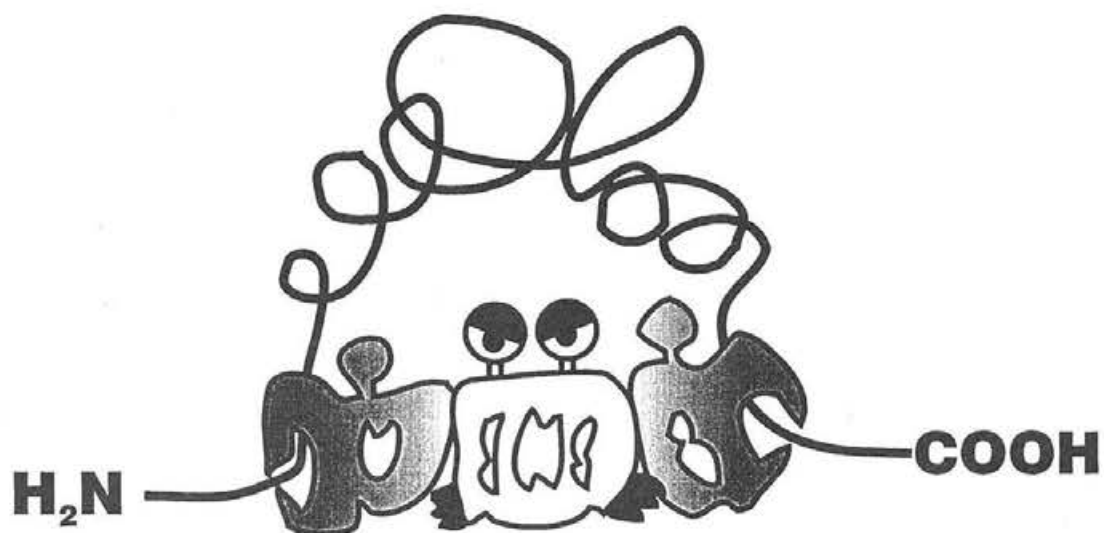


特定領域研究

「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11号（平成11年11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“ふろておりしす”発行
 - 3 出版案内
 - 4 学会・集会案内
- (4) 学会・集会報告
 - 1 第6回日本生化学会春季シンポジウム (6th CGGH Symposium 1999)
「蛋白分解酵素による生物活性の制御とその医学的応用」
“Biological Roles of Proteolysis in Health and Disease”
 - 2 FASEB夏季研究会議 "The Calpain System in Health and Disease"
印象記
 - 3 「IPS (International Proteolysis Society) -First General Meeting」
 - 4 The 8th International Aspartic Proteinase Conference
 - 5 第29回米国神経科学会に参加して
- (5) ミニレビュー
 - 1 脳虚血とプロテアーゼ
 - 2 脳cdc2様キナーゼ、CDK5の活性化サブユニットp35の
プロテアソームとカルパインによる分解
 - 3 ADAMTSファミリー
 - 4 一酸化窒素 (NO) による蛋白質の化学修飾と機能改変
 - 5 細胞増殖因子受容体の細胞内分解の分子機構
- (6) トピックス
 - 1 “カテプシンC” ノックアウトマウス
- (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

ご存知のように、本重点／特定領域研究は本年度で最終年度を迎えますが、その間、ニュース誌「ぷろておりしす」をあまりに順調に発行してきたために、遂に巻頭言が弾切れになり、なんと私のところへお鉢が回ってきました。いまさら抱負を語っても仕方がないので、これまでに感じた事を断片的に書きましよう。

本研究班が発足した当初は、プロテオリシスに関するまとまったプロジェクトの必要性は幅広く認識されていました。しかし、ひとくちに蛋白質分解といっても、そのカバーする範囲はあまりに広く、まとめ役の鈴木領域代表者は「細胞内蛋白分解」ということで、ひとつの垣根を作りました。その後、これにはこだわらずに、面白いなら非細胞内のもの（こと）も取り込んだのは、いい刺激になりました。

この4年間があっという間に過ぎた気がするのは、良いことなのか悪いことなのか、各々の班員の印象は異なると思います。毎年、同じような話をする班員もいれば、毎回、フレッシュな話題を提供してくれた班員もいました。これには、研究室を挙げてプロテオリシス研究をしている班員と一匹狼的に研究をしている班員との余力の差もありましょうが。

当初にもっとも不愉快だったのは、（どの研究班にでもあるのでしょうか）こじつけ的にプロテオリシス研究者を称した人達でした。でも、この認識は改まりました。面白いプロテオリシス研究が、プロテオリシス道を歩んでいる研究者ではなく、一見無関係に見える人達から現れることがしばしばあるからです。かく申す私は、カルパインというプロテアーゼをしっかりと握り締めて参加したのですが、こだわり過ぎて返って道を見失ったような気がします。もっと豊かな、いい加減な気持ちでプロ

テオリシスと接すればよかったと、今さらながら後悔しています。

プロテオリシス研究は奥が深いことも実感しました。カルパインのように、X線解析で高次構造まで解っても機能の判らないものがあったり、アルツハイマー病βアミロイドを切り出すセクレターゼのように、存在するはずなのに中々その実体がかめなかったものもあり、各人各様にまだまだ楽しめる研究分野のようです。一方では、目的とするものを精製したりクローニングしてみたらプロテアーゼや重要な基質だった、というラッキーな成果もありました。これは、意外性という要素が強いため、その斬新さはひとしおです。しかも、生物学的現象に裏付けされているので、その意義も明確です。本研究班のタイトルである「ニューバイオロジー」的成果はこれらの意外な分野から出たものも多く、この重点／特定領域研究の存在価値を高めたと思います。

本研究班の目的であり、かつめでたく結論になった、プロテオリシスにより蛋白質が壊されるだけでなく、新たな（性質の）蛋白質が創成されるという生産的な意義が確立され、プロテオリシスは重要な生体反応だという認識と確信が深まりました。

今後も、本研究班のような、プロテオリシスの縦系と横系を織りなす場が続くことを願っています。うん。

平成11年11月

特定領域研究(A)「細胞内蛋白分解」総括班メンバー
川島 誠一（総括班員・都臨床研）

(2) 平成11年度特定領域研究班・会議日程

1 第4回 公開シンポジウム

テーマ：「シグナル伝達とプロテオリシス」

日時：平成11年12月20日(月) 13:00~17:00

会場：東京ガーデンパレス・高千穂(2階)

13:00-13:05 領域代表者挨拶

13:05-13:35 畠山鎮次 (九大・生医研、科技団・クレスト)

I κ Bと β -カテニンの分解を制御するユビキチンリガーゼ複合体
SCFFWD1/ β -TrCP

13:35-14:05 津田玲生 (HHMI, UCLA)

EGFとNotchシグナルのクロストークに關与する新規F-box/WD40
蛋白質(ユビキチンリガーゼサブユニット)

14:05-14:35 岩井一宏 (京大・院・生命科学)

癌抑制性遺伝子産物pVHLのユビキチンリガーゼサブユニット
としての同定とそのガン化における役割

14:35-14:55 休憩

14:55-15:25 ○千葉智樹, 田中啓二 (東京都・臨床研)

ユビキチン様タンパク質NEDD8によるSCF複合体の制御

15:25-15:55 戸所一雄 (理研/ライフサイエンス筑波研)

プロテオリシスによる細胞分裂制御

15:55-16:25 吉田裕樹 (九大・生医研)

アポトーシスのシグナル伝達;アダプター分子Apaf1の役割

16:25-16:55 西道隆臣 (理研・脳科学総合研)

脳実質においてペプチドの寿命はどのように決定されるか?
生理的シグナル伝達と病的シグナル伝達の制御

16:55-17:00 領域副代表者挨拶

2 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

3 平成11年度：第2回 総括班会議

日時：平成11年12月20日（月）（昼）

場所：東京ガーデンパレス

- 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

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・名誉教授：研究評価, チェック・レビュー
- 矢崎 義雄 国立国際医療センター病院長：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

2 特定領域ニュース誌“ふろておりしす”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薦め下さい。

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：鈴木紘一、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：
鈴木紘一)
- 細胞工学 特集号 “ユビキチンは細胞周期を制御する：タンパク質分解から
も見た細胞周期” 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”
1999年10月号発行 (編集企画：木南英紀)
- Molecular Medicine 特集号 “ユビキチンシステムと癌” 2000年2月号発行
(コーディネーター：田中啓二)
- 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：鈴木紘一、木南英紀、田中啓二)
- バイオサイエンスの新世紀 (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) 日本免疫学会（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, P.K.Srivastava, K.Tanaka
（座長・田中啓二・岩井一宏）
- (2) 日本分子生物学会（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) **"The 2nd International Conference on Protease Inhibitors"**
December 3-6, 1999, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
(Ben M. Dunn)
- (2) **"Proteinase Inhibitors and Activators: Strategic Targets for Therapeutic Intervention"** University of Oxford, England, UK,
April 17-20, 2000, Brian Austen, John Deadman, Roger Epton,
Robin Leatherbarrow, Chris Southan
- (3) EMBO Workshop **"Ubiquitin-Proteasome Pathway and Cellular Regulation"** (G.Strous and A. Ciechanover) May 14-18, 2000, Driebergen,
The Netherlands
- (4) **"Proteolytic Enzymes & Their Inhibitors"** Gordon Research Conference
Colby-Sawyer College, New Hampshire, USA, July 9-14, 2000
Organizer: Wolfram Bode

(4) 学会・集会報告

1. 第6回日本生化学会春季シンポジウム (6th CGGH Symposium 1999) 「蛋白分解酵素による生物活性の制御とその医学的応用」 “Biological Roles of Proteolysis in Health and Disease”

5月19日から21日にかけて、第6回日本生化学会春季シンポジウム「蛋白分解酵素による生物活性の制御とその医学的応用」が徳島県鳴門市ルネッサンスナルトリゾートにおいて、日本生化学会CGGHフォーラム主催、(財)国際協力医学研究振興財団共催、特定研究(A)「蛋白分解のニューバイオロジー」、日本細胞生物学会、日本分子生物学会協賛で開催されました。今回はプロテアーゼを主題として行われる初めての日本生化学会春季シンポジウムで、参加者は約160名で2題の基調講演、24題の口頭発表(外国人12人含む)、85題のポスター発表がありました。春季(CGGH)シンポジウムは、新しいフロンティアを開き我が国から情報を発信すること、外国人も若く実践的な人々を優先的に招待し、参加者とゲストスピーカーで濃密な情報交換ができることを意図した国際シンポジウムであります。また今回は、特に日本生化学会学術集会企画委員会の要請で、参加者、招待講演者間のより親密な交流を促進するため泊まり込み方式で参加者全員が発表するゴードンカンファレンス形式で行われました。初めての企画で、また朝は8時から夜は10時までと今までの日本の学会にはないタイトなスケジュールであったため、主催者側としては不安でありましたが、講演会場、ポスター会場ともいつも満員であり盛況で、時間いっぱい大変活発な討論が続けられました。また多くのこの特定研究の班員の先生方にも参加していただきました。幸い天候にも恵まれ、風光明媚な鳴門の景色を楽しみながら、非常にリラックスした雰囲気の中で、X線構造解析からノックアウトマウスまで広い領域で有意義な情報交換が行われました。特に、計6回ビュッフェ形式で毎回違う方と食事をとることができたので、親交を深めると同時に、新たな共同研

究の話も進んだようで、この点も非常に良かったと思います。

シンポジウムの構成は3日間の日程で、4つのセッションでの招待講演、ポスター発表が行われました。5月19日は、夕食後セッション1「生理活性ペプチドとレセプターの活性化機構」について、6題の口頭発表が行われました。Gary Thomas, Daniel Constam, 辻明彦らにより、最近、発生生物学、内分泌学の分野で注目されているサチライシン様プロテインコンベルターゼ (SPC) について、特異阻害剤、ノックアウトマウスによる機能解析、遺伝子発現調節機構等が発表されました。芳本忠, Lloyd Fricker, 深水昭吉はそれぞれ、プロリン特異ペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼE, レニンアンジオテンシン系について、最近の研究成果を発表しました。サチライシン様プロテインコンベルターゼは、日本では私共も含めて研究者人数が少なくプロテアーゼ領域ではマイナーな領域ではありますが、特にDaniel Constamの発表はノックアウトマウスを用いてSPCのうちFurinとPACE4の発生過程における役割を解析したもので、参加者の大きな関心を集めました。Furinのノックアウトマウスは胎生10日付近で死亡しますが、その原因は心臓の形態形成異常であり、BMP等のmorphogenetic factorの活性化にFurinが寄与していることを示しました。またPACE4のノックアウトマウスは単眼症を呈し、Nodalのシグナリング異常マウスと似たフェノタイプであることを示しました。ウイルス・バクテリアは、宿主細胞のプロテアーゼを利用して融合タンパクやトキシンの活性化を行います。Gary Thomasは、Furinに阻害作用を有するアンチトリプシン変異体 (PDX) を作製し、これを用いて、シュードモナストキシンのFurinによる活性化及びPDXの治療薬としての可能性を発表しました。特にFurinはゴルジ膜と細胞膜の間をサイクリングしている酵素であるので、外側からPDXを加えるだけでFurinの活性の阻害が可能で、多くの感染症の治療への応用が期待されました。

5月20日は、まず基調講演として勝沼信彦博士がシステインプロテアーゼ (カテプシンB.H.L, S) の特異阻害剤による機能解析、特に抗原提示機構、アポトーシスにおける役割について、最近のデータを発表しました。勝沼信彦博士はここ十年来、

X線結晶構造解析を積極的に導入し、ドラッグデザインによる新規カテプシン阻害剤を開発され、今まで不可能と考えられてきたWhole animalの系でも特定のカテプシンのみ阻害する系を確立し、抗原提示とインバリアントチェーン分解におけるカテプシンの役割、アポトーシスにおけるカテプシンとカスパーゼの関係、骨代謝におけるカテプシンL, Kの役割等、未発表の結果も含めて最新の研究成果を発表され、参加者に大きなインパクトを与えられました。続いて午前中はセッション2「蛋白分解酵素の活性制御とその新しい医学応用」について、特にトリプターゼ、キマーゼに焦点をあて、Bradley A. Katz, Andreas Bergner, L.B. Schwartz, 木戸博, 松森昭, 宮崎端夫らにより、阻害剤の設計、構造、活性化機構、ウイルス感染、心疾患とのかわりについて発表が行われました。午後は2時30分から5時30分まで85題のポスター発表と活発な質疑応答が行われました。招待講演者の方々も積極的に討論に参加し、互いに細かい情報交換ができました。夕食後は、セッション3「新しい蛋白分解系とその生理機能」において、Guy Salvesen, Vito Turk, 大隅良典, 瀬原-藤沢淳子, 反町洋之, A. Mollaらにより、アポトーシス、カテプシンによる抗原提示機構、オートファージ、メルトリンの構造と機能、新HIVプロテアーゼ阻害剤の開発について、それぞれ最新の研究成果が発表されました。

5月21日は、午前中セッション4「ユビキチン/プロテアソーム研究の新展開」について、登田隆, Y. Ben-Neriah, 岩井一宏, Keith D. Wilkinson, 小出武比古, 田中啓二らにより、ユビキチン/プロテアソームが関与する細胞周期の調節, NF- κ B活性化, IRP2の鉄依存性分解, 及び脱ユビキチン酵素の機能, 小胞体における蛋白質の品質管理機構, 抗原提示機構について発表が行われました。Y. Ben-Neriahは、NF- κ Bの阻害タンパクであるI κ Bを特異的にユビキチン化するリガーゼを分離し、その作用機構, ユビキチンを介した分解系による調節機構について講演し、参加者の注目を集めました。続いて岩永貞昭博士により基調講演「組織因子によるFVIIの活性化調節」が話されました。会議終了後公式にアルコールが解禁となり、大きなマグロの作りを楽しみながら会話が弾みました。

このように、今回の日本生化学会春季シンポジウムは国内・海外より最先端のプロテアーゼ領域の研究者が集まり、プロテアーゼの構造、反応機構、特異阻害剤のデザイン、形態形成、免疫反応における役割、病態とのかかわり等について濃厚な情報交換、共同研究の展開が行われ、新しい創造的研究の場となった画期的な国際シンポジウムになったと思われまふ。特に、参加者全員が発表し、泊まり込みで行うという形式が非常に功を奏したと思われまふ。海外の招待講演者の方々からも、最近参加した会の中でも最も非常に実り多きミーティングであったと、お褒めの言葉をいただきました。

最後に、各セッションの企画をお願いした木戸博（セッション2）、鈴木絃一（セッション3）、田中啓二（セッション4）、座長をお願いした伊藤明夫、鈴木宏二、川島誠一、山本健二、木南英紀の各先生方に、この場をお借りして深く感謝の意を表したい。また、財政的に支援いただいた国際協力医学研究振興財団、文部省、徳島大学にも深く御礼を申し上げたい。

松田佳子（徳島大学工学部生物工学科）

2. FASEB夏季研究会議 "The Calpain System in Health and Disease" 印象記

米国コロラド州Copper Mountainで、本年6月20日ー25日に上記テーマで国際会議が開催された。カルパインのみを特定のテーマにした国際会議は、不思議に過去にあまり開かれておらず、2年前に英国Oxfordで開かれたものが最初であった。Goll (Univ Arizona)がchairpersonで、Mellgren (Med College Ohio)とWang (Parke-Davis)がCo-chairとして企画した。WangはOxfordでもCo-chairとして参画しており、やはり製薬会社のスポンサー（？）がないと国際会議を開くのは難しいのかも知れない。参加者は100名余りで、日本からは基調講演をされた鈴木絃一先生（以下、敬称略、東大）グループに佐々木（名市大）、中尾（熊本大）、牧（名大）と東ら千寿製薬

グループが参加した。デンバーから車で2時間もかけてやっと到着した所は、山肌に残雪があちこちに見られる標高2,900メートルもの高地にあるリゾートであった。20日は夜の基調講演のみで、21日からは午前中と夜が口頭発表、午後がポスターとなっており、全体的に時間的には余裕があった。午後は登山をしたり、乗馬、川下り、スポーツジムでテニスなどをして過ごす人もいたようだ。予め貰った案内には、慣れるまでアルコールや激しい運動は控えた方がよいと注意書きがしてあったが、時差と低酸素のダブルパンチのためか、日本やヨーロッパからの参加者の中には2、3日頭痛で悩まされた人が多かった。

口頭発表者は、要旨も提出せずに会議に臨むということで、話を聞いてみるまでは演者が何を話すのかタイトルからしか推察がつかず、内容を正確に理解するにはやはり要旨が欲しい。というか、印象記をまとめるに際して、いかに自分のメモが役に立たないか恥じ入る次第で、記憶も薄れた現在、強く残った印象のみを紹介させて頂くことにする。今回の会議を一言で表現するとなれば、カルパインもついにここまで来たか、ということになる。結晶解析やトランスジェニック、ノックアウトなどの成果がつきつきと披露された。

最大のトピックスは、カナダQueen's 大学グループのJiaによるm-calpainの3次元構造の発表であろう。噂には聞いていたが、実際にきれいなスライドを見せつけられると衝撃とともに、何とラッキーだろうと思わざるを得なかった。結晶化は他のグループもやっていたのに――。彼らは大腸菌発現による組換え体を使って、カルシウム非存在下でのX線結晶解析を行った。小サブユニットのGlyおよび疎水性残基に富む領域（ドメインV）を欠いているが（これが良かったのかも知れないが）、明らかにされた構造は、カルシウム非存在下ではなぜ不活性なのかを説明するに十分であり、言い換えれば、カルシウムによるカルパインの活性化機構を高次構造レベルで推測させるとともに、意外なことも明らかになった。

高次構造に基づくドメイン構造から、彼らはプロテアーゼドメイン（従来は

domain II) を domain I (Cysを含む) と domain II (His、Asnを含む) に分けることを提唱した。活性中心のCysとHisがカルパインの場合には10.5 Åも離れ、パパインのように3.5 Å以下とはなっていないため、活性中心を形成できない。カルシウム存在下では構造変化によりこの距離が短くなり、触媒反応が可能になると考えられる。domain IIIとdomain IV (5つのEF-handをもつカルシウム結合領域) の間のリンカーを通じて構造変化の情報がdomain IIに伝えられると考えられる。意外なことの一つは、大サブユニットのN末端領域(従来のdomain I、彼らは単にprodomainと称した)が小サブユニットと接触していることである。活性化に伴ってprodomainが自己消化すること、そして自己消化産物はカルシウム感受性が高くなることが分かっていたが、両者の接触は、小サブユニットがprodomainを通じてカルパイン活性を抑制していることの説明となる。また、domain IIIは、Synaptotagminのリン脂質結合性カルシウム結合領域と高次構造が類似しており(一次構造は似ておらず)、PKCなどのC2ドメイン相同領域であることが報告された。この領域に実際にカルシウムやリン脂質が結合するかどうかは今後の課題となるが、生理的な活性化場所であるとされる細胞膜上でのカルパイン作用を考える点で重要な知見である。

彼らは、高次構造に基づいて各種変異体の解析を行い、また、カルシウム存在下での結晶化、カルパスタチンとの複合体の解析などを進める予定であり、やっとカルパインも構造生物学の先頭グループに仲間入りをしたかと感慨深く聞いた。とともに、生化学では長らく日本がリードして来たのに、ここに至って先を越され、日本人の貢献がなかったのは残念であるとの思いを深くしたのも事実である。前述のGollは、組織より精製したカルパインは6カ所でTyr、Ser、Thrがリン酸化されていると報告したが、バキュロウイルス系を使った昆虫細胞での発現は、翻訳後修飾が不均一となりいい結晶ができないのだろうか、とふと思った(嬉しいことに、その後、東大グループとドイツのBodeらのグループとの共同研究により、昆虫細胞で発現させたヒトm-カルパインの結晶構造も解明された。翻訳後修飾の問題はなさそうである)。一方、Narayana (Alabama大学) は、小サブユニットのカルシウム結合

ドメイン (S-CaMLD)の結晶構造は2年前にカナダグループと同時期に発表できたが、大サブユニットのそれはいい結晶が取れず、まだ成功していない。今回は、カルバスタチンC領域ペプチドが、S-CaMLDとの複合体の結晶構造解析によって、 α -helixを形成しているとの報告に終わった。微妙な構造の違いで結晶の良し悪しが決まるとすれば、運に任せるしかない。

Queen's大学グループのElceは、カルパイン小サブユニット遺伝子のノックアウトマウスについて報告したが、胎生期の9.5日以降で致死になる。それ以前では見かけ上は正常であり、循環器系の異常があるのではとの質問があった。彼ら是对立遺伝子がともに欠損したES細胞を樹立したが、カゼインザイモグラフィーによる活性測定では、 μ -カルパイン、m-カルパインともに検出できなかった。Westernで μ -カルパイン大サブユニットのバンドは検出できたが、m-カルパインのそれは欠損株で検出できなかった。小サブユニットがないため、翻訳後のフォールディングがうまく行かず、分解し易くなっているのかも知れない。変異ES細胞は、増殖速度、細胞接着、移動性に顕著な変化が認められず、カルパインが細胞周期の進行 (Mellgren, Ohio医科大)、内皮細胞の接着 (Fox, Cleveland Clinic)、iso-アクチン再構成による伸展 (Herman, Tufts大)に関わっているという報告と一致しない。用いた細胞の違いか、あるいは変異ES細胞では検出感度以下の極微量のカルパイン活性が残っているためか、また、カゼインザイモグラフィーの測定方法は、大サブユニットのみでも本来は活性をもつが電気泳動中に失活したのではないか、など疑問が尽きない。いずれにせよ、カルパインは生命に必須であることが分かって幸せだ、と演者は締めくくった。また、Zimmermanら (Pennsylvania大)も小サブユニットのKOマウスを作成中で、ヘテロは健康であるとのポスター発表をしていた。

反町・鈴木ら (東大)が発見した骨格筋に特異的なカルパインp94は、肢体型筋ジストロフィー症2Aの責任遺伝子としてBeckmannら (Genethon, 仏)に同定されて

以来、注目を浴びて来たが、今回もいくつか興味深い報告がなされた。反町は、構造機能相関について膨大な変異体の解析結果やカルバスタチン、fodrin、転写因子 MEF2が基質となること、さらに、優性阻害変異型のp94のトランスジェニックマウスが、筋形成に異常があることを報告した（PowerPointを使った液晶プロジェクターによる発表は、聴衆を魅了した）。p94はその活性発現にカルシウムを要求しないが、Carafoli（Padova大、伊、今年スイスより転勤）は、p94の組換え体がカルシウム依存性であると報告した。反町らの変異体の一部にはカルシウム要求性を示すものがあり、討論の場で、CarafoliらのcDNAの配列には変異が入っている可能性が暗に指摘された。興味深いことに、Shearer（Oregon健康科学大）の報告によれば、Lp82はp94のsplice variantであり、かつ異なるプロモータをもつレンズ特異的カルバインであるが、やはりカルシウム要求性があり、カルバスタチンによって弱く阻害される。3-D構造からカルシウム要求性に関する解答が得られるのも、そう遠い将来のことではなさそうだ。Lp82は、ヒトではmRNAは存在するもののexon 1に終止コドンが存在し蛋白としては合成されないとのこと。他の動物では蛋白質として存在しているが、その生理的機能が問われる。少なくとも、もヒトの白内障とは無縁のようだ。Beckmannらはwhole body in situ hybridizationで、Lp82がマウスのレンズおよび網膜に発現していることを示した。p94のKOマウスは予想通り筋形成に異常を示したが、外見上、眼には異常が認められなかった。Welm（Baylor医科大）はポスターで、CCAAT/enhancer 結合蛋白質C/EBP β のプロセッシングにp94 またはisoform（実体は不明）が関わっていることを示唆した。p94 isoform は、新生マウス肝で検出されるが、C/EBP α 欠損マウスでは検出されず、C/EBP β のプロセッシングも起こらない。

普遍型（ μ -およびm-）カルバインのカルシウム要求濃度は、試験管内では生理的濃度の1～3桁も高く、in vivoでは生体膜以外に活性化蛋白質の存在が注目されていた。Pontremoli（イタリアGenoa大）のグループは、過去そのような因子の精製に関する論文を幾編も発表していたが、他のラボでは追試困難で疑問視されていた。

今回、同グループのMelloniは、 μ の活性化因子（一次構造発表済み、腫瘍抗原UK114と同一でシャペロン様蛋白と類似）の抗体を使って局在性を調べると、核周辺部の膜に存在すること、 m の活性化因子は一次構造からAcyl-CoA結合蛋白質であると報告した。そして、カルパスタチンが核周辺部の2点で凝集し、TPA添加で拡散することを示した。カルパスタチンは主に細胞質にあると相場が決まっていたので、にわかには信じ難い。

カルパスタチンについては、そのN末領域と発現が話題になった。昨年の本研究会議で川島（臨床研）がラットカルパスタチンで報告したように、従来のN末よりは上流に翻訳開始コドンが存在する。最初にウシ（Antin, アリゾナ大）で、そしてマウスおよびヒト（牧、名大）で明らかになり、また、ブタ（Bardsley, 英Nottingham大）でもありそうだ。ウシ、ブタとマウス、ヒトではexon 1に相当する配列が異なり、プロモータが異なると思われる。前者ではcAMPで誘導がかかるが、後者では恒常的な発現か、誘導がかかるのか今後の解析を待たねばならない。従来のN末のすぐ上流にもプロモータが存在することが示唆される。また、Kosower（イスラエル、Tel Aviv大）はラット筋芽細胞の融合過程でカルパイン活性発現が必要であり、カルパスタチンの一過性の減少がRNAレベルで生じていること、TGF- β が融合を阻害すること、そしてOligoadenylate synthase活性化に伴うlatent RNaseの活性化を示唆した。Wang（Parke-Davis）は、アポトーシスとの関連で、カルパスタチンがcaspaseによって分解されることを既に論文で発表していたが、今度はカルパインがcaspase-3を分解し不活性化することによりアポトーシスに対して抑制的に作用することを示唆した。Potter（Tufts大）は、阻害中心の合成カルパスタチンオリゴペプチド（24-mer）のN末にk-FGFのシグナルペプチド（16-merの疎水性残基）を付加することにより、細胞透過性を高めたインヒビターを調製し、血小板凝集やガラス表面での伸展反応をIC50が30-50 μ Mで阻害することを示した。

この他、病態との関係では、脳腫瘍におけるmerlinのカルパインによる分解促進

現象（中尾、熊大）、Dystrophin欠損モデルマウスでのカルパイン活性の昂進（Spencer, UCLA）、そして脳虚血（Lee, Virginia 大）や脳傷害（Hayes, Texas健康科学大）、脱ミエリン症（Banik, 南Carolina 医科大）におけるカルパイン作用と阻害剤による治療の可能性が話された。さらに*C. elegans*の性決定に関与する新規カルパインTRA-3（Kumabara, 英Sanger Center）や精子形成への関与が示唆される新規カルパイン（Dear, Max-Planck）など数題の講演があった。

今回の会議では、急遽、故村地孝京都大学名誉教授の功績を讃えてMurachi Awardが創設され、大学院生やポストドクのポスター発表の中から4人が奨励賞として受賞することになった。残念ながら日本人は含まれていなかったが、内容もさることながら発表（当然ながら英語で）の仕方が審査に大きく影響したようだ。会議の最後に、Mellgren (Med College Ohio)が中心になって2年後にもう一度FASEB会議を開催することが決められた。また、新規カルパインが続々と発見されて名称が不統一になっているため、新たに系統的な名称を付けることが提案され、反町（東大）がまとめ役をすることになった。2年後にどんな展開が待っているのか楽しみであるとともに、当事者として頑張らねばとの思いを強くした。

牧正敏（名大院・生命農学）、佐々木實（名市立大・医）

カルパインの名称に関する補足

今回の学会でDearなどが発表したように、次から次へと「カルパインのプロテアーゼ領域と相同性を持つ分子」が見いだされている。線虫では十数種類あるようなので、ヒトでは20種前後ではないかと予想されている。以下に現在までに同定されている脊椎動物のカルパイン関連分子の情報をGDB(The Genome Database)が勝手に採用したCAPN（外人は、”KPN（ケイピーエヌ）”のように発音していた）という遺伝子名の順番にまとめてみた。CAPNシリーズの難点は、発音しにくい点、遺伝子産物名と数字がくい違っている点（例えば、CAPN5は、nCL-3、CAPN8は、nCL-2、CAPN9はnCL-4）、CAPN4 (30K)は「カルパインのプロテアーゼ領域と相同性」は持

たない点である。これだけ増えると caspase のように番号付けで行かざるを得ないとは思いますが、何かよい案はないだろうか？

なお、データの一部は <http://ag.arizona.edu/calpains/nomenclature.html> を参照した。

反町洋之（東大院・農生科）

GDB Name	染色体位置	塩基配列 ¹	アミノ酸配列 ¹	遺伝子産物	Orthologues in invertebrates	CaM 領域	分布	備考
<i>CAPN1</i>	11q12-q13.1	X04366	29664	μ -calpain large subunit(μ CL, μ 80K)	いろいろ ²	+	普遍的	
<i>CAPN2</i>	1q41	M23254	511637	m-calpain large subunit(mCL, m80K)	いろいろ ²	+	普遍的	
<i>CAPN3</i>	15q15.1-q21.1	X85030	791040	p94(calpain 3, nCL-1), Lp82, Lp74 etc.		+	骨格筋、レンズ	ヒトでは Lp82 等が無いらしい。
<i>CAPN4</i>	19q13	X04106	35328	μ -, m-calpain small subunit(30K)		+	普遍的	
<i>CAPN5</i>	11q14	Y10552, U94346	2065171, 2529435	hTRA-3(calpain 5, nCL-3)	TRA-3(線虫)	-	普遍的(精巣、脳)	線虫の性決定遺伝子
<i>CAPN6</i>	Xq23	AJ000388	2274962	Calpamodulin (CANPX)	TRA-3(線虫)	-	胎盤、胎児骨格筋	Cys が活性中心にない
<i>CAPN7</i>	3p24	AB028639	5102944	PalBH,	PalB(カビ), Cpl1p(酵母)	-	普遍的	
<i>CAPN8</i>	1q41	(D14479)	(441200)	nCL-2, nCL-2'		+, -	胃	mCL, nCL-4 と遺伝子座が近い
<i>CAPN9</i>	1q42.1-q43	AF022799	2502077	nCL-4		+	消化管	全ての臓器で少量は発現している
<i>CAPN10</i>	(予約済)	-	-	calpain 10?		?		
<i>CAPN11</i>	6p12	AJ242832	5689776	calpain 11	いろいろ ²	+	精巣	μ /mCL と 57%一致
<i>CAPN12?</i>	16p13.3	U85647	3462351	SOLH	SOL(ハエ)	-	普遍的	
<i>CAPN13?</i>	?	(AF126867)	(5305702)	?		-	普遍的	<i>CAPN8</i> と誤報されている
<i>CAPN14</i>	2p22-p23	-	-	?		?	?	pseudogene?
<i>CalpainC</i> ?	?	(X01415)	(63333)	μ /m-calpain large subunit(μ /mCL)		+	普遍的	ニワトリ筋肉の主要カルパイン
<i>CAST</i>	5q15-q21	D16217	303599	calpastatin		-	普遍的	

¹GenBank 登録番号はヒトのシーケンスのもの。ただし、ヒトが登録されていないものは()で示した。

²例えばショウジョウバエの Dm-calpain (CALP A) や CALP B などがこれにあたると思われるが、これらが μ CL と mCL のどちらに対応するかは不明である。

付録 FASEB Summer Research Conferences at Copper Mountain - The Calpain System in Health and Diseaseの集合写真



日本から参加した三人の当班員の先生と今回のChairのDr. Gollおよび次回のChairのDr. Mellgrenを示した。

3. 「IPS (International Proteolysis Society) -First General Meeting」

IPS (International Proteolysis Society)が主催する第一回 general meeting は1999年9月25日から9月30日までアメリカ合衆国、ミシガン州、Macknac Islandで開かれた。Macknac Islandはヒューロン湖に浮かぶ小さな島で、アメリカの代表的なリゾートの一つであるということだった。9月末は相当寒く、黄葉が進み、夜は4-5°Cくらいまで下がった。日本から行く場合、とにかく遠いというのが我々の本音であった。シカゴあるいはデトロイトからトラバース・シティに飛び(約1時間)、そこからバスで2時間、さらにフェリーボートで島に渡るというコースである。待ち時間を入れると、行き帰りともまる2日(時差を抜きにして)かかる行程である。学会の参加者は240-50名で、学会主催者が期待したよりも下回ったようである。日本人参加者は20数名で、以前のICOPよりも参加者は少なかった。IPSとはどういうものか、実体がつかめなかったのと、開催地が遠いということが災いしたのだろうか?

学会は9月25日夜、鈴木紘一教授(東京大学分子細胞生物学研究所)の基調講演「Structure and function of superfamily members of calpain」を皮切りに翌朝から一般講演が始まった。口頭発表は、「Pathogens and Parasites」、「Inflammation and Degeneration」、「Homeostasis」、「Late-breaking Topics」、「Plants and Viruses」、「Development」、「Cancer」、「Protein Processing」という8つのSessionsが設けられ、合計54題の講演が行われた。ポスター発表は、口頭発表が終わった夜8時半から2時間アルコールを飲みながら行われ、合計68題の発表があった。詳しい内容は省略するが、概していうと非常に興味ある新しい発表がある一方、あまりインパクトのないおぎなりの発表が混っていたのは残念であった。目に付いたのは、構造生物学的研究、とくにプロテアーゼやインヒビターの立体構造解析の発表が極めて多いことで、この領域における日本の研究の立ち後れを痛感した。

会議に出席した人の一部の関心は、IPSの実体と運営方法であった。第一回の今

回の学会は立ち上げに参画したデトロイト大学のBonnie Sloan教授を会長とする組織委員会が運営を行ったが、会議の中日で開かれる総会（Business meeting）で、新しいcouncil membersを選出し、選ばれたmembersが今後の学会を運営していくことになっていった。とはいっても、大部分の参加者は、どういう手順と方法で選挙するのか知らされていなかった。細かい成り行きは省くが、暫定的組織委員会の提案した投票方法は、北アメリカ（USAとカナダ）地区、ヨーロッパ地区、その他の国々という3つの地区に分け、予めノミネートした人々から地区ごとに3名連記で投票するというものだった。参加者全員（当日配布されたIPS規約に賛成した人）の全員投票によって民主的に行うという原則であった。参加者の8割がアメリカ人であることは、ここでは不問にされた。プロテアーゼ、プロテオリシスの領域で活躍されている研究者が多い日本が「その他の国々」に入れられたことは不本意だと思われる方も多いと思うが、投票の結果、12人のcouncil membersに入った日本人はただ一人（徳島大学分子酵素学研究センター・木戸 博先生）となった（鈴木紘一先生は辞退）。IPSは学会であるので、年会費をどれくらいに設定するか、Journalを出すのか（総会での挙手の反応ではむしろ否定的で、持ち越しとなった）、プロテアソームのグループなども取り込み学会の規模を大きくするかなどは、今後議論されていくと思われる。会員数を増やし、若い研究者が積極的に参加する魅力的な学会にしていく努力が必要となるであろう。

次回は2001年にミュンヘンで、Bode 博士 (Max-Plank-Institute, Germany) が、日本流に言えば会頭で行われる予定である。

最後に、ICOPはどうなったのか気がかりの先生もおられると思うので、私なりの解釈を申し上げますと、ICOPがIPSに変わったのではなくて、IPSを新たに立ち上げ、ICOPは自動的に消滅することになると思われる。

木南英紀（順天堂大学医学部生化学第一講座）

4. The 8th International Aspartic Proteinase Conference

第8回アスパラギン酸プロテアーゼ国際会議が1999年9月7日から9月12日までポルトガル、マデイラ島フンシャルで開催された。マデイラ島はポルトガルの首都リスボンから南西約1000kmの大西洋に浮かぶ島で、その中心のフンシャルは人口約10万の山の斜面に横に広がった形の美しい町である。平均気温が16～25℃と年間を通して温暖なため、夏冬問わずヨーロッパからの観光客が大変多い。日本からの観光客はまだそれ程多くないようだが、われわれが泊ったホテルで日本からのグループに2, 3出合ったので、今後は次第に増えることが予想された。日本から行く場合、直行便がないため乗り継ぎをせねばならず、行程的にはかなりハードなものであった。しかし、マデイラ島の素晴らしい景色と底抜けに明るい人々に出合って、長旅の疲れはどこかへ吹き飛んでしまったようだった。学会の参加者は120～130名で、今までのアスパラギン酸プロテアーゼ国際会議に比べて参加者は幾分少なかった。日本人参加者も約15名とこれも以前よりも少なかった。開催地が遠隔地であったことが影響したのかも知れない。

会議は、9月7日夜のJordan Tang教授(University of Oklahoma)の基調講演「A pre-millennium reflection on aspartic proteinases in human diseases」を皮切りに、翌朝9時から一般講演が始まった。口頭発表は、"Expression, biosynthesis and processing", "Structure and mechanism", "Aspartic proteinases in disease-I: microbial and parasite proteinases", "Aspartic proteinases in disease-II: retroviral and mammalian proteinases", "Aspartic proteinase inhibitors and new drug design", "Plant aspartic proteinases", "Functional genomics and gene manipulation"という7つのセッションに分けられ、合計42題の講演が行われた。ポスター発表は昼食が終わった2時頃から3時半ぐらいまでの間に行われ、合計68題の発表があった。口頭発表のうち、内容的にはかなりインパクトのある新しい発表がある一方で、何故このような演題が選ばれたのか首を傾げた

くなるような発表があったのは残念であった。

発表内容についてはすべてを詳細に報告することは能力的にも物理的にも（個人的に興味をもてない発表には会場に居なかった）できないが、私自身が興味をもった発表についてのみ幾つか紹介をさせて頂きたい。"Expression, biosynthesis and processing"のセッションではyapsinsについての発表が興味をひいた。yapsinsは塩基性アミノ酸に対してユニークな特異性を示す新しいタイプのアスパラギン酸プロテアーゼファミリーである。これまでyeastとmammalに同定されている。S. cerevisiaeではyapsin 1, 2および3があり、mammalではyapsin Aが知られている。yeast yapsinsについて活発な研究を行っているY.P. Loh (NIH)はyapsins 1, 2, 3についての基質切断特異性や生合成およびプロセッシングについて報告した。また、彼女はヒトにおけるyapsin Aのpro-opiomelanocortinのプロセッシング酵素としての重要性についても言及した。J. Jean (Institute for Animal Health, UK)はGPIアンカーのアスパラギン酸プロテアーゼである寄生虫Eimeria aspartic proteinase (EAP)の生合成と病原性機能について報告し、他のアスパラギン酸プロテアーゼとは異なるユニークな生合成系について報告した。"Structure and mechanism"のセッションでは、新しいアスパラギン酸プロテアーゼであるplasmepsin (N.K. Bernstein, University of Alberta, Canada)、phytepsin (A. Zdanov, ABL, USA)等々のX線結晶解析データが示された。残念ながら、この分野における日本の立ち遅れは如何ともしがたいと、痛切に感じた。セッション3と4では、寄生虫や病原微生物および哺乳動物が保有するアスパラギン酸プロテアーゼについて、古典的なものから新規なものまでが多種報告され、それらの病原性機能とともに構造解析データが示され、これらを標的としたドラッグデザインの可能性について報告された。とくにK. Miki (Toho University, Japan)が報告した胃ガンの診断マーカーとしての血中pepsinogenの有用性については、多くの患者のスクリーニングデータを基にしたもので大変興味深く感じた。"Plant aspartic proteinases"セッションは圧倒的にヨーロッパのグループからの発表が多く（主催者のC. Faroの分野ということもあるが）、日本からはT. Asakura (Atomi Junior College)がoryzasin IのC末端領域にある1

00アミノ酸残基から成るpolypeptide insertの意義について種々の変異体を用いた実験結果を報告し、それがautolysis制御に何らかの機能を果していることを示唆した。

会議期間中は南国のまぶしいばかりの太陽と澄みきった海にかこまれて、実に快適な毎日を過ごすことができた。日本を発つ前はアフリカに近い島だということでも多少の不安もあったが、美しく整った観光設備やひとなつこい地元の人達にふれて、今までにない楽しい経験をすることができた。できればもう一度、日本人の観光客に荒らされる前にここを訪れてみたいと思った次第である。

次回は2年後、東アジア（日本になる可能性は大）で行われる予定であるが、詳細についてはまだ決まっていない。

山本健二（九州大学歯学部歯科薬理学教室）

5. 第29回米国神経科学会に参加して

今年の米国神経科学会は10月23日から28日にかけてマイアミビーチのコンベンションセンターで行われた。前回、1994年にマイアミで行われた時は、ハリケーン（ゴードン）が大会期間中ずっと居座り大変荒れ模様の大大会であったが、今回は天候にも恵まれ、気分良く参加することができた。演題数は約15000、参加人員は約20000人と、相変わらずのマンモス学会であった。ポスター会場のパネルの数が1000以上あり、ポスター発表は午前と午後の2回行われたので1日2000演題を越える数の発表がなされた。

演題数の多いテーマは、アルツハイマー病と多岐に渡ってとりあげられる細胞死であった。後者に関しては、カスパーゼと神経細胞死に話題が集中していた。アルツハイマー病関連では、amyloid precursor protein (APP)のプロセッシング酵素について新たな展開がみられた。これまでに、SelkoeらはPresenilin-1 (PS1)が γ -secretaseである可能性を、PS1の膜貫通ドメインTM6とTM7に保存されているAsp257と

Asp385がamyloid β -peptide ($A\beta$)産生に必須であることを提示した。この事実はNotch-1の細胞内ドメインの切断にも適合することも示されてきた。この仮説に関連して注目を引いたのはHaassらの演題で、ヒトの脳および白血球でPS1のexon 8を欠損したspliced transcriptが検出されているが、このvariantはpoint mutationがかかりAsp257Alaとなる。HEK-1細胞にこの Δ exon8cDNAを発現させ、さらに β APPとNotch-1を発現させたところ、 γ -secretaseによる $A\beta$ の産生には異常はなかった。しかし、Notch-1の切断は抑制された。これらの結果は、 $A\beta$ の産生には他のAsp残基が関与する可能性もあり、PS-1の γ -secretaseとしての位置づけを完全には否定しきれないが、その可能性は低いとの結論であった。

もう一つのトピックスは β -secretaseの同定である。AmgenのCitronのグループはAPPの β -secretase活性を持つ膜貫通型のアスパラギン酸プロテアーゼのクローニングに成功した (Vassar et al., Science 286:735-741, 1999)。本大会で彼らからの報告はなかったが、他のグループから同様の報告がなされ、この発表にはたくさんの報道関係者がつめかけた。周知のごとく、APPのプロセッシングには α , β , γ -secretasesが関与している。 α -secretaseによってN端の大分子(APPs α)の切断と10kDの膜結合型のC83に切断される。この候補としてはmetalloproteinasesのADAM10あるいはTACEが知られている。 β -secretase活性では、N端の100 kDのAPPs β と膜結合型のC90に切断され、C83とC90はさらに γ -secretaseによって切断され $A\beta$ ($A\beta$ 40と $A\beta$ 42)と病原性のないP3 peptideが産生される。 $A\beta$ のN端はAsp (APPのP1 positionで、MetとAspの間で切断される) が主であるが、マイナーなものとしてGluがある (この2型が β -secretaseによる切断と考えられている)。Citronらは、ヒト胎児腎由来で β -および γ -secretaseを発現しており、APPをプロセッシングして $A\beta$ を産生することが知られている293細胞を用いて、 β -secretase活性を持つ酵素の同定を行った。この細胞のcDNAライブラリーをサイトメガロウイルスのプロモーターを持った発現ベクターに組み込み、これらcDNAプールをAPPを過剰発現した293細胞に一過性に発現させて、 $A\beta$ 産生を上昇させるcDNAクローンを同定した。これによって同定された

酵素はペプシンファミリーに属するアスパラギン酸プロテアーゼであることが明らかとなり、BACE (β -site APP cleaving enzyme)と命名された。BACE cDNAは2526bpからなり、ORFは501個のアミノ酸をコードしている。BACE蛋白はN端側21アミノ酸からなるシグナル配列を有し、22-45番目のアミノ酸配列がプロペプチドの配列で、C端側に膜貫通部位を有している。活性を持つ本体は46-460番目までのアミノ酸配列からなる糖蛋白（4カ所の糖結合部位を持つ）で、C端側24アミノ酸残基が細胞質ドメインを構成している。本酵素は2カ所の活性部位を有し、膜貫通型のアスパラギン酸プロテアーゼとしては初めての酵素である。興味あることに、BACE蛋白はカテプシンEに37%の相同性を示す。ラットとマウス型も同定され、ヒト型と高い相同性を有していることが分かった。BACE mRNAの発現は、脾臓に高く、脳を含む多くの組織で認められ、脳ではほとんどの領域で発現がみられる。in situ hybridizationの結果、グリア細胞ではなく神経細胞に発現することが確かめられている。蛋白の分子量は約70 kDであり、細胞内局在はゴルジとエンドソームに認められている。活性特性の解析から、P1 positionで切断すること、および多少ではあるがTyrとGluの間で切断することが明らかにされている。至適pHは4.5と低い。これらの事実は、BACEが β -secretaseであることを強く示唆している。今後、アルツハイマー病患者の脳におけるBACEの存在形式の解析が待たれる。

アルツハイマー病ではA β の蓄積が問題であり、これに関わる酵素の同定は重要な課題である。今回のBACEの発見は、酵素学的には非常に興味深いものである。しかし、アルツハイマー病の病理を考えると、やはり真に重要な酵素は最後に残された γ -secretaseである。

内山 安男（大阪大学大学院医学系研究科情報伝達医学専攻機能形態学講座）

6. 第72回日本生化学会大会シンポジウム

「プロテオリシスによる細胞機能のモジュレーション」

平成11年10月7日木曜日、神奈川県のパシフィコ横浜で行われたこのシンポジウムでは約2時間半にわたってプロテオリシスが様々な局面で細胞機能を調節しているということを改めて実感する、多岐にわたる最新の講演を聴くことができた。早朝9:00からという時間と、東横線が事故で遅れていたにもかかわらず、席はほぼ満席の盛況であった。

まず、「オートファジーの分子機構の解明をめざして」と題して大隅良典先生（基礎生物学研究所・エネルギー変換機構研究部門）の講演でシンポジウムが始まった。大隅グループの独壇場であるオートファジー（自食作用）の分子機構に関して、最新のデータも交えたレビューであった。オートファジーは分解基質を膜で隔離し分解コンパートメントへと送り込むシステムであり、プロテオリシスそれ自体に加えてダイナミックな膜形態の変化を伴う細胞生物学的現象である。大隅グループは酵母のオートファジー不能変異株を包括的に分離し、これまでに13の遺伝子をクローニングしてきた。本講演は、これらの産物が蛋白質リン酸化・非ユビキチン性蛋白質結合システム・蛋白質プロセッシング・局在調節などの分子機構を介して複雑な制御系を構成していることを示して圧巻であった。

続いて、「大腸菌膜結合AAA ATPase/プロテアーゼFtsHの機能」と題して、秋山芳展先生（京大・ウイルス研）が講演された。AAA ATPaseに属する膜結合型亜鉛メタロプロテアーゼである大腸菌FtsHによる内在性膜蛋白質の分解機構について、遺伝学的手法と生化学的手法を有効に組み合わせた研究についてお話しいただいた。特異的基質であるYccAを用いて、内在性膜蛋白質の分解がN末端側からprocessiveに行われ、さらにその際に基質蛋白質の細胞質側へのdislocationが必要であることを見事に示した実験であった。さらにFtsHの自己切断を手がかりに、その基質特異性についてもデータを示された。また変異蛋白質を用いた詳細な構造機能連関の解析から、触媒部位を提唱された。

次に、「Notchシグナル活性化におけるプロテオリシスの重要性」と題して、黒岡尚徳先生（京大院・医学研究科）にお話し頂いた。Notch受容体は細胞膜表面に発

現し、Deltaなどのリガンドとの結合により活性化されて幹細胞の分化を抑制する働きを持つ蛋白質である。Notchシグナル活性化の分子機構について、最近プロテオリシスが重要な働きをしていることが明らかになり脚光を浴びている。本講演ではこのホットな分野の最新の進展をお話しいただいた。リガンド依存的にプロセッシングされ核に移行すると考えられているNotch細胞内ドメインがそれ自身で転写活性化因子としての機能を持つこと、この細胞内ドメインが転写因子Su(H)/RBP-Jと結合することを示された後、リガンド非依存的切断とリガンド依存的切断に関して阻害剤を用いた解析についても言及された。

後半に入って、森和俊先生(京大院・生命科学)が哺乳類の小胞体ストレス応答にプロテオリシスがどのような制御をしているかについて、酵母のUPR(unfolded protein response)の研究をふまえて最新のデータをまじえてお話しいただいた。哺乳類のUPRに関与すると考えられるシス配列に結合する因子として、ベーシック・ロイシンジッパー型蛋白質、ATF6を同定し、翻訳産物である90 kDaのタイプII小胞体膜貫通型糖蛋白質が、UPRによってプロテオリシスにより50 kDaの可溶性核蛋白質に変換され小胞体シャペロンの転写を活性化することを明らかとした。プロテアーゼの同定に関しては今後の課題であるが、そのプロテアーゼがどのようにシグナルを受容して90 kDa→50 kDaの切断を行っているのかが興味深い。

続いて、中尾光善先生(熊本大・医・腫瘍医学)が、神経繊維腫症2型(NF2)の責任遺伝子産物であるマーリンのカルパインによる分解過剰が腫瘍発生に関与すること、そして変異型p53が長寿命化することはユビキチン系が関与していること、の2点についてプロテオリシスが生命維持に必須である例として話し下さった。筋ジストロフィーもそうであるが、カルパインが活性化するとろくなことにならないようである。もちろん、それだけ普段は厳密に活性を制御しながら生命に必須な細胞機能を果たしていることの裏返しではあるのだが。今後はカルパインが活性化してしまうメカニズムについてさらなる研究が待たれるところであろう。

最後に、本特定領域代表の鈴木紘一先生(東大・分生研)がカルパインの構造機

能相関について、つい最近解かれたカルパインの三次元構造を参照しながら熱のこもった講演をした。裏話ではあるが、実際にX線のデータを解析したドイツのボーデ教授の研究室では、他のグループと競合していることもあったと思われるが、X線データを撮ってから三次元構造の構築まで1ヶ月かからないという驚異的なスピードで終わらせたそうである。その結果、他の紹介記事にもあるかもしれないが、IPSミーティングの会頭のplenary講演で、カルパインの3次元構造を発表できたわけである。内容については他稿を参照してほしい。

さて、今回のシンポジウムは、何人かの先生方から「プロテオリシスの多面性を実感できる話題が多くて良かった」というお言葉も頂きましたが、主催者の側からはいくつもの反省点があります。まず、我々と生化学会大会本部との連絡が悪く(実際には本部からの一方通行に近かった)、シンポジウムの公募に関して多くの先生方にご迷惑をおかけした点であります。我々は締め切りの時期や募集の方法を一切知らされることなく本部の指示する締め切りまでに到着した演題とご依頼した演題で構成したわけですが、締め切り後に続々と申し込みがあり、泣く泣くお断りした次第であります。お聞きすると、「本部にも問い合わせたが明確な返事を頂けなかった」とおっしゃる先生もいらっしゃいまして、我々ももっと本部と連絡を密にして事務連絡を明確にすべきであったと深く反省しております。

また、講演・質疑応答の時間共に、非常に不十分であったことも深くお詫びいたします。当初は多少延びても良いだろうとたかをくくって、少し窮屈なのを承知の上でなるべく多くの演題を入れようと考え、2時間半に6題という構成にしたのです。しかし、シンポジウムの会場が最終的に決められた結果(もちろんプログラムの後です)、我々の会場だけはそのあとランチオンセミナーがあるため「準備の都合上1分違わずきっちり終わってください」と本部の方から半分脅しのような警告を再三にわたって頂き、延長しないことに全精力を傾けざるをえなかったわけです。しかしながら、講演して下さった先生方は皆様時間どおりに終えていただき、全

体としてもまさに1分も延長せずに終了することができて、心から御礼を申し上げさせていただきます。実は、最後に今ここで述べているようなこととお話ししたかったのですが、あれよあれよという間に、会場係の人に占拠されやむなく撤退したわけです。

また、朝早くからの開催にも関わらず、最初からほぼ満席の盛況を頂き、心から感謝いたしておりますと共に、プロテオリシスへの関心の盛り上がりを楽しみ半分、おちおちしてはられないぞという厳しき半分の気持ちで受け止めております。プロテアーゼの生化学から入った研究者にとっては、ある意味で「緩い」実験の多く見えるのが、生理機能からプロテアーゼにたどり着いた研究かもしれません。実際に、生理機能に主眼をおいて研究している研究者にとっては、作用しているのが何のプロテアーゼであっても関係ないかもしれません。また、プロテアーゼ命の研究者にとってはそのプロテアーゼが実際にどんな生理機能をしているかよりも、どのくらいの濃度のインヒビターで阻害されるかの方が重要かもしれません（すみません）。しかしながら、そこで反目し合うよりはお互いに間口を広げて共同研究ができれば新たな視野が開けてくるかもしれないなあと、徒然に思いました。

（前田達哉：東大・分生研、反町洋之：東大院・農生科）

(5) ミニレビュー

1. 脳虚血とプロテアーゼ

脳卒中は日本国民の死亡原因の第2位を占め、中でも脳梗塞（脳虚血による神経細胞死）は食生活の欧米化に伴い増加傾向にありその2/3にも及び、国民衛生上重要な疾患となっている。脳梗塞は生命が助かった患者にも運動マヒや失語症などの後遺症をもたらし、日常生活に大きな制約を引き起こす（かの田中角栄氏も、これで政治生命を絶たれた）。このようなはっきりとした神経症状を出さなくとも、小さな脳梗塞が脳に多発すると健忘、見当識障害、性格変化などが現れ、ついには痴呆症に陥る。日本での老人性痴呆の患者数は126万人といわれ、その40%は脳血管性痴呆で、アルツハイマー病によるものを上回る。この脳虚血による神経細胞障害のメカニズムは虚血の程度（＝強さ：脳血流が完全に途絶し0になるものから、蛋白合成の障害を起こす軽度の脳血流低下まで）とその持続時間（栄養動脈の永久閉塞なのか、一時的閉塞の後再開通するのか）によって異なってくる(1)。脳血流が正常の1/7以下になり永久に血流が再開通しなければ、神経細胞はごく短時間のうちにネクロシスに陥ってしまう。我々医学の臨床にたずさわる人間にとって、これは治療のできない病態となってしまう。これに対処できるのは、神経移植などの再生医療になってくる。現在、幹細胞を使った治療が動物実験で試みられている。脳血流が正常の1/7以下でも、数分以内に正常に回復すれば神経細胞は生存し、ネクロシスにならない。この中間の条件で、神経細胞は虚血中または後に産生される細胞障害物質により損傷され、長い経過では数日後に細胞死にいたる。この細胞障害物質中最も影響が大きいと考えられているのが、興奮性神経伝達物質のグルタミン酸である(2)。グルタミン酸は生理的状态で神経シナプス前終末のシナプス小胞に貯蔵されている。虚血によりATPが減少しシナプス前神経細胞に脱分極が

起こると、シナプス小胞からグルタミン酸がシナプス間隙に放出される。生理的状況下では、このグルタミン酸はすぐに神経細胞内にATP依存性に再吸収される。ところが、虚血下ではATPの減少によりこれが再吸収されず細胞外（シナプス間隙）に留まり、シナプス後部のグルタミン酸受容体（特にその内のNMDA受容体）に結合、これを活性化し、シナプス後部神経細胞内へCa²⁺を大量に流入させる。このCa²⁺が細胞内に存在するCa²⁺依存性のプロテアーゼ、タンパク質キナーゼなどを活性化し、様々なシグナル伝達を介して神経細胞死を引き起こすと考えられている。同じ条件の虚血を加えても脳組織内で障害程度が部位により異なるのは、各部位間でNMDA受容体の分布密度が異なるからと考えられている（密度が高ければ障害も強い：例えば海馬CA1領域の錐体細胞）。Ca²⁺依存性プロテアーゼであるカルパインが虚血後活性化され神経細胞骨格のフォドリンを分解すること、カルパイン阻害剤が神経細胞死を予防することが証明されている(3)。また、カルパインはさらにリソソーム膜を破壊し、貯蔵されたカテプシンを放出させ細胞分解を起こすともいわれる(4)。この他、グルタミン酸-Ca²⁺から少し離れるが、弱い脳虚血後、数日かかって神経細胞死に至ることがあり、これにはアポトーシスが関与しているといわれる。実際、カスベース1, 3の阻害剤またはそのノックアウト・マウスで神経細胞死が減弱すると報告されている(5)。プロテアソームに関する報告は少なく、わずかに、脳虚血後p112の発現が虚血神経細胞内で増加するという報告があるくらいである(6)。以上、虚血による神経細胞障害のメカニズムのメイン・ストリームとその中でのプロテアーゼの役割について現時点での概要を述べた。もちろん、これ以外に細胞障害物質はフリーラジカル、エイコサノイドなどたくさんあり、単独物質が原因とはいえない。これが各細胞障害物質の阻害剤またはノックアウト・マウスで虚血性神経細胞障害を100%ブロックできない理由でもあろう。みなさんの身近を見ていただければ、誰かしら脳梗塞を患った方がおられると思う。

このように、脳虚血は非常にポピュラーかつその人の人間性をも奪いかねない

怖い疾患である。基礎医学、生物学を専攻される方々に少しでもその病態についての知識を提供しかつ興味を持っていただければ、このコラムを書いた意義もでてくる。読者の中からどなたか、この病態解明もしくは治療法開発に参加もしくはアドバイスをいただければ幸いである。文献は代表的なものに限局しておいた。さらに詳しい情報を希望される方は、yoko-ns-@hyo-med.ac.jpまでご連絡ください。

参考文献

1. Hossmann KA. Viability thresholds and penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565, 1994
2. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695, 1993
3. Saido TC, Yokota M, Nagao S, et al. Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain *J Biol Chem* 268:25239-25243, 1993
4. Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur J Neurosci* 10:1723-1733, 1998
5. Schulz JB, Weller M, Moskowitz MA. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative disease. *Ann Neurol* 45:421-429, 1999
6. Wigle D, Ho W, Lo D, et al. Altered expression levels of SEF-2 and p112 in the rat hippocampus after transient cerebral ischemia: identification by m-RNA differential display. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:435-442, 1999

横田正幸（兵庫医科大学脳神経外科）

2. 脳cdc2様キナーゼ、CDK5の活性化サブユニットp35のプロテアソームとカルパインによる分解

サイクリン依存性キナーゼ（CDK）は、増殖サイクルのエンジンとして、真核細胞の細胞周期の進行を促進していることはよく知られている（1）。近年、このCDKのグループの中に、増殖をしない神経細胞で発現し、神経機能の制御、あるいは脳形成に重要な働きをするものがあることが明らかになってきている。ここでは、

そんな神経細胞で活性をもつユニークな CDKとして注目されているCDK5について、最近分かってきたその活性制御へのプロテアソーム、カルパインの関与について紹介したい。

CDK5は神経細胞でのみ活性が検出されているCDKである(2、3)。これはCDK5の活性化サブユニットであるp35の発現が神経細胞に限定されているからである。CDK5は微小管結合蛋白質タウやニューロフィラメントHサブユニットなどの神経軸索内の細胞骨格蛋白質をin vitroでリン酸化する。それ以外にも、シナプシンIやMunc18などの小胞のエキソサイトーシスに関係した蛋白質や、低分子量G蛋白質RacのエフェクターであるPak1をin vitroでリン酸化することが知られている。培養神経細胞でCDK5の発現をアンチセンスDNAによって抑える、あるいはドミナントネガティブなCDK5を過剰発現させると、神経突起の伸展がみられないことから、CDK5は軸索内の細胞骨格系の蛋白質のリン酸化を介して、神経細胞の突起伸展を制御していると考えられている。一方、CDK5のノックアウトマウスでは、脳の形成に異常が見られている。脳の層構造は、神経細胞が脳の内側から外側へと移動し、後から移動するものが外に配置される(インサイドアウト)ことで形成される。CDK5のノックアウトマウスでは、大脳と小脳の層構造に内と外の逆転が見られることから、CDK5は脳形成時の神経細胞の移動に関係しているのではないかと考えられている。

増殖細胞でのCDKの活性制御のメカニズムは、よく研究されている。細胞周期特異的なサイクリンの合成やCDKのリン酸化・脱リン酸化に加えて、ユビキチン・プロテアソーム系によるサイクリン、CDKインヒビターの分解も、増殖細胞でのCDKの活性制御に重要な役割をしている。サイクリン、CDKインヒビターの分解は、ユビキチン・プロテアソーム系によって制御される細胞機能のなかでも最も関心を集めているものの一つであろう。すでにサイクリン、CDKインヒビターのもつユビキチン化のシグナルとなるアミノ酸の配列やリン酸化部位、及び、ユビキチン化反応を担うE3なども特定されてきている。これに対して、神経細胞でのCDK5の活性制御

機構はよく分かっていない。増殖細胞でのCDKが、活性化にCAK (CDK-Activating Kinase) によるリン酸化が必要であるのに対して、CDK5では必要とされていない。CDK5は活性化サブユニットであるp35との結合により活性化することが分かっているのみであり、これまでp35の蛋白量がCDK5の活性を決定していると考えられていた。p35はサイクリンとはアミノ酸配列上の相同性をもっていないが、p35もプロテアソームによって分解されていることを、昨年、ハーバード大学のグループと我々が相次いで報告した(4、5)。培養神経細胞の蛋白合成をシクロヘキシミドで止めると、蛋白量の変化しないCDK5に対してp35はすみやかに消失し(半減期~3h)、同時にCDK5の活性は失われた。このp35の消失はラクタシスチンによって抑えられた。培養神経細胞内では、プロテインホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸によってp35の分解が促進され、同時にp35のリン酸化が見られた。このことから、p35の分解にはp35自身のリン酸化がトリガーとなることが示唆されている。p35のプロテアソームによる分解がどのような神経機能と関係しているのかは興味のあるところであるが、p35のユビキチン化の機構など全く分かっていない状況である。

一方、哺乳動物の脳から活性をもったCDK5を精製してくると、活性化サブユニットはp35ではなくてp25になっていた。CDK5/p35複合体として精製されたという報告はまだない。P25はp35のN末約100アミノ酸が除かれたC末側の分解産物である。脳内ではp35が大部分であり、p25はわずかにしか見られないことから、このp25への限定分解は精製の過程で起こるものであると考えられていた。これまで、この限定分解がどのようなプロテアーゼによるものか、また生理的に意味のあることなのかは全く分かっていなかった。最近、我々はこの限定分解はカルパインによることを明らかにしている(6)。この限定分解はCDK5の活性には影響を与えなかった。しかし、ラット脳抽出液で10万gの遠心により沈澱に回収されるCDK5/p35複合体が、p25への限定分解により上清にくるようになった。したがって、カルパインによるp35の限定分解は、CDK5の細胞内の局在を変えることでCDK5の基質特異性を制御しているのではないかと考えている。また、この限定分解が神経細胞内でも神経細胞死誘

導時に起こることも分かった。カルパインが細胞死に関係することは前々から言われてきたことではあるが、これはCDK5が神経細胞死に積極的な関与をすることを予想させるものである。

CDK5活性化サブユニットであるp35は、プロテアソームによる全分解とカルパインによる限定分解の、2種のプロテアーゼによる分解を受けていた。P35のリン酸化がプロテアソームによる分解のトリガーとなりそうなことは先ほど述べたが、逆にp35のリン酸化はカルパインによる限定分解を抑制する（大貫ら未発表）ことも分かっている。したがって、p35がプロテアソーム、又はカルパインのどちらによって分解されるかは、p35のリン酸化により制御されていると考えられる。

参考文献

1. Nigg, E. A. (1995) *Bioessays* 17, 471-480
2. Tang, D., and Wang, J. H. (1996) *Prog. Cell Cycle Res.* 2, 205-216
3. Lee, K. Y., Zhong, Q, Yu, Y. P. and, Wang, J. H. (1997) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 7, 951-958
4. Patrick, G. N., Zhou, P., Kwon, Y. T., Howley, P. M., and Tsai, L. H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 24057-24064
5. Saito, T., Ishiguro, K., Onuki, R., Nagai, Y., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. (1998) Okadaic acid stimulated degradation of p35, an activator of CDK5, by proteasome in cultured neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 775-778
6. Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto., and Hisanaga, S. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 CDK5 activator to p25. *J. Biol. Chem.*, in press

齋藤太郎（東京都立大学理学研究科）

3. ADAMTSファミリー

1. はじめに

ご存じのように、ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) は、出血性ヘビ毒メタロプロテアーゼおよびディスインテグリンと相同性なドメインを持つ遺伝子群の総称である。当初、ADAMファミリーでは、Whiteらにより受精に関わるファーティリンが発見され、また瀬原らにより筋管形成に関わるメルトリンが見い出されて、ADAMの細胞接着因子としての機能についてその先駆的な研究がなされた[1,2]。またBlackらにより、TNF α -converting enzyme (TACE)がADAM型の膜型メタロプロテアーゼであることが報告されて以後[3]、サイトカインや増殖因子の膜型前駆体のプロセッシング、サイトカイン受容体のsheddingなど、膜蛋白因子のセクレターゼとしてのADAMファミリーの機能が次々に明らかにされてきている。「細胞内蛋白分解」の研究班においても、泉らによりメルトリン γ が膜結合型HB-EGFから分泌型を遊離すること[4]、また石浦らによりメルトリン γ がアミロイド前駆体の α セクレターゼとして働くという重要な研究がなされている[5]。

一方、我々は、ADAMファミリーと相同なメタロプロテアーゼドメインと、トロンボスポンジン(TSP)タイプIモチーフを持つ、分泌型のADAMファミリー分子を同定し、その構造的特徴からADAMTS1 (ADAM family gene with TSP motifs)と命名していた[6]。その後、我々は、ADAMTS1が他のADAMファミリーと違って細胞外マトリックス結合性であり[7]、また活性型のメタロプロテアーゼであることを明らかにしてきた[8]。また以前より、ヘビ毒メタロプロテアーゼに軟骨プロテオグリカンであるアグリカンを分解する活性があることが報告され、プロテオグリカンの分解とADAMとの関わりが推定されていたが、最近、アグリカンのコア蛋白を切断するAggrecanase-1、2がクローニングされ、いずれもADAMTS-1と同様の基本構造を持つ遺伝子であることが明らかにされた[9,10]。またI型プロコラーゲンN-プロテアーゼ

もTSPタイプI・モチーフを持つメタロプロテアーゼとして報告されており[11]、これらの分子を含め、TSPタイプI・モチーフをもつADAMファミリー遺伝子群が現在ADAMTSファミリーと呼ばれている。

2. ADAMTS1の特徴とADAMTSファミリーの基本構造

ADAMTS1は、がん悪液質誘導に関わる遺伝子群を検索する過程で、マウス結腸癌コロシ26のがん悪液質誘導性腫瘍で高発現する遺伝子として筆者らが同定したものである [6]。ADAMTS1遺伝子の発現は、in vivoでのLPS投与により心臓、腎臓等において誘導され、また胎生期においてもその発現が見られることから、炎症や組織発生におけるADAMTS-1プロテアーゼの関与を推定している。図1のように、ADAMTS1は、アミノ末端側に、ヘビ毒メタロプロテアーゼや他のADAMファミリーと相同なプロプロテイン、メタロプロテアーゼ、ディスインテグリン様の各ドメインを持っている。一方、ADAMTS-1のカルボキシル末端側の構造は、膜型のADAMファミリーとは異なり、Cysリッチ、EGF様、膜貫通領域の各ドメインを持たず、そのかわりにトロンボスポンジン(TSP)で見出されたタイプIモチーフを3つ有する分子である。ADAMTSファミリーでは、TSPモチーフがメンバーによってバラバラな位置にあるわけではなく、図1に示すように、中央部にTSPタイプI・モチーフが1コピー存在し、スペーサー領域をはさんでカルボキシル末端にTSPタイプI・サブモチーフが存在するという基本構造をとっている。しかし、カルボキシル末端のTSPタイプI・サブモチーフのコピー数は、そのメンバーによりまちまちである。

(a) TSPタイプI・モチーフ

ADAMTSファミリーにみられるTSPタイプI・モチーフは、トロンボスポンジン1、2で見出されたものである。トロンボスポンジンは、血小板の凝集促進作用、血管新生の抑制、細胞の接着や運動性への関与など多彩な機能を持つ細胞外マトリックス蛋白であり、タイプI、タイプII、タイプIIIモチーフなど各種の細胞外マトリックス等に結合する複数の機能ドメインから成り立っているが、ADAMTSファミリーに存在するTSPモチーフは、このうちのタイプI・モチーフのみである。このタイプI・

モチーフは補体第3成分を活性化するプロペルジンにも存在することから、別名プロペルジン・モチーフとも呼ばれ、ヘパラン硫酸などの硫酸化グリコサミノグリカンに結合するモチーフとして知られている。TSPタイプI・モチーフ中にはW(S/G)_xWおよびCS(A/V)(T/S)CGという硫酸化グリコサミノグリカンへの結合に重要な2つのエレメントが存在する。ADAMTSファミリーでは、中央部のタイプI・モチーフでこの2つのエレメントは良く保存されているが、カルボキシル末端のサブモチーフではW(S/G)_xWのエレメントが不完全である。しかしADAMTS1の場合、いずれのタイプI・モチーフも、ヘパリンへの結合に関しては機能的である[7]。またタイプI・モチーフはトロンボスポンジンの血管新生抑制活性に対応するモチーフとして知られているが、ADAMTS-1にも血管新生抑制活性があることが報告されており、我々のグループでも同様の結果を得ている。

(b) スパーサー領域 (ECM結合ドメイン)

ADAMTS1をクローニングした当時、3つのTSPタイプI・モチーフの間に介在する領域は、既存の蛋白との相同性がないためにスパーサー領域とよんだ。前述のようにADAMTS1は細胞外マトリックス結合性蛋白であるが、ADAMTS1のECM結合ドメインを調べた結果、3つのTSPタイプI・モチーフおよび、スパーサー領域がそれぞれ独自にECM結合活性を有することがわかっている[7]。すなわちADAMTS1の場合、このスパーサー領域はECM結合ドメインとして機能する。またADAMTS1をヘパリン存在下で発現した場合には、ADAMTS1はECMから培養上清中に遊離されることから、ADAMTS1の結合する相手方はECM中の硫酸化グリコサミノグリカンである。スパーサー領域は、ADAMTS1と他のADAMTSファミリーで保存された領域であることから、他のメンバーでも同様の機能が推定される。

3. I型プロコラーゲンN-プロテアーゼ(pNP1)(ADAMTS2)

細胞外に分泌された前駆体プロコラーゲンは、プロコラーゲンN-プロテアーゼおよびC-プロテアーゼにより、N末端およびC末端のプロペプチドが切断されてコラーゲン分子となる。I型プロコラーゲンN-プロテアーゼ(pNP1)は、I型およびII型プロ

コラーゲンに作用するN-プロテアーゼであるが、同酵素の欠損症として、1970年代にベルギーのウシで見つかった皮膚脆弱症 (dermatosparaxis)がよく知られている。この皮膚脆弱症のウシの皮膚では、pNP1の活性が欠損しているために、N末端プロペプチドが残存したpNコラーゲンが蓄積し、このため正常なコラーゲン線維の形成が阻害されて、皮膚の脆弱化が引き起こされる。ColigeらはpNP1遺伝子をクローニングし、pNP1が4つのプロベルジン(TSPタイプ I)モチーフをもつメタロプロテアーゼであることを報告したが[11]、図1のようにpNP1はADAMTSで共通した基本構造をとっており、現在ADAMTS2に割り当てられている。最近、皮膚脆弱症のウシのpNPI遺伝子には、メタロプロテアーゼをコードする部分に17bpの欠損変異があり、フレームシフト変異が生じていることが明らかにされている。またヒト先天性コラーゲン病のうち Ehlers-Danlos症候群 (EDS)のVII型Cが、同じくpNP1活性の欠損によりpNコラーゲンが蓄積することが知られているが、EDS-VII型Cの患者でもpNP1遺伝子にナンセンス変異が見つかり、同疾患がpNPI遺伝子の異常によることが証明された。

4. Aggrecanase-1, 2 (ADAMTS4, 5)

アグリカンは軟骨の主要なプロテオグリカンで、II型コラーゲンとともに軟骨マトリックスを構築している。またアグリカンはN末端の球状ドメインG1を介してリンクプロテインおよびヒアルロン酸に結合し、巨大な会合体を形成している。アグリカンにはAsn(341)-Phe(342)および、Glu(373)-Ala(374)という2つの主な切断部位が知られており、このうちAsn(341)-Phe(342)はマトリックスメタロプロテアーゼ群 (MMP-1,-2,-3,-7,-9,-13)により切断される部位であり、一方、Glu(373)-Ala(374)を切断するプロテアーゼがAggrecanaseと呼ばれている。Arnerらのグループはウシ鼻軟骨培養上清より Aggrecanase を精製、cDNA をクローニングし、Aggrecanase-1(ADAMTS4), Aggrecanase-2 (ADAMTS5(11))がADAMTS1と類似の構造をもつADAM型メタロプロテアーゼであることを明らかにした[9,10]。アグリカンにおける Aggrecanaseの切断部位はヒアルロン酸結合部位に近接しているため、

Aggrecanaseにより切断されたアグリカンは巨大会合体から遊離してしまい、結果として軟骨マトリックスが破壊される。また、Aggrecanaseで切断されたアグリカン断片が骨関節炎や炎症性関節疾患の患者の関節滑液中に検出されることから、これらの疾患における軟骨破壊へのAggrecanaseの関与が強く示唆されており、今後関節炎の治療のターゲットとして期待されている。

5. おわりに

TACEのような典型的なADAMファミリーは膜蛋白因子のセクレターゼとして働く膜型メタロプロテアーゼであるのに対し、ADAMTSファミリーは細胞外マトリックスに局在して、コラーゲンやプロテオグリカンなどのECM構成分子のプロセッシングや分解に関わる一連のメタロプロテアーゼ群であると考えられる。現在ADAMTSファミリーとしては8つの遺伝子が報告されているが、これらのうちの幾つかは、データベースに既に登録されていた遺伝子であったため、研究者によって異なった番号がつけられて多少混乱しているが、現在はHuman Gene Nomenclature Committeeで決められた番号が推奨されているようである。ADAMTSファミリー遺伝子は線虫*C. elegans*にもいくつか存在し、このうちGon-1遺伝子は生殖巣の形態形成に必須であることが明らかにされている[12]。またADAMTSファミリーの面白いところは、pNP1(ADAMTS2)が皮膚脆弱症の原因遺伝子であり、またAggrecanaseと関節疾患との関わりからも想定されるように、ADAMTSファミリー遺伝子の欠損または過剰な発現がECMの構築異常や破壊を引き起こし、結果として疾患と密接に関わる可能性が考えられることである。我々の研究グループでは、遺伝子欠損マウスの解析からADAMTS1の生体における機能を明らかにする方針で進んできたが、ADAMTS1遺伝子欠損マウスでは腎臓における異常など明らかになってきており、疾患との関連も期待している。TSファミリーにも多くの研究者が参入してきていて競争も激しくなっているが、なんとかADAMTS1プロテアーゼの生理的な役割を明らかにし、埋もれてしまわないように頑張りたいと思う。

参考文献

1. Wolfsberg, T.G. et al. (1995) *J. Cell Biol.* 131, 275-278.
2. Yagami-Hiromasa, T. et al. (1995) *Nature* 377, 652-656.
3. Black, R.A. et al. (1997) *Nature* 385, 729-733.
4. Izumi, Y. et al. (1998) *EMBO J.* 17, 7260-7272.
5. Koike, H. et al. (1999) *Biochem. J.* 163, 371-375.
6. Kuno, K. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 556-562.
7. Kuno, K. and Matsushima, K. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 13912-13917.
8. Kuno, K. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18821-18826.
9. Tortorella, M.D., et al. (1999) *Science* 284, 1664-1666.
10. Abbaszade I. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 23443-23450.
11. Colige, A. et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2374-2379.
12. Belloch R. and Kimble J. (1999) *Nature* 399, 586-590.

久野 耕嗣 (金沢大学がん研究所)

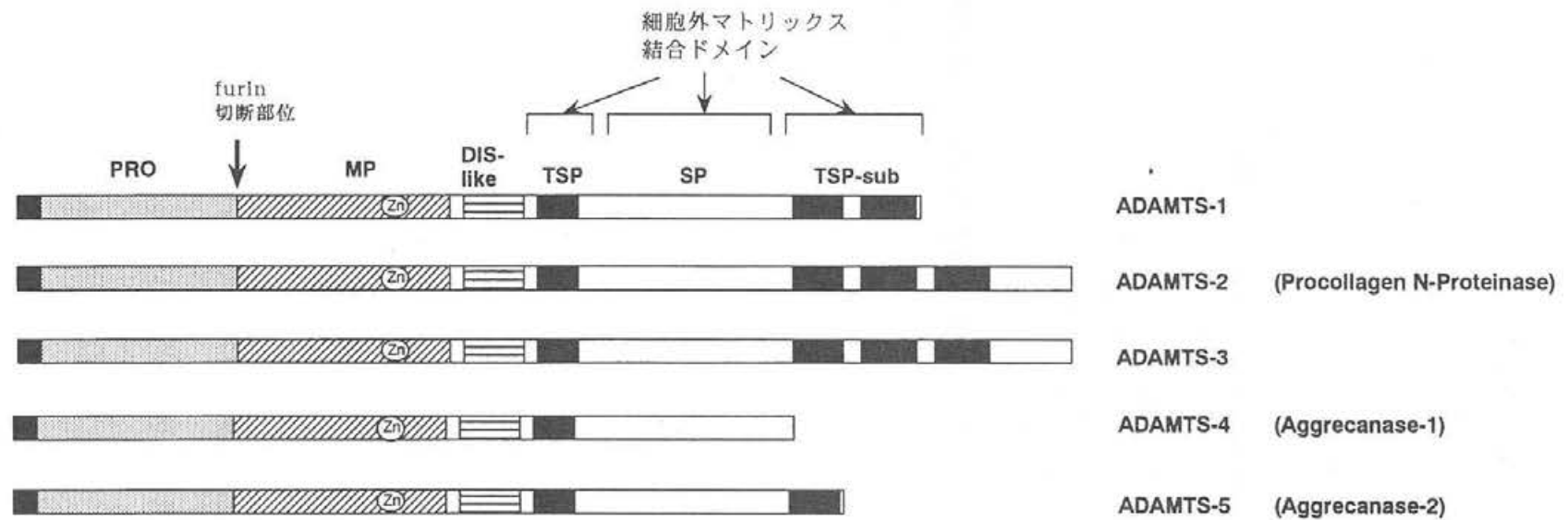


図1 ADAMTSファミリーの基本構造

PRO:プロドメイン、MP:メタロプロテアーゼドメイン、DIS-like: ディスインテグリン様ドメイン
 TSP: トロンボスポンジン・タイプI・モチーフ、SP: スペーサー領域、
 TSP-sub: トロンボスポンジン・タイプI・サブモチーフ

4. 一酸化窒素 (NO) による蛋白質の化学修飾と機能改変

はじめに

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は循環系、神経系の情報伝達のみならず感染や炎症の幅広いメディエーターとして機能し、さらには免疫反応の調節、アポトーシスの制御、発癌などの幅広い生命現象に関わっていることが明らかにされつつある。種々の病態において誘導型NO合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) の発現を介して過剰に産生されるNOは、可溶性グアニレートサイクラーゼの活性化による古典的な作用 (内皮依存性血管拡張など) に加えて、パーオキシナイトライト (ONOO) や NO^+ (ニトロソニウムカチオン)、 NO_2 などのNO由来の反応性窒素酸化物の生成を経て多彩な病態生理活性を発揮している (1)。近年このような反応性窒素酸化物が、種々の生理活性蛋白質のシステインやチロシンなどの化学的反応性に富むアミノ酸残基を、ニトロ化 (NO_2 あるいは NO_2^+ の付加反応)、ニトロソ化 (NO あるいは NO^+ の付加反応) あるいは酸化で修飾することにより、その生理活性を改変させることが知られるようになった。そこで本稿では、最近の報告や我々の知見をもとに、NOに依存したアミノ酸残基の化学修飾による蛋白質の機能変化について紹介する。

チオールのニトロ化、ニトロソ化による生理活性分子の機能変化

チオール基は化学的反応性に富み、酸化還元反応やその他の化学修飾を受けやすい。特に、システイン残基はその化学反応性の高さゆえに多くの生理活性物質の活性中心を形成する。また、システイン残基どうしの-SS-結合や金属との配位結合は、蛋白の高次構造形成において重要である。活性中心のチオール基、あるいは構造維持に関わるチオール基のニトロ化、ニトロソ化は、その蛋白の生理活性に重大な影響を及ぼすことが想定される。また、さほど重要でないチオール基でも、ニ

トロソ化されることにより、もとの生理活性に加え、ニトロソチオールとしての生理活性が付加されることも考えられる。そのような例として、カスパーゼのNOによる可逆的活性制御 (2-5)、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) のONOOによる活性化 (6-8)、 α 1-プロテアーゼインヒビター (α 1PI) のニトロソ化誘導体であるS-NO- α 1PI (9) の静菌作用などについて概説する。

1) カスパーゼのNOによる阻害とアポトーシスの制御

Fasリガンドやtumor necrosis factorなどのサイトカイン、そして抗癌剤など、様々な物質がアポトーシスを誘導することが知られている。アポトーシスの発現に細胞内蛋白分解酵素が関与していることは初期の研究段階より示唆されていたことであるが、今日では細胞内のチオールプロテアーゼである一連のカスパーゼカスケードが連鎖的に活性化され、細胞内蛋白質の分解が惹起されることにより、アポトーシスが誘導されるものと考えられている。このカスパーゼカスケードの活性化には、アポトーシス誘導の刺激の違いにより、あるいは細胞の種類の違いによって、複数の経路が存在していることがわかっているが、それらの最下流にはカスパーゼ3が共通して存在し、その活性化に引き続くヌクレアーゼ活性の発現がアポトーシスの遂行に重要と考えられている。

一昨年、NOがカスパーゼ3の活性を抑制する報告が相次いで発表され、注目された。Oguraらは、NO放出試薬 (NOR1) がカスパーゼ3の活性を濃度依存的に阻害し、過剰のチオール (グルタチオン) の存在下にて回復することを報告した (2)。一般に、ニトロソ化されたチオール基、すなわちニトロソチオール (RS-NO) は、還元反応により容易にNOを再放出するので、NOの除去に伴い蛋白の機能も可逆的に回復する。またMelinoらはFas刺激された細胞に引き起こされるアポトーシスとPARP (poly(ADP-ribose)polymerase) の切断がNO (NO+) 放出試薬 (S-nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP) により抑制されることを報告している (3)。カスパーゼ3の触媒ドメインであるp17は5個のシステイン残基を有するが、Dimmelerらは、その

うちでCys163のみが遊離のチオールとして存在し、これがNOによりニトロソ化を受ける標的残基であることを示した(4)。一方で、Fas刺激などをうけていない生理的条件下で、カスパーゼ3は不活性前駆体の状態で存在しているが、Stamlerらのグループは、これに加えて、内因性にNOSより産生されるNOがカスパーゼ前駆体を恒常的にニトロソ化していることで、その活性を制御しており、さらに、Fas刺激を受けることにより脱ニトロソ化と同時に前駆体の切断が起こり、カスパーゼ3は活性化されアポトーシスが引き起こされるという興味ある知見を報告している(5)。いずれにしても、NOの抗アポトーシス作用は、NOによる機能性蛋白の比較的単純な化学修飾を介する大変重要な細胞機能制御メカニズムの一つかもしれない。

2) その他のチオールプロテアーゼのNOによる阻害

カスパーゼ以外のチオールプロテアーゼも、同様にニトロソ化によりその活性が制御されている可能性がある。各種チオールプロテアーゼは、リソゾーム内蛋白分解の主要な役割を演じていることがわかっている。その中の一つカテプシンKは、特に破骨細胞による骨吸収において重要な働きを持つチオールプロテアーゼであるが、やはりこのプロテアーゼもNOにより失活することが報告されている(10)。我々はこれまで、溶血性連鎖球菌の菌体外毒素であり、劇症型溶連菌感染症の主要な病態発現因子の一つと考えられている*S. pyogenes* exotoxin B (SPE-B)の病態生理活性について検討してきた。SPE-Bもまたチオールプロテアーゼであり、dithiothreitol (DTT)にてチオール基をフリーにすることで活性化される。精製、活性化したSPE-BをNO放出試薬(NONOate)やニトロソチオール(ニトロソグルタチオン, S-NO- α_1 PI)と反応させることにより、その酵素活性が強く阻害された。興味あることに、それぞれのIC₅₀は3600, 1200, 17 μ M (NONOate; ニトロソグルタチオン; S-NO- α_1 PI)であり、NOよりニトロソチオール(特にニトロソ化蛋白であるS-NO- α_1 PI)により強い阻害活性が認められた。一般に、NOそのものによるチオールのニトロソ化よりもニトロソチオールから遊離のチオール基へのニトロソ転移反

応 ($RS-NO + R'SH \rightarrow RS-H + R'S-NO$) の方が、ニトロソ化の効率が良いことが知られている。従って、NOやニトロソチオールは、SPE-Bなどのチオールプロテアーゼ活性中心のチオール基のニトロソ化を介して触媒活性を失わせているものと思われる（未発表）。

3) MMPの活性化

MMPは細胞外マトリックス構成蛋白を分解し、多細胞生物の形態変化や炎症時の組織障害、癌の転移浸潤に重要な役割を演ずるメタロプロテアーゼ群である。MMPは不活性型前駆体（proMMP）として細胞外に分泌される。proMMPのpropeptide（autoinhibitory domain）中にはシステイン残基を含むPRCGV(N)PDという配列が保存されており、そのチオール基が活性中心の亜鉛イオンに配位結合することで基質との結合が妨げられ、不活性の前駆体性が維持されており（システインスイッチ説）、亜鉛イオンに配位したチオール基が何らかの化学修飾を受けることにより、その配位が切断され本酵素は活性化される。これまでMMPを活性化する化学修飾物質として、チオールと高い反応性を有する有機水銀化合物やN-ethylmaleimideなどのアルキル化剤、そして活性酸素種などが知られていたが、我々はこれに加えて、proMMPとNO₂あるいはONOO[•]を応させるとその活性化が惹起されることを報告した（7）。この活性化反応はNOやニトロソチオール（GSNOなど）ではみられないことから、システインスイッチのニトロソ化ではなく、ニトロ化あるいは酸化によりもたらされるものであると考えられた。さらに興味あることに、我々はこのproMMPのONOO[•]による活性化反応が、還元型グルタチオン（GSH）の存在下でより著明に増強することを見出した（8）。この活性化はMMPに対するグルタチオンの結合（conjugation）によりもたらされるが、その結合はDITTなどによる還元反応により切断できないことから、システインスイッチとグルタチオン間の単純な-SS-結合とは異なる結合様式であることが示唆された。これに関連して、最近、ONOO[•]とグルタチオンの反応によりニトログルタチオン（GSNO₂）が生成することが報告さ

れた (11)。そこで、化学合成したGSNO²とproMMPを反応させてみたところ、proMMPの著明な活性化が確認された。従って、ONOOとグルタチオンの反応により生じるGSNO²により、グルタチオンとPRCGVPD配列中のシステイン残基との間で通常のジスルフィドとは異なる結合（例えば-S(=O)-S-結合など）が生じ、不可逆的なMMPの活性化がもたらされているものと推察された。

4) α_1 PIのニトロソ化に伴う新たな生理活性の発現

α_1 PIは生体内の主要なセリンプロテアーゼインヒビター (serpin) であり、好中球エラスターゼやプラスミンなどを阻害する防御因子である。従来より知られていた知見として、酸化的修飾を受けやすく、特にその活性中心のメチオニン残基の酸化によりプロテアーゼ阻害活性を失うことが知られている。また α_1 PIは、その分子内に一つのCysを有しているが、我々は、NOと α_1 PIの反応により、このCys232のチオール基が容易にニトロソ化され、S-NO- α_1 PIが生ずることを見出した (9)。興味あることに、このS-NO- α_1 PIはトリプシンやエラスターゼに対する元来のserpinとしての阻害活性は保持しながら、血管平滑筋弛緩作用といったニトロソチオールとしての生理活性に加え、新たに細菌に対する強い静菌作用 (bacteriostatic activity) を獲得した。我々はその他のニトロソチオール (GSNO, S-NO-albumin) やNO放出試薬であるNONOateにも静菌作用を認めているが、S-NO- α_1 PIの静菌作用の強さ (IC₅₀) は0.1-10 μ Mで、S-NO-albuminの約10倍、そしてGSNOやNONOateの約1000倍強力であった。静菌スペクトラムは*S. aureus*, *S. pyogenes*といったグラム陽性球菌および*E. coli*, *S. typhi*, *S. typhimurium*といったグラム陰性桿菌いずれにおいても同程度に認められた (9)。さらにS-NO- α_1 PIは、前述のチオールプロテアーゼに対する阻害活性も有しており、 α_1 PIはニトロソ化に伴ない、従来のserpin活性に加え、チオールプロテアーゼ阻害活性と幅広いスペクトラムの静菌活性を獲得し、多様な生理活性を発揮することがわかった。

チロシンのニトロ化による生理活性分子の機能変化

チロシン (L-tyrosine) をはじめとする芳香族アミノ酸残基はベンゼン環 (フェノール基) の π 電子のため、高い化学的反応性を有する。また、生体内における ONOO⁻ をはじめとする反応性窒素酸化物の産生はニトロチロシン (3-nitro-L-tyrosine) の産生をもって知ることができる (12)。慢性関節リウマチ、肝移植後、敗血症性ショック、筋萎縮性側索硬化症などの多くの病態で蛋白のチロシン残基がニトロ化され、あるいは遊離のニトロチロシンの濃度が増加することが報告されている (13)。チロシンのニトロ化の機序として、a) ONOO⁻ によるニトロ化、b) ミエロパーオキシダーゼ (MPO) による NO₂ の酸化反応によるニトロ化、c) チロシンラジカルと NO のラジカルカップリング反応、d) ニトロ化脂質によるニトロ化反応、e) 酸性環境下での亜硝酸によるニトロ化などが考えられている (13)。これまでニトロチロシンの生成は反応性窒素酸化物のマーカーとして用いられてきたが、近年はニトロチロシンそのものの生理活性、あるいは生理活性蛋白のチロシン残基のニトロ化に伴う機能変化が注目されるようになってきた。

1) α -tubulin のチロシンニトロ化に伴う微小管形成不全とアポトーシス

ニトロチロシンの生物活性として、細胞障害、増殖抑制、そして細胞形態変化などが知られている。その機序として Eiserich らは、遊離のニトロチロシンが上皮、内皮、及び線維芽細胞中の細胞骨格蛋白である α -tubulin の C 末端側にほぼ選択的に取り込まれ (α -tubulin ligase を介して)、これが細胞の α -tubulin の重合を阻害することにより微小管形成不全を招き、形態変化、運動能低下、ひいては細胞障害 (アポトーシス) を招くことを見だし (14)、大変注目されている。

2) EGF レセプターのチロシンニトロ化に伴うシグナル伝達の誘発

EGFR (epidermal growth factor receptor) は上皮細胞の成長分化に関与するレセプター型チロシンキナーゼファミリーに属し、そのリガンドである EGF や TGF α

(transforming growth factor- α) との結合により2量体となることで、それ以降のシグナル伝達が惹起され、DNA複製や細胞分裂を促進する。van der Vlietらは、上皮系の樹立化細胞株であるA431細胞にONOO⁻を反応させると、EGFRのチロシン残基がニトロ化され、さらにそれがdityrosine cross-linkを形成することにより、不可逆的な、リガンドの結合を介さないEGFRの2量体化 (dimerization) が誘発され、それ以降のシグナル伝達が引き起こされることを報告した (15)。このことは、ONOO⁻ がリガンドを介さないレセプターの活性化により細胞の増殖や分化の制御異常をもたらし、その機序としてEGFレセプターのチロシン残基のニトロ化が関与している可能性を示しており、NO/ONOO⁻ の生理活性を考える上で示唆に富む知見である。

おわりに

以上述べてきたNOによる蛋白質機能改変のメカニズムの概略を図1にまとめた。この数年来、チオール基およびチロシンのニトロ化あるいはニトロソ化に関する化学反応論の進歩に加え、ニトロソチオールやニトロチロシンの生理活性、あるいは蛋白質中のシステイン残基やチロシン残基の化学修飾に伴う生理活性の変化 (蛋白質機能の不活性化・活性化あるいは新たな機能の付加) が注目を浴びている。また、本稿においては詳しく述べなかったが、この様なNO/ONOO⁻ による生体分子の化学修飾は、蛋白質・アミノ酸に限らず、さらにそれらの中枢にある遺伝子 (DNA, RNA塩基) にまで及び、これによる遺伝子変異に伴った生体機能の改変 (分子進化、発癌) は、21世紀に向けたこの分野における大変重要な研究課題である (16)。NOやONOO⁻ などの反応性窒素酸化物の生理活性や病態生理活性は、これまでその情報伝達因子としての機能や細胞毒性を中心に論じられてきたが、今後さらにNOによる生理活性物質や生体分子の化学修飾とその機能改変の分子メカニズムが解明されていくものと期待される。

参考文献

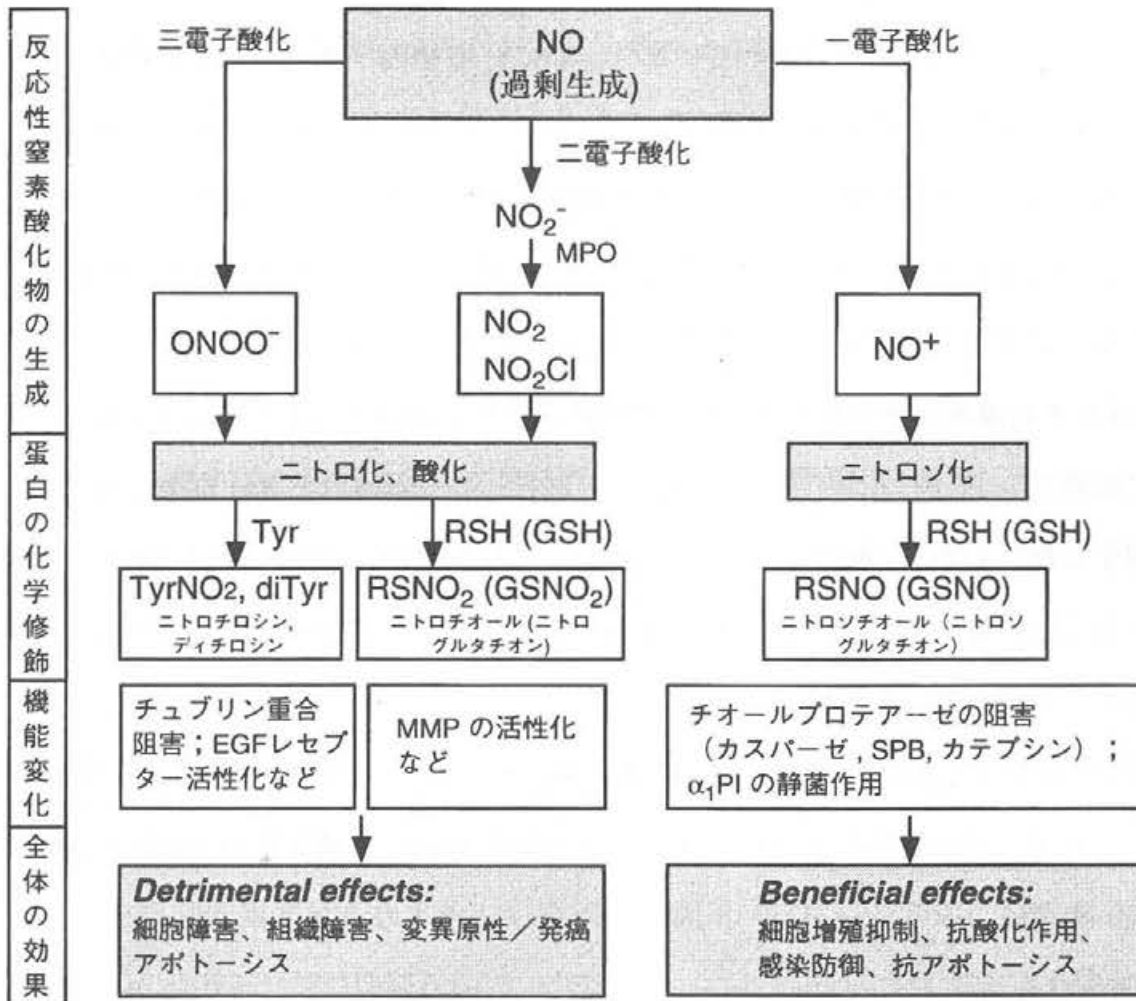
1. Inoue, K., Akaike, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Sawa, T., Otagiri, M., Suzuki, S., Yoshimura, T., and Maeda, H. (1999) *J Biol Chem* 274, 27069-27075.
2. Ogura, T., Tatemichi, M., and Esumi, H. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* 236, 365-369.
3. Melino, G., Bernassola, F., Knight, R. A., Corasaniti, M. T., Nistico, G., and Finazzi-Agro, A. (1997) *Nature* 388, 432-433.
4. Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., and Zeiher, A. M. (1997) *J Exp Med* 185, 601-607.
5. Mannick, J. B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D. T., Zeng, M., Miao, Q. X., Kane, L. S., Gow, A. J., and Stamler, J. S. (1999) *Science* 284, 651-654.
6. Okamoto, T., Akaike, T., Nagano, T., Miyajima, S., Suga, M., Ando, M., Ichimori, K., and Maeda, H. (1997) *Arch Biochem Biophys* 342, 261-274.
7. Okamoto, T., Akaike, T., Suga, M., Maeda, H., and Ando, M. (1998) in *The Biology of Nitric Oxide Part 6* (Moncada, S., Toda, N., Maeda, H., and Higgs, E. A., eds), pp. 283, Portland Press, London.
8. Maeda, H., Okamoto, T., and Akaike, T. (1998) *Biol Chem* 379, 193-200.
9. Miyamoto, Y., Akaike, T., and Maeda, H. (1999) *Biochim Biophys Acta*, on submission
10. Percival, M. D., Ouellet, M., Campagnolo, C., Claveau, D., and Li, C. (1999) *Biochemistry* 38, 13574-13583.
11. Balazy, M., Kaminski, P. M., Mao, K., Tan, J., and Wolin, M. S. (1998) *J Biol Chem* 273, 32009-32015.
12. Akaike, T., Noguchi, Y., Ijiri, S., Setoguchi, K., Suga, M., Zheng, Y.M., Dietzschold, B., and Maeda, H. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2448-2453.
13. Ischiropoulos, H. (1998) *Arch Biochem Biophys* 356, 1-11.
14. Eiserich, J. P., Estevez, A. G., Bamberg, T. V., Ye, Y. Z., Chumley, P. H., Beckman, J. S., and Freeman, B. A. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6365-6370.
15. van der Vliet, A., Hristova, M., Cross, C. E., Eiserich, J. P., and Goldkorn, T. (1998) *J Biol Chem* 273, 31860-31866.
16. Akaike, T., Fujii, S., Kato, A., Yoshitake, J., Miyamoto, Y., Sawa, T., Okamoto, S., Suga, M., Nagai, Y., and Maeda, H. (2000) *FASEB J*, in press.

岡本竜哉、赤池孝章、前田 浩（熊本大学医学部微生物学）

図 1.

NOによる様々な反応性窒素酸化物の生成を介した
生理活性蛋白質の機能改変

岡本・赤池



5. 細胞増殖因子受容体の細胞内分解の分子機構

<はじめに>

細胞増殖因子がその受容体に結合すると、受容体が活性化してシグナルが下流へと伝えられます。このシグナルの過剰がおこると、細胞の異常な増殖が起こり、悪性腫瘍や動脈硬化など、様々な疾病につながるということがわかっています。

生体には当然ながら、このような事態を回避するために、いろいろなネガティブフィードバックの経路が備わっています。特に、増殖因子研究のごく初期から、リガンド刺激されると受容体の内在化によるダウンレギュレーションが起こり、細胞をいわゆる「脱感作状態」にすることが観察されていました(1)。実際に、リガンド刺激後も内在化されないような変異型増殖因子受容体には、リガンド依存的に細胞をトランスフォームする活性があることも示されています(2)。

リガンド刺激された受容体は細胞内に内在化され、初期エンドソームに局在し、さらに後期エンドソームからリソゾームへと移行して分解されると、従来は考えられて来ましたが。しかし1992年に、リガンド刺激された増殖因子受容体がユビキチン化されることが見い出され(3)、これをきっかけに、プロテアソーム系の関与も示唆されるようになっていきます(4)。

この総説では、最近の進歩を中心にまとめ、ついで、私たちがこの問題にどのように取り組んでいるかを（スペキュレーションも含めて）紹介させていただきたいと思います。

<活性化した受容体はユビキチン化される>

先に述べた増殖因子受容体のユビキチン化は、班員の森聖二郎先生（千葉大学医学部）がスウェーデンのルードヴィック癌研究所に留学中にされた発見です。森先生は、リガンド刺激後に血小板由来増殖因子（PDGF）受容体が電気泳動上スメ

ア化することに注目し、これがユビキチン化によることを明らかにされました(3)。また、このユビキチン化には受容体のキナーゼ活性が必要であることも示されました。この後、他の増殖因子受容体においてもリガンド刺激依存的にユビキチン化がおこることがつきつぎに報告され、一部の例外はあるものの、チロシンキナーゼ型の増殖因子受容体に広く認められる現象であることがわかっています。

PDGF受容体の場合、細胞内ドメインのC-末端側から98残基を欠失したり、一部のチロシン残基をフェニルアラニンに置換したりすると、ユビキチン化の程度が非常に低下することが知られていますが、そのような変異型受容体では、リガンド刺激後の受容体の分解が有意に抑制されます(5)。したがって、受容体の活性化に依存したユビキチン化は、確かに受容体分解のシグナルになっているわけです。これは、活性化した受容体からのシグナルをシャットオフする機構として、合理的なものと考えられます。

また、PDGF受容体の細胞内分解はプロテアソーム阻害剤の添加によって有意に抑制されます(4)。このことはプロテアソーム系が分解過程に関与していることを示唆しています。ただし、プロテアソームがユビキチン化された受容体を直接分解しているのか、何らかのタンパク質がプロテアソーム依存的に分解されることが受容体の分解経路への移行に必要なのかははっきりしない点もあり、議論の分かれるところかもしれません(6)。PDGF受容体の分解はラクタシスチン添加によって有意に遅延しますが、びたりと抑制されるわけではありません。しかし、クロロキンを追加しても抑制効果は見られません。上皮成長因子(EGF)受容体の細胞内分解は、MG132により部分的に抑制され(7)、クロロキンによりほぼ完全に抑制されます。いっぽう、肝細胞増殖因子(HGF)受容体の場合、ラクタシスチンにより分解はほぼ完全に抑制されます(8)。

このように見てくると、同じ活性化細胞増殖因子受容体でも、分解のされ方は一様ではないことが考えられます。しかし、同じように(?)ポリユビキチン化された受容体が異なった分解をうける仕組みは謎のままです。あるいは、ユビキチン化のさ

れ方が微妙に違うのか、分解経路へと進む際の補助的な因子の関与のしかたが違うのか、可能性はいろいろと考えられます。

ごく最近、EGFやPDGFの受容体をユビキチン化するリガーゼ (E3) としてc-Cblが同定されました(9,10)。c-Cblは、受容体からのシグナルをネガティブに調節することで、注目を集めていたタンパク質です。c-Cblはリン酸化チロシン結合ドメインをもっており、自己リン酸化した受容体と結合することがわかっています。これは受容体のユビキチン化には受容体のチロシンキナーゼ活性が必要であることと、よく一致しています。c-Cblはもともと、レトロウィルスから癌遺伝子として単離された*v-cbl*の細胞ホモログとして見いだされたものです。興味深いことに、*v-cbl*ではリン酸化チロシン結合能をもつN末端側だけでtruncateされた形になっており、c-Cblの作用に対してドミナントネガティブ的に抑制することが容易に想像できます。c-Cblの生理的機能、すなわち増殖因子受容体のユビキチン化の抑制が腫瘍形成につながることを示唆しており、増殖因子受容体のダウンレギュレーションが増殖シグナルの過剰を防ぐ重要な機構になっていることがわかります。

<ユビキチン化された受容体の細胞内移行とHrs>

ポリユビキチン化した受容体は細胞内へと内在化されます(ただし、内在化してからユビキチン化されるという考えもあります)。このようにしてとりこまれた複合体は初期エンドソームに局在し、先に述べたように、ライソゾームあるいはプロテアソームにより分解されていくと考えられています。いっぽう、一部は分解されずにリサイクルされて細胞表面に戻っていきます。では、内在化された受容体が分解経路に移行するのか、リサイクルされるのかという選別はどのような分子機構によるのでしょうか?このプロセスにユビキチン化が関与している可能性は大です。チロシンキナーゼ型増殖因子受容体の中にはインスリン受容体のようにユビキチン化されない変わり種もあるのですが、インスリン受容体はリガンド刺激後、内在化されるものの、分解経路に移行しないで細胞表面へとリサイクルされてしまうので

す。また、EGF受容体刺激時にc-Cblの働きを抑制してやると（すなわち、ユビキチン化も抑制される）大部分が細胞表面にリサイクルされることも報告されています(7)。

この、内在化された受容体の細胞内移行をコントロールしている物質の候補として私たちが注目しているのが、Hrsというタンパク質です。HrsとはHGF-regulated tyrosine kinase substrateの略であり、1995年に駒田雅之博士（関西医科大学・現フレッド・ハッチンソン癌研究所）によって同定されたものです(11)。このタンパク質はHGFをはじめとして様々な増殖因子の刺激によりチロシンリン酸化されるタンパク質であり、細胞内では初期エンドソームに局在することが知られています(12)。酵母ではHrsのホモログとしてVps27というタンパク質が知られていますが、Vps27変異株ではエンドソームから液胞へのタンパク質の輸送に支障をきたし、結果としてエンドソームがタンパク質の蓄積をおこして肥大化することがわかっています(13)。哺乳類のHrsも同様の機能を担うことが想像されますが、実際、ノックアウトマウスの実験もこの考えを支持するものでした。すなわち、Hrsノックアウトマウスの細胞では、初期エンドソームが肥大化したような像が観察されたのです(14)。

HrsはそのN-末端領域にFYVEドメインという特徴的な構造をもっています。このFYVEドメインはZnフィンガーの一種なのですが、昨年になって、PI3P、いわゆるホスファチジルイノシトール3リン酸に特異的に結合することが示され、これが初期エンドソームへの局在に重要であることが報告されました(15)。また、Hrsのリン酸化や初期エンドソームへの局在化もホスファチジルイノシトール3キナーゼ（PI3K）の阻害剤であるワルトマニン処理によって抑制されることが知られています(14)。どうやら、Hrsの機能はPI3Kと密接な関係があるようなのです。ところが、PI3Kそのものも、内在化されたタンパク質の細胞内移行に深く関与していることが知られています。酵母でのPI3KのホモログはVps34/end12と呼ばれており、エンドサイトーシスによりとりこまれたタンパク質が液胞（リソソームに該当）へと輸送され分解されるのに必要なタンパク質です(16)。また、PDGF受容体の刺激後の挙動の

観察から、PI3Kが活性化されることは受容体内在化には必要ないものの、内在化した受容体が一サイクルされずに分解経路へ移行するのに必要であることもわかっています(17,18)。したがって、直接的な証拠が得られるにはいたっていませんが、PI3Kがこのプロセスに関与するときの実行分子がHrsである可能性が考えられます。

<Hrs-Hbp複合体の機能>

Hrsの機能を探る目的でHrs結合タンパク質をyeast two hybrid systemにより検索し、得られたのがHbp (Hrs binding protein)です(19)。HrsとHbpはお互いのcoiled-coil領域を介して構成的に複合体を形成しています。HbpのSH3ドメイン欠失体やcoiled-coil欠失体を過剰発現した細胞株では、増殖因子や受容体の内在化は影響をうけないのに、その分解は有意に抑制されることがわかりました。したがって、HrsとHbpが複合体を形成して増殖因子/受容体の細胞内分解に関与しているらしいこと、その機能にはHbpのSH3ドメイン結合タンパク質との相互作用が重要であることがわかりました。

では、このHbp-SH3結合タンパク質は何か？ということが問題になります。しかしながら、細胞内での結合タンパク質を探り当てるということは、手法的な発達はあるものの、それほどやさしいことではありません。私たちは、HbpのSH3ドメイン結合タンパク質として、Far-Western法によりUBP-Y (ubiquitin specific protease-Y)を同定しています。これは1998年に発見されたタンパク質であり(20)、詳しい機能についてはわかりませんが、ユビキチン系に結びつくことから、HbpのSH3結合タンパク質の候補としてはもっともらしく思えます。ただ、この相互作用が*in vivo*でどのような意味をもっているのかは、今後の検討課題です。

いっぽう、Hbpの性質について、他にも面白いことがわかってきました。Hbp結合タンパク質をFar-Westernスクリーニングしたときに、ポリユビキチン(ユビキチン前駆体)が陽性に出ていたため、Hbpがユビキチンと相互作用する可能性を考え

ていましたが、最近になって、Hbpとユビキチンが相互作用することを確認できました。Hbpのユビキチン結合領域は、まだ同定できておりませんが、検索した限りでは既知のユビキチン結合タンパク質とはアミノ酸レベルでの有意な相同性はみられておりません。このユビキチン結合能が、ユビキチン化して内在化した受容体の分解経路への選別過程に関与しているのではないかと考えて研究を進めています。

<さいごに>

このようにして見つかってきた、タンパク質相互作用により細胞内で実際に機能的な複合体が形成されている可能性については、今後、きちんと確認していかなければなりません。複雑な制御系であるだけに、解析を進めるにつれ、役者がどんどん増えていくような気もしています。また、先にも述べたように、分解経路におけるプロテアソームの役割が十分に理解されたとはいえないことも、解決すべき問題のひとつでしょう。

最近では、増殖因子受容体からのシグナルをネガティブに制御する機構の研究に注目が集まりつつあります。抑制的制御機構の破綻は細胞の異常増殖につながるため、疾病との関連にも興味もたれます。このような流れのなかで、ユビキチン化が関与したシステムは、その中心的な話題として研究が進んでいくものと思われます。長い間、発展の乏しかったこの領域に、今後の何年間かに大きな進展があるものと期待しています。

参考文献

- (1) Heldin, C.-H., Westermark, B., and Wasteson, Å. (1979) *Nature* 282, 419-420
- (2) Wells, A., Welsh, J.B., Lazar, C.S., Wiley, H.S., Gill, G.N., and Rosenfeld, M.G. (1990) *Science* 247, 962-964
- (3) Mori, S., Heldin, C.-H., and Claesson-Welsh, L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 6429-6434
- (4) Mori, S., Tanaka, K., Omura, S., and Saito, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* 270,

29447-29452

- (5) Mori, S., Heldin, C.-H., and Claesson-Welsh, L. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 577-583
- (6) Hicke, L. (1999) *Trends Cell Biol.* 9, 107-112
- (7) Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger B., and Yarden, Y. (1998) *Genes Dev.* 12, 3663-3674
- (8) Jeffers, M., Taylor, G.A., Weidner, K.M., Omura, S., and VandeWoude, G.F. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 799-808
- (9) Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T., and Liu, Y.C. (1999) *Science* 286, 309-312
- (10) Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S.A., Tsygankov, A.Y., Alroy, I., Lari, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., and Yarden Y. (1999) *Mol. Cell* *in press*
- (11) Komada, M., and Kitamura, N. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15, 6213-6221
- (12) Komada, M., Masaki, R., Yamamoto, A., and Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 20538-20544
- (13) Piper, R.C., Cooper, A.A., Yang, H., and Stevens, T.H. (1995) *J. Cell Biol.* 131, 603-617
- (14) Komada, M., and Soriano, P. (1999) *Genes Dev.* 13, 1475-1485
- (15) Gaullier, J.-M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., and Stenmark, H. (1998) *Nature* 394, 432-433
- (16) Munn, A.L., and Riezman, H. (1994) *J. Cell Biol.* 127, 373-386
- (17) Joly, M., Kazlauskas, A., Fay, F.S., and Corvera, S. (1994) *Science* 263, 684-687
- (18) Joly, M., Kazlauskas, A., and Corvera, S. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13225-13230
- (19) Takata, H., Kato, M., Denda, K., and Kitamura, N. *Genes to Cells* *in press*
- (20) Naviglio, S., Matteucci, C., Matoskova, B., Nagase, T., Nomura, N., DiFiore, P.P., and Draetta, G.F. (1998) *EMBO J.* 17, 3241-3250

(宮澤恵二：東京工業大学 生命理工学部)

(6) トピックス

1. “カテプシンC” ノックアウトマウス

カテプシンCノックアウトマウスはNK細胞、CTL細胞の機能不全を引き起こす。カテプシンC (別名 Dipeptidyl peptidase I) はリソゾームに存在するパパイン型システインプロテアーゼである。一次構造は1991年、筆者らのグループにより決定された(1)。カテプシンCは一次構造上、ほぼ成熟型酵素部分に匹敵する長さのプロペプチドを持っているという点で、他のパパイン型システインプロテアーゼと異なっていた。また、オリゴマーを形成しており、リソゾーム分画から精製されたにもかかわらず、部分ペプチドとしてプロペプチド部分のアミノ酸配列が検出されたことから、この酵素はリソゾーム中でプロ型酵素と成熟型酵素が共存し、オリゴマーを形成していると考えられていた。最近、このオリゴマー形成はゴルジ体に到達する前に行われていることが、明らかにされた(2)。この酵素の酵素学的特徴として、タンパク質からジペプチドを切り出すこと、中性付近でエンドペプチダーゼの活性を持つことがあげられる。この性質から、プロテインケミストの間からは、アミノ酸配列を決定するのに使用することが模索されていた。

しかしながら、免疫ロジストの目からは全く別の観点で興味もたれた。カテプシンCは、試験管内でNK細胞やCytotoxic T細胞が他の細胞にアポトーシスを引き起こさせる実行部隊であるグランザイムAおよびBを活性化する(3、4)。グランザイムAに関してはその作用点は明らかにされていないが遅発性アポトーシス(シグナリング後6時間前後)を引き起こし、グランザイムBはカスパーゼと同様にアスパラギン酸のC末側を切断することにより早発性アポトーシス(シグナリングから2時間以内)を引き起こす。これらの酵素はいずれもセリンプロテアーゼであり、NK細胞やCTL細胞の分泌顆粒に存在している。この分泌顆粒は特殊化されたり

ソゾームであり、グランザイムAおよびBも他のリソゾーム酵素と同様にマンノース-6-リン酸を糖鎖として持っている。これらの酵素は、標的細胞の細胞膜にパーホリンが標的細胞の細胞膜に穴をあけた後、分泌顆粒から放出されて標的細胞の細胞質に到達し、カスパーゼ群の下流でアポトーシスの引き金を引くと考えられている。これまでに、パーホリンのKOマウス、グランザイムAのKOマウスおよびグランザイムBのKOマウスが作成され、そのNK細胞やCTL細胞の細胞障害活性が検討されている。パーホリンKOマウス由来のものはほとんど標的細胞にアポトーシスを誘導しないのに対して、グランザイムAのKOマウスでは早発性アポトーシスのみが誘導され、グランザイムBのKOマウス由来のものでは遅発性アポトーシスのみが誘導された。そして、グランザイムA KOマウスとグランザイムB KOマウスを交配させて作成したダブルKOマウス由来のものではパーホリンKOマウスと同様に、ほとんど標的細胞にアポトーシスを誘導する活性をもっていなかった。

1997年になり、2つのグループからカテプシンCの遺伝子構造が発表された(5、6)。いずれもシングルコピー遺伝子であったが、驚いたことにヒトとマウスで遺伝子の構造が全く異なっていた。ヒトカテプシンC遺伝子は2つのエキソン、全長3.5kbpであり、IL-2により発現が増強される。これに対してマウスの遺伝子は7つのエキソン、全長20kbpにおよび、T細胞の活性化によって遺伝子の発現が増強することはなかった。このことから、後者のグループは生体内でのカテプシンCによるグランザイムAおよびBの活性化に疑問をいただいていた。1999年7月、後者のグループからカテプシンCのKOマウスの論文が発表された(7)。カテプシンC KOマウスは正常に生まれ、発育し、妊娠、出産も正常であった。また、血液中のリンパ球、胸腺や、脾臓内のリンパ球の表面マーカーも正常マウスのものと同様であった。予想されたように、NK細胞中のグランザイムはプロ型のままであった。また、好中球中のカテプシンGやエステラーゼも不活性型のままであった。さらに、NK細胞やCTL細胞の細胞障害活性は、パーホリンKOマウスやグランザイムのダブルKOマウスと同じ程度にまで低下していた。すなわち、試験管内で見い出さ

れたカテプシンCのグランザイム活性化機構は生体内でも機能していることが明らかになった。このことは、生体内にカテプシンCの機能を代替するジペプチジルアミノペプチダーゼが存在していないことを意味している。カテプシン類では、基質特異性のオーバーラップのために、試験管内で認められた活性がKOマウスでも認められることは稀である。カテプシンCはすべての臓器で発現が認められていることから、今後、カテプシンCのKOマウスをより詳細に検討することで、カテプシンCの他の細胞での機能を明らかにしてほしいと思う。

参考文献

1. Ishidoh K, Munro D, Sato N, Kominami E. (1991) Molecular cloning for cDNA of rat cathepsin C - cathepsin C, a cysteine proteinase with an extremely long propeptide-. J. Biol. Chem. 266, 16312-16317.
2. Demirov, D., Sarafian, V., Kremensky, I., Ganey, V. (1999) Evidence for protein splicing in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. Biochim. Biophys. Acta, 1448, 507-511.
3. Mcguire, M.J., Lipsky, P.E., Thiele, D.I. (1993) Generation of active myeloid and lymphoid granules serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidylpeptidase I. J. Biol. Chem. 268, 2458-2467.
4. Kummer, J.A., Kamp, A.M., Citarella, F., Horrevoets, A.J.G., Hack, C.E. (1996) Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. J. Biol. Chem. 271, 9281-9286.
5. Rao, N.V., Rao, G.V., Hoidal, J.R. (1997) Human dipeptidyl-peptidase I - Gene characterization, localization, and expression-. J. Biol. Chem. 272, 10260-10265.
6. Pham, C.T.N., Armstrong, R.J., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Payan, D.G., Ley, T.J. (1997) Molecular cloning, chromosomal localization, and expression of murine dipeptidylpeptidase I. J. Biol. Chem. 272, 10695-10703.
7. Pham, C.T.N., Ley, T.J. (1999) Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 8627-8635.

(石堂一巳・順天堂大学・医学部)

(7) 掲示板コーナー

“ふ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”

「ふろておりしす」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「ふろておりしす」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絃一教授が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。

(ふろておりしす 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。

(ふろておりしす 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。

(ふろておりしす 事務局)

(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11号です。さて、本誌10月号において「IPS (International Proteolysis Society) 設立」についての案内と第1回国際会議が開催予定であるとの記事を掲載した。その後の、顛末について記しておきたい。ご存知のようプロテオリシスに関する国際的な組織としては、ICOP (International Committee on Proteolysis)があり、それは主としてACOP, ECOP, JCOPから構成されており、3年毎に米国・欧州・日本で国際会議が開催されてきた。日本でも、勝沼先生および鈴木先生が主催されたICOP会議は、多くの班員の記憶に深く刻まれており、我が国における「プロテオリシス」研究史の金字塔になっていることは周知の通りである。この組織のもう一つの活動は、ICOP News Letterを発行して、世界のプロテオリシス研究の動向を全世界のメンバーに提供してきた。ところが、前回のNews Letterに突然、ICOPがIPSに転換される(発展的解消?)と言う内容の記事が配布され、併せて最後のICOP会議は第1回のIPS会議に変更して行われることが伝えられた。同時に、この記事はインターネットを通じて全世界に流された。この動向に対して、定山溪の夏期ワークショップでの総括班会議において、勝沼先生より「このIPS設立の動きは寢水の話であり、これまでのICOPにおける日本の活動を全く無視したものであって容認し難い。本来、ICOP会議を開催してから、討議すべきものである。JCOPとして見解を質すべき」との憤怒のご意見が出されました。この要請を受け、鈴木領域代表者(JCOP代表)がIPS組織委員会会長のBonnie Sloan教授に対して、かなり厳しい内容の質問状を送ったが、「返答無し」という結果であった。News Letter等の情報から考えると、IPSの実体については第1回のIPS会議中に討議するように企画されていたと思われ、鈴木先生の質問状に対応すべき回答が準備されていなかった可能性が高いと思われる。あるいは、予想もしなかった質問であったために、答えに窮し意識的に無視したとも考えられる。しかし、そもそもこのIPS設立の話は本末転倒と言うべき事態である。本来ICOP会議を開催してから、その場で新しい組織、即ち「IPS設立」を提案して討議すべきであり、なんの説明もないままにICOP会議をIPS会議に変更して会議を開催するなど、全く常軌を逸していると言っても過言でない事柄である。しかも、筆者はその会議に参加していないので側聞するに、そのIPS会議ではIPS変更を前提にして今後の運営について討議するなど、会議主催派の独断専横とも言うべき事態であつたらしい。従って、勝沼先生の見解は、真に正鵠を得たものであり、これまでにJCOP側代表としてICOPの発展に貢献されてきた先生のお怒りは全く、妥当と言うべきものである。さて、第1回IPS会議の内容について

ては木南領域副代表者の記事に詳しいので、参照されたい（但し、会議の顛末については、非常に控え目に書かれていますので、本稿と対照して読まれると、全体が良くお分かり頂けるかも知れない）。何よりも、残念であることは、日本が、北米・欧州IPSとは別格に第3の「その他の国々」の範疇に組み込まれたことは、何としたことであろうか！これまでのICOP運営の貢献度から、せめて、アジア・オセアニアIPSでも組織して、その中の指導的立場を日本が堅持する程度の優遇性が与えられて然るべきと思われる。これでは、日本のプロテオリシス研究の名誉が著しく損なわれる事態にならないかと危惧される。何と云っても、「その他の国々」とは、アフリカ・アジア・南アメリカ、そして南極・北極等々の一員であることを意味するので（この表現の趣旨は、これらの国々の知的水準を貶めることを意図するのではなく、少なくともこれまでのプロテオリシス研究に大きく貢献してこなかった現状を比喩的に表現したものである）、国際社会の仲間入りをしたと喜ぶ馬鹿もいるまいというのが、正直な感想であろう。これまで、ICOPの発展に貢献されてきた日本を代表する諸先生方の功績を如何に評価すべきかを考えると、言葉が無いといっても過言でない。これでは、良識ある日本のプロテオリシスのメンバーが、積極的なIPS参加に逡巡するのではと危惧される。次回は、欧州（ミュンヘン）で開催される予定らしいので、関係者は日本の名誉のためにも大いに巻き返しを計って頂きたいものである。あるいは、そもそも今回のIPS設立は、米国の一部がヘゲモニーを発揮しての動向であり、世界からのコンセンサスを得ているとは言い難い現状を踏まえると、IPSそのものを認めないという動きがあっても然るべきでなかろうか。最も懸念すべき問題は、このような恣意的な運営体制では、一流の研究者達から疎んじられ、かつてのICOPのようなプロテオリシス世界の中心的な役割を担うことに大きな齟齬をきたさないかと言うことである。――――うん。これらの見解は、編集部へ寄せられた参加者の一部の意見を代弁したものであるもので、当然ながら反論も大いにあることが予想される。大事な問題であるので、班員及び関係者のご意見を承りたい。この問題に関して本誌読者の意見を次号に載せたいので、是非、記事をお寄せ下さい（本稿への反論を含め、如何なる見解も掲載拒否は致しません）。特に、今回の会議参加者からの積極的な見解を戴きたいと思っています。活発な、意見の応酬になることを期待しています。今回の編集後記は、余計な挑発を繰り返したので、いつもより長くなりましたが、大事な問題でもありますので、ご了承願いたいと思います。それでは恒例により、投稿を呼びかけます。次回は最終号ですので、「末期」を飾るためにも（我が国のプロテオリシス研究が、このような事態に陥らないことを祈念しますが）できる限り立派なニュース誌に仕上げたいと思っています。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“ぶろておりしす”発行事務局：都臨床研 田中・川島）

編集後記に対する付記

「ふるておりしす」発行事務局の田中・川島両先生が書かれた「編集後記」を見て、これまでのICOPの委員で第一回IPS会議に出席していた者として、ご参考までに若干の途中経過と会議の様子を付け加えます。

編集後記にも書かれているように、本年7月に定山溪で行なわれたワークショップの時に開催された総括班会議で、勝沼先生からIPSの暫定委員に質問状を出したらどうかとの提案がありました。木南先生と私が日本のICOPメンバーに登録されていますので、私が勝沼先生の意見を代表した形で手紙を書き、木南先生にも目を通していただいたものを、Michigan会議の責任者で、IPSの暫定的な責任者であるBonnie Sloane教授に送りました(7月21日付)。

手紙の内容の要点は大体次ぎのごとくです。

「9月に開催されるMichiganの会議は第一回IPS学会と宣伝され、ICOPがIPSに変わることで1999年3月に発行されたICOP News Letterにも記載されているが、少なくとも日本のICOPメンバーにはこれまで正式な連絡は何もない。IPS学会に変える理由等をICOP News Letterで広く一般に知らせるべきだとJudy Bond教授

(News Letter 発行責任者)に伝えたが、IPSに変わる通知が出ただけで、変わる理由は明らかにされなかった。我々には正式な情報が伝わってこないので、

- ① ICOPからIPSに変える考えはどのように出てきたのか、
- ② これまで何故ICOPメンバーの間でこのことが話し合われなかったのか、
- ③ 変えなければならない理由は、
- ④ ICOPの何処が悪いのか、新しい組織の利点はなにか、
- ⑤ IPSのポリシーは？もし、IPSがユビキチン/プロテアソームの領域などを含めプロテオリシスのほとんどの領域を取り込んだ大きな学会にするなら、この変化はまだ不十分ではないか。あまり学会の大きさを問題にしないのなら、変えなければならない理由が明確でない、
- ⑥ 学会組織は資金を集めるには良いかもしれないが、一方では、非学会員の自由な参加を制限することにならないか。

これらの点が良く分からないので、MichiganのIPSのbusiness meetingの前にまずICOPメンバー会議を開いてメンバーの理解を取り付けるべきではないか。」

この手紙に対し、9月9日付けでSloane教授から概ね次ぎのような手紙がきました。正式な学会組織にした方が良いというのは主に次ぎの理由です。

- ① プロテオリシスの領域は学会間の競争が激しく、領域の重複もあり、正式なスポンサーがないと資金集めが厳しい
- ② プロテオリシスの領域は拡大しつつある
- ③ ICOP開催のための資金を集めるのが難しい(特に米国では)。
- ④ ICOPはヨーロッパとアジアの会議なので興味が無い人が多い(特に米国では)。
- ⑤ プロテオリシスは重要な広い領域なので、正式な学会組織にし、選挙できちんと選ばれた役員が一定の任期を勤めるのがよい(これも主に米国では)。

この手紙と共に、Michiganの会議で提示されたIPS学会の規定の原案が同封されていました。

ICOPはそもそも東欧で始まったのでヨーロッパ色が強だけでなく、日本は梅沢・青柳先生のプロテアーゼインヒビターや勝沼先生のカテプシンなどプロテアーゼ全般の研究を通じて多大な寄与をしてきたため、ICOPはヨーロッパと日本が中心の学会であるとの印象を与えるのは事実かもしれません。また、ICOPの運営は10人足らずのICOPメンバーが中心で行なわれ、ICOPメンバーの選出法や任期が規定されていないので、米国人から見ると非民主的で面白くない点が多かったかもしれません。このような理由から米国中心の会議に変え、新しい学会組織を作る動きが米国で起こったと判断しています。

MichiganのIPS会議ではICOPメンバー会議は結局おこなわず、IPSのbusiness meetingが開かれIPSの役員選挙を行いました。Business meetingの前にIPS学会の暫定委員を中心に何回か話し合いが持たれましたが、結局、選挙では①アメリカ・カナダ、②ヨーロッパ、③その他の地域（アジア、アフリカ、メキシコ以南の南アメリカ）の三地域にわけ、各地域から同数の候補者を指名し、出席者は全員、自分の所属地域だけでなく、他の地域についても投票を行ないました。各地域の上位得票者3名、他に全体の得票で上位3名の計12名を役員として選出し、初代の会長にはBonnie Sloane教授が選出されました。日本からは木戸博教授が選出されました。結果的にはほぼ米国の思惑通りになり、ICOPに対するこれまでのヨーロッパや日本の貢献を考えると、はっきり言えば米国に乗っ取られた感じかもしれません。組織の細かいことを問題にするより、これまで以上に日本の研究の実績を学会で示すことで淘汰を図っていくべきでしょう。

この他、IPSの学会誌の発刊が提案されました。多数の出席者は新しい雑誌の刊行には反対でしたが、business meetingでは採決は行なわず、引き続き検討することで会議は終了しました。新しい雑誌を刊行しても会員多数の積極的な賛成がないと雑誌の将来は厳しいでしょう。

各国夫々の思惑があったようですが、日本は地理的に離れ、語学の点でもハンデがあり、大多数をしめる米国の一般参加者にまで日本の宣伝が行き届かない点を痛感しました。その点、言葉に不自由しないオーストラリア、南アフリカなどは第三地域の選挙では得をした感があります。選挙は一見、公平ではありますが、自分の地域以外に対しても選挙権を持つこと、参加者が多い開催国の意向が出やすいことなど幾つかの問題点が明らかになりました。

次回はW. Bode教授が開催責任者となり、ドイツのミュンヘン近郊で行なわれることも決定されました。IPSに関しては今後、日本代表の木戸博教授から色々な情報が発信されると思います。ご期待下さい。

鈴木 絃 一

(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。

Activation of the Proteasomes of Sand Dollar Eggs at Fertilization Depends on the Intracellular pH Rise

Kazuyoshi Chiba,* Janet M. Alderton,† Motonori Hoshi,‡ and Richard A. Steinhardt†¹

*Department of Biology, Ochanomizu University, 2-1-1 Ohtsuka, Tokyo 112-8610, Japan;

†Molecular and Cell Biology, University of California at Berkeley, 391 LSA, Mail Code 3200,

Berkeley, California 94720-3200; and ‡Department of Life Science, Tokyo Institute

of Technology, Nagatsuta-cyo, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226, Japan

The mechanism of the activation of intracellular proteasomes at fertilization was measured in living sand dollar eggs using the membrane-impermeant fluorogenic substrate, succinyl-Phe-Leu-Arg-coumarylamido-4-methanesulfonic acid. When the substrate was microinjected into unfertilized eggs, the initial velocity of hydrolysis of the substrate (V_0) was low. V_0 measured 5 to 10 min after fertilization was five to nine times the prefertilization level and remained high throughout the first cell cycle. Hydrolysis of the substrate was inhibited by *clasto*-lactacystin β -lactone, a specific inhibitor of the proteasome. There has been *in vitro* evidence that calcium may be involved in regulation of proteasome activity to either inhibit the increase in peptidase activity associated with PA 28 binding to the 20S proteasome or stimulate activity of the PA 700–proteasome complex. Since both intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and intracellular pH (pH_i) increase after fertilization, hydrolysis of the proteasome substrate was measured under conditions in which $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i were varied independently during activation. When the pH_i of unfertilized eggs was elevated by exposure to 15 mM ammonium chloride in pH 9 seawater, V_0 increased to a level comparable to that measured after fertilization. In contrast, $[Ca^{2+}]_i$ elevation without pH_i change, induced by calcium ionophore in sodium-free seawater, had no effect on V_0 in the unfertilized egg. Moreover, when unfertilized eggs were microinjected with buffers modulating pH_i , V_0 increased in a pH-dependent manner. These results indicate that the pH_i rise at fertilization is the necessary prerequisite for activation of the proteasome, an essential component in the regulation of the cell cycle. © 1999 Academic Press

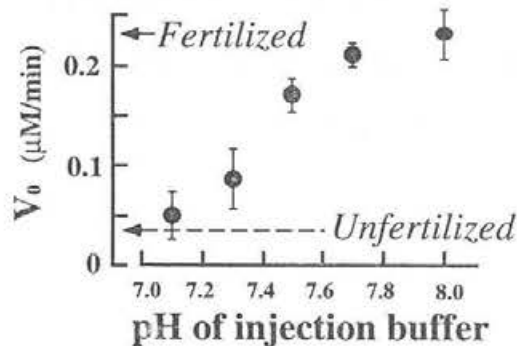


FIG. 3. Changes in the initial velocity of hydrolysis of Suc-Phe-Leu-Arg-CAMS in unfertilized eggs microinjected with buffers at various pH values. Eggs were microinjected with the buffer containing 300 mM Hepes, 300 mM Pipes, and 100 mM EGTA, pH 7.1–8.0. EGTA was included in the buffer to prevent possible injection-induced activation of the eggs. One minute after injection of the buffer, the substrate was injected to determine V_0 . Symbols represent the mean values \pm SE ($N = 3$ or 4). Dashed lines indicate the mean values of V_0 in fertilized or unfertilized eggs without injection of pH buffer: fertilized, 0.23 ± 0.052 μ M/min, unfertilized, 0.033 ± 0.018 μ M/min (the mean values \pm SE, $N = 3$).

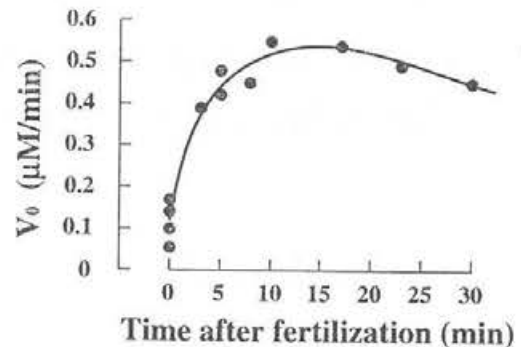


FIG. 1. Changes in the V_0 of the proteasome substrate Suc-Phe-Leu-Arg-CAMS after fertilization. To calibrate the rate of hydrolysis, the known fluorescent product of hydrolysis (ACMS) at a concentration of 6.3 μ M was injected into each egg, along with the exopeptidase inhibitor, bestatin. Next, the fluorogenic substrate Suc-Phe-Leu-Arg-CAMS was injected at the indicated time to get values of V_0 . Bestatin and the substrate were injected to final concentrations of 800 and 63 μ M, respectively.

TABLE 2

Treatment	V_0 [average of relative intensity] \pm SEM	N
Unfertilized in natural seawater	4.0 ± 1.00	3
15 mM NH_4Cl ^a	$32 \pm 2.29^*$	10
<i>Clasto</i> -lactacystin β -lactone + 15 mM NH_4Cl ^a	$9.4 \pm 1.21^*$	7

^a Eggs were pretreated in pH 7 seawater for 7 h with or without 100 μ M *clasto*-lactacystin β -lactone. Then the medium was changed to 15 mM NH_4Cl in pH 9 seawater 15 min before substrate microinjection.

* $P < 0.0001$, unpaired t test for NH_4Cl -treated eggs with and without *clasto*-lactacystin β -lactone.

プロテアソーム測定用基質 (Suc-Phe-Leu-Arg-ACMS)

は、細胞内でプロテアソームによって分解され、発蛍光性となる。この基質を、タコノマクラ卵 (ウニの仲間：カシパン類に属する海産不脊椎動物：卵が非常に透明な良い実験材料) にマイクロインジェクションし、細胞を生かしたまま、受精時におけるプロテアソーム活性を定量した。受精前の基質分解初速度 (V_0) に比べ、受精後3分で V_0 は約10倍に上昇した。この活性の著しい変化は、細胞内遊離カルシウム濃度の上昇には依存せず、受精後にもたらされる細胞内pHの上昇によることが明らかになった。

A simple purification and fluorescent assay method of the poliovirus 3C protease searching for specific inhibitors

Shoji Hata ^{a,*}, Taisuke Sato ^a, Hiroyuki Sorimachi ^{a,b}, Shoichi Ishiura ^c, Koichi Suzuki ^a

^a Laboratory of Molecular Structure and Function, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

^b Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

^c Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan

Received 8 June 1999; received in revised form 1 August 1999; accepted 24 August 1999

Picornaviruses such as poliovirus, foot-and-mouth disease virus, and encephalomyocarditis virus produce their proteins by translating their genomic RNA, injected within the host cell, into a precursor polyprotein, which is then subjected to precise processing. The polyprotein is cleaved into mature proteins predominantly by the viral 3C protease. A simple purification and assay method for poliovirus 3C protease for use for screening for inhibitors of the 3C protease is described. A poliovirus cDNA fragment containing the 3C protease coding region was inserted into pET22b vector and expressed in *Escherichia coli*. The His-tagged protein (3CD'-His) was purified by a Ni-affinity column and the activity of the purified enzyme was measured by a fluorescent assay with a fluorogenic substrate containing the 3C-specific cleavage site, MocAc-MEALFQGPLY-Dnp. The kinetic parameters calculated from the Lineweaver–Burk plot and the effects of inhibitors showed that *E. coli* expression with His tag and the assay using the fluorogenic substrate are efficient, simple and sensitive methods for purifying the 3C protease, and measuring its activity. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

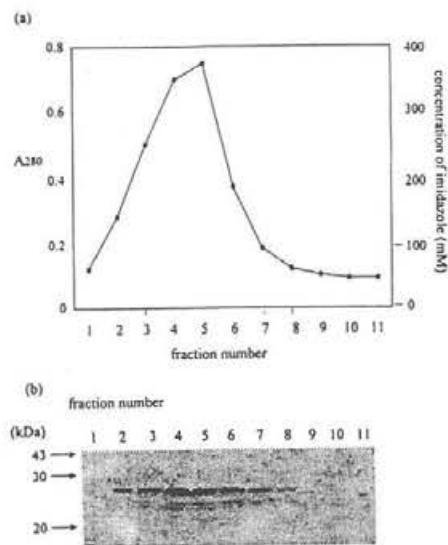


Fig. 2. Expression and purification of the His-tagged 3CD' protease. (a) Chromatogram of Ni²⁺-affinity chromatography. Solid circles, the A₂₈₀ value of each fraction; broken line, the concentration of imidazole. Fractions 4 and 5 (indicated by the arrow) were collected and dialyzed. (b) SDS-PAGE analysis of each fraction. The collected fractions were applied to a SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue. The arrowhead indicates the His-tagged 3CD' protease.

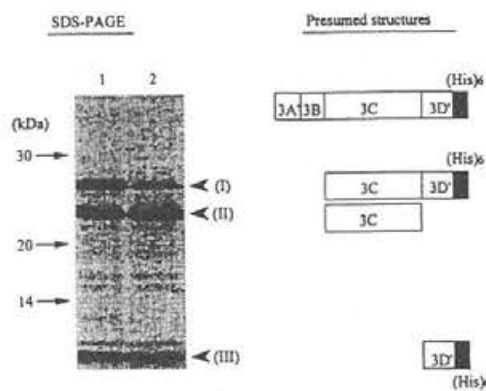


Fig. 3. Autolytic activity of the His-tagged 3CD' protease. The His-tagged 3CD' protease was incubated at 30°C for 15 h (lane 1), and 39 h (lane 2). Each sample was analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining. The arrowheads indicate the 3CD' protease (I) and its autolytic fragments (II and III).

本研究では、ポリオウイルスの複製に必要な 3C プロテアーゼ (トリプシン様システインプロテアーゼ) の特異的阻害剤の探索、開発を目的に、3C プロテアーゼの簡便な精製法、アッセイ法の確立を行った。大腸菌内で不溶性画分に発現した 3C プロテアーゼを Ni アフィニティーカラムによりワンステップで大量に精製し、透析による再生に成功したので、次に 3C プロテアーゼの特異的切断配列をモチーフとした蛍光基質を用い、精製した 3C プロテアーゼの簡便かつ高感度のアッセイ法を確立した。このアッセイ法による各種阻害剤の 3C プロテアーゼに対する効果を検討したところ、大部分のシステインプロテアーゼ阻害剤に阻害効果は見られず、一部のセリンプロテアーゼ阻害剤に高い阻害効果が見られた。この結果は、算出した 3C プロテアーゼの kinetic parameter と共に、既報の結果とほぼ一致していた。以上の結果から、確立した 3C プロテアーゼの簡便な精製法、および鋭敏なアッセイ法が、有効であることが明らかとなった。

Table 1
Effect of protease inhibitors on the 3CD' protease in the fluorescent assay method^a

Inhibitors	Concentration (mM)	Inhibition (%)
None	–	0
Iodoacetic acid	0.4	100
2,2'-Dipyridil disulfide	0.4	100
MgCl ₂	2.0	0
ZnCl ₂	2.0	100
TLCK	0.2	51
TPCK	0.2	82
E-64	1.0	0
Leupeptin	2.5	0
Calpastatin	0.8	30
Chymostatin	0.1	54
Aprotinin	0.1	64
PMSF	1.7	32
Oryzacystatin	0.01	0
Cystatin (egg white)	5.6 µg/ml	0
Cystatin α (rat)	40 µg/ml	0
Cystatin A (human)	40 µg/ml	0
Bromelain inhibitor	500 µg/ml	0

^a Each inhibitor was incubated at the concentration shown with 1 µM enzyme solution in reaction buffer (150 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) for 30 min. Then, 1 µM DTT and 5 µM substrate were added, and the mixtures were incubated for 30 min in a total volume of 200 µl. To stop the reaction, 200 mM sodium acetate and 10% SDS were added. Inhibition ratio was calculated as described in Section 2.

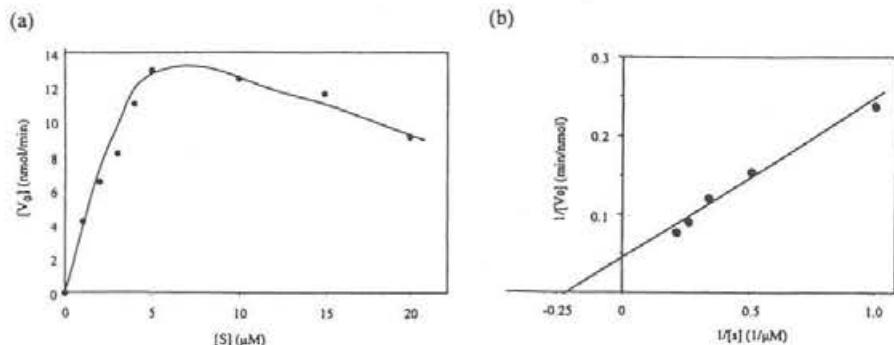


Fig. 6. (a) Saturation curve and (b) Lineweaver–Burk plot of the fluorescence assay of the His-tagged 3CD' protease with the designed fluorogenic substrate (MocAc-MEALFQGPLY-Dnp). Incubation was carried out as described in Section 2 and the initial velocity at each concentration of the fluorogenic substrate was calculated and plotted. K_m and V_{max} values are 4.15 µM and 5.25 µmol/min/mg, respectively.