おもしろいことが分かってきた。まず、ヒト細胞や分裂酵母 (*S. pombe*) では、細胞周期 (特にG2/M期) に依存的なWee1の分解の論文がすでに2, 3編報告されていたのである (EMBO, 1995年, 14, 1878-1891; JBC, 1997年, 272, 13320-13325)。しかし、これらの論文は上記Science誌の論文には全く引用されていなかった。さらに調べてみると、実は出芽酵母 (*S. cerevisiae*) で、Swe1 (出芽酵母のWee1ホモログ) がまさにCdc34/SCF依存的に分解されることが一流誌とされるGenes & Development誌 (1998年8月号, 12, 2587-2597) にすでに報告されていたのである。しかし、上記のScience誌論文にはこの論文も引用されていなかった。両論文は発行時期が4ヶ月の差でかなり近接しているが、Science誌論文の投稿, revision, 発行の期日から見て、Genes & Development誌に言及する機会は十分にあったはずであるが、引用されていなかったのである。しかし、このScience誌論文には大幅なFigureの脱落もあり、その時は、何かの間違いだらうと思っていた。

さてその内に、Figureの脱落の訂正が掲載された (Science, 283, 35; 283, 2102)。訂正Figureは元より、その訂正に上記の引用漏れ(?)の謝辞でもあるかと注意して見てみたが、それらしいものは一切なかった。なぜこのようなことが起こったのか不可解である。思うに、Science誌論文の筆頭著者はポストドクであり、この分野では新参者のようであった。このため、例えば出芽酵母のSwe1をWee1のホモログと思わなかったのかも知れない (Genes & Development誌論文のタイトル/要旨にはSwe1としか出ていない)。しかし、最終著者 (著者は二名のみ) は細胞周期の分野では一流の研究者であり、この点で、Genes & Development誌のみならずEMBO誌やJBC誌の引用漏れは腑に落ちない。(かく言う私も関連論文を調べるまでは上の3論文を知らなかったわけで、人の事をとやかく言えた義理ではないが、それでも、投稿までには当然調べておくべきことであつたらう。) Science誌論文で腑に落ちない点が更に2つあった。1つはそのポストドク氏自身がcorresponding authorになって

いることであり、他の1つは、(失礼ながら)論文中のWee1の分解の記述が取って付けた様になっていることであった。こうなると何か釈然としないものを感じるのだが、そう思うのは私1人だけであろうか？

さて、事の真相はともかく、Science誌論文を見るとWee1の分解機構とその生理的意義が一遍に解決されたかに見える。しかし、少なくとも初期発生においては、事実はかなり複雑そうである。Science誌では、精子核DNAを大量に加えたツメガエル無細胞系を用いて、Wee1がS期において複製チェックポイントで安定化され、G2期に約半分が分解されるとしている。これは確かに、酵母等のS期におけるWee1の安定性を良く説明できる。また、逆説的であるが、ツメガエル卵の受精直後(S期に相当)でのWee1の分解—冒頭の私達の“発見”—も説明できる。なぜならば、核DNA/細胞質の比が非常に小さい卵では複製チェックポイントが働かないため、S期でもWee1が不安定になると考えられるからである。しかし、受精後に最もCdc2のY15のリン酸化の亢進するG2期におけるWee1の安定性を説明できない(また、なぜG2期以前に分解されるのか、その意義を説明できない)。更に、G2期で停止した卵母細胞にはWee1は存在しないが、ectopicにWee1を発現させるとG2期であるにも関わらずきわめて安定である。加えて、これまで述べてきたツメガエルWee1は母性型Wee1であって、最近私達の見出した体細胞型のツメガエルWee1は母性型Wee1とはかなり異なった代謝的安定性を持つようである。更にまた、いくつかの体細胞種でS期におけるWee1の安定性は共通しているが、不安定な時期は必ずしもそうでない。このように、Wee1の分解とその意義については未だ不明な点が多いのである。Wee1はS期とM期のカップリングとG2チェックポイントに関与するきわめて重要な負のCdc2レギュレーターであり、その分解機構と意義の解明は益々重要な課題になろう。

このミニレビューならぬ雑文では、Wee1 ‘小’ 事件ということで半ば憶測を交えてごく簡単に一筆書かせて頂いた(Weeとはスコットランド語で‘小さい’ことを意味する)。あとで知った事だが、例のポストドク君は昨年末のアメリカ細胞生物学会でWee1の分解ドメインとその役割について発表したようである(Mol. Biol.

Cell 9, 242a)。同君の次の論文を楽しみにしているが、今度はくれぐれも引用漏れ(?)のないように祈っている次第である。

(九州大学：佐方功幸)

2. インテグリンを介した細胞接着とカルパイン

インテグリンは、 α と β サブユニットからなる細胞表面に発現する接着因子である。ここでは、インテグリンを介した細胞接着にカルパインが関与する興味深い現象について紹介したい。

インテグリンを介した接着調節は様々に調節されており、インテグリンの種類やその修飾、細胞外の活性化因子やリガンドの存在、細胞骨格系の結合タンパク質、あるいはシグナル伝達分子によって、細胞内外から複雑に調節されている。簡単に分けてしまうと、インテグリンの接着に関する要因は、1) 細胞での発現および、2) 立体構造の変化である。つまり、細胞内タンパク質、または細胞外二価金属イオンによって活性化されていてリガンドに結合できる状態にあるかということである。そして、接着部位にどのくらいインテグリンが集積するか、アクチン骨格の形成を伴うか、どんなシグナル伝達分子が関与するか、といったことも重要であろう。ここではインテグリンを介した接着とカルパインの関連について書きたいと思う。インテグリンの活性化やアポトーシスに伴って、インテグリンの短い細胞内ドメイン (cytoplasmic domain) のカルパインによる切断が見られることが報告されている。これは主に $\beta 3$ インテグリンに関して既に研究が進んでおり、細胞機能との関連もかなり興味深いところである (1, 2)。

$\beta 4$ 以外の β インテグリンの細胞内ドメインは約40アミノ酸残基からなり、2箇所のNPXY motif から成るチロシンリン酸化部位を持っている。また、 $\beta 1$ について

は、細胞骨格関連分子の α -アクチニン、テーリン、パキシリンや、シグナル伝達分子の pp125FAK などとの結合部位が良く分かっている。分かり易いレビューも出ているので、そちらを参考にさせていただきたい (3)。 $\beta 1$ インテグリンにおける NPXY motif のチロシンリン酸化の意義については、接着に全く影響しなかったことなどから論議の対象とされていたが、方向性のある細胞遊走には必要であるとの報告 (4) があり、私は非常に納得した。

好中球のビトロネクチンへの $\alpha v \beta 3$ を介した接着で証明されていることであるが、細胞遊走において、後ろ足をひっぺがす際には局所的な Ca^{2+} の上昇が起こる。これをキレートしてしまうと、前足 (leading edge) は出るのだが、後ろ足がひっぱがれないので、前に進めないのである (5)。その時、アクチンは前足へ移動するが、 $\beta 3$ インテグリン、テーリンは、後ろ足に残ったままなのである。

後ろ足をはがす過程には、カルシニューリンが関与していることが示唆されているが、さて、カルパインはどうであろうか？ カルパインが Ca^{2+} の上昇に伴い膜へ移行し、インテグリンやテーリンを切ることで rear detachment が起こるとしたら、それはいかにもありそうな話だし、「カルパインは細胞遊走に必要」ということで、カルパインの重要な生理機能が明らかになることになる。実際、かなり以前ではあるが、m-カルパインが接着斑に存在するという報告もある (6)。が、似たようなことを考える人はいるもので、既に論文がいくつか出ている (7-9)。しかし、下記のインヒビターの特異性の問題があって、私は信じていない。まだまだ検討の余地あり、である。むしろ、カルパインインヒビター I が細胞遊走を阻害するというなら、プロテアソームの関与も考えられる。これはまだまだこれからの領域ではあるが、いくつか報告が出てきており (10、11)、2-3 年のうちにはかなりの数になるだろう。が、プロテアソームインヒビターが、アクチン骨格、接着斑集積タンパク質の分解の阻害剤として関与するのか、はてまたインヒビターにより誘導されるストレスタンパク質によるによる 2 次的な影響なのか、それとも NF κ B 不活化によるマトリックスメタロプロテアーゼなどの合成、分泌が止まったためなのか (10)、そのメカニズム

は是非これから解明されるべきことである。

一方、血小板の活性化において、カルパインは、細胞膜裏打ち構造に移行し、フォドリンやテーリン、そしてシグナル伝達分子 pp125FAK を切断する。また同時に、カルパインは、 $\beta 3$ インテグリンのC末端領域も切断する(図1)。これらのタンパク質分解および血小板活性化はカルパイン阻害剤 (E64d) によって阻害されるので、カルパインが関与していることは間違いないと思われる。この説が非常に魅力的なのは、インテグリンの切断に伴いインテグリンC末端領域に結合する細胞骨格関連分子の種類や数、親和性が大幅に変わると予想されるからである。カルパインは血小板の不可逆的な活性化に必須のようである。また、別の見方をすれば、 $\beta 3$ インテグリンC末端切断によって不可逆的に血小板の活性化が引き起こされるのかもしれない。

また、去年、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の浮遊培養、または serum starvation によるアポトーシスの初期において、 $\beta 3$ インテグリンC末端切断が起こり、それが原因でアポトーシスが引き起こされるのではないかという論文(2)が出た。いうなれば、(接着細胞では) 死んだ細胞がなんで浮遊しているのかということ、カルパインがインテグリンC末端を切断するために脱接着するからだというのだ(!)。

では、 $\beta 1$ を含む他のインテグリンではどうであろうか。コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの細胞外マトリックスからのシグナル伝達に、それらのレセプターである $\beta 1$ インテグリンは、活性化に伴いそのC末端は切断されるであろうか? 活性化に伴いインテグリンの一部のC末端が分解されることはあるかもしれないが、活性化とC末端分解とは同義ではないだろう。C末端分解が起こるとするのは、上記の血小板の例のようにかなり激しい活性化ではないだろうか。growth factor やホルモン刺激などによる様々な刺激に対してのフィードバック機構と同様の、インテグリンを不活化するフィードバック機構なのだろうか? それとも、インテグリンの活性化には2種類あり、通常のインテグリンの活性化によるシグナルカスケードと、C末端切断による別のシグナルカスケードが存在するのであるだろうか? 興味は尽

きない。

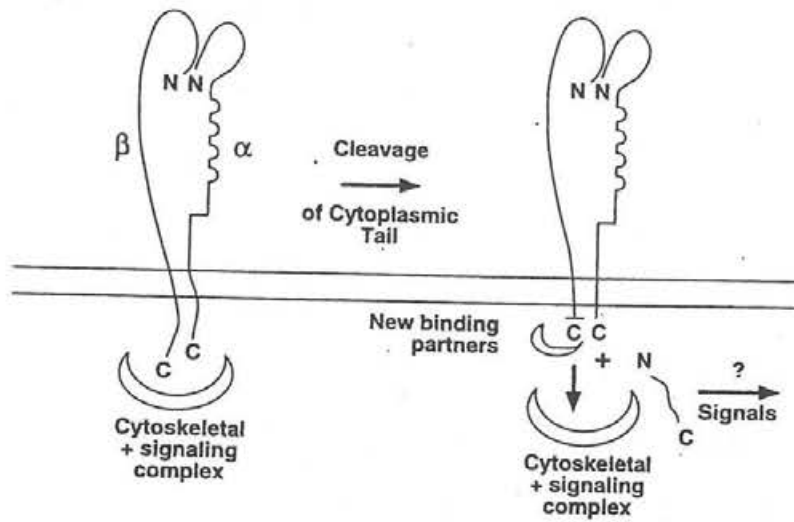
最後に、カルパイン特異的阻害剤について一言書こうと思う。現在、カルパイン阻害剤には、アミノ酸のロイシン2つをベースにした、ロイペプチン (Ac-Leu-Leu-Arg-aldehyde)、ZLLal (Z-Leu-Leu-aldehyde)、カルペプチン (Z-Leu-norLeu-aldehyde)、と、ロイシン3つのカルパインインヒビターI (Ac-Leu-Leu-norLeu-aldehyde)、ZLLLal (Z-Leu-Leu-Leu-aldehyde)、がある。その他に、E64dがあり、これらが代表的なものである。これらの阻害剤は、ロイペプチンを除いて、全て膜透過性があり、大変使いやすく、有用である。しかし、多数の論文にカルパインインヒビターIはプロテアソームも強く阻害すると書かれているにもかかわらず、カルパインインヒビターIで細胞遊走が阻害されたのはカルパインが関わっているからである、と堂々と考察する論文が複数通っているのはなぜか(7, 8) (えらい先生の名前も入っているからかなあ、他のインヒビターも試しているはずなのに、効かなかったのかなあ、)。カルパインインヒビターという名前が紛らわしいのであって、いい加減この名称を使うのをやめて、ALLnLalという風に構造で表現するようにしてほしいと思うが、どうであろうか。しかし、プロテアソームにより特異的なラクタシスチンが登場して久しいので、現在ではロイシンベースの阻害剤はもう使う価値は半減したかもしれない(が、値段は20倍も安い)。一方、カルパイン特異的といっても、あまり高濃度で用いているのもどうかと思う(9)。特異性に問題が生じてくるからである。最近、カルペプチンがプロテインホスファターゼを阻害するために、アクチン骨格の形成に影響するという論文(12)を読んだ。これでカルペプチンも使えなくなってしまったか、と残念であった。また、ラクタシスチンはカテプシンAを阻害するという論文まで出た(13)。阻害剤というのは特異性という点で議論されるのは運命なのかも。遺伝子を使った実験を始めないと、もうインヒビターだけでは論文は通らなくなった、ってこと?

文献

- 1) Du, X., Saido, T.C., Tsubuki, S., Indig, F. E., Williams, M.J., and Ginsberg, M.H.

- (1995) Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin $\beta 3$ subunit. *J. Biol. Chem.*, 270, 26146-26151
- 2) Meredith Jr, J., Mu, Z., Saido, T., and Du, X. (1998) Cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin $\beta 3$ subunit during endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 273, 19525-19531
 - 3) LaFlamme, S.E., Homan, S.M., Bodeau, A.L., and Mastrangelo, A.M. (1997) Integrin cytoplasmic domains as connectors to the cell's signal transduction apparatus. *Matrix Biol.*, 16, 153-163
 - 4) Sakai, T., Zhang, Q., Fassler, R., and Mosher, D.F. (1998) Modulation of $\beta 1A$ integrin functions by tyrosine residues in the $\beta 1$ cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.*, 141, 527-538
 - 5) Lawson, M.A., and Maxfield, F.R. (1995) Ca^{2+} and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature*, 377, 75-79
 - 6) Beckerle, M.C., Burridge, K., DeMartino, G.N., and Croall, D.E. (1987) Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell*, 51, 569-577
 - 7) Huttenlocher, A. Palecek, S.P., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R L., Lauffenburger, D.A., Ginsberg, M.H., and Horwitz, A.F. (1997) Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.*, 272, 32719-32722
 - 8) Palecek, S.P., Huttenlocher, A. Horwitz, A.F., and Lauffenburger, D.A. (1998) Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J. Cell Sci.*, 111, 929-940
 - 9) Stewart, M.P., McDowall, A., and Hogg, N. (1998) LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca^{2+} -dependent protease, calpain. *J. Cell Biol.*, 140, 699-707
 - 10) Ikebe, T., Takeuchi, H., Jimi, E., Beppu, M., Shinohara, M., and Shirasuna, K. (1998) Involvement of proteasomes in migration and matrix metalloprotease-9 production of oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 77, 578-585
 - 11) Allport, J.R., Ding, H., Collins, T., Gerritsen, M.E., and Luscinskas, F.W. (1997) Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J. Exp. Med.*, 186, 517-527
 - 12) Schoenwaelder, S. M., and Burridge, K. (1999) Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. *J. Biol. Chem.*, 274, 14359-14367
 - 13) Ostrowska, H., Wojcik, C., Omura, S., and Worowski, K. (1997) Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234, 729-732

図1 カルパインにより切断されるインテグリンC末端の模式図
(Smith, J.W. (1997) Matrix Biol., 16, 173-178より転載)



(6) トピックス

1. "カテプシンS" KOされる

カテプシンSは脾臓に大量に存在するパパイイン型システインプロテアーゼである。これまでに、その組織特異的発現とカテプシンSを特異的に阻害するとされているLVHS(morpholinourea-leucine-homophenylalanine-vinylsulfone phenyl)を培養抗原提示細胞に投与することよりMHC-IIによる外来性抗原の提示が阻害されることから、外来性抗原ペプチドのプロセッシングやインバリアント (Ii) 鎖の分解に関与していると考えられてきた(1)。また、実際に生体にLVHSを投与しても同様の効果が認められることが報告されていた(2)。このカテプシンSのノックアウトマウスが2ヶ所の研究室から同時に発表された(3、4)。このカテプシンSノックアウトマウスは正常に誕生し、成長するようである。

Shiら、はカテプシンSのノックアウトマウスの脾臓細胞では細胞表面にほぼ正常量のMHC class IIが存在していたが、生合成から細胞表面に到達するまでの時間が遅延しており、Ii鎖の分解産物であるp10が強く結合しているためにOVA (ovalbumin) から切り出された抗原ペプチドを結合することができないこと、しかしながら、HEL(Henegg lysozyme)を抗原とした抗原提示能は正常マウス由来の脾臓細胞を上回っていることを示した。Ii鎖の分解は胸腺上皮細胞では正常に起こっていた。この結果はNakagawaらのカテプシンLノックアウトマウスの結果と一致していた(5)。生体にOVAやHELを抗原として投与したところカテプシンSノックアウトマウスではリンパ節での細胞増殖すなわちB細胞の増殖は著しく低下していた。さらに血清中の抗体のサブクラスを定量したところ、このノックアウトマウスではIgMは正常量存在するがIgG2a, IgG3は少量しか存在していなかった。このノックアウトマウスでは、気道にOVAを噴霧してできた実験的過敏性肺臓炎モデルにおいて気管内分泌物

中のIgEは正常マウスとほぼ同量存在していることから、クラススイッチの異常が起きているのではなく、B細胞に対する刺激が著しく低下していることが示唆された。さらに、このノックアウトマウスの足底にOVAを免疫し同側のリンパ節組織を検討したところでは、Germinal centerが形成されていないことすなわちBリンパ球の増殖やアポトーシスが起っていないことが明らかにされた。

一方、NakagawaらはMHC class IIのアレルの違いにより脾臓細胞でのカテプシンSのI鎖の分解に関与する度合いが異なっていることを見出した。すなわち、H-2bのアレル (I-Ab) を持つマウスではカテプシンSノックアウトによりI鎖の分解が著しく低下するのに対して、H-2qアレル (I-Aq) を持つマウスではノックアウトマウスでもI鎖の分解が軽度に変化するのみであった。この傾向はB細胞や樹状細胞でも同様であった。また、これらの細胞では細胞表面に発現しているMHC class IIが12-14 kDaのI鎖由来のペプチド(SLIP, small leupeptin induced peptide)と複合体を形成している。また、カテプシンLを発現しているマクロファージではI-Abを発現しているカテプシンSノックアウトマウス由来でもSLIPはゆっくりと分解されることから、カテプシンLがカテプシンSにかわってゆっくりとSLIPを分解しているらしい。内在性タンパク質の抗原提示能をB細胞、樹状細胞、マクロファージを用いて検討したところ、カテプシンSノックアウトマウス由来のものでも正常マウス由来のものとの差は認められなかった。一方、外来性タンパク質に対する抗原提示能をこれらの細胞で測定したところ、I-Ab拘束性の抗原提示能はB細胞および樹状細胞ではカテプシンSノックアウトにより著しく低下しており、マクロファージによる抗原提示能も抗原の種類により低下していた。一方、I-Aq拘束性の抗原提示能はいずれの抗原提示細胞を用いてもほとんど変化が認められず、II型コラーゲンを抗原タンパク質として用いた時の樹状細胞およびマクロファージによる抗原提示能のみが低下していた。さらに彼等はII型コラーゲンを注射することにより誘発される関節炎がカテプシンSノックアウトマウスでは軽症に終わることを示した。さらにこの時、血液中の抗コラーゲン抗体のうち、IgG1およびIgG2aが著しく減少していた。OVAやHELを投与し

た時のリンパ節由来のT細胞の増殖が正常マウスとノックアウトマウスとで違いがないことから、特定の抗原に対する反応性がカテプシンSノックアウトマウスでは消失していると結論づけた。

これらの報告は、カテプシンSの外來性抗原の提示においてIi鎖の分解に重要な役割をはたしているが、すべての外來性抗原ペプチドの切り出しに関与しているわけではないことを示している。また、MHC class IIのアレルの違いによってもIi鎖の分解や抗原ペプチドの切り出しにカテプシンS 関与している度合いが異なっていることを示している。前号の「ぷろておりしす」で述べたように、Legumainが破傷風毒素の抗原ペプチドの切り出しには決定的な関与をしているとしても、カテプシンSやそれ以外のカテプシン類の関与に関してはハッキリとはしていない。カテプシン類はその基質特異性のオーバーラップによりKOマウスでは明確な結果を得ることは難しいようである。

カテプシンの外來性抗原ペプチドの切り出しへの関与を証明するには、おそらくダブル・トリプルノックアウトマウスの作成が必要なのであろう。カテプシンBとLのダブルノックアウトマウスは産まれてこないという。はたしてノックアウトマウスから外來性抗原ペプチド切り出しへのカテプシンの関与は明らかにされるのであろうか。それとも、活性中心を変異したカテプシンのトランスジェニックマウスが作成されることにより解決するのであろうか。まだまだ、道険しいようである。

文献

1. Riese, R.J., Wolf, P.R., Bromme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*, 4, 357-366.
2. Riese, R.J., Mitchell, R.N., Villadangos, J.A., Shi, G.-P., Palmer, J.T., Karp, E.R., DeSanctis, G.T., Ploegh, H.A., and Chapman, H.A. (1998) Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J. Clinical Investigation*, 101, 2351-2363.
3. Shi, G.-P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1999) Cathepsin S required for normal MHC class

- II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, 10, 197-206.
4. Nakagawa T.Y., Brissette, W.H., Lira, P.D., Griffiths, R.J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J.D., Eastman, S.E., Howard, E.D., Clarke, S.R.M., Rosloniec, E.F., Elliott, E.A., and Rudensky, A.Y. (1999) Impaired invariant chain degradation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity*, 10, 207-217.
 5. Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., and Rudensky, A.Y. (1998) Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*, 280, 450-453.

(石堂一巳・順天堂大学・医学部)

(7) 掲示板コーナー

【国内シンポジウムの案内】

第4回 病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究。

平成11年8月20日(金)～21日(土) ウィルあいち

(名古屋市東区上堅杉街1) (代表世話人 青柳高明)

プログラム

- 基調講演 「マトリックスメタロプロテアーゼ：
基礎破壊因子としての役割と研究の動向」
岡田 保典(慶応大学医学部病理)
- 教育講演 「アポトーシスとプロテアーゼ」
「アポトーシスの基礎」
田沼 靖一(東京理科大学薬学部)
「がん治療とアポトーシス」
鶴尾 隆(東京大学分子細胞生物学研究所)
オーガナイザー： 石浦 章一(東京大学大学院総合文化研究科)
木南 英紀(順天堂大学医学部生化学第一)
- ワークショップ「疾患マーカーとしてのプロテアーゼとインヒビター」
オーガナイザー： 小川 道雄(熊本大学医学部第二外科)
水谷 栄彦(名古屋大学医学部産婦人科)
- シンポジウム「感染とプロテアーゼ」
オーガナイザー： 山本 健二(九州大学歯学部薬理学)
木曾 良明(京都薬科大学薬品化学)
- 口頭講演・ポスター講演

【国際シンポジウムの案内】

第2回国際プロテアーゼインヒビター会議のおしらせ

第1回国際プロテアーゼインヒビター会議(International Conference on Protease Inhibitors '97)は、1997年12月6日京都で開催され、世界各国から200人を超える参加者を数えて好評に終了しました。本会議が成功に終了しましたので、ぜひ第2回の会議を開いて欲しいという世界中の研究者の要望にこたえて、フロリダ大学医学部のベン・ダン教授が世話人の労を取って下さり、本年12月に開催されることになりました。

プロテアーゼ・阻害剤相互作用、ドラッグデザイン、新しい発見、プロテアーゼインヒビターを用いる治療等についてのステート・オブ・アートな発表が行われます。

すべてのクラスのプロテアーゼをターゲットとしたインヒビターの開発にかかわる科学者が一堂に会します。会場はフロリダ大学の新築の脳研究所で行われ、会場のレクチャーシアターは最先端のプロジェクション設備を備えており、160席ある各聴衆席にコンピューターの端末が備えられています。

会議は、12月の第1週末をはさんで行われ、観光地オーランドもすぐ近くです。

The 2nd International Conference on Protease Inhibitors
Chairman

Professor Ben M. Dunn

Department of Biochemistry and Molecular Biology
University of Florida College of Medicine

とき：1999年12月3日(金)～6日(月)

ところ：University of Florida, Gainesville, Florida, USA

問い合わせ先：bdunn@college.med.ufl.edu

ホームページ：<http://www.ufbi.ufl.edu/conferences/icpi>

演題募集

Serine Proteases and Inhibitors
Cysteine Proteases and Inhibitors
Aspartic Proteases and Inhibitors
Metalloproteases and Inhibitors
Proteosome and Inhibitors
Caspases and Inhibitors
New Inhibitor Design
Structure-Based Drug Design
New Targets for Drug Discovery
Genetic Analysis and Proteases
Protein Protease Inhibitors

招待講演 (交渉中も含む)

Cele Abad-Zapatero (Abbott Labs)
Dan Bur (Roche, Basel)
John Erickson (NCI Frederick)
David Fairlie (University of Queensland) Confirmed
Paul Jackson (Guilford Pharmaceuticals)
Mike James (Edmonton University)
John Kay (University of Cardiff) Confirmed
Dale Kempf (Abbott Labs)
Dong H. Kim (Pohang University) Confirmed
Yoshiaki Kiso (Kyoto Pharmaceutical University) Confirmed
Dan Rich (University of Wisconsin) Confirmed
Guy Salvesen (Burnham Institute)
Yasuyuki Shimohigashi (Kyushu University)
Christian Steinkuhler (IRBM, Italy) Confirmed
Liang Tong (Columbia University) Confirmed
Kevin Wang (Park Davis) Confirmed
Alex Wlodawer (NCI Frederick) Confirmed

なお、日本国内の方には、アナウンスメントができましたらお送りいたしますので、希望者は下記宛お申し込み下さい。

FAX: 075-591-9900

E-mail: kiso@mb.kyoto-phu.ac.jp

京都薬科大学薬品化学教室

木曾良明宛

“ぶろておりしす伝言板”

世に受け入れられない仮説も自由に発表できるコーナー。このコーナーでは、技術的な問題への質問コーナーとしても利用して頂くと共に、回答コーナーを設け対処したい。また新しい有用な情報があれば、班員に知らせたい。

“AAAスーパーファミリータンパク質”ホームページ開設のお知らせ”

「ぶろておりしす」でもたびたび紹介させていただいているAAAファミリータンパク質、AAAプロテアーゼのインターネットホームページを開設いたしましたので、お知らせします。AAAタンパク質については、ドイツ、チュービンゲン大学のFrohlichによって、国際版のAAAホームページが作られていますが、その内容はsequenceの比較と系統樹が主体であり、入門的な記述や特に機能に関する記事・図版が不十分であることなどをカバーするためと、特に日本におけるAAAスーパーファミリータンパク質の研究の発展を願って設置しました。アドレスは：
<http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/AAA/aaainfo.html>です。本重点の班員の方々にも多少なりとも関連する情報が盛り込まれておりますので、ご覧いただき、御意見をいただけましたらと思います。ホームページの1ページ目にはAAAスーパーファミリータンパク質のイントロダクションがあり、これはMENUの「代表的AAAタンパク質とその機能」に続きます。「代表的AAAタンパク質とその機能」では、プロテアソーム、メタロプロテアーゼ、膜融合、ペルオキシソームなどに関わるAAAタンパク質について概説しています。MENUには、このほか、出芽酵母のAAAタンパク質、古細菌 (Archaea) のAAAタンパク質、真正細菌のAAAタンパク質、総説、ミニレビュー、WWWサイト、シンポジウム・ワークショップなどの各ページへのリンクがあります。このうち、ミニレビューではAAAタンパク質に関する様々な話題について短くまとめたものを掲載していきますが、現在のところ、本誌「ぶろておりしす」に掲載されたミニレビューの中からAAAタンパク質に関連するものを編集担当者の許可を得て転載しております。今後内容につきましては充実していきたいと思っております。

(小椋 光：熊本大学・医)

書評

"Intracellular Protein Catabolism" (Eds. by Suzuki, K. and Bond, J.S.) Adv. Exp. Med. Biol. vol. 389, 1996, Plenum Press, New York. 本書は本特定領域研究代表者である鈴木紘一教授が1994年10月に東京で開催した第10回 International Conference on Intracellular Protein Catabolism (ICOP) 国際会議での主要講演者の総説を成書に編集したものである。現在の蛋白質分解の世界が網羅的に整理されており、初心者のみならずこの領域の研究者の座右の書として利用されるべき好書である。

(ぶろておりしす事務局)

"Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors" (eds. Katunuma, N., Kido, H., Fritz, H., and Travis, J.), 1997, IOS Press. 本書は一昨年徳島で開催されたFAOBMB会議におけるシンポジウム: Biological Functions of Proteases (この会議の詳細については本誌第2号p.9の学会報告記を参照)の講演要旨を拡大して総説にまとめたものである。本書は"Physiological and Pathological Aspects of Proteases", "Physiological and Pathological Aspects of Protease Inhibitors", "Protease and Immunology", "Proteases and Cancers"の4章から構成されており、最新の研究成果が網羅されている。一読を勧めたい。

(ぶろておりしす事務局)

「新聞・ニュースから」のコーナー案内

本特定領域ニュースでは「新聞・ニュースから」のコーナーを設けますので、新聞・ニュース等において本特定領域研究班班員の記事が目にとまりましたら、自薦でも他薦でも結構ですので事務局にお知らせ下さい。ご存知のように、研究成果を国民に還元することは重要であります。研究概要を国民に広く知って頂くためには、研究成果が新聞・ニュースなどのマスメディアに報じられることは、文部省において強く推奨されているところであり、また研究評価としても高く位置づけられています。従って、本特定領域班員の活躍の指標ともなりますので積極的に新聞・ニュースに登場することが期待されます。

(ぶろておりしす事務局)

薬エイズ抗

2種結合で効果向上

京都薬大服用の手間減らす

作用の異なる二種類の抗エイズ薬をくっつけてウイルス抑制効果を高めることに京都薬科大学の木曾良明教授らが成功した。エイズ患者や感染者の治療では複数の薬を併用する「カクテル療法」が一般的だが、結合が実用化できれば、一つの薬の投与で済ませることが可能になるといふ。

エイズウイルスの増殖を抑える抗エイズ薬には、大きく分けて逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の二種があり、両者はそれぞれウイルスの増殖プロセスを違うポイントで抑える効果がある。「カクテル療法」は逆転写酵素阻害剤のうち二種、プロテアーゼ阻害剤の一種の三剤を服用するケースが多いが、服用の時間や量が複雑で、定められた通り服用できない患者がいるのが問題となっていた。

木曾教授らは最も一般的

な逆転写酵素阻害剤の「AZT」と、新たに発見したプロテアーゼ阻害剤とを結合させて一つの分子にし、試験管内で効果を測定した。その結果、ウイルスに対する抑制効果はAZTだけの場合に比べ約七倍に高まった。

木曾教授は「結合分子は細胞の中で二つに分かれ、それぞれが効果を発揮している」とみている。逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤にはそれぞれ数種類あり、さまざまな組み合わせが可能になるといふ。

日本経済新聞

1998年(平成10年)12月5日(土曜日)

IPS (International Proteolysis Society) 設立!

ICOP (International Committee on Proteolysis) 国際蛋白質分解委員会が発展的に解消してIPSになることが決定。日本代表である鈴木特定領域長のICOP会員への手紙と関連記事を掲載します(併せて第1回IPS国際会議のApplication Formも掲載)。

ICOP NEWS LETTER の読者の方へ

ICOP NEWS LETTER の「最終号」をお送りします。

ご承知のことと思いますが、1985年に始まった ICOP(International Committee on Proteolysis)会議は、これまでほぼ2年に1回の割合で日本、米国、欧州各地で順番に開催され、蛋白質分解やプロテアーゼ、プロテアーゼインヒビターの構造・機能相関、生理機能、細胞機能などの研究の発展に大きな役割を果たし、この分野の世界の研究を支えてきたといっても過言ではありません。ICOP は学会ではなく、プロテオリシスを研究する世界の研究者の親睦組織で、これまで主に有志の方々の尽力と努力で支えられてきました。しかし、最近、プロテオリシスの研究領域がバイオロジーと不可分な領域として無限といってよいほどの広がりを見せ、多数の研究者が新しく参加し、新しい観点からの研究が活発に行われるようになり、プロテオリシスの世界は量的、質的にこれまでとは全く異なる様相を呈するようになりました。このような状況のもとで、プロテオリシスの研究をさらに推進・発展させるために、ICOP を発展的に解消して International Proteolysis Society(IPS) を設立する話がおこりました。

IPS 設立の話は、次回の ICOP 会議の開催国である米国を中心に討論された結果で、ICOP の運営会議で正式に討論されたことはありません。Protein Society の傘下に入ることも検討されたようですが、独自の学会 IPS を組織する線で準備が進んでいます。本年9月25日～30日に Michigan で開催される ICOP 会議で IPS への移行が正式に提案・決定される予定で、9月の会議が ICOP としては最終の、IPS としては最初の会議になります。

ICOP の活動ではこれまで日本は非常に大きな役割を果たしてきましたが、IPS の設立については日本側には殆ど情報が公開されないまま事が運んでいるのが実情です。しかし、最も大切なことはプロテオリシスの研究が今後さらに発展するのに適した体制ができる事だと思います。

ICOP NEWS LETTER の配布は当初、勝沼信彦先生が担当されていましたが、その後、私がお引き受けし、米国の Judy Bond 教授がまとめた原稿を増刷して皆様にお送りしてきました。今回の IPS の設立に伴い、ICOP NEWS LETTER はこれが「最終号」になります。これまでのご愛顧・ご愛読有難うございました。なお、今後の情報は、「IPS のインターネットの頁：www.protease.org」をご参照下さい。

以上、ICOP NEWS LETTER の最終号の配布にあたり私が知る範囲でこれまでの状況をお知らせしました。思い違いがあるかもしれませんがご容赦下さい。

平成 11 年 4 月 6 日

東京大学分子細胞生物学研究所

鈴木 紘 一

March 1999

NEWSLETTER

ICOP

International Committee on Proteolysis



IPS

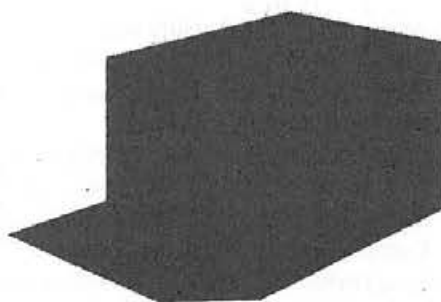
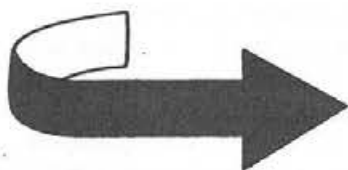
International Proteolysis Society

1985 - 1999

1999 -



INTERNATIONAL
COMMITTEE ON
PROTEOLYSIS



Coming soon: A new Society

A Society for the new millenium

International Proteolysis Society

<http://www.protease.org>



**IPS/ICOP Conference on
Proteolysis and Protein Turnover**
(1st IPS Conf; 12th ICOP Conf; Bonnie
Sloane, Guy Salvesen, and John Mort,
Edwin Madison, Judith Bond, Thomas
Bugge, Organizers)

Sept 25-30,
1999

MissionPt,
Mackinac Isl,
Michigan
USA

Bonnie Sloane
Dept Pharmacology
Wayne State Univ
Detroit MI 48201
email:
bsloane@med.wayne.edu

International Proteolysis Society (IPS) The 1st Conference

A newly organized Society, the International Proteolysis Society (IPS), is being incorporated as a not-for-profit society with the goal of facilitating interactions among basic, clinical, and industry scientists working on proteases and inhibitors in organisms from bacteria to humans.

The missions of the Society are:

- ° To further the pursuit of knowledge in research on proteolysis
- ° To encourage exchange of ideas and resources in the widest possible sense by supporting a member-driven society
- ° To encourage scientists in training by providing travel funds for meetings
- ° To act as a center for the coordination of meetings on proteolysis
- ° To hold an International General Meeting every two years, on a rotating basis between the Americas, Europe/Africa, and Asia/Australia
- ° To sponsor specialized workshops on topics in proteolysis
- ° To foster links between academic and industrial organizations with common interests in proteolysis

IPS evolved from the International Committee on Proteolysis (ICOP). The first IPS meeting will take place at the Mission Point Resort on Mackinac Island, Michigan from September 25-30, 1999. All those who attend the first meeting will automatically become voting members with the first election of officers to be conducted at the business meeting on September 28th. Until then, the members of the interim council of IPS are:

Bonnie Sloane (President and Council Chair)
Guy Salvesen (Secretary)
John Mort (Treasurer)
Edwin Madison
Judith Bond

The organizing committee for the 1st IPS meeting consists of the interim council plus Dr Thomas Bugge.

The IPS Conference on Proteolysis will consist of a plenary lecture, four poster sessions and eight platform sessions: Pathogens/Parasites; Protein Processing; Inflammation/Degenerative Diseases; Late-breaking Topics; Hemostasis; Plant/Viruses; Cancer; and Development. The platform sessions will have 67 speakers: 41 who are internationally recognized experts and 26 who are junior scientists (students, postdoctoral fellows or those within the first 3 years of holding an independent position). Submitted abstracts will be used by the session chairs, in consultation with the IPS council, to select the 26 junior scientists.

The deadline for submitting abstracts is July 15, 1999. There will be an interactive form on our web page for submission of abstracts and for meeting registration. Hotel registration will be set up as a hyperlink from the web page.

For more information, see the IPS web page: www.protease.org

1999 International Proteolysis Society

CONFERENCE REGISTRATION FORM

September 25 – 30, 1999; Mackinac Island; one form per person

Name _____

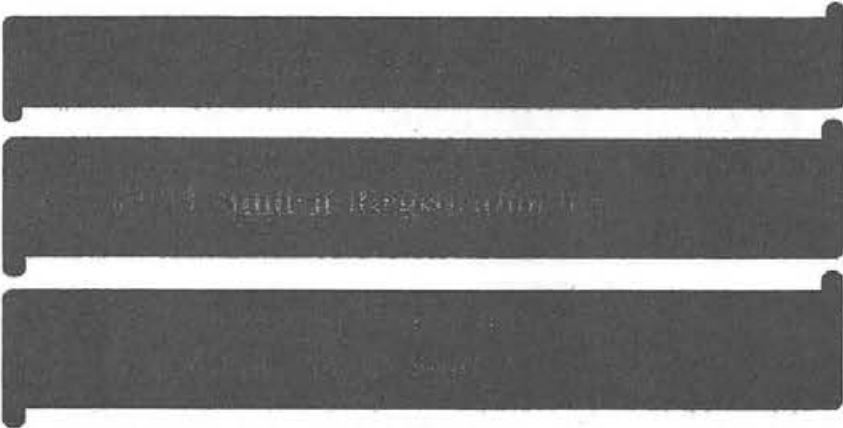
Position _____

Organization _____

Address _____

Telephone _____ Fax _____

E-mail _____



Check here for standard fee

Check here for student fee. Attach documentation

Check here for accompanying fee

Enter amount enclosed _____

If paying by credit card, please fill out:

Mastercard

Visa

Card # _____

Expiration Date _____

Signature _____

Name as it appears on card: _____

Mail completed form and payment to:
Registrar – International Proteolysis Society
Division of Continuing Medical Education
4H University Health Center
4201 St. Antoine
Detroit, MI 48201-2194

(8) 編集後記

“ふろておりしす”は、特定領域研究「細胞内蛋白分解」のニュース誌であり、班員間の連絡・情報交換などを主目的に発行されているものでありますが、「日本のプロテオリシス研究の活性化を目指す」という意図も担って編集に取り組んでいます。今回は第10号です。「プロテアーゼの研究」は少し前までは、古いタイプの生化学分野と見なされ、時代の流れに敏感な若い研究者の歡心を買う対象ではなかった。しかし、昨今の「蛋白分解の研究」は新しい生命科学の担い手として脚光を浴びつつあり、“Proteolysis”という言葉にはなにかしらモダンな気配すら感じさせる。さしずめ、黒子とその衣装を脱ぎ捨て観衆の視線を集めた表舞台に躍り出してきた感じすらする状況である。その舞台では、少し許りの覗き見程度から、精神までもどっぷり浸かった役者らが様々に蠢いている。この状況は、長い間“Proteases”あるいは“Protease Inhibitors”と言う伝統の世界に慣れ親しんできた中高年の研究者達には戸惑いすら感じさせる。伝統を擁護するか革新するかは、色々な思惑が錯綜していつも世代交代の争いの種になる。「老兵は消え去るのみ」として達観するか「まだまだ若い者には負けん」と醜態を暴け出すかは、政治の世界では日常茶飯事に現れる。一方、巷では「老人力」なる言葉が横行して中高年者に生きる希望を鼓舞させる。しかし、科学の世界ではいかばかりであろうか？優れた発見が、概ね若い柔軟な精神に宿ってきたことは、「二重らせん」の発見を例にとるまでもなく科学史を繙けば明瞭である。しかし、先般のTimes誌の日本特集を散見すると、とある東京の街角の若者のファッションがいかにも日本の現代文化だと言わんばかりに映写されている。とても誇りうる文化だとは言い難く、また時代の一端を反映しているとは言え、記者の眼を疑う記事と暗澹たる気分させられた。このような若者に未来を預けられないと思うのは、中高年に共通した感慨であろう。本特定領域研究も本年度で終焉である。これが、一期目の終わりにすぎず、二期目のはじまりであることに期待したいが、そのためには「老人力」のみならず「若い力」が必要であることは自明である。むしろ後者が前者を凌駕しない限り、蛋白分解の世界に未来は訪れないであろう。「若い力」に追い抜かれることは何ら恥ずべき自体ではなく、「老人力」にはその状況を楽しむ余裕が欲しいものである（これには若い力が単に年齢のみでなく実力として世界に認知されねばならないことが前提であるけれども）。現在のようなかつてない情報社会では、情報の過剰に埋没することなく的確に情報を収集することは勝利への秘技でもある。いずれにしても、研究者の個性が根元的に重要であることに異論はないが、しかし集団としての協調（共同研究のみならず情報交換の供与など）がもたらす研究の飛躍的な進展もまた注視すべききあろう。このような視点に目を向ければ、本特定領域研究も「牽引的役割」を担ってきたと言えなくもない。多くの班員が活動する場を提供されたことに歓喜の声とまでは言わないが、その必要性を十分に認めていると思われるからである。この状況を踏まえると、今後も新たな組織の継続が必要である。そして、このためには若い研究者の進出がなんとしても要求される。これは時代の要請でもあり、また世界との競合に勝利する唯一の方途でもある。些か明晰でない文章を羅列したが、これは投稿原稿が少ないのに飽いて、思考が支離滅裂になってきたことに起因している。それでは恒例により、投稿を呼びかけます。日本語の原稿は細明朝体、英語の原稿はTimesで作成し「文字化け」防止のために、e-mail (tanakak@rinshoken.or.jp) でなくdiskでお送り頂ければ幸いです。(特定領域ニュース誌“ふろておりしす”発行事務局：都臨床研 田中・川島)

(9) 発表論文の概要紹介

班員各位の研究進捗状況を把握する目的で随時発行（巻末添付）。いずれもオフセット印刷しますので、1ページ一杯に巧く記載して下さい。但し、図書・総説は除き原著論文に限定します。班員の自信作を数多く集めたいと考えていますので、“ぶろておりしす事務局”に送って下さい。研究成果を班員相互に素早く伝達する必要性からゲラ刷りの段階でも結構ですので、迅速に作成して頂きたいと考えています。本誌は本来、班員相互の情報交換と相互扶助(?)を計ることを基本的な目的に発行していますが、「日本の蛋白質分解研究」の裾野を開拓する主旨からも、班員以外の研究者達にも送付していますし、これまでも班員以外の多数の方々よりミニレビュー等の執筆にご協力頂きました。従って、この「発表論文の概要紹介」の欄についても、班員以外にも広く門戸を解放したいと思っています。この欄への投稿は自分の研究を国内津々浦々に宣伝する絶好の機会ですので、多くの「班員」および「蛋白質分解研究者」からの掲載原稿の提出を強く希望します。

Apg7p/Cvt2p: A Novel Protein-activating Enzyme Essential for Autophagy

Isei Tanida,* Noboru Mizushima,[†] Miho Kiyooka,[‡] Mariko Ohsumi,[‡] Takashi Ueno,* Yoshinori Ohsumi,[‡] and Eiki Kominami*⁵

*Department of Biochemistry, Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421, Japan;

[†]Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki 444-8585, Japan; and

[‡]Department of Bioscience, Teikyo University of Science and Technology, Yamanashi 409-0193, Japan

Submitted November 3, 1998; Accepted February 16, 1999

Monitoring Editor: Randy W. Schekman

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the Apg12p-Apg5p conjugating system is essential for autophagy. Apg7p is required for the conjugation reaction, because Apg12p is unable to form a conjugate with Apg5p in the *apg7/cvt2* mutant. Apg7p shows a significant similarity to a ubiquitin-activating enzyme, Uba1p. In this article, we investigated the function of Apg7p as an Apg12p-activating enzyme. Hemagglutinin-tagged Apg12p was coimmunoprecipitated with c-myc-tagged Apg7p. A two-hybrid experiment confirmed the interaction. The coimmunoprecipitation was sensitive to a thiol-reducing reagent. Furthermore, a thioester conjugate of Apg7p was detected in a lysate of cells overexpressing both Apg7p and Apg12p. These results indicated that Apg12p interacts with Apg7p via a thioester bond. Mutational analyses of Apg7p suggested that Cys⁵⁰⁷ of Apg7p is an active site cysteine and that both the ATP-binding domain and the cysteine residue are essential for the conjugation of Apg7p with Apg12p to form the Apg12p-Apg5p conjugate. Cells expressing mutant Apg7ps, Apg7p^{G333A}, or Apg7p^{C507A} showed defects in autophagy and cytoplasm-to-vacuole targeting of aminopeptidase I. These results indicated that Apg7p functions as a novel protein-activating enzyme necessary for Apg12p-Apg5p conjugation.

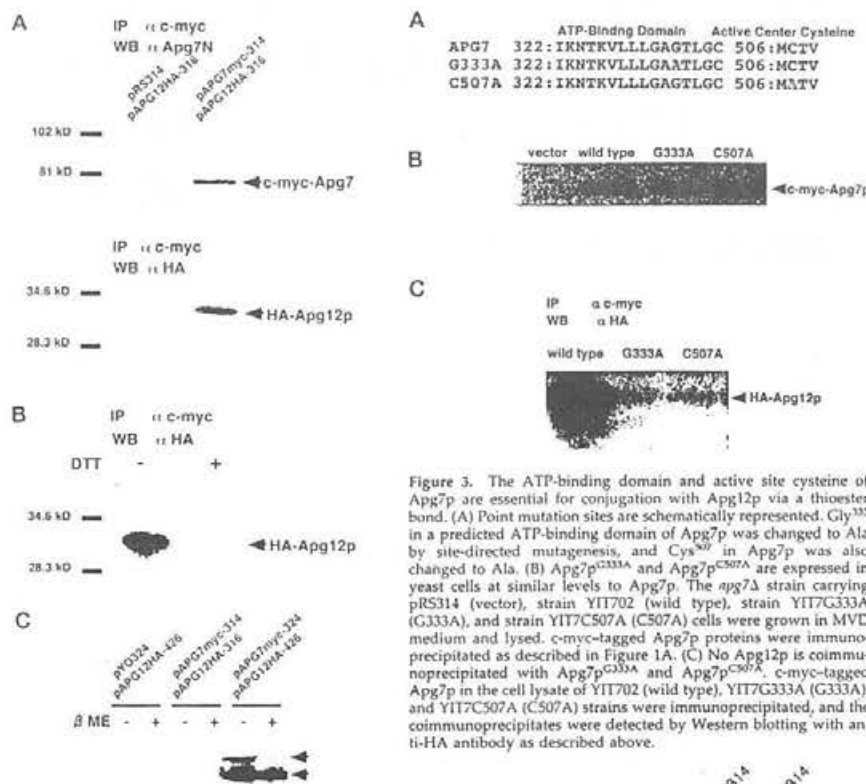


Figure 3. The ATP-binding domain and active site cysteine of Apg7p are essential for conjugation with Apg12p via a thioester bond. (A) Point mutation sites are schematically represented. Gly³³³ in a predicted ATP-binding domain of Apg7p was changed to Ala by site-directed mutagenesis, and Cys⁵⁰⁷ in Apg7p was also changed to Ala. (B) Apg7p^{G333A} and Apg7p^{C507A} are expressed in yeast cells at similar levels to Apg7p. The *apg7Δ* strain carrying pRS314 (vector), strain YIT702 (wild type), strain YIT7G333A (G333A), and strain YIT7C507A (C507A) cells were grown in MVD medium and lysed. c-myc-tagged Apg7p proteins were immunoprecipitated as described in Figure 1A. (C) No Apg12p is coimmunoprecipitated with Apg7p^{G333A} and Apg7p^{C507A}. c-myc-tagged Apg7p in the cell lysate of YIT702 (wild type), YIT7G333A (G333A), and YIT7C507A (C507A) strains were immunoprecipitated, and the coimmunoprecipitates were detected by Western blotting with anti-HA antibody as described above.

Figure 1. Apg12p conjugates with Apg7p via a thioester bond. (A) Apg12p was coimmunoprecipitated with Apg7p. pAPG7myc-314 plasmid (CEN) was transformed into *apg7Δ* cells producing HA-tagged Apg12p to express c-myc-tagged Apg7p. A transformant was designated as the YIT702 strain. The pRS314 vector was used as a control. Cell lysates were prepared as described in MATERIALS AND METHODS. A c-myc-tagged Apg7p was immunoprecipitated with Agarose beads conjugated with anti-c-myc mAb (9E10). The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE on a 10% gel and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. Proteins were detected by Western blotting with αApg7N antibody (for Apg7p) and anti-HA mouse mAb (H6B12; for HA-tagged Apg12p). (B) The coimmunoprecipitation of Apg12p with Apg7p is sensitive to DTT. A cell lysate of the YIT702 strain was prepared as described above. The lysate was boiled with (DTT+) or without 1 mM DTT (DTT-). Immunoprecipitation and Western blotting were performed as described above. (C) The higher molecular weight band of Apg7p in cells overexpressing Apg7p and Apg12p is sensitive to β-mercaptoethanol. Cells grown to early logarithmic phase in MVD medium were harvested and converted to spheroplasts in spheroplasting solution. The spheroplasts were harvested in 1.3 M sorbitol as a cushion, lysed with a 4× SDS sample buffer (Ausubel et al., 1995) with a protease-inhibitor mixture (Sigma). The lysate was boiled for 5 min in the presence (βME+) or absence (βME-) of 5% β-mercaptoethanol. SDS-PAGE on a 7% gel and Western blotting were performed as described above. pY0324/pAPG12HA-426; strain YIT704 cells; pAPG7myc-314/pAPG12HA-316; strain YIT702 cells; pAPG7myc-324/pAPG12HA-426; strain YIT703 cells.

Apg12p-Apg5p conjugating system
は、酵母のオートファジーに必須である。APG7遺伝子は、推定分子量約71.4kDaのタンパク質をコードする新規の遺伝子であり、酵母・哺乳類のUBA1 (ユビキチン活性化酵素、E1)と部分的に相同性が認められた (1998年、水島ら)。*apg7* 変異株では Apg12p-Apg5p conjugate が全くみられないことから、Apg7pはApg12pを基質としたUBA1に似た機能を果たしている可能性がある。本報告では、共免疫沈降法及び非還元SDS-PAGEにより、Apg7pがApg12pとチオエステル結合を形成する事を示した。また部位特異的突然変異を用いて、その機能にはATP結合部位及びCys⁵⁰⁷が必須であることを示した。また野生型Apg7pの代わりに、これらの変異タンパク質のみを発現した株ではオートファジー及びAPIのプロセッシングに機能欠損がみられた。以上のことから、Apg7pは、Apg12pを基質とした新規E1酵素であり、その酵素活性は、オートファジーやAPIのターゲティングに必須である。

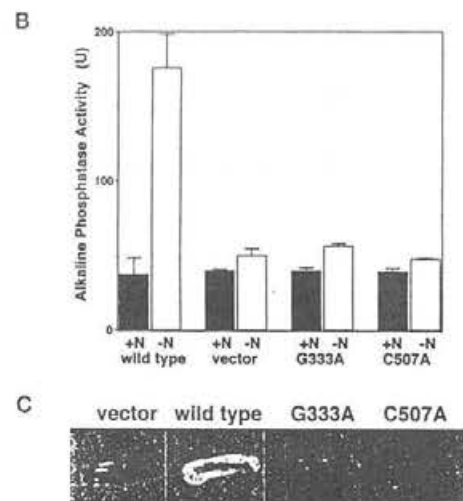


Figure 5. The ATP-binding domain and active site cysteine of Apg7p are essential for autophagy. (A) Gly³³³ and Cys⁵⁰⁷ in Apg7p are essential for the accumulation of autophagic bodies under nitrogen-starvation conditions. Cells grown to early logarithmic phase in MVD+Ura medium were transferred to nitrogen-starvation medium in the presence of PMSF and incubated for 8 h at 30°C. Representative Nomarski images of the cells are shown. Autophagic bodies accumulated in vacuoles of *apg7Δ* cells carrying pAPG7myc-314 (a). Few autophagic bodies accumulated in vacuoles of *apg7Δ* cells carrying pRS314 (b) pAPG7G333Amyc-314 (c), and pAPG7C507Amyc-314 (d). (B) Autophagy in *apg7Δ* cells expressing Apg7p^{G333A} and Apg7p^{C507A} was monitored by an alkaline phosphatase processing assay. We constructed strain YTS2 (*pho8::pho8Δ60 apg7::HIS3 trp1*) and transformed it with plasmids pRS314 (vector), pAPG7myc-314 (wild type) pAPG7G333Amyc-314 (G333A), and pAPG7C507Amyc-314 (C507A). Cells growing logarithmically in MVD+Ura medium (N+) were transferred to nitrogen-starvation medium and incubated for 4 h at 30°C.

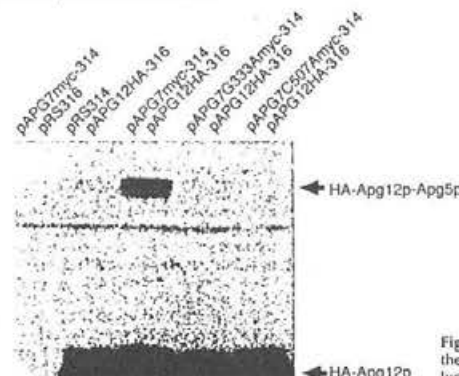


Figure 4. Apg7p^{G333A} and Apg7p^{C507A} show significant defects in the formation of the Apg12p-Apg5p conjugate. The conjugate in cell lysates expressing HA-tagged Apg12p was detected by Western blotting using αHA antibody as described previously (Mizushima et al., 1998a). pAPG7myc-314/pRS314; *apg7Δ* cells expressing c-myc-tagged wild-type Apg7p only; pRS314/pAPG12HA-316; *apg7Δ* cells expressing HA-tagged Apg12p only; pAPG7myc-314/pAPG12HA-316; strain YIT702 cells; pAPG7G333Amyc-314/pAPG12HA-316; strain YIT7G333A cells; pAPG7C507Amyc-314/pAPG12HA-316; strain YIT7C507A cells.

Autolysosomal Membrane-associated Betaine Homocysteine Methyltransferase

LIMITED DEGRADATION FRAGMENT OF A SEQUESTERED CYTOSOLIC ENZYME MONITORING AUTOPHAGY*

(Received for publication, January 11, 1999, and in revised form, March 6, 1999)

Takashi Ueno[†], Kazumi Ishidoh[‡], Reiko Mineki[§], Isei Tanida[‡], Kimie Murayama[§], Motoni Kadowaki[¶], and Eiki Kominami[‡]

From the [†]Department of Biochemistry and [‡]Central Laboratory for Medical Sciences, Juntendo University School of Medicine, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421 and the [§]Department of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University, Igarashi, Niigata 950-21, Japan

We compared the membrane proteins of autolysosomes isolated from leupeptin-administered rat liver with those of lysosomes. In addition to many polypeptides common to the two membranes, the autolysosomal membranes were found to be more enriched in endoplasmic reticulum luminal proteins (protein-disulfide isomerase, calreticulin, ER60, BiP) and endosome/Golgi markers (cation-independent mannose 6-phosphate receptor, transferrin receptor, Golgi 58-kDa protein) than lysosomal membranes. The autolysosomal membrane proteins include three polypeptides (44, 35, and 32 kDa) whose amino-terminal sequences have not yet been reported. Combining immunoblotting and reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses, we identified the 44-kDa peptide as the intact subunit of betaine homocysteine methyltransferase and the 35- and 32-kDa peptides as two proteolytic fragments. Pronase digestion of autolysosomes revealed that the 44-kDa and 32-kDa peptides are present in the lumen, whereas the 35-kDa peptide is not. In primary hepatocyte cultures, the starvation-induced accumulation of the 32-kDa peptide occurs in the presence of E64d, showing that the 32-kDa peptide is formed from the sequestered 44-kDa peptide during autophagy. The accumulation is induced by rapamycin but completely inhibited by wortmannin, 3-methyladenine, and bafilomycin. Thus, detection of the 32-kDa peptide by immunoblotting can be used as a streamlined assay for monitoring autophagy.

マクロオートファジーでは、リソゾームプロテアーゼによって分解される細胞質の基質蛋白が先ずオートファゴゾームに取り込まれ、次にオートファゴゾームがリソゾームと融合してオートリソゾームとなって初めて分解される。この研究では、オートリソゾームの膜蛋白とリソゾームの膜蛋白を徹底的に比較することによって、オートファゴゾーム由来の、固有の膜蛋白を探索しようというアプローチが採られたが、そのような膜蛋白は結局見出されなかった。その代わりに、分解を受ける側の基質蛋白の一つであるBHMTという細胞質酵素とその限定分解断片が多量に結合していることが解った。BHMTの限定分解断片の生成は、オートファゴゾームからオートリソゾームへの熟成の過程と期を一にして起こるので、この断片を検出することによって細胞レベルでオートファジーをモニターする簡便なアッセイが確立された。

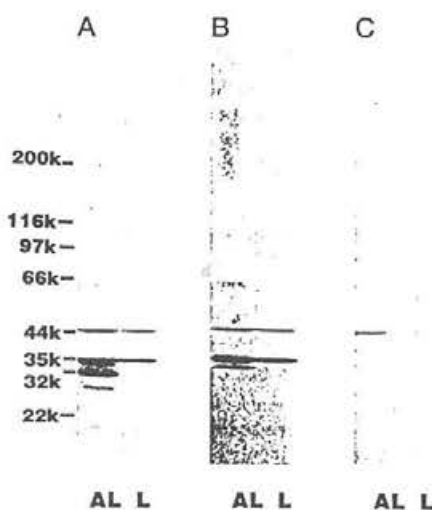


FIG. 3. Immunoblot analysis on BHMT and its partially degraded fragments, p35 and p32. Equal amounts of protein (80 μ g) from autolysosomal (AL) and lysosomal (L) membranes were separated in 10% SDS-polyacrylamide gels, and the separated proteins were electrophoretically transferred onto a Millipore membrane filter (GV, 0.22- μ m pore size). The membrane filter strips were incubated with either α -p32-10R (A), α -p35-10R (B), or α -p44-10R (intact BHMT, C) antibody followed by the horseradish peroxidase conjugate of anti-rabbit IgG. The positions of molecular size markers (myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), and trypsin inhibitor (22 kDa)), as well as p44 (44 kDa), p35 (35 kDa), and p32 (32 kDa), are shown on the left.

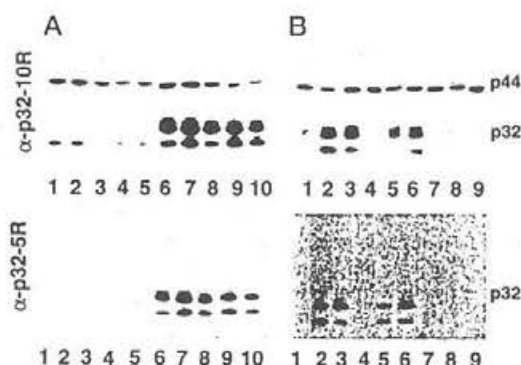


FIG. 6. E64d-induced accumulation of a BHMT fragment (p32) in cultured hepatocytes under starvation conditions as demonstrated by immunoblots. A, hepatocytes cultured at 37 °C in 6-cm dishes with Williams E/10% FCS were washed twice and incubated with 5 ml of KRB buffer containing 0.1% dimethyl sulfoxide (control, lanes 1-5) and 10 μ g/ml E64d plus 10 μ g/ml pepstatin (lanes 6-10). At 2 h (lanes 1 and 6), 4 h (lanes 2 and 7), 8 h (lanes 3 and 8), 12 h (lanes 4 and 9), and 24 h (lanes 5 and 10) after the transition, cells were harvested and homogenized by sonication for 10 s in 0.5 ml of ice-cold 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.5) containing 0.15 M NaCl. The homogenates were solubilized in SDS-PAGE sample buffer and electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gels. The separated proteins were electrophoretically transferred onto a Millipore membrane filter (GV, 0.22- μ m pore size). The membrane filter was incubated with either α -p32-10R (upper panel) or α -p32-5R (lower panel) antibody followed by the horseradish peroxidase conjugate of anti-rabbit IgG. B, hepatocytes cultured in 6-cm dishes with Williams E/10% FCS were washed with KRB buffer and incubated at 37 °C for 4 h with Williams E/10% FCS (lanes 4-6) or KRB buffer (lanes 1-3 and 7-9) containing the following reagents: 0.2% dimethyl sulfoxide (control, lanes 1 and 4); 10 μ g/ml E64d (lane 2); 10 μ g/ml E64d and 10 μ g/ml pepstatin (lanes 3 and 5); 10 μ g/ml E64d, 10 μ g/ml pepstatin, and 0.2 μ M rapamycin (lane 6); 10 μ g/ml E64d, 10 μ g/ml pepstatin, and 0.1 μ M wortmannin (lane 7); 10 μ g/ml E64d, 10 μ g/ml pepstatin, 10 mM 3-methyladenine (lane 8); 10 μ g/ml E64d, 10 μ g/ml pepstatin, and 0.1 μ M bafilomycin (lane 9). After incubation, the hepatocytes were harvested, homogenized by sonication, solubilized, and electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gels. The separated proteins were electrophoretically transferred onto a Millipore membrane filter (GV, 0.22- μ m pore size). The membrane filter was incubated with either α -p32-10R (upper panel) or α -p32-5R (lower panel) antibody, followed by the horseradish peroxidase conjugate of anti-rabbit IgG.