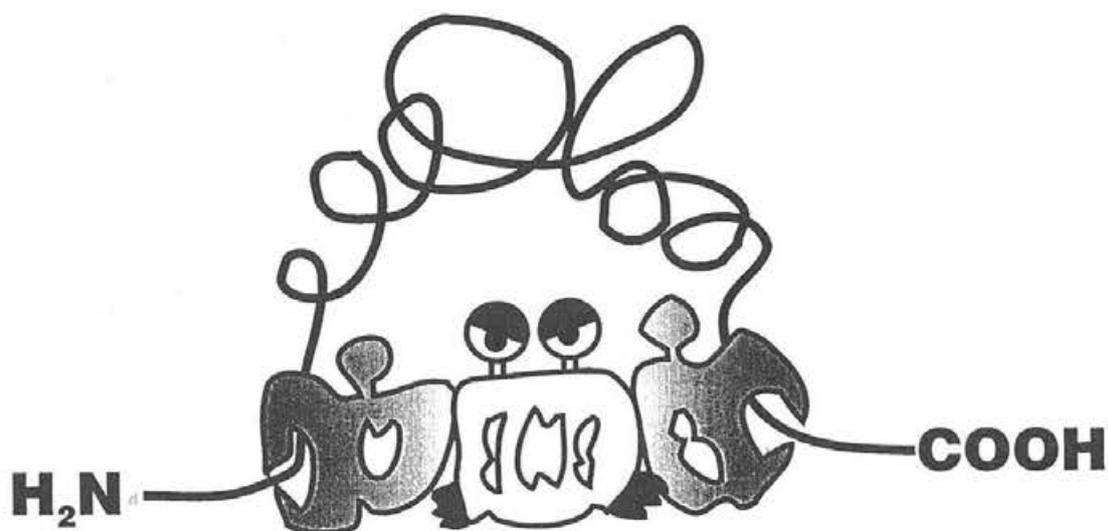


特定領域研究

「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12号（平成12年3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 分子生物学会ワークショップ見聞録
 - 2 第4回特定班主催公開シンポジウム「シグナル伝達とプロテオリシス」
- (5) ミニレビュー
 - 1 オートファジーとは何か
 - 2 ユビキチンとプロテアソーム：最新の研究動向
 - 3 ATP依存性プロテアーゼとシャペロン：unfoldase vs chaperone
 - 4 記憶学習機構とプロテアーゼ
 - 5 哺乳類RAD23ホモログの多様な機能
 - 6 生物時計とプロテオリシス
- (6) トピックス
m-カルパインのCa²⁺非存在下での結晶構造を見て思うこと
- (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

(1) 巻頭言

この特定領域研究「蛋白分解のニューバイオロジー」(略称：細胞内蛋白分解)は平成8年度に開始されてから早くも4年が経過し、平成12年3月で終了する事になりました。班員相互の連絡だけでなく、プロテオリシス関連研究者間の連絡・意思の疎通を目的として発行されてきたこの機関誌は、最先端のトピックスや情報を集めた記事を満載し、号を重ねるごとに熱烈な読者・ファンを獲得してきましたが、残念ながら本号が最終号になります。発刊からこの機関誌の編集・発行を担当してくださった都臨床研の田中啓二博士、川島誠一博士には心から御礼申し上げます。お二人の強力なリーダーシップと人脈なしには極めてホットな題材を扱った素晴らしい原稿を毎号集め、立派な機関誌を発行する事は到底不可能だったと思います。

4年前、本特定領域研究が始まった頃は、プロテオリシスが一つの研究領域として認知されはじめた黎明期でした。しかし、この4年間、プロテオリシス研究の進歩は実に目覚しく、全ての生物現象でプロテオリシスが主要な役割を果たす事実が次々と明らかにされ、プロテオリシスとバイオロジーの不

可分の関係が実証されてきました。システインプロテアーゼとセリンプロテアーゼが関係する生物現象に的を絞ってスタートしたと思った本特定研究も、その後の発展から、そのような枠組みでは到底まとめられない実に幅広い複雑な現象が含まれる事が明らかになってきました。次ぎの特定研究はメタロプロテアーゼと酸性プロテアーゼを中心に組織すると単純に考えていた時期もありましたが、様々な生物現象の中でおこるプロテオリシスの多様性・複雑性が解明されるにつれ、プロテオリシスを大きくまとめるのが非常に困難になってきました。この様なわけで、本研究に続くものとして比較的広い領域のプロテオリシスをカバーする特定領域研究は残念ながら企画できませんでした。これはプロテオリシスが次の段階に進んだ事を示しています。すなわち、プロテオリシスの研究が現象の発見、枚挙の時代から、次ぎの詳細な解析、すなわち、生物現象の中にプロテオリシスが如何にintegrateされているかの個々のケースの解析に移っているからです。プロテオリシス研究がもう少し進展し、解析された個々のケースを統合する段階がくれば、再度、本研究のような広い範囲をカバーする特定領域研究が必ず必要になるものと思います。

振り返って見れば、プロテオリシスの研究が著しく進展した時期とこの特定領域研究の研究期間は完全に一致しています。その意味で、この特定領域研究は実に時宜をえた企画であったと言えます。この特定領域研究がこの間、日本のプロテオリシス研究の発展に多大な寄与をした事を信じ、これを土台に、日本のプロテオリシス研究がさらに大きく飛躍し、世界の研究をリードする事を期待したいと思います。

最後になりましたが、本特定領域研究に直接・間接にかかわり多大な御支援下さった日本のプロテオリシス研究者の方々に心から御礼を申し上げると共に、プロテオリシス研究発展の為に益々研究を進められる事を期待しています。

平成12年2月

領域代表者 鈴木 紘 一

(東京大学分子細胞生物学研究所)

(2) 平成11年度特定領域研究班・会議日程

1 平成11年度：第3回 総括班会議

日時：期日未定

- 議題： 1. 経過報告
2. 来年度の活動計画
3. 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“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回発行してきましたが、本号が最終号となります。

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）

"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 (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 (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

(コーディネーター：田中啓二)

実験医学 特集 “拡大するユビキチンの世界：癌・神経疾患の中核へ (仮題)”

2000年7月発行予定 (編集：田中啓二)

シュブリンガー・フェアラク社発行「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

国際学会

(1) "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

- (2) EMBO Workshop on "**Ubiquitin-Proteasome Pathway and Cellular Regulation**" (Organizers: G. Strous and A. Ciechanover) May 14-18, 2000, Driebergen (The Netherlands)
- (3) Fifth Cold Spring Harbor Meeting on "**The Cell Cycle**" (Organizers: S. Elledge, J. W. Harper, and J. Roberts) May 17-21, 2000, Cold Spring Harbor Laboratory (USA)
- (4) Gordon Research Conference on "**Lysosomes**" (Organizer: J. S. Bonifacino) June 25-30, 2000, Colby-Sawyer College, New Hampshire (USA)
- (5) Gordon Research Conference on "**Proteolytic Enzymes & Their Inhibitors**" (Organizer: Wolfram Bode) July 9-14, 2000, Colby-Sawyer College, New Hampshire (USA)
- (6) "**International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors: The new Millennium**" (Organizer: V. Turk) September 9-13, 2000, Portoroz (Slovenia)

(4) 学会・集会報告

1. 分子生物学会ワークショップ見聞録

手許にある研究社刊「新英和中辞典（第4版）」で「ubiquitin」の語源となっている「ubiuitous」を引いてみると

u-biq-ui-tous [ju(:)bikwatas, -kwi-] a, 至る所にある、遍在する (omnipresent ; [戯言]
至る所に姿を表す ~-ly adv. ~-ness n.

と解説されている。ユビキチン分子の発見から機能が明らかになるまでは、ユビキチンはこの辞書の説明する通り「至る所にある」ペプチドと認識されていた。その後、ユビキチン経路が細胞周期などをはじめ様々な生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかにされ、注目を集めるとともに、多くの研究報告がなされてきた。今回の分子生物学会のワークショップ「新しい細胞機能制御系 ” ユビキチンワールド”」の内容を見ても、細胞周期の制御から発生に至る多岐に渡る生命現象に関わるユビキチン経路についての研究報告がなされた。これらのことを考えてみると、ubiquitinの語源は前出の辞書の解説の「至る所にある」という意味よりも、むしろ[戯言]の「至る所に姿を表す」という解釈のほうが妥当なように思われる。

さて、話を本題に移して発表について触れてみようと思う。昨年12月7日から12月10日にかけて日本一の記憶も新しい福岡ダイエーホークスの本拠地である福岡ドームと隣接するシーホークホテルで行われた第22回日本分子生物学会年会において、ワークショップの一つとして3日目に「新しい細胞機能制御系 ” ユビキチンワールド”」と題してユビキチン関連の10題の口頭発表が行われた（以下、敬称略）。中山（九大・医）によりSCFの機能についての報告がなされた。Skp2によって構成されるSCFがサイクリンF、p27を特異的に認識し、酵母からの知見と異

なりサイクリンFの認識にはリン酸化が必須ではないということであった。また、skp2ノックアウトマウスではサイクリンFの蓄積が見られ、DNA含量、中心体の複製、細胞死に異常が見られ、Skp2がこれらの多面的な機能を担っていることを示唆するものであった。千葉（都臨床研）の発表はI- κ B α を認識するSCFの構成成分である β TrCP1/2を過剰発現するとI- κ B α のポリユビキチン化が促進され、それはI- κ B α と結合したCullin1のNedd8化により促進されるというものであった。また、HeLa細胞のS100画分にI- κ B α のポリユビキチン化を促進する因子があることを報告した。津田（加大ロス校）はショウジョウバエの発生におけるEGFレセプターの解析からその下流でWDリピート、F-boxを持つEbi蛋白質が機能し、細胞増殖に関わるDelta蛋白質の制御因子であるSu(H)蛋白質の機能抑制をしていることを明らかにし、ユビキチン経路が発生過程におけるシグナル伝達においても機能していることを示唆する報告をした。発生過程に関わるユビキチン経路のひとつであり非常に興味深いものであった。戸所（理研・筑波セ）はM期の進行に重要なAPC(anaphase promoting complex)の制御について、Aキナーゼ、poloキナーゼ、あるいはスピンドルチェックポイントのシグナルがどのようにAPCを制御しているかについて話した。APCのなかのどの因子がこれらのシグナルの標的になっていてどのような作用機作でAPCの活性を制御しているかを明らかにすることが今後の課題であろう。岩井（京大・院生命）の報告はpVHLを構成成分とするVBC-CULについてUbcH5をE2とするユビキチンリガーゼ活性を有することを示し、腫瘍を多発する変異として同定されたナンセンス変異を有するpHVHLを含むVBC-CULはリガーゼ活性を持たないことから、VHLが変異することにより標的蛋白質をユビキチン化できないことにより腫瘍を形成することが示唆されるというものであった。太田（聖マリ大・外）はSCFの構成成分のRoc1/2を単離し、Roc-Cul1がSCFの機能に必須であることを示した。また、全てのRoc-Culの組み合わせはユビキチン転移酵素Ubc5cの存在下でライゲースとして機能したのに対してUbc3(Cdc34)の存在下では一部のRoc-Culの組み合わせでしかライゲースとして機能しないことを示し、SCFの組み合わせによりユビキチン転移酵

素の選択性が異なることを示した。嘉村（HHMI）はVHL複合体を精製し18kdの蛋白質Rbx1を単離した。出芽酵母において相同遺伝子を破壊するとSic1、Clnの蓄積が見られcdc34変異株など同様の表現型を示したことから Rbx1はSCFの必須因子であり、Cdc53のRub1化を促進することを報告した。安田（東京薬大）はSUMO1について解析し、癌抑制遺伝子産物p53もSUMO1修飾を受け、SUMO1化される領域はアセチル化によりp53が機能制御を受ける領域と一致することを報告した。また、SUMO1化の再構成系を解析して、この反応にはユビキチンリガーゼが必要ないことを報告した。友田（奈良先端大・バイオ）はp27のC末と相互作用する新規蛋白質Jab1遺伝子を単離し、細胞内でのJab1の大量発現によりp27の減少および細胞質への局在化がみられ、細胞増殖の増殖因子依存性を低下させたと報告した。このことは細胞内局在によっても蛋白質分解が制御されていることを示唆し、非常に興味深いものであった。最後に小南（九大・医）は、分裂酵母のSCFについてPop1およびPop2を含む構成成分の異なるものが存在し、基質特異性が異なる可能性があること、接合不全の変異株を単離した結果、原因遺伝子はAPC10と相同な遺伝子であったことなどを報告した。

なお、1日目のワークショップ「DNA複製に連携した染色体ダイナミクス」においてHieter（HHMI）は、Skp1がSic1、Clnの分解のみでなくcentromereに存在するCBF3複合体の制御にも関わっているという報告をした。また、ポスターセッションにおいても数々の興味深い発表がなされ、日本においてもユビキチンワールドが広がりつつあることを印象付ける学会であった。 清野浩明（国立遺伝研）

2. 第4回特定班主催公開シンポジウム「シグナル伝達とプロテオリシス」

平成11年12月20日に文部省科学研究費特定領域研究「蛋白分解のニューロバイオロジー」の会議に先立ち、第4回シンポジウム「シグナル伝達とプロテオリ

シス」が開催された。発表メンバーとしては、特定研究領域の班員や、海外や日本で活躍されている（タンパク分解に関係する）トピックス性の高い情報を提供する先生方が選ばれていた。特に、今回はシグナル伝達ということから、EGF受容体シグナルでショウジョウバエを使った遺伝学的研究をなさっている津田先生（UCLA）と細胞死シグナルのキー分子であるApaf1の遺伝子破壊マウスを解析されている吉田先生（九州大学）の講演をうかがい、様々な生物学分野で蛋白分解システムが重要であることが、再確認された。

まず最初に研究班の班長である鈴木紘一先生が、この班が行ってきたシンポジウムの御感想を述べられ、班員である我々も今度、蛋白分解の分野の研究を進展させ、日本の独創的な研究で世界に通じるようにならなければならないと自覚させられた。

九州大学の畠山は、最近、高等動物での重要な働きをしているSCFについての発表を行った。特に、免疫反応上重要なシグナルであるNF- κ Bの抑制因子であるI κ B、及び、癌化や初期発生上、重要な β -カテニンのユビキチン化に、酵素複合体であるSCFFWD1/ β -TrCPが関与することを報告した。昨年 of 班会議での発表後、さらに他のI κ BファミリーであるI κ B β とI κ B ϵ の発現調節にもSCFFWD1/ β -TrCPが作用することと、FWD1/ β -TrCPとI κ B α もしくはSkp1との分子論的相互関係を明らかにした。また、最近の研究報告として、Skp2というF-ボックス蛋白を基質受容体とするSCFSkp2が細胞周期のS期進行に関与するサイクリンであるサイクリンEと結合し、ユビキチン化を遂行させるということを発表した。SCFSkp2によるサイクリンEのユビキチン化はcdk2と結合していないサイクリンEに起こるというもので、以前報告されていたcdk2と結合したままリン酸化を受けたサイクリンEがユビキチン化されるメカニズムとは分解経路としては機序が異なるものである。

津田先生（UCLA）は昨年の分子生物学会での発表にさらなる研究結果を加えたものであった。内容としては、EGFとNotchシグナルの両方に関与するebi（このミュータントではショウジョウバエのさなぎの形が海老型、実は逆海老でしたか？）とい

うF-ボックス蛋白を報告した。まず、*ebi*が神経分化に関与するTramtrack88発現を抑制させる機能を有し、この分子がEGFシグナルの重要な部分を占めることを示した。さらに、ショウジョウバエの遺伝学的及び形態学的方法により、*ebi*が神経分化上の側方抑制にかかわるNotchシグナルにも作用するという実験結果を述べた。実際には、*ebi*が、Notchからのシグナルを転写レベルの作用を促すSu(H)/RBP-Jkに結合するというもので、*ebi*がSu(H)/RBP-Jkもしくはその周辺分子の発現調節を行っている可能性を示唆するものであった。

岩井先生（京都大学）は、IRPのユビキチン化機序の解明ではなく、今回は岩井先生の留学先のボスの最近の主要テーマであるVHLのユビキチン化の講演でしたので、先生の研究の幅に広さに感動したしだいでした。内容は、von-Hippel Lindau病という多発性の癌を発症する疾患の臨床及び統計医学的な事柄から、そのために必要と考えられるユビキチン化の関与という基礎医学的領域までの総括的な発表であった。実際にVHLをおそらく基質受容体とするCBC複合体がユビキチンリガーゼ複合体として作用し、p100とp220という分子がユビキチン化される基質である可能性を述べた。今後、この両分子の分子レベルで同定し、VHLの基質（HIF1の可能性？）の蓄積と癌発症機序の関係を明らかにしていただきけることを期待します。

千葉先生は（東京都臨床研）はI κ B α のユビキチン化に関与するSCF $^{\beta$ -TrCPのin vitroのユビキチン化再構成系による解析及び、Cullin活性調節系であるNedd-8コンジュゲーションに関与する酵素系の同定を発表した。ヒトにおいては β -TrCPに遺伝子が2つあることを同定し、両遺伝子産物ともI κ B α のユビキチン化に関与することを明らかにした。また、Nedd-8カラムによる生化学的手法により、チオエステル結合する分子の同定により、E1様、及びE2様分子をクローニングし、Nedd-8化の分子論的生化反応系を明らかにした。さらに、Nedd-8は、これまで同定されているすべてのCullin分子に共有結合することと、酵母を使用した遺伝学的解析によりNedd-8化がCullinの機能調節に関与していることを示した。

戸所先生（理化研）は、細胞分裂のなかでユビキチン介在性蛋白分解に関与する

APCの活性化制御によるCut2/Pds1及びサイクリンB分解のかなり複雑な総括的な講演を行った。M期における主要イベントの一つであるCut2/Pds1の分解にはCdc20が、もう一つのイベントであるサイクリンBの分解にはCdh1がAPCの活性化に重要な分子であることがわかった。さらに、APC自体の活性化機序としては、Cdc20/Cdh1を含み、Mad/Babファミリー、Plkファミリー（Poloキナーゼ）が時期特異的に複雑なメカニズムを遂行していることが発表された。実際に、PlkがAPCの成分のうち、APC1, APC3, APC6をリン酸化し、サイクリンBのユビキチン化を活性化することの発見が、最近の戸所ラボの業績のひとつである。

吉田先生（九州大学）は、最近のトピックス性の高いことから班員外から選出され、アポトーシスシグナルを担う分子であるApaf1のノックアウトマウスの解析を発表された。このマウスは、胎生期に神経細胞の蓄積により、頭部に腫瘤が形成され、Apaf1が神経細胞の生死の選択性に重要な役割を果たしていることがわかった。また、Apaf1のノックアウトマウス解析により、細胞レベルで、カスパーゼに対する反応は低下しているが、Fasのアポトーシスシグナルには関係ないことが明らかにされた。

西道先生（理化研）は、アルツハイマー病アミロイドβペプチド（Aβ）を標識し、動物脳内に投与し、その代謝を追跡する実験システムを報告した。この方法は、実際にin vivoでのAβの分子としての挙動、中間代謝産物の同定、その切断点の同定、及び修飾に参与する酵素の候補の同定など、多くの具体的な情報を得ることのできる重要な研究手段といえる。今度、他の分子に対しても十分応用できる有用な方法といえる。

以上7名の先生方の御講演の一部を紹介させていただいたのですが、質問、討論も含め積極的な議論が展開され、シグナル伝達以外の分野の研究者の先生方にも影響を与えたものと期待している。また、場所が東京であったことにより、近辺の研究施設の先生方もみえられていたようで、今後も蛋白分解の研究領域がさまざまな領域の先生に影響を与えたり、異なる領域の研究者間で共同研究が進むことを期待したい。

畠山鎮次（九州大学生体防御医学研究所細胞学部門）

(5) ミニレビュー

1. オートファジーとは何か

Proteolysisを日本語で適切に表現する言葉がなく、蛋白(質)分解も用いられるがカタカナでプロテオリシスと表現されることが多い。同様に、Autophagyも自食作用、自己貪食と訳されることもあるが、現在はオートファジーというカタカナが定着してきた。オートファジーに関する総説を書くつもりでいたが、どっと別なる仕事押し寄せ、ゆっくりと書く時間がなくなってしまった。結局は「オートファジーとは何か」という雑文的なものになった。オートファジーに興味をもっただければ、この稿の目的は達している。「ぷろておりしす」の読者には「オートファジー」って何だという人はいないとは思いますが、念のため定義だけ最初に簡単に触れておく。リソソーム/液胞系が細胞内の細胞質成分、細胞質蛋白質やオルガネラの一部を取り込んで分解する過程をいう。

「オートファジー」という現象の最初の記載とその後の研究の推移

オートファジーの研究の歴史は長い。そこから始めることにする。オートファジーの動物における研究は現在でも肝臓を用いて行われることが多いが、最初にオートファジーが観察されたのも肝臓であった。グルカゴンを投与したラット肝臓に、細胞質やミトコンドリアなどのオルガネラを二重膜で囲んだ小胞が出現することが電子顕微鏡下で観察された。1962年のことで J. Cell. Biol. に報告されている(1)。De Duveによるリソソームの発見が1949年であるから、10数年後ということになる。1960年代には、オートファジーとリソソームの関係を形態学的に解析した論文は多数みられる。なかでも、グルカゴンを投与した肝臓におけるオートファゴソーム、オートリソソームの形成過程をきめ細かく解析した Arstilla と Sheburne の論文 (1968) は特筆に値する(2)。彼らは、discussion で、すでに今後の課題 3 つを指摘している。

- 1) オートリソソームに存在する加水分解酵素はどのようにして獲得されるか？
- 2) オートファゴソームの二重膜構造の起源は？
- 3) オートファジーの制御機構と代謝的要求は？

1) は現在では、大筋は解決されているが、2) オートファゴソームの二重膜構造の起源や形成機構、3) オートファジーの制御機構は現在でも、この分野の研究の中心的課題である。オートファジーはグルカゴン投与よりも、絶食動物の方がずっと誘導率は高いのだが、この当時はなぜか非常に高価なグルカゴンが使われていた。アメリカでないと出来ない実験だったと思う。

1970年代に入ると、Mortimoreのグループが還流肝を用いて、少し遅れてSeglen達が培養肝細胞を用いて、オートファジーの制御機構を生化学的あるいは細胞生物学的手法で研究した。オートファジーの簡便な定量化が今日でも最も緊急な課題であるが、彼らは肝細胞切片を電子顕微鏡で観察し、オートファゴソーム、オートリソソームの数を数えて定量化した。酵母におけるオートファジーの簡便な定量化は、すでに大隅らのグループによって開発されている。液胞酵素であるアルカリホスファターゼのN末端の細胞質と膜ドメインを欠き、C末端の成熟領域とプロ領域のみをもつ変異酵素を酵母に発現させ、窒素飢餓状態におくと、オートファジー経路で変異酵素は液胞に運ばれ、そこで活性化される。酵素活性の測定だけでオートファジーをモニターできるわけである。筆者らは同じ手法で動物の系でも試みたが、まだ成功していない。さて、Mortimoreらは、アミノ酸除去と添加によるオートファゴソームの形成と退縮のキネティックスを測定し、オートファゴソーム形成の半減期は約8分と極めて速いことを明らかにした。オートファゴソーム形成には蛋白合成が不必要か、あるいは極めて代謝回転の速い蛋白質が関与することが議論された。1990年代に入っても動物レベルでのオートファジー研究が大きな進展がみられたとはいえない。その中で、Dunnが種々のオルガネラマーカーを用いて、もう一度形態学的

な手法でオートファゴソームの二重膜構造の起源を丹念に調べた。オートファゴソームの二重膜は滑面小胞体由来であるというのが彼の結論で、我々の生化学的な研究の結論ともよく一致した。オートファジーの形態学的研究というとDunnの論文(3)が引用されることが多い。しかし、後述するように酵母の研究から、新生のオートファゴソームは蛋白質をほとんどもたず、主として脂質からなる小胞が集合してオートファゴソームが形成されるという説が提唱されている(8)。高等動物でも酵母の説が当てはまるのかは今後の検討課題である。

二つのオートファジーの経路

今まで述べてきたオートファジーはマクロオートファジーという経路で、これとは別にミクロオートファジーという分解経路もある。リソソーム膜がくびれて陥入した結果、細胞質やオルガネラがリソソームへと入り込み、ついでくびれた部分が閉じて、内部の細胞成分が分解される機構である。このミクロオートファジーの機構も酵母では少しづつわかりだしてきた。高等動物では、まだ形態学的な研究のレベルにとどまっている。

オートファジーの生理的役割

現代では、町にゴミがあふれ、人や動物の死体がごろごろと放置されているという場面に遭遇しないので、清潔な町であることが当然のように思われているが、かつてはそうではなかった。町を整然と保つためには大がかりなシステムと絶え間ざる労力が必要である。細胞内環境を整然と保つための装置として、個々の蛋白質を選択的に分解するユビキチン／プロテアソーム系と大規模な蛋白質分解やオルガネラ分解を行うオートファジー／リソソーム系がある。これらの系を作動させるには非常に多くの分子の関与が必要であり、エネルギーを要求する。

飢餓状態や発生の段階における組織の再構築では、大規模な蛋白質の分解を必要とする。酵母では栄養状態が悪くなれば胞子を形成して対応する。飢餓への適応

現象は、不要な蛋白質やオルガネラの分解という大規模な細胞内処理から始まり、得られたアミノ酸とエネルギーを利用して、栄養供給のない環境下で生存するために必要な蛋白質を合成するという過程で行われる。オートファジーはこのように飢餓時に生き延びるための生存戦略であり、非常に長い進化の過程で獲得したシステムであろう。そんなに厳しい飢餓状態でなくとも個体レベルでは、空腹と満腹のサイクルによってオートファジーはコントロールされている。空腹時、血中アミノ酸レベルが下がるのと並行して、血糖値を上げる作用を持つアドレナリンやグルカゴンの濃度が上昇する。これらのホルモンはオートファジーを促進し、結果的にタンパクの分解は亢進する。逆に満腹になって血中アミノ酸濃度が高まり、血糖値を下げるインスリンが分泌されているときは、オートファジーは抑制される。生存戦略として獲得されたオートファジーは、定常状態でも代謝の変化に应答して細胞内処理を行い、恒常性を維持している。

選択的オートファジー

これもオートファジーの生理的機能の一つである。品質管理といえば、まず小胞体でのタンパク質の生合成の過程で生じた異常な蛋白質のトランスロコンを介する逆行性輸送とユビキチン/プロテアソーム系による分解をイメージする。一方、オルガネラの品質管理はオートファジー/リソソーム系が行っており、それらについての形態学的な観察は十分に蓄積されている。ミトコンドリア内膜の酵素複合体の配列にわずかの欠陥があり、その結果、内膜のswelling、脂質二重膜の損傷、膜の一部破裂、そしてオルガネラ内容物の細胞質への放出（アポトーシスを引き起こすほどの放出ではない）などがおこるようになると、ユビキチン/プロテアソーム系あるいはオートファジー/リソソーム系が処理する。さらに、ミトコンドリアが機能を失い、エネルギー産生を制御できなくなったような異常なミトコンドリアはオートファジーによって選択的に除去される。しかし、正常と異常ミトコンドリアをオートファジー/リソソーム系がどのようにして識別しているかという最も重要な点は

まったくわかっていない。

ペルオキシゾームは生理的条件下で、オルガネラがそのままの形で分解されることが知られている。ペルオキシゾームというオルガネラを完全に保つためには、機能も完全に維持しなければならないらしい。酵母やさらに肝細胞でも、メタノールや長鎖脂肪酸が培地にあるとこのオルガネラを維持できるが、細胞内の長鎖脂肪酸の量を減少させるとペルオキシゾームの分解は促進される。さらには、メタノールがあってもアルコール酸化酵素をシアン化合物で阻害するとペルオキシゾームは分解される。酵母では、メタノールを唯一の炭素源として培養するとペルオキシゾームのカタラーゼやアルコール酸化酵素は誘導される。そこで、酵母の炭素源をエタノールあるいはグルコースに変えると、広範なペルオキシゾーム分解がおこる。分解の機構は酵母の種類によって異なり、*S. cerevisiae*や*H. polymorpha*では、グルコース培地に移すと機能していないペルオキシゾームはマクロオートファジーによって分解されるが、エタノール培地に移された*Pichia pastoris*のペルオキシゾームはミクロオートファジーによる分解を受ける。つまり、ペルオキシゾームの選択的分解はマクロオートファジーで行われる場合とミクロオートファジーで行われる場合があるということである(8)。ミクロオートファジーによる分解はペルオキシゾーム膜の変化を認識するというよりも、酵母における代謝の変化がペルオキシゾームの取り込みを制御する遺伝子群、たとえば*P. pastoris*では、PAG (peroxisome-autophagy) 遺伝子群を誘導する結果と考えられている。一方、酵母の代謝応答によるペルオキシゾーム膜の構造と組成の変化がマクロオートファジーを誘導するらしい。形態的には、ペルオキシゾーム膜に近接した形でオートファゴソーム膜がペルオキシゾームを取り囲んでいく様子が観察される。高等動物でも、マクロオートファジーによるペルオキシゾームの選択的オートファジーは認められる。典型的な例はクロフィブレート動物に投与すると肝臓内のペルオキシゾームは著しく増加するが、投与を中止すると、ペルオキシゾームを取り込んだオートファゴソームが多数出現する。この場合もペルオキシゾーム膜表面の荷電と疎水的な性質が変化することが知られてい

る。

マクロオートファジーとミクロオートファジーは膜動態としては全く異なる素過程からなるが、ミクロオートファジーにもApg蛋白結合システムの活性化酵素、Apg7が必要であることが明きらになっており、二つの分解系は少なくとも一部は分子装置を共有している可能性がある。選択的オートファジーは、生理的条件のみならず、種々の病態で障害を受けたオルガネラの処理機構としても重要であり、選択性の分子機構の解明は今後の大きな課題の一つである。

オートファジーによる細胞死

この課題もオルガネラの品質管理と密接な関係がある。細胞死はアポトーシスとネクローシスに分けられる。種々のアポトーシスのシグナル経路はカスパーゼを活性化し、最終的にアポトーシスとしての典型的な特徴を示す細胞死に至る。ここ数年カスパーゼに非依存性の細胞死の報告が蓄積しつつあり、昨年だけでも100報以上の報告がある。カスパーゼ非依存性の細胞死には、複数のメカニズムがあると考えられるが、オートファジー関与の細胞死もその一つである。形態学的にネクローシス様の細胞死が正常の発生過程で認められることは古くから知られている。核変化が乏しく、細胞質における早期のオートファジー・空胞形成を特徴とする細胞死で、autophagic degenerationという言葉で表現されている。生理的な細胞死の一つの型であり、厳密な制御（生存シグナルによってコントロールされる？）を受ける点でネクローシスと区別される。実験的にも、カスパーゼを阻害するとアポトーシスの形態的な特徴は抑制されるが、細胞死そのものは抑制されないという結果が最初Baxによる細胞死で認められ(4)、その後同様の報告が相次いでいる。カスパーゼを阻害しなくても、TNF α による細胞死はネクローシス様の形態を示し、カスパーゼが関与しないことが示されている。最近、国立がんセンターの口野ら(5)は活性型Ras発現によるグリオーマの細胞死がautophagic degeneration型であることを実証した。活性型Rasでは著明な空胞出現を伴う細胞死が誘導されるが、野生型Rasでは誘導効

率は悪く、優性抑制型Rasでは細胞死が誘導されなかった。このRasによる細胞死で見られる空胞はリソソーム膜マーカー・lgp120陽性であり、オートリソソーム由来であることを認めている。このRasシグナル伝達に基づく細胞死では、カスパーゼは活性化されていない。残念なことに、オートファジーが直接Ras誘導性細胞死に関与するかどうか調べられていない。

Xueら(6)は頸部神経根由来の交感神経ニューロンの初代培養細胞を用いて、NGF除去によるアポトーシスを解析した結果、カスパーゼの活性化、DNA断片化に先立ってオートファジー小体の数が30倍増加することを認めている。3-メチルアデニンによってオートファジーを抑制するとアポトーシスを遅延させ、カスパーゼの活性化、DNA断片化を抑制し、ミトコンドリアからのシトクロームcの遊離も阻害するという。カスパーゼ阻害剤はアポトーシスの形態学的な特徴は抑制するが、細胞死そのものは抑制しない。著者らはアポトーシスのシグナルはミトコンドリアの機能不全とオートファジーの活性化の両方を刺激し、活性化されたオートファジーはカスパーゼ非依存性の細胞死に導くと結論している。オートファジーがニューロンの細胞死をもたらす機構については全く触れていない。

細胞死とオートファジーの関連についての分子機構を示唆する論文が、Natureに最近報告された(7)。Levineらのグループは、すでにBeclin1というBcl-2と相互作用する哺乳類の新しいコイルドコイルタンパク質を指令する遺伝子を単離していた。今回は、beclin1がagp6/vps30を破壊したオートファジー欠損酵母へのbeclin1遺伝子導入によってオートファジーが促進することから、beclin1がヒトagp6のホモログであることを示した。さらに、beclin1の発現レベルが非常に低いヒトMCF7乳癌細胞でも、beclin1の遺伝子導入によってオートファジーが促進することを明らかにした。しかも、このMCF7細胞でのbeclin1の自食作用促進活性は、MCF7細胞の増殖の阻害や培養下でのクローン形成性、ヌードマウスでの腫瘍形成の阻害と結びついていた。組織レベルでも、ヒトの乳癌の上皮細胞株や組織では、内在性のBeclin1蛋白質の発現が低レベルになっていることが多いのに対し、正常な乳腺上皮細胞では普遍的

に高いレベルで発現されていた。このように、beclin1の発現の抑制がヒトの乳癌やその他の癌の発生や進行にかかわっていることが示唆される。Bcl-2と相互作用する遺伝子として単離されたapg6/beclin1が細胞死の抑制を介して癌の発生や進行を抑制するかどうかは興味深いところである。今後、オートファジーを介する細胞死の経路と分子メカニズムは注目を集めることになるだろう。

オートファジーの分子機構

オートファジーという膜現象で最も重要なステップであるオートファゴソームの形成までの機構にAPG遺伝子群は関与しており、それらの機能解析は酵母の系で猛烈な勢いで進みつつある。それらの現時点での成果はすでにKlionskyとOhsumiが、総説としてまとめている(8)。大きく分けると外部情報の認知に続くシグナル伝達に関わるもの (APG1, APG13など)、二つのApg結合システムの構成要素 (APG12, APG5, APG7, APG10, APG16とAPG8, APG4, APG3) およびまだ機能が明確でないもの (APG6とAPG14, APG9)に分けられる。それぞれのApg群のつながりは未だよくわからないが、モディファイアーAPG12のアクセプターであるApg5は直接オートファゴソームの形成に関与することが示唆されており、そうだとするとオートファゴソーム上にApg結合システムの標的分子があることになる。窒素飢餓におくと、Apg8はオートファゴソームの外膜に結合し、時間が進むにつれ、遊離してくる像が観察されており、オートファゴソームの形成にApg8の結合と脱着が必要なことを示唆している(9)。Apg8がオートファゴソーム膜上のどんな分子に結合しているかは興味あるところである。Apgの中で唯一の内在性膜タンパクである (6-8回膜貫通ドメインをもつ) Apg9は液胞周辺の小胞に局在する(10)。しかし、オートファゴソームを含む細胞内のどの小胞とも異なるコンパートメントに局在しているようであり、Apg9局在コンパートメントはオートファゴソームのdonner小胞の可能性、あるいはオートファゴソーム形成の最終段階に関与する付属小胞などが考えられる。いずれにしても、Apg結合システムやApg9を含む多数のApgタンパク群が協調的にオートファゴソ-

ム形成に関与するようである。

一方、高等動物のApgタンパク群の機能解析も、テンポは遅いが進行している。Apg6 (beclin1) に関しては上述した。我々はApg7 (E1様酵素) を介したApg12-Apg5結合がみられることを観察できた。微小管結合LC3はApg8と構造上よく似ており、酵母のApg8と同じくオートファゴソーム膜に局在するかどうか調べられている。情報は今のところ少ないが、高等動物でも基本的には、酵母Apgタンパク群と類似の分子装置をオートファゴソーム形成に使っていると思われる。しかし、高等動物に特有なApgがある可能性も否定はできない。

オートファゴソーム形成後、リソソーム/液胞と融合するが、融合マシーナリーに関しても酵母の系では、系統的とはいえないが解析が加えられている。液胞のt-SNAREであるVam3、クラスCのVPSなどの変異でオートファジー小体が蓄積することが知られている。高等動物では、まだ全く手が着けられていない。

ホスファイノシトールキナーゼのホモログTorがオートファジーの調節に関与しており、Torを阻害するラパマイシンによってオートファジーは誘導される。高等動物でも、ラパマイシンによってオートファジーは誘導される(11) (全くインスリンのない状態では、誘導効果がないらしい; 門脇、新潟大学)。Torの下流でApgタンパク群は働くと想定されているが、外部情報の認知からTorまでのシグナル伝達系は高等動物と酵母では大きく異なると思われる。臓器や組織・細胞における生理機能の多様性に応じたオートファジーの制御機構があるに違いない。神経細胞は大きな細胞表面をもち、膜の処理にオートファジー/リソソーム系はフル活動していると思われるが、この細胞におけるオートファジーの制御機構の究明は老化や神経変性疾患の病態解明につながる。勿論、個体レベルでの発生・分化における役割の解析も重要である。

(追加) 酵母でのオートファジー研究では、液胞酵素・アミノペプチダーゼI(API)のプロセッシングが常に同時に検討される。APIは、生合成後、細胞質にプロ型

として存在し、栄養の良い状態ではCVT小胞に包まれた後、液胞に運ばれ、液胞内でプロペプチドが切断されて活性化する。窒素飢餓状態では、オートファジー経路で液胞に運ばれ、活性化する。二つの経路すなわち、Cvt (cytoplasm-to-vacuolar targeting) 経路とオートファジー経路に関わる遺伝子群には共通したものが多く、二つの研究の流れが合流して研究が進められてきた。しかし、高等動物には、今まで調べた限り、APIと同じような経路でリソソームへ輸送されるリソソーム酵素はないので、今回は説明を省いた、勿論、今後この経路が発見される可能性は否定できない。

文献

- 1) Asfford, T.P. and Porter, K.R. (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. Cell. Biol.* 12, 198-202
- 2) Arstila, A.U., and Shelburne, J.D. (1968) Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am. J. Pathol.* 53, 687-733
- 3) Dunn W, Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1923-1933
- 4) Xiang, J., Chao, D.T., and Korsmeyer, S.J. (1996) BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 14559-14563
- 5) Chi, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., Fujita, H., Yoshida, M., Chen, W., Asai, A., Himeno, M., Yokoyama, S., and Kuchino, Y. (1999) Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* 18, 2281-2290.
- 6) Xue, L., Fletcher, G.C., and Tolkovsky, A.M. (1999) Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell Neurosci.* 14, 180-198.
- 7) Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672-676.
- 8) Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 1-32.
- 9) Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999) Formation process of autophagosome traced with

Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* 147, 435-446

- 10) Noda, T., Kim, J., Huang, W.P, Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., and Klionsky, D.J. (2000) Apg9p/Cvt7p Is an Integral Membrane Protein Required for Transport Vesicle Formation in the Cvt and Autophagy Pathways. *J Cell Biol.* 148, 465-480
- 11) Ueno, T., Ishidoh, K., Mineki, R., Tanida, I., Murayama, K., Kadowaki, and Kominami, E. (1999) Autolysosomal membrane-associated betaine homocysteine methyltransferase. Limited degradation fragment of a sequestered cytosolic enzyme monitoring autophagy. *J. Biol. Chem.* 274, 15222-15229

木南英紀（順天堂大学医学部・生化学第一講座）

2. ユビキチンとプロテアソーム：最新の研究動向

（1）はじめに

細胞内の全ての蛋白質は不均一に代謝回転しており、この過程に代謝エネルギーが必要であることは約半世紀前から知られていたが、その分子メカニズムは長い間不明であった。ユビキチンとプロテアソームは、このエネルギー依存性の蛋白質分解反応を触媒する酵素系として発見された（図1）。その後の飛躍的な研究の進展から、ユビキチンとプロテアソームは生物学的に多様な働きをもっていることが相次いで判明し、現在その選択的な蛋白質分解系の生理的重要性に関する報告は増加の一途を辿っている。このユビキチン/プロテアソーム依存性の蛋白質分解システムは、多数の標的分子に自在に対処できるように非常に大きな多様性を獲得していることが大きな特徴となっている。現在、ユビキチンとプロテアソームに関する報告は、指数関数的に上昇しているが、その最大の理由は、この蛋白質分解系が一方向の生体反応を厳格に実行することができる有用性をもっているからであろう。実際、ユビキチン/プロテアソーム系が様々な生命現象の局面で大規模に利用されていることを示唆する例は、未曾有の勢いで集積しつつある。

(2) ユビキチンシステム

ユビキチンは当初ヒストンに共有結合している普遍的な修飾分子と報告されたが、その後間もなくATP依存性蛋白質分解系の因子として再発見された。現在、ユビキチンはポリ化して蛋白質分解の目印として作用することが判明しているが、膜蛋白質の場合には単独分子の結合でエンドサイトーシスの指標となることも判明している。しかし、モノユビキチン化の意味は依然として不明なことが多い。

ユビキチンとN-末端則

ユビキチンは76個のアミノ酸から構成された8.6 kDaの小さなタンパク質である。ユビキチンは、活性化酵素 (E1) にチオエステル結合した後、結合酵素 (E2) を経由してリガーゼ (E3) の作用で標的蛋白質にイソペプチド結合し、さらにこの共有結合反応を繰り返して、複数のユビキチン分子が枝状に重鎖結合する (図1)。生じたポリ-ユビキチン鎖は“分解シグナル”となってプロテアソームにより捕捉された後、標的蛋白質は速やかに分解される。このユビキチン修飾反応の開始反応を触媒する酵素E1の作用にATPの加水分解が必要であることから、代謝エネルギーは標的識別のために消費されると考えられる。

Hershkoらはユビキチン化反応のメカニズムを生化学手法で明らかにしたが、同時期Varshavskyらは酵母の遺伝学的手法によりユビキチンシステムがin vivoで作動していることを証明した。その研究の過程で、彼らは蛋白質のN-末端のアミノ酸がユビキチン化の速度即ち蛋白質の不安定性の決定に寄与していることを偶然に見出し、このルールを「N-末端則」と命名した。N-末端則を中心としたユビキチン研究は、蛋白質の寿命の不均一性を説明することが可能な魅力ある仮説として一世を風靡した。しかし、当初の期待に反して「N-末端則」は大きく発展せず、蛋白質分解系の一翼を占めるに過ぎなくなってしまった。

ユビキチンリガーゼ研究の動向

華々しく登場した「N-末端則」の意外な没落の原因は、この経路を触媒するE3であるUbr1 (E3 α) の遺伝子破壊が酵母の表現型に大きな影響を与えなかったことによる。その後、ユビキチンシステムによって分解される標的蛋白質が洪水のように出現したにもかかわらず、それらの大部分が「N-末端則」に従わないことが判明した。そこで改めて、ユビキチンリガーゼの研究が蛋白質分解を理解するキーワードとして浮上し、その研究推進に拍車がかかってきた。その突破口になったのは、代謝的に不安定であることが生理的に意味のある個別の蛋白質の分解メカニズムの研究であった。その結果、ユビキチンリガーゼに新しい概念が誕生した。

【Hect 型ユビキチンリガーゼ】

最も重要な癌抑制遺伝子であるp53は、DNAの損傷をモニターする転写因子であるとともに、アポトーシスや細胞周期を制御するキー分子としても作用することが知られている。興味深いことに、p53は細胞内で非常に不安定であり、ユビキチンシステムがその分解を担っていることが判明した。そして、p53のユビキチンリガーゼはパピローマウイルスの発癌研究の過程で偶然に発見された。子宮頸癌の多くはhigh risk型のパピローマウイルスHPV16/18の感染に起因しており、発癌の一因はウイルスの遺伝子にコードされたE6がp53に結合してp53のユビキチン依存的な分解を促進する作用にあることが判明した。そして、p53のユビキチン化に関与する酵素として同定されたE6-AP (E6-associated protein) は、E2からユビキチンを受け取って標的蛋白質に結合させる反応を触媒するE3であった。E6-APはユビキチンとチオエステル結合する活性システイン残基をC-末端領域に有する新規なユビキチンリガーゼであり、ユビキチンがE1-E2-E3のカスケード反応で転移されることが判明した最初の例であった。しかも、このユビキチン結合部位を含む約350アミノ酸の領域は、種を超えて多数の蛋白質に高く保存されていることが判明した。その触媒部位は Hect ドメイン (homologous to E6-AP carboxyl terminus) と命名され、このHectドメインをもつ多数の蛋白質がユビキチンリガーゼとして機能する仮説が提唱された。実際、E6-APの他にNedd4, Rsp5, Tom1, Ufd4, Pub1など多数の分子群がHect型ユビキチンリ

ガーゼとして作用することが判明している。ごく最近発見されたSmuflも、TGF- β ファミリー蛋白質であるBMPの細胞内シグナル因子Smad1のユビキチン化を触媒するHect型E3であった。今後、Hect型E3の発見は増加の一途を辿ることが予想されている。筆者らは、このE1-E2-E3のカスケード反応に関与するE3を2型ユビキチンリガーゼと定義することを提案している（図1参照）

【Ring-Box 型ユビキチンリガーゼ】

さて、もう一つの型の新しいユビキチンリガーゼは、細胞周期の研究、ことに細胞周期進行のエンジンとして働くMPF（M期促進因子）とSPF（S期促進因子）の研究から発見された。これらのエンジン分子はサイクリンをパートナーとする蛋白質キナーゼCDK（サイクリン依存性キナーゼ）であり、細胞周期の進行に伴って活性化・不活性化を繰り返しているが、この不活性化のステップでサイクリンが周期的に分解することがCDKの活性制御に必須であることが判明した。そして、サイクリンはユビキチン-プロテアソーム経路で迅速かつ時期特異的に分解されることが見出されたのである。とくにB型サイクリンのユビキチン化を触媒するE3として発見されたのが、APC/C（anaphase-promoting complex：有糸分裂の後期促進因子/cyclosome）である。このAPC/Cは、B型サイクリンの分解のほか、Cut2/Pds1（アナフェーズインヒビター）やAse1（紡錘体結合蛋白質）等のM期の進行を司る多数の因子群の選択的なユビキチン化を触媒する。これらの分子には「サイクリンボックス」と名付けられたユビキチン化修飾に必須なドメインが存在するが、APC/Cによる直接の認識部位であるか否かは不明である。いずれにしてもAPC/Cは細胞周期のM期のチェックポイント制御において中心的な働きをしていることが判明している。APC/Cは十数個のサブユニットから構成された大きな複合体で、時期特異的なユビキチン化に関わるアダプター因子（Cdc20/Fizzy, Hct1/Cdh1）の可逆的な会合や複数のリン酸化修飾によってその活性が調節されている。しかし、APC/CのE3としての作用機構は当初全く不明であった。

一方、APC/Cが発見されて間もなく、G1/S期の進行に作用するユビキチンリガー

ぜはSCF (Skp1/Cdc53 or Cullin-1/F-box protein) と呼ばれる複合体であることが判明した。SCFはCDKインヒビターであるp40^{Sic1}のユビキチン化に關与するE3として見出されたが、その後、p27^{KIP1}、サイクリンD1、E2FなどG1/S期の進行に直接・間接的に關与する様々な因子群や転写因子NF- κ Bの負の調節因子I κ BあるいはWnt/Winglessシグナル系の仲介因子である β -カテニンなどの代謝的安定性の決定に關与していることが明らかになった。SCFは当初、上記の異型三量体と考えられていたが、その後、SCFに会合する第4の因子としてRING-box蛋白質 (Roc1/Rbx1/Hrt1) が発見された。SCFリガーゼで興味深いことは、基質蛋白質と相互作用するために標的識別に關与していると考えられているF-box proteinは数百の分子多様性を擁しており、またCullinやSkpにも複数の分子種が同定されていることである。これらの事実から、細胞内には、理論的に数百~数千のSCFが存在すると考えられている。さらに最近、SCFと相互作用してその活性を調節する新しい分子群の存在も示唆されている。このように、SCFは巨大な複合体であるAPCとは異なってサブユニットの置換と言う新しい仕組みで標的識別の多様性を確保しているのである。

興味深いことは、APC/Cのサブユニットの中にCullin-1やRoc1と相同性を示す分子APC11やAPC2が存在することであった。Cullin-1はE2と会合することから、E3にユビキチンをリクルートする役割を担っていると推定されている。そして、Roc1の分子内に存在するRING-boxと名付けられたモジュール構造がE3としての触媒部位を構成することが示唆された。そこで、これらはRING-box型ユビキチンリガーゼと類別することが提案されている。筆者らは、このRING-box型E3を1型リガーゼとして類別している(図1)。最近の研究から、N-末端側のE3であるUbr1やp53のもう一つのE3である癌遺伝子産物Mdm2もこのグループに入ることも示唆されている。また、EGFやPDGFのリセプターのユビキチン化を触媒するc-Cbl、tramtrackやDCCのユビキチン化を触媒するSiah-1もRING-box型E3である。さらにごく最近、乳癌などで高頻度で遺伝子変異が見出されている癌抑制遺伝子BRCA1 (breast cancer gene 1) や若年性パーキンソン症状群の責任遺伝子Parkinもユビキチンリガーゼ活性(筆者らの

ラボで解明)を持つことが発見され、世界的に注目の的になっている。このように、ユビキチンリガーゼは、その作用機構からHect型E3とRING-box型E3の2種のグループに大別できることが一般化されつつある。これらのE3群には、特定のE2との組み合わせで機能する場合と複数のE2を利用する場合がある。しかし、E2とE3が提携する分子機構は、依然として謎である。

3) プロテアソームシステム

1970年頃、細胞質にリソソーム阻害剤に非感受性のプロテアーゼ系が存在することが判明し、その研究の過程でプロテアソームは発見された。従って、初期のプロテアソーム研究は酵素学が中心であり、1980年後期にユビキチン系との連携が判明してから、その生物学的重要性が広く認識されるようになり、今日の興隆を迎えている。

20Sプロテアソーム

約20年頃前、細胞質に非常に大きな中性プロテアーゼが存在することに多くの研究者が気付いていた。その酵素は基質特異性が広いことから、多機能性プロテアーゼ複合体と呼ばれていた。筆者らはこの酵素を安定に精製する方法を確立してその物理学的性質を詳細に調べた結果、沈降係数が20Sで円筒型の分子形状を有することが判明したことから、1988年にプロテアソームと命名した。20Sプロテアソームは多成分複合体であり、筆者らは20-30 kDaから構成されたほとんど全てのサブユニット群を分離しそれらの一次構造をcDNAクリーニングによって決定した。他方、HuberらはX線結晶構造解析に成功して、20Sプロテアソームの分子の実体を明らかにした。その結果、本酵素は α リングと β リング(各々7種のサブユニットから構成)が $\alpha\beta\beta\alpha$ の順で会合した分子量約75万の多成分複合体であることが判明した。そしてプロテアソームは触媒活性部位にスレオニン残基を有する新型のプロテアーゼであることが判明し、スレオニンプロテアーゼとして作用する3種の触媒サ

プユニット (X, Y, Z) は β リングの内表面に存在していることが明らかにされた。

26Sプロテアソーム

20Sプロテアソームは細胞内で不活性型として存在し、調節因子と会合して活性型酵素に転換されることから、当初発見された酵素は触媒ユニットとして作用していることが判明した。高次構造の解析から、20Sプロテアソームの外側の α リングがほぼ完全に閉じているために基質の往来に障害をきたし、結果として不活性型になっていることが明らかとなった。

その後、PA700あるいは19S複合体と名付けられた活性化因子が発見された。PA700は20Sプロテアソームの両端にATP依存的に会合して、分子量2000~2500 kDaの巨大な分子集合体を形成することが判明した。この20SプロテアソームとPA700から構成された複合体、すなわち26Sプロテアソームが真核生物のATP依存性プロテアーゼである。PA700は25-110 kDaの異型サブユニット群から構成されており、ごく最近、そのPA700がlid（蓋部）とbase（基底部）の複合体であることが判明した。lidはユビキチン化蛋白質を捕捉するため必要であることから、標的選別に関与すると考えられている。他方、baseは6種のATPアーゼを含む複合体であり、基質蛋白質のアンフォールディングに寄与していると推定されている。

26Sプロテアソームは触媒部位が20Sプロテアソームの内表面にあるために、基質を分解するためには分子内に取り込むことが必要である。逆に言うと、触媒部位と基質の自在な接触を妨げることによって、無秩序な細胞タンパク質の破壊から免れていることになる。Baumeisterらは、このように触媒部位を基質との接触から隔離するために複合体の内部に閉じこめているプロテアーゼをself-compartmentarizing proteaseと呼ぶことを提唱している。

オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の分解機構

26Sプロテアソームはユビキチン化された蛋白質を選択的に分解する酵素として

発見されたが、ユビキチンを付加された蛋白質のみを標的とする訳ではない。実際、オルニチン脱炭酸酵素（ODC）は26SプロテアソームでATP依存的に分解されるが、この分解反応にユビキチンシステムは関与しない。現在、ODCはユビキチン化修飾を経由しないで生理的に分解される唯一の蛋白質であることから、きわめて特殊な例であると考えられている。ODCはオルニチンからポリアミンを生合成する代謝経路の律速反応を触媒する酵素で、様々な外環境に敏速に応答して激しく変動することが知られている。ODCは代謝的にきわめて不安定であり、その半減期は10-60分である。このように、ODCは最も短い寿命の酵素である。これは、ODCが関与する代謝経路の最終産物であるポリアミンが細胞増殖に必須であると共に、その過度な蓄積が細胞に毒性を与えるためにその回避戦略としてODCレベルでの制御が要求されるためである。すなわち、生物は細胞内のポリアミンレベルを厳格に維持しかつ迅速に変動させるために、ODCをターゲットとした巧妙なフィードバック制御機構を進化的に獲得したのである（図2）。

このODC調節のキー分子はアンチザイム（AZ）と呼ばれるODCの阻害蛋白質である。AZのmRNAは調べた限り全ての組織細胞でかなり豊富に存在するにもかかわらず、その蛋白質は非常に少ない。それは、通常AZのmRNAは翻訳開始後、間もなく停止コドンで終結し機能的なAZ分子が生合成されないためである。興味深いことに、ポリアミンが増えるとリボソームでの翻訳機構にフレームシフトが誘発され、通常は翻訳されないフレームから活性型の完全鎖AZが合成されるようになる。すなわち、ODCが誘導されると蓄積したポリアミン依存的なフレームシフト機構が作動し、AZが遺伝子の転写を介することなく急速に合成されるのである。その結果、ODC活性は瞬時に抑制され、ポリアミン合成は低下するのである。

さて興味深いことは、AZの作用機序である。AZはODCの阻害蛋白質として発見されたが、実は活性型である二量体のODCとは相互作用せず、単量体のODC分子に強固に結合することが判明した。したがって、結果的に二量体から単量体に平衡を移動させることになってODC活性は阻害されることになる。さらに面白いことに、

細胞内にはAZインヒビターという蛋白質が存在し、この分子はAZ-ODC複合体からAZを強制的に取り除きODCを再度活性型に変換させる作用をもっている。AZインヒビターはODCと構造的に類似しているがODC活性は示さず、AZに対してODCよりも遥かに高い親和性を有しているためAZ-ODC複合体からAZを横取りするのである。その結果、解離したODCは二量体を形成して元の活性を示すことができるのである。このように、ポリアミン依存的なAZのフレームシフト制御に加えてAZインヒビターが存在することは、細胞がいかに厳格にODCを制御することに腐心しているかが読みとれるようである。このような巧妙なフィードバック代謝調節機構が高等動物で存在することは、きわめて稀であるように思われる。

しかし、最も興味深いのは、AZの作用機構である。AZは実は、ODCの活性を阻害するのみならず、その分解を促進する作用を有することが判明したのである。そして筆者らは、その分解に代謝エネルギーが必要であることを明らかにすると共に、最終的に26SプロテアソームがAZ依存的にODC分解を触媒することを証明した。勿論、この分解はATP依存的に進行するが、ユビキチンを要求しないことが最大の特徴である。興味深いことに、少数のAZが多数のODCを分解できること、またAZはODCと一緒に分解されず繰り返し再利用されることなどの性質は、AZの作用が一見ユビキチンの作用に類似しているように見える。しかし、AZはユビキチンとの構造的な相同性はなく、またユビキチンと異なり蛋白質の共有的な修飾分子ではない。決定的な違いは、ユビキチンがそれ自体が分解シグナルとなるのに反して、AZは26Sプロテアソームによる識別の直接のターゲットにはならないことである。したがって、両者は同じように標的分子に不安定性を付与することができるが、その作用機構は全く異なっているのである。では、AZがどのようにしてODCの不安定性を誘発するのかは大変に興味深い。この問いを解く鍵は、ODCの分子構造の中に隠されていたのである。

不思議なことに、下等生物ではポリアミンが過剰に存在しても毒性を誘発しないので、高等生物に見られるようなポリアミンによる負のフィードバック機構は存

在しない。そのような生物のODCを高等生物の細胞内に発現させても安定であり、ポリアミンによる、すなわちAZによる負の調節を受けない。その違いをキメラODCを作成して解析すると、ODCのC-末端側に秘密があり、C-末端側が高等生物由来のODCである場合のみ迅速な分解が観察された。C-末端の欠失やこの領域にアミノ酸変異をもつ高等動物のODCは、AZと結合できるにも関わらず、細胞内で安定性を獲得したのである。そして、最終的に26Sプロテアソームにターゲットされないことが判明した。したがって、ODCにAZが結合すると分子内に内包されていたC-末端の分解シグナルが露出して26Sプロテアソームによって補足されると推定された（図2）。

最近、本特定研究班班員の村上らは、筆者らと共同して26SプロテアソームがODCを分解する分子機構を明らかにした。26SプロテアソームはAZによって露出したODCのC-末端の分解シグナルを識別して補足することが示唆された。このとき、20Sプロテアソームが結合していない遊離のPA700はその識別能力を持たないと思われる。そして、この補足と同時にODC分子の取り込みが始まり、このプロセスに連動してエネルギー依存的な不活性化、すなわちODC分子のアンフォールディングが誘導される。その後、触媒活性部位のある20Sプロテアソームの内腔へ運搬され、最終的に分解される。この分子内輸送にも、ATPの加水分解が必要と推定されている。したがって、代謝エネルギーは標的分子の変性と分子内輸送のために消費されることが考えられる。このODCの分解機構の中で大きな問題は、26SプロテアソームがどのようにしてAZ依存的に露出したODCの分解シグナルを識別するかが未解明なことである。ユビキチンの場合には、PA700を構成するサブユニットにポリユビキチン鎖を結合する分子が同定されているが、ODCの場合にはその分子機構が未だ解き明かされていないのである。この解明は26Sプロテアソームの分子識別を考察するためにも重要である。

4) プロテアソームの分子多様性

プロテアソームは、細胞周期等の基本的な生命活動に関係しているために、酵母からヒトに至る全ての真核生物に普遍的に存在し、本複合体を構成する遺伝子群は、触媒ユニット（20Sプロテアソーム）および調節ユニット（PA700）とも進化的に高く保存されている。そして、これの構成因子のほとんどが必須遺伝子から構築されている。しかしながら、研究が進んでくると、この概念に変容を迫る事実が、高等生物で相次いで発見されている。その代表例は、免疫プロテアソームである。1991年にプロテアソームが、長い間不明であった内在性抗原のプロセッシング酵素であるという画期的な発見があり、プロテアソームは分子のレベルでの自己と非自己の識別という免疫の根源に関わる分子であることが判明した。筆者らは、ガンマ型インターフェロン（IFN- γ ）で誘導されるサブユニット（LMP7, LMP2, MECL1）が、互いに高い相同性を有する3個の構成型サブユニット（X, Y, Z）と置換することを発見し、このIFN- γ 誘導型サブユニットを含むプロテアソームはMHCクラスIペプチドを造成しやすいように機能変換していることを示した。これらの知見に基づいて、筆者らはこのIFN- γ 誘導型プロテアソームを“免疫プロテアソーム”と命名した。最近の研究から、免疫プロテアソームの造成は、IFN γ で誘導されるサブユニット群の選択的な分子集合によることが判明し、さらにLMP7はLMP2やMECL1の取り込みに必須であることが判明し、この仕組みによって均質な免疫プロテアソームの造成が可能となっている。適応（獲得）免疫は、高等生物が獲得した生体防御機構であるので、免疫プロテアソームを構成する遺伝子群は、有顎脊椎動物以降に出現し、酵母などの下等生物には存在しない。

さらに、20Sプロテアソームに会合する新しい調節因子として、PA28（REG）が発見された。このPA28と名付けられたもう一つの活性化因子は、PA28 α とPA28 β の二種のサブユニットが交互に会合した6-7量体として細胞質に存在し、20Sプロテアソームの両端に会合してフットボール型プロテアソームを形成する。PA28は、ユビキチン化蛋白質の分解には直接かかわらず、プロテアソームのペプチダーゼ活性を顕著に促進することが判明した。したがって、フットボール型プロテアソーム

は蛋白質分解の初反応を触媒するエンドプロテアーゼとしては作用できず、26Sプロテアソームと連携してその産物の中間代謝に関与すると推定されている。興味深いことは、PA28もまた高等生物に特異的であり、酵母には存在しない分子であることである。筆者らはPA28 (α と β の二種のサブユニット) のcDNAクローニングに成功するとともにその発現がIFN γ によって強く誘導されることを見出し、この活性化因子が免疫応答に関与している可能性を示唆した。しかし、PA28は20Sプロテアソームに結合しても、ユビキチン化の有無に関わらず蛋白質を分解することができないので、この活性化因子の役割は謎であった。ところがごく最近、我々は20Sプロテアソームの両端にPA700とPA28の両調節ユニットを併せ持ったプロテアソーム複合体が、細胞内に存在することを突き止め、このPA700-20S-PA28複合体を“ハイブリッド型プロテアソーム”と名付けた。ハイブリッド型プロテアソームは26Sプロテアソームと同様にATP依存性プロテアーゼとして作用すること、さらに驚いたことに、IFN γ の処理でこのハイブリッド型プロテアソームが大幅に増加することも併せて見出した。したがって、IFN γ は、免疫プロテアソームのみならずハイブリッド型プロテアソームも大量に造成して、内在性抗原のプロセッシング反応を加速的に触媒すると推定される。

このように、プロテアソームは進化に符丁して新たな関連遺伝子群を造成し、機能の多様性を獲得してきたと考えられる。実際、“免疫プロテアソーム”や“ハイブリッド型プロテアソーム”の造成は、適応免疫と言う多細胞生物が獲得した新しい生存戦略の構築に必須であったと推定される。他方、免疫とは別の機構においてもプロテアソームの分子多様性の存在することが判明している。それは、筆者らがごく最近に見出したポリユビキチンレセプター (pUb-R) である。pUb-Rは、26Sプロテアソームがポリユビキチン化された蛋白質を捕捉するためのサブユニットで、PA700を構成する一成分であり、Rpn10と命名されている。ゲノム解析が完了している酵母では、pUb-R/Rpn10は一分子しか存在しない。ところは、川原らはマウスやヒトなどの哺乳動物では、すくなくとも5種類のpUb-RをコードするcDNAの単離に

成功し、その遺伝子構造の解析から、これらが単一遺伝子からalternative splicingによって生じることが判明した。興味深いことに、これらのアイソフォーム分子群は、発生特異的であったり、脳に特異的であることが判明した。これらの結果は、高等生物には、普遍的プロテアソームに加えて、分子種の異なるpUb-Rをもった組織特異的プロテアソームが存在することを示唆している。

さらに、ごく最近、プロテアソームの骨格構造を形成するサブユニット群に加えて、プロテアソームに可逆的に会合する分子が多数発見されつつある。これらには、プロテアソームの分子集合に関与する因子、蛋白質分解作用に関係する因子、標的識別に関与する分子などが存在する。今後は、このようなプロテアソームの構造・機能を調節する分子群の研究が、プロテアソームの生理的意義の解明に向けて、より重要に貢献することが予想される。

5) 生理作用と病態

ユビキチンとプロテアソームが様々な生物作用を示すことは今日ではもはや自明のことになりつつあるが、その解明に大きく貢献したのは、酵母の欠失変異体あるいは温度感受性変異株を用いた遺伝学的な機能解析である。しかし、これらの手段は高等生物には簡単に適用できない。最近になってプロテアソームの阻害剤が開発・発見されてから、この酵素の役割の解明が飛躍的に進展した。最初は、種々のアルデヒド型ペプチド誘導体がプロテアソーム阻害剤として開発された。とくに Z-Leu-Leu-Leu-CHO (別名MG-132)は、プロテアソームの強力な阻害剤として頻用されたが、問題はこの阻害剤はカルパインやカテプシンなどシステインプロテアーゼ群をも強く阻害することから、その効果の解釈に慎重な考察が必要であった。ところが、微生物の産生する二次代謝産物がであるlactacystin (活性型はclasto-lactacystin β -lactone) やeponemycinがプロテアソームの活性中心であるスレオニン残基に結合する特異的な阻害剤であることが判明して以来、細胞におけるプロテアソームの関与の証明がきわめて簡便になったのである。

最近、細胞周期の制御因子、物質代謝の律速酵素、シグナル伝達因子、転写因子、癌及び癌抑制遺伝子産物、ポリペプチドレセプター等を含め、プロテアソームによって異化代謝される分子群は増加の一途を辿っており、枚挙の暇がない状況が続いている。また、プロテアソームは、変異・障害蛋白質あるいは正常なフォールディング・分子集合に障害をきたしたような異常蛋白質の積極的な除去にも関与している。すなわち、プロテアソームは小胞体や細胞質における蛋白質の品質管理機構、およびこれに関連したストレス応答にも密接に関係しているのである。このようにプロテアソームは細胞内の短寿命機能蛋白質や変異やストレスによって生じた異常蛋白質の積極的な分解を司る多機能性の蛋白質分解システムであり、細胞の恒常性を維持監視する中心的分子であることが判明している。

最近、ユビキチン/プロテアソームに直接・間接に関わる疾患に関する知見が集積しつつある。とくに、ユビキチンが異常蓄積する神経変性疾患が数多く報告されている。代表的な例は、老人性痴呆の主原因となっているアルツハイマー病の神経細胞内にユビキチン化したリン酸化型タウ蛋白質が異常に蓄積している発見である。また、トリプレットリピート病であるハンチントン舞踏病の原因遺伝子*huntingtin*はユビキチン化された状態で脳内に異常蓄積している他、脊髄小脳失調症1型の脳の核内凝集体にもユビキチンが蓄積している。さらに形態学的な所見からは、パーキンソン病、レビー小体病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト-ヤコブ病等の神経変性疾患の脳にユビキチンあるいはユビキチン化された蛋白質が多量に蓄積していることが観察されている。

一方、ユビキチンリガーゼの異常が疾患に結び着いている例が急激に増えている。前述したBRCA1やParkinはその代表例になると思われる。その他、E6-APユビキチンリガーゼをコードする*UBE3A*はAngelman症候群（重度の精神発達遅滞を主症状とする神経疾患）の原因遺伝子である。遺伝性の高血圧症であるLiddle症候群はアミロイド感受性上皮ナトリウムチャンネルが変異のためにNEDD4ユビキチンリガーゼによって分解されずチャンネル活性が持続的に上昇することが原因であり、嚢胞性線維

症の場合には原因遺伝子であるCFTR（クロライドチャンネルをコード）が変異によりプロテアソーム系によって速やかに分解されることが原因となっている。von-Hippel-Linda病の原因遺伝子*pVHL*は、ごく最近、ユビキチンリガーゼ複合体のサブユニットを構成していることが判明した。様々な免疫異常を誘発するマウスの*Itch*遺伝子は、NEDD4に類似したHECTドメインをもつユビキチンリガーゼをコードしている。

このように、ユビキチンリガーゼ以外にもユビキチン修飾系に関連する酵素群に関連した疾患も確実に増加する傾向にある。このように、ユビキチン・プロテアソームの機能異常に関連した疾患を仮に「ユビキチン病」と定義すると、今後、ユビキチン病は大幅に増大してくることが予想される。

6) おわりに

本稿ではユビキチンシステムとプロテアソームの蛋白質分解作用を概説した。この二種のシステムの発見により、約半世紀前に記載された代謝エネルギーを利用する蛋白質分解機構の謎が解けた。その結果、この蛋白質分解装置は数百の遺伝子群を駆使し、蛋白質の生合成装置をも凌ぐ複雑性をもっていることが解ってきた。すなわち、ユビキチンシステムは蛋白質のリン酸化に匹敵する翻訳後修飾系であること、またプロテアソームは生化学史上最も複雑で精巧な分子集合体であることが判明したのである。そして、この蛋白質分解系が生物学的に実に多様で重要な意義をもっていることが明瞭になってきた。現在、ユビキチンとプロテアソームは生命を理解するために不可欠なキーワードとして、その重要度は日毎に増幅しつつあると言ってよいであろう。しかし、このユビキチン/プロテアソームシステムの全容が解明されたわけではない。昨今の急速な研究進展にもかかわらず、この蛋白質分解系は依然として未解決な問題が山積している。それらの解明は、細胞内蛋白質分解機構にまた新しい概念を誕生させることになるかも知れない。

文献（本稿に関連の総説を記載）

- Hershko, A., Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 761-807
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425-479
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., Seemuler, E. (1998) The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92: 367-380
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C., Huber, H. (1999) The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28: 295-317
- Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17: 7151-7160
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A. L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 801-847
- DeMartino, G. N., Slaughter, C. A. (1999) The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274: 22123-22126
- Deshaies, R. J. (1999) SCF and Cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 435-467.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30: 405-439
- Huibregtse, J. M., Maki, C. G., Howley, P. M. (1998) Ubiquitination of p53 tumor suppressor. In "Ubiquitin and the Biology of the Cell" (Eds by Peters, J.-M., Harris, J. R., Finley, D.) pp323-343, Plenum Press, New York.
- Mayer, R. J., Landon, M., Lowe, J. (1998) Ubiquitin and the molecular pathology of human disease. In "Ubiquitin and the Biology of the Cell" (ed by Peters, J.-M., Harris, J. R., Finley, D.) pp. 147-189, Plenum Press, New York
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N., Tanaka, K. (2000) Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 1-6.
- Orlowski, M. (1990) The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 29: 10289-10297.
- Rechsteiner, M. (1998) The 26S proteasome. In "Ubiquitin and the Biology of the Cell" (Eds by Peters, J.-M., Harris, J. R., Finley, D.) pp147-189, Plenum Press, New York.
- Rivett, A.J. (1993) Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.* 291: 1-10.
- Schwartz, A. L. and Ciechanover, A. (1999) The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50, 57-74.
- Tanaka, K., Tanahashi, N., Tsurumi, C., Yokota, K., and Shimbara, N. (1997) Proteasomes and antigen processing. *Adv. Immunol.* 64: 1-38.
- Tanaka, K. (1998) Molecular biology of proteasomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 537-541
- Tanaka, K. (1998) Proteasomes: structure and biology. *J. Biochem.* 123: 195-204
- Tanaka, K. and Chiba, T. (1998) The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes to Cells* 3: 485-498.
- Tanaka, K. and Kasahara, M. (1998) The MHC class I ligand generating system: Roles of immunoproteasomes and INF- γ inducible PA28. *Immunol. Rev.* 163: 161-176.

- Tanaka, K., Suzuki, T., and Chiba, T. (1998) The ligation systems for ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Molecules Cells* 8: 503-512.
- Tanaka, K., and Kawahara, H. (2000) Proteasome and apoptosis. In "Proteases as Targets for Therapy" *Handbook of Experimental Pharmacology*. (Eds. von der Helm K. and Korant B.) 341-358. Springer-Verlag, New York.
- Varshavsky, A. (1992) The N-end rule. *Cell* 69: 725-735.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*68: 1015-1068.
- Zachariae, W., Nasmyth, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes & Dev.* 13: 2039-2058.

図1：ユビキチンとプロテアソームによって触媒されるエネルギー依存性の蛋白質分解機構モデル

S：標的タンパク質、Ub：ユビキチン、E1：Ub活性化酵素、E2：Ub結合酵素、E3：Ubリガーゼ。E1は、単一酵素であるが、E2 (Ubc1~Ubc13) とE3には分子多様性があり、E3は1型と2型に類別できる。1型E3は、RING-boxをもつ酵素で、このドメインはE2のリクルートに関与すると推定されている。1型E3は、多くの場合、基質と直接に会合する。また1型E3は、単量体の場合と複合体の場合がある。2型E3は、UbとUb-E2からUbを受け取り（チオエステル結合）、標的分子にUb分子を連結させる酵素であり、このUbと結合する領域は、HECTドメインと呼ばれ、多くの2型E3に保存されている。すなわち、2型E3は大きな遺伝子ファミリーを形成している。真核生物のATP依存性プロテアーゼである26Sプロテアソームは、触媒機能を司る20Sプロテアソームの両端にU字型の調節ユニット（PA700）が会合した大きなダンベル型粒子である（詳細は本文参照）。

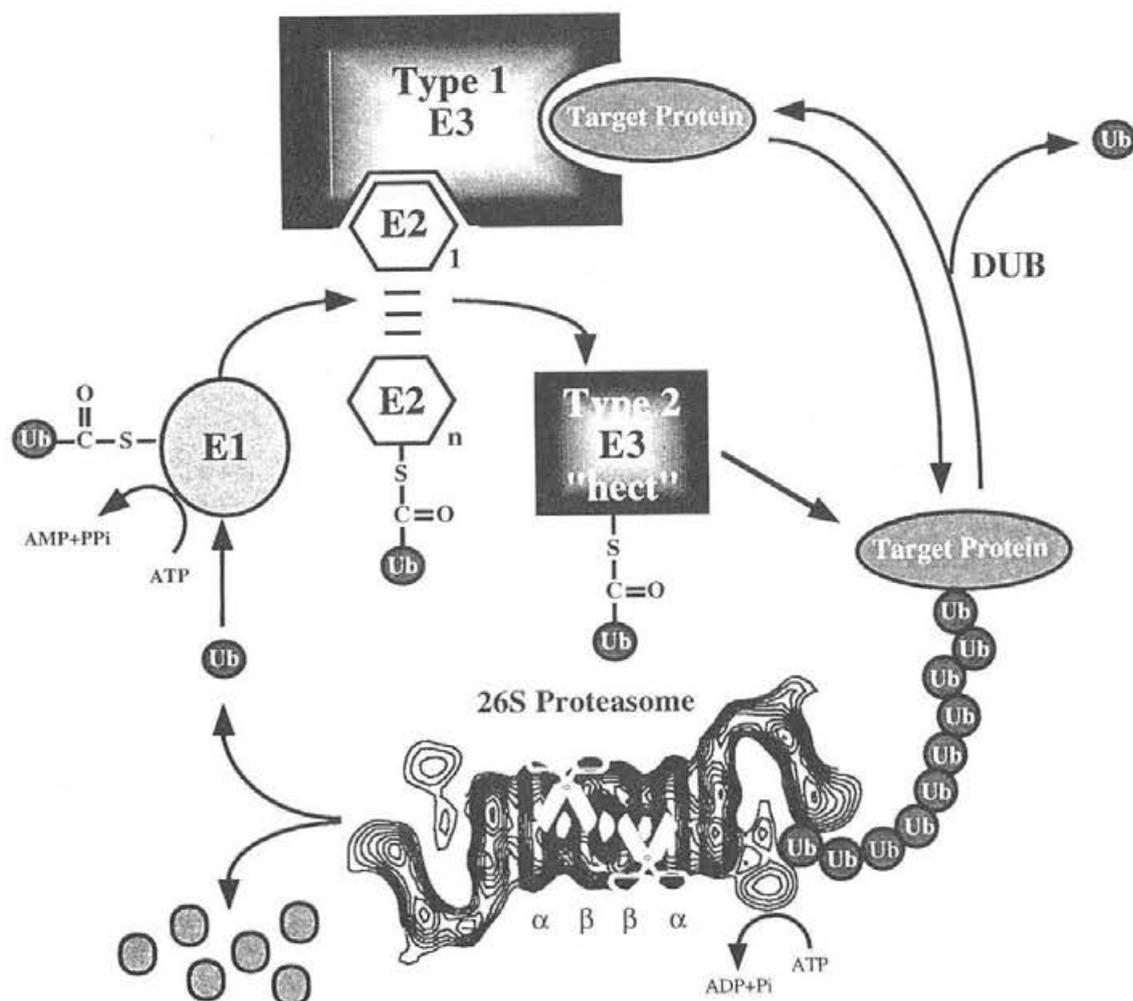
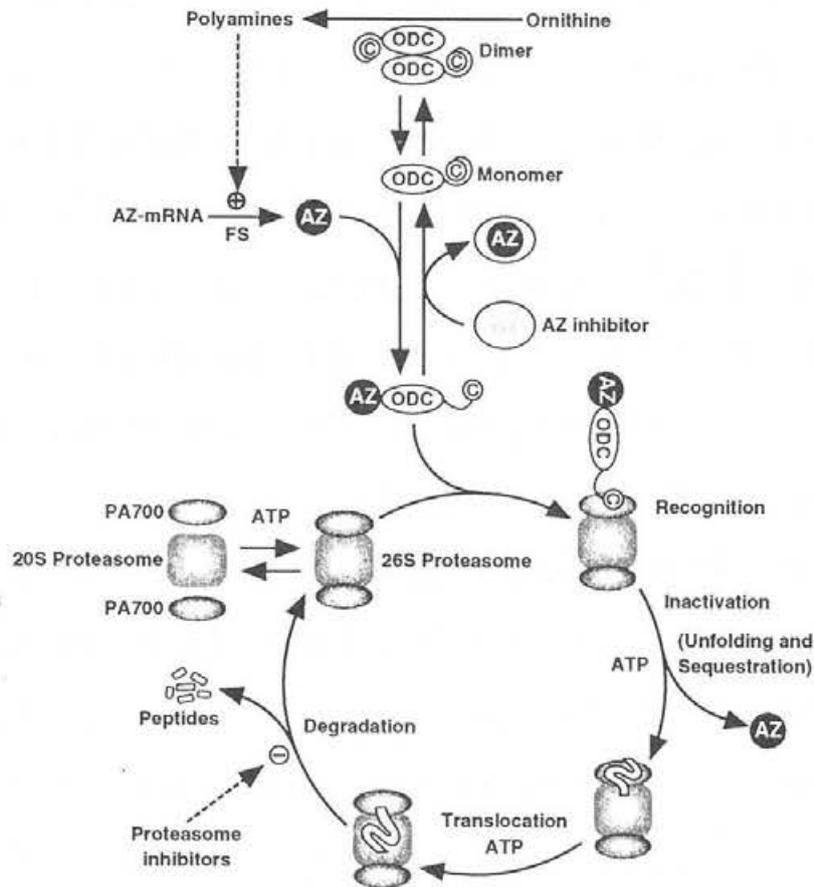


図2：オルニチン脱炭酸酵素の分解調節機構モデル

オルニチン脱炭酸酵素（ODC）は活性型の二量体と不活性型の単量体との平衡関係にある。ポリアミン依存的なフレームシフトにより合成されたアンチザイム（AZ）は単量体に結合し、AZ-ODC複合体を形成する。AZに高い親和性をもつAZインヒビターはAZ-ODC複合体を解離させ、ODCを活性型に再転換させることができる。ODCはAZと結合すると、C-末端にマスクされていた“分解シグナル”が露出し、26Sプロテアソームによって識別される。ODCはPA700に取り込まれると、ATP依存的に不可逆的にアンフォールディングされるが、このときAZは解離して再利用される。PA700で変性されたODCはATP依存的に20Sプロテアソームの中に分子内輸送された後、ペプチドに分解される。プロテアソーム阻害剤はこの過程を抑制する。



3. ATP依存性プロテアーゼとシャペロン : unfoldase vs chaperone

ATP依存性プロテアーゼの制御ATPaseサブユニット(ドメイン)は、基質タンパク質を認識し、unfoldし、プロテアーゼサブユニット(ドメイン)にトランスファーする。したがって、その作用からunfoldaseとも呼ばれる。一方、分子シャペロンは、タンパク質の変性を抑制したり、変性タンパク質のrefoldingを行う。ところが、ATP依存性プロテアーゼの制御ATPaseがシャペロンとしても機能するという例がいくつか報告されている(1, 2, 3)し、また、シャペロニンGroELの反応には部分的な基質タンパク質の変性を伴うという報告(4)もされ、ATP依存性プロテアーゼの制御ATPaseとシャペロン、言い換えればunfoldaseとchaperoneの区別が難しくなっている。これらの問題点を整理し、筆者の仮説を述べさせていただく。

まず、ATP依存性プロテアーゼ(26Sプロテアソーム、ClpAP/XP、HslVU、Lon、FtsHなど)のunfoldase活性から見ていくことにする。これらのプロテアーゼが基質に作用するとき、制御ATPaseからプロテアーゼに基質が移行することは間違いなく、実験的にも確かめられている。したがって、その樽型の構造からすれば、基質タンパク質がunfoldされることが必要で、この考えは一般に受入れられてきたが、直接それを証明する実験はこれまでなかった。最近、Horwichのグループは、ClpAについてSsrAタグのついたGFP(緑色蛍光タンパク質)をモデル基質にして、基質タンパク質のunfoldingを証明した(図1:文献5)。

GFPは、タンパク質のfolding状態を蛍光によってモニターできるので、この目的に適している。細胞内でストップコドンを持たない不完全なmRNAが翻訳されたときにC末端にSsrAと呼ばれる疎水性のタグがつけられた未完成のタンパク質が作られるが、ClpAPプロテアーゼはSsrAタグタンパク質を分解除去するプロテアーゼとして機能する。そこで、GFPに人工的にSsrAタグをつけたタンパク質を構築し、これを基質として実験に用いた。その結果、この基質タンパク質はClpAPプロテアーゼによって確かに分解されることが分かった。次に、基質蛋白にClpAだけを作用さ

せると、わずかな蛍光の低下が観察された。彼らは、この結果を、ClpAはATP依存的にSsrA-GFPを変性させるが、GFPは自己refoldingが効率良く起こるので極端な蛍光の低下に至らないと考え、変性した基質がrefoldingしない細工を考えた。シャペロンGroELは、変性タンパク質を取り込んで、そのrefoldingをアシストするシャペロンとしてよく知られているが、そのGroELの変異で、trapと呼ばれる変異がある。trap GroELは、基質との結合はできるが、releaseに欠陥があるため、基質をいつまでもtrapしておく（結果としてrefoldingは起こらない）性質を持つ。ClpAによってSsrA-GFPがunfoldされるのであれば、それはtrap GroELに文字通りtrapされ、変性したままに保つことができる。結果は、見事に予想通りであった。SsrA-GFPの一部が変性しているのか全体が変性しているのかについて調べたところ、ほぼ全体について変性が起こっているという結果が得られた。つまり、ClpAは基質タンパク質を完全に変性する活性を持つことが実証された（5）。

次に、シャペロンによる変性基質タンパク質のrefoldingについて見てみよう。Unfoldingとrefoldingは逆の反応であるが、変性タンパク質のrefoldingはunfoldingに依存しているようだ。GroELが基質タンパク質を捉えてrefolding反応を助けるとき、基質タンパク質の部分的なunfoldingが起こっていることが示された（図1；文献4）。おそらく、変性というのは、完全にほどけた状態ではなく、nativeなタンパク質とは異なる折り畳み状態であり、分子内にnativeなタンパク質にはない相互作用が生じていると考えられる。この状態からrefoldingするには、いったんそれらの異常な相互作用を解消してやる必要がある。それが、GroELの機能の一つと考えられる。そうだとすれば、基質タンパク質を完全にunfoldすることが、refoldingにもつながることが理解しやすい。

最近、吉田のグループ（6）とBukauのグループ（7）から、ClpBの興味深い活性が報告された。いずれのグループもClpBとDnaK/J/GrpEの共同作用で、変性タンパク質の凝集体が解きほぐされ、refoldingまで起こることを実験的に示した（図1）。Bukauのグループは、凝集体へ最初に作用するのは、ClpBであると述べている。

ClpBは凝集体を解きほぐす活性があるらしい。どのような作用かについての詳細は今後の研究を待たねばならないが、これもunfoldingで説明できるのではないかという気がする。Bukauのグループの示した、ClpB単独ではaggregationがさらに進むと思われるデータは興味深い。

以上の結果を、独断と偏見で解釈してみたい。その前に、ATP依存性プロテアーゼの制御ATPaseの構造的特徴について簡単に触れておく必要がある。ATP依存性プロテアーゼ（26Sプロテアソーム、ClpAP/XP、HslVU、Lon、FtsHなど）の制御ATPaseは、構造的によく似ている。26Sプロテアソームの6種類の制御ATPaseとFtsHのATPaseは高い相同性を持ち、AAAファミリーATPaseと呼ばれている。また、これら以外のClpAP/XP、HslVU、LonのATPaseも予測される二次構造などの類似性からAAA ATPaseと近縁であることが明らかで、これらすべてを包含するものとしてAAA+というスーパーファミリーが提唱された（8；「ぶろておりしす」第3号のミニレビュー「ATP依存性プロテアーゼ群の分子進化」も参照）。当然これにはClpBも含まれる（ClpBは、構造的にはClpAとは兄弟のような関係にあるが、プロテアーゼとしては機能しないと考えられており、上に述べたような機能から、シャペロンとして分類されている）。AAA+ ATPaseとしては、これらタンパク質基質に作用するATPaseのみならず、DNA、RNAに作用してヘリカーゼ活性を示すものもある。それらについて言及することは別の機会に譲ることにするが、これらのAAA+ ATPaseの構造的共通性は、リング状のオリゴマーを形成することである。

さて、そういう点をふまえて上に述べたようなAAA+ ATPase（AAA ATPaseを含む）の作用を解釈してみると、1）基本的に、ClpA、26Sプロテアソームのbase（これには6種類のAAA ATPaseが含まれる）、ClpBの基質への作用はすべて「完全なunfolding」と考える（図2）。2）Unfoldされた基質がその後どうなるかは、基質の性質や環境によって異なると考える。SsrA-GFPのように自己refoldingしやすい基質は、結果としてもとの状態に戻る。変性タンパク質から出発すれば、結果的にはシャペロン活性として検出される。Aggregateからのrefoldingには、DnaKシャペロン

系が必要であるが、これは使った基質によるかもしれないし、また、周りが変性タンパク質の凝集体だらけの環境では、完全にunfoldされた基質が自己refoldingする前にそれらの凝集体にtrapされてしまうと考えることもできる。3) Unfoldingは、ATPaseリングを通過するときに起こるのであろう。AAA ATPaseで唯一結晶構造が解かれたNSF-D2の6量体リングの中央の穴の直径は、約15Åである。この穴を通過するには、タンパク質がunfoldする必要がある。この点において、入り口の大きいGroELとは決定的に異なる。おそらく、unfoldingとtranslocationが共役して起こり、この反応にATPの加水分解のエネルギーが使われる。4) Unfoldされたタンパク質は、リボソームで合成された新生タンパク質と似た状態かもしれない(図2)。

つまり、unfoldingとrefoldingは、結果としては逆の反応であるが、unfoldaseであるATP依存性プロテアーゼのATPaseが示すシャペロン活性は、unfolding反応によってもたらされる別の結果を見ていると考えることが可能で、特別に逆反応などを想定する必要はないように思われる。この状態からのfoldingは、DnaKやGroELシャペロンの助けを必要とする場合もあるし、自分自身で起こる場合もある。5) AAA+リングは、あらゆる状態のタンパク質に作用するポテンシャルがある(図2)。上に見たように、AAA+ ATPaseリングは、native, denatured, aggregatedいずれにも作用できるようである。もちろん今のところ一つのAAA+がすべての状態の基質に作用することが示されたわけではないが、少なくとも、26Sプロテアソームのbaseは、nativeとdenaturedの両方に作用できる。この性質は、特筆すべきことのように思われる。

DnaKやGroELが表面に疎水性の部分が出ていて変性基質にのみ作用するのは、極めて対照的である。これは、AAA+は基質のいずれかの末端から反応を始めることと関係があるのではないかとと思われる。結論として、unfoldase vs chaperoneという問題提起は、unfoldaseはchaperoneの一形態であると定義し直せば、その問題自体はあまり意味がないといえる。もちろん、ここに述べた仮説が正しいという保証はない。しかし、ATP依存性プロテアーゼのATPase、すなわちAAA+ ATPaseによるタン

パク質のリモデリング機構は、今新しい段階を迎えようとしていることは間違いがない。最近、ClpAやHslUVの結晶構造も解かれたという情報もあるので、構造と機能の関係の解明が加速されるものと期待される。

タンパク質のunfoldingはプロテオリシスのときだけではない。タンパク質が膜を通過する際にも、unfoldingが必要と考えられている。最近、ミトコンドリアにインポートされるモデルタンパク質を使って、これがミトコンドリアへ入って行く際にタンパク質のどこからunfoldingが起こるかを調べた結果が報告された(8)。この場合には、N末端側からunfoldingが起こることが示された。AAA+ ATPaseの基質タンパク質の中にはN末端側に認識部位を持つものとC末端側に認識部位を持つものがあるが、これらはどちらの端からunfoldされるのであろうか？ C末端側からのunfoldingもあるのだろうか？

文献

1. Braun, BC, Glickman, M, Kraft, R, Dahlmann, B, Kloetzel, P-M, Finley, D, and Schmidt, M (1999) *Nature Cell Biol.* 1, 221.
2. Pak, M, Hoskins, JR, Singh, SK, Maurizi, MR, and Wickner, S (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 19316.
3. Wickner, S, Maurizi, MR, and Gottesman, S (1999) *Science* 286, 1888.
4. Shtilerman, M, Lorimer, GH, and Englander, SW (1999) *Science* 284, 822.
5. Weber-Ban, EU, Reid, BG, Miranker, AD, and Horwich, AL (1999) *Nature* 401, 90.
6. Motohashi, K, Watanabe, Y, Yohda, M, and Yoshida, M (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7184.
7. Goloubinoff, P, Mogk, A, Zvi, APB, Tomoyasu, T, and Bukau, B (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13732.
8. Neuwald, AF, Aravind, L, Spouge, JL, and Koonin, EV (1999) *Genome Res.* 9, 27.
9. Huang, S, Ratliff, KS, Schwartz, MP, Spenner, JM, and Matouschek, A (1999) *Nature Struct. Biol.* 6, 1132.

【お断りと宣伝】 このミニレビューは、私どもが開設している「AAAファミリータンパク質」のホームページ (<http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/AAA/aaainfo.html>)

に掲載するために、「AAA+ ATPaseリングはunfoldaseである!？」と題して書いたものを「ぷろておりす」用に改題して加筆したものである。ホームページには、そのミニレビューのほかに、いくつか関連するミニレビューや情報も掲載しています。たとえば、本ミニレビューでは、AAA ATPaseのリング状のオリゴマー構造は unfolding機能に適した構造であることを述べましたが、最近私たちはAAA ATPaseが ATPase活性を示すためにはオリゴマー形成が必要であるという結果を報告し、別のミニレビュー「AAA ATPaseの「分子間触媒モデル」」で解説しております。また、AAA+ ATPaseについての論文（文献8）を解説したミニレビュー「AAA+：シャペロン様ATPaseクラス」も掲載しています。是非、ホームページも併せてご覧ください。

（小椋 光：熊本大学・医学部・細胞複製）

図1. AAA+ ATPaseリングの様々な作用

本文で述べた最近の知見をまとめて示した。Refoldingにおける26SプロテアソームのbaseやClpBの作用機構は必ずしもunfoldingであることが証明されているわけではない。

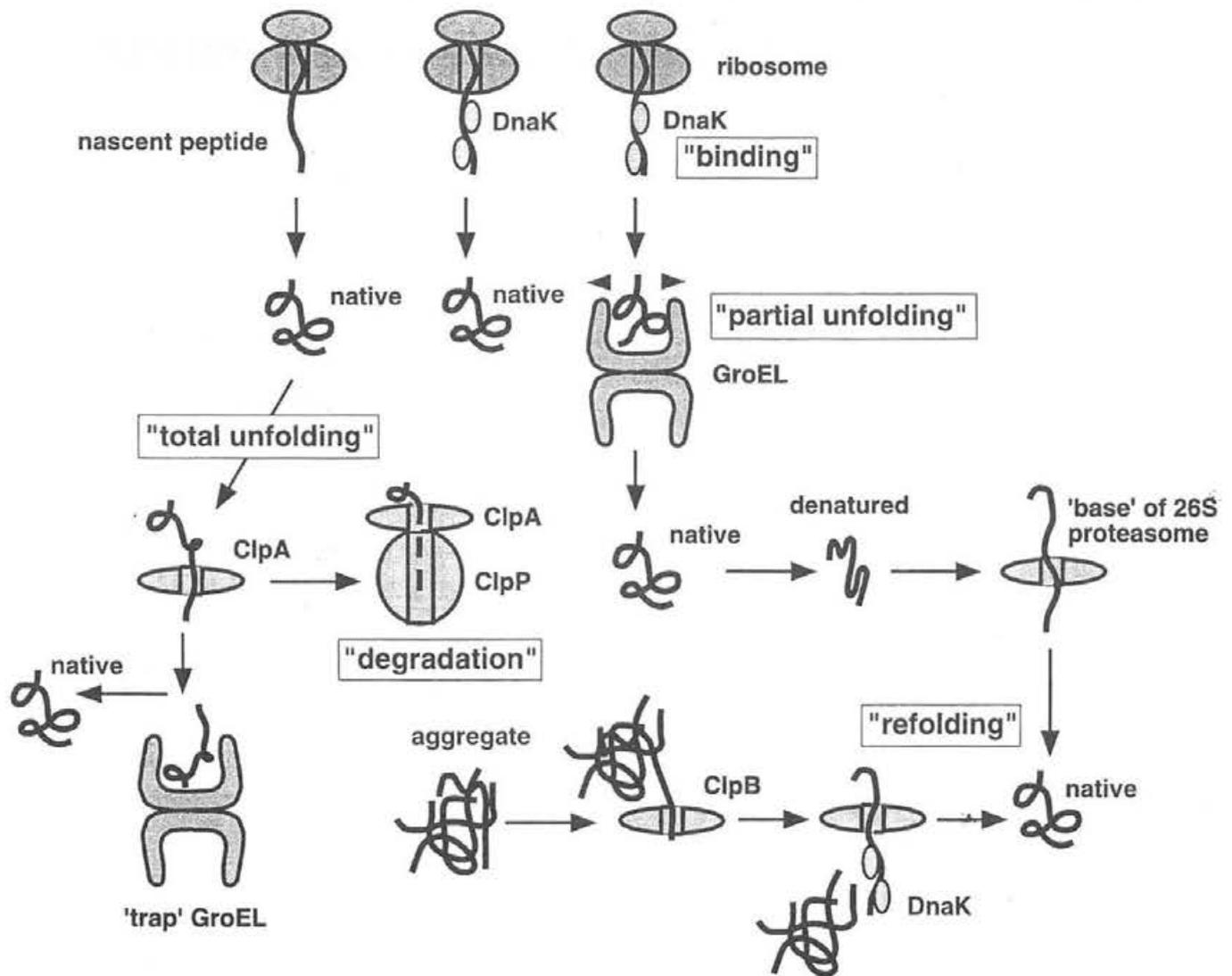
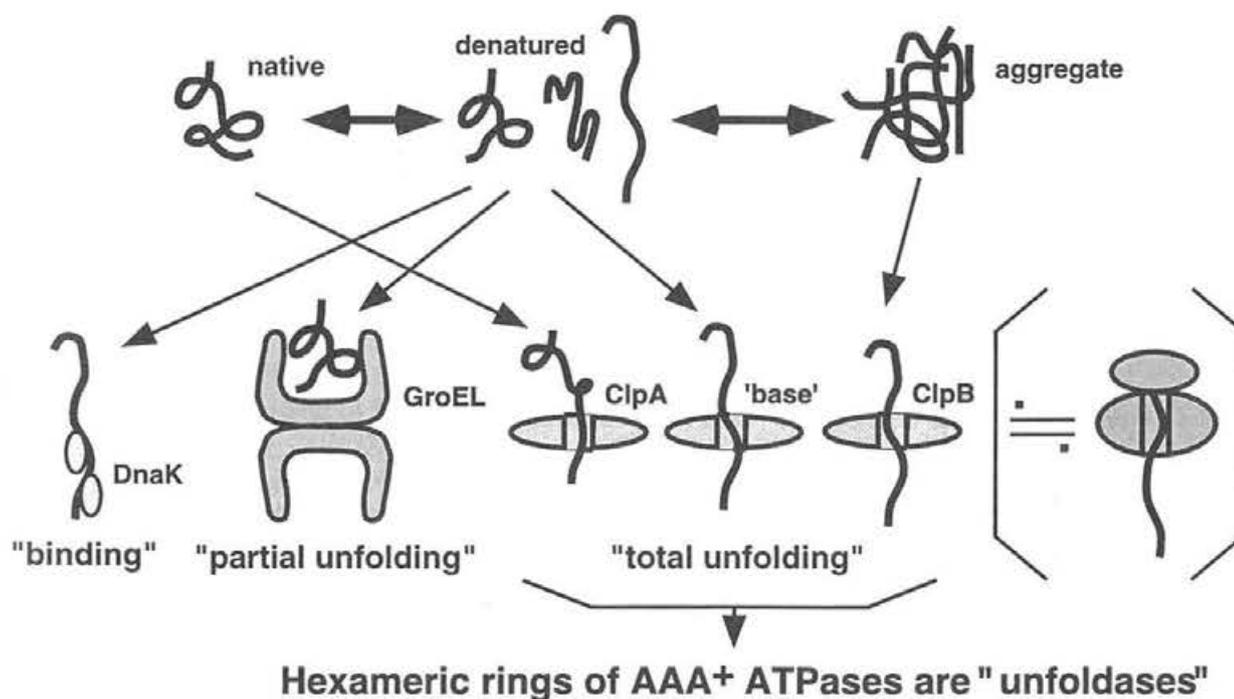


図2. Unfoldaseの作用

図1に示した種々の作用を分類し、基質タンパク質の状態との関係を示した。



- Total unfolding of proteins may be similar to nascent chain elongation.
- AAA⁺ hexamers can potentially access to any states of proteins.

4. 記憶学習機構とプロテアーゼ

はじめに

昨年7月のワークショップ、12月の班会議では、みなさんに記憶・学習全般についてお話することができませんでした。脳の基本機能である“記憶・学習”そしてそれを支える“神経可塑性”は高次脳機能を考える上で必須なことです、わからないことだらけです。今回は、記憶・学習機構全般について、そして、記憶・学習を支える神経可塑性に関与するプロテアーゼをいくつかとりあげ、できるだけ分かりやすく書いてみました。どうかおつきあい下さい。班員のみなさんの知識の糧となれば幸いです。

1) 記憶と学習の分類

我々が感覚器を通して受容する情報は短期記憶あるいは長期記憶として貯えられる。記憶学習機構は、感覚神経細胞のミリ秒以下のチャンネル活動を神経の可塑性(plasticity)を介して何年も貯え、かつ、必要な時に取り出せる形に変換する柔軟かつ巨大な機構である。記憶学習の過程は外界からの様々な感覚情報を獲得するステップ(記銘、acquisition)、その情報を保存しておくステップ(保持、storage)、そして、保存されている情報を読み出すステップ(想起、recall)からなり、いずれのステップが欠けても記憶として成立しない。そして、記憶の第一のステップ、記銘のステップを“学習”とよぶ。想起は、何の手がかりもなしに思い出す“再生”といくつかの中から選びだす“再認”に分けられる。たとえば犯人さがして、「犯人はどんな人でしたか?」と尋ねて思い出させるのは再生、「犯人はこの中にいますか?」と尋ねて写真の中から選ばせるのは再認である。

記憶の分類

陳述記憶と非陳述記憶

我々は日常生活の中で、「富士山は日本で一番高い山である」のような多くの“事実 (fact)” を覚えていく。また、我々は、「昨日の夕食はカレーライスだった」のような日々の“出来事 (episode, event)” をも覚えていく。このような事実や出来事に関する記憶を、言葉で述べることができる記憶、陳述記憶 (declarative memory) と呼ぶ。一方、泳ぎ方やヒモの結び方など言葉で述べることができない“技術” や“行動” についての記憶を非陳述記憶 (non-declarative memory) と呼ぶ。一般的に、陳述記憶は思い出す努力を必要とし、簡単に形成されるが、簡単に失われる。一方、非陳述記憶はくり返しや練習が必要であるが、一旦形成されるとなかなか失われない。数年間自転車に乗らなかったり泳がなかったりしても、“身体が覚えていて” すぐに自転車に乗れたり、泳げたりするのは非陳述記憶のいい例である。

また、自動車教習の初期には意識して様々な操作をする、たとえば、「バックの時のハンドルと方向感覚」や「ローからセコンドに入れるの時の操作」等である。これらの操作をくり返していると、意識しなくてもできるようになる。はじめは陳述記憶であるが、徐々に非陳述記憶となって行く例である。このような例は、日常生活において多く見られる。

長期記憶、短期記憶、ワーキングメモリー

我々は、外界の変化に対応するために、感覚器から得られた外界の情報を“感覚貯蔵” にごく短い間保持するが、これらは1秒以内に消失する。感覚貯蔵の情報のうち、我々が注意を払った情報は“短期記憶” として保持される。短期記憶は、電話帳で調べた番号を電話をかけるまで覚えているような記憶である。短期記憶は一時的で、その容量に限りがあり、そのうえ、保っているにはくり返すこと (リハーサル) が必要である。短期記憶の保持に必要なリハーサルは、情報を短期記憶から消滅させないようにしている“維持リハーサル” と、情報の意味を考えたり、イメー

ジを浮かべながら行う“精緻化リハーサル”に区別される。後者は新しい情報を既存の記憶と結び付けて短期記憶から長期記憶へ転送するのに役立つと考えられる。短期記憶は形成されやすいが簡単に失われてしまう。しかし、何らかの機構により、くり返し唱えていなければならなかった電話番号を忘れなくなる。情報が“長期記憶”に組み込まれたのである。長期記憶は永続性、大容量、リハーサル不要等の性質を持つ。このように、感覚情報が長期記憶に貯えられる機構を“記憶の強化（consolidation）”と呼ぶ。長期記憶には新しいタンパク質の合成（遺伝子の転写・翻訳）が必要であるが、短期記憶にはその必要が無いことでも区別される。脳をコンピューターにたとえると、短期記憶はRAMに、長期記憶はハードディスクに貯えられていると考えるとわかりやすい。

“何種類もの情報”が同時にかつ一時的に保持されることの一般的な言い方として用いられる“ワーキングメモリー（working memory）”には、“作業記憶”“作働記憶”などが訳語として当てられている。ワーキングメモリーに一時的に貯えられる情報には随時獲得される最新の感覚情報だけではなく、過去に獲得された長期記憶から取り出された情報も含まれる。ワーキングメモリーは外界の状況変化やその流れを保持しておく機構で、文章や会話の理解、暗算など様々な活動を正しくかつ円滑に行うための記憶である。ワーキングメモリーは外界の変化に伴って保持されている情報を能動的に消去したり、置き換えたりする機構も含まれる。このように、ワーキングメモリーは思考、推論、学習、理解など我々の高次の精神機能の基礎となる重要な記憶であると考えられる。

学習の分類

陳述記憶は比較的簡単に形成され、簡単に失われてしまう。この型の記憶は脳内のシナプスの小さな修飾によっておこると考えられ、その機構を解明するのは非常に困難である。一方、非陳述記憶は非常に顕著に形成されることに加えて、知覚と運動を結ぶ単純な反射経路にも形成される。非陳述型の“学習”は、ある感覚入

力に反応して運動応答（行動）を獲得する機構である。この非陳述記憶は大きく
“連合学習（associative learning）”と“非連合学習（nonassociative learning）”に分
けられ、様々な動物モデルでの研究が進んでいる。

非連合学習

非連合学習はある一つの刺激に対する応答が時間とともに変化する学習で、
“馴化（habituation）”と“感作（sensitization）”は非連合学習に属する。馴化は、
「刺激Aをくり返し与えることにより、その刺激Aに対する反応が減弱する」とい
う学習で、個体に対する無害な刺激に対する“慣れ”である。たとえば、いきなり
爆竹が爆発するとびっくりする。しかし、その爆発が続くと、その音に馴化して
（慣れて）、最後にはまばたきもしなくなる。すなわち、爆竹の音（刺激A）は危
害のないものとして無意味な反応をしなくなる。

一方、感作は「強い刺激Xにより、別の刺激Yに対する応答が強化される」とい
う学習である。たとえば、馴化の例で、突然爆竹の中の一本がとんできて足にあた
ったとしよう。次の爆竹の音からは驚き・身構えることになる。爆竹で痛い目にあ
うという強い刺激（X）により、爆竹の音という刺激（Y）に対する反応が感作（強化）
されたのである。

馴化は無害な反応に対する過剰な反応・行動を防ぎ、また、感作は外界からの
侵襲刺激に対する防御行動の機構として重要である。これら2つの行動は生物の生
存にとって基本的なもので、脊椎動物を含む高等動物からアメフラシなどの下等動
物まで様々な行動様式の中に保存されている。感作と馴化は海産無脊椎動物アメフ
ラシを用いて行動レベルから分子レベルまで詳細に検討されている（Bailey, 1996）。

連合学習

2つあるいは2つ以上の出来事（刺激）を関連づける連合学習は、古典的条件
付けとオペラント条件付けに、大きく分類される。連合学習は、脊椎動物だけでは

なく、アメフラシやウミウシ等の海産無脊椎動物、さらにはDrosophilaやHoneybeeなどの昆虫を用いて研究されている (Byrne, 1987)。

古典的条件付け

ロシアの生理学者イワン・パブロフ (Ivan Pavlov) により詳細に研究された古典的条件付けは、刺激Aによって引き起こされる応答Rと、通常はその応答Rを引き起こさない刺激Bとを関連づける学習である。刺激Aは訓練なしに (条件付け無しに) 応答を引き起こすので “無条件刺激 (unconditional stimuli, US)” と呼ばれる。パブロフの実験の場合、USは “肉の粉” であり、引き起こされた応答は犬の “だ液量の増加” である。刺激Bは訓練により (条件付けにより) 応答を引き起こすので “条件刺激 (conditional stimuli, CS)” と呼ばれる。パブロフの実験ではCSは “ベルの音” であった。

条件付けの訓練は “肉の粉 (US)” と “ベルの音 (CS)” とをくり返し犬に対提示 (pairing) する。しばらくすると、犬はベルの音 (CS) だけでもだ液を流すようになる。犬は “ベルの音” が “肉の粉” の到来を意味することを学習したのである。CS (ベルの音) に対して学習された応答は “条件応答 (conditioned response, CR)” と呼ばれる

オペラント条件付け

オペラント条件付け (operant conditioning, instrumental conditioning, trial-and-error learning と呼ばれる) では、動物の自発的行動 (反応) に対して reinforcement か punishment が与えられる。reinforcementは反応Aの頻度を増加させる刺激 (えさや砂糖水など) であり、一方punishmentは反応Aの頻度を減少させる刺激 (電気刺激など) である。たとえば、迷路で一つの通路の端に “えさ” を置くと、次の時にその通路に入る頻度が高まる。 “えさ” という reinforcementにより、その通路に入る頻度が増加したのである。この時、えさのかわりに電気ショックを与えると、その通路

に入る頻度が減少する。電気ショックはpunishmentである。古典的条件付けではある刺激（肉）に対する反射反応（だ液量の増加）を観察したが、オペラント条件付けの場合は、みかけ上刺激のない条件下で自発的な行動（operantとよばれる）を観察する。

その他の学習

古典的条件付けやオペラント条件付けあるいは非連合学習にあてはまらない学習も、たくさん知られている。代表的な例は、鳥の鳴き声学習（birdsong learning）やヒトの言語学習で見られる模倣学習（imitation learning）である（赤ちゃんは親の言葉を聞き、まねして覚える）。これらの学習はみかけ上、何の刺激とも対提示されていないので古典的条件付けではなく、ましてや、赤ちゃんの学習途中にえさを与えたり電気ショックを与えたりしないので、オペラント条件付けではない。

2) 健忘症と陳述記憶

病気やケガによる脳の損傷は、健忘症（amnesia）と呼ばれる重篤な記憶の喪失を引き起こす。これらの脳障害が記憶にどのような影響を及ぼすかという研究は、記憶学習機構を知る上で、はかり知れない貢献をしている。健忘症には、脳傷害の時点から新しい記憶を形成できなくなる前行性健忘症（anterograde amnesia）と脳傷害の時点から過去への記憶をなくす逆行性健忘症（retrograde amnesia）の2つがある。前行性健忘は、通常は過去の記憶、たとえば、子供の頃の記憶は正常である。また、通常、逆行性健忘では脳傷害の時点から過去のある時期までの記憶が障害され、過去の全ての記憶が失われることは稀である。

1957年にScovilleとMilnerは、各種の精神神経疾患で側頭葉内側部切除を受けた手術患者10人の健忘症を報告している。その中で最も有名なH.M.はてんかんの発作で薬物治療がきかなくなり、最後の手段として27歳の時に側頭葉内側部の切除手術（lobectomy）を受けた（lobotomyロボトミーは切り離すだけ、lobectomyは切

除である)。手術後、てんかんの頻度は減少し、H.M.の感覚、知能、パーソナリティーその他普段の行動は正常であった。しかし、困ったことに、ひどかったのは前行情健忘症であった。子供の頃の記憶は極めて正常であったが、H.M.は5分前に会った人のことを覚えていられなかった。MilnerはH.M.を40年以上診察しているが、診察のたびごとにH.M.に自己紹介しなければならないという。

H.M.は子供の頃のことは思い出せたことから、手術以前に形成された記憶及びその想起の機構は正常である。さらに、短期記憶も正常であり、くり返していれば、6桁までの数字を覚えることができた(我々はくり返していれば5~10桁までを問題なく記憶することができる。電話番号がこの範囲にあるのは意味がある)。しかし、一旦くり返すのをやめたり注意が他に向けられると、その数字を覚えていないどころか、H.M.は何をしていたかさ覚えていない。すなわち、陳述性の短期記憶を長期記憶に変換する能力が欠如していた。しかし、彼の運動学習を伴うような非陳述記憶を形成する能力は正常であった。

H.M.が切除手術で失った部分は、主に扁桃核と海馬を含んでいた。この領域へは大脳皮質で高度に処理された感覚情報が供給されることが知られている。さらに、海馬ではLTP(長期増強、long-term potentiation)、LTD(長期抑圧、long-term depression)が神経可塑性として観察されており、これらの神経可塑性と学習との直接の関連が注目されている。H.M.の例から明らかなように、海馬を含む側頭葉内側部は長期記憶を貯えておく場所ではなく、それを取り出してくる(想起する)のに必要な場所でもなかった。その他の健忘症のケースからも、この領域は短期記憶を長期記憶に変換する機構に重要な役割りをしていると考えられる。

3) 小脳と非陳述記憶

各筋肉への運動の命令自体は大脳から発せられるが、その筋肉の協調性や細かい調節を司るのが小脳である。運動学習は、運動の手順を覚える“手続き学習”と、運動の手順を滑らかに、素早く、かつ正確に行うような“スキル学習”とに分けら

れる。手続き学習は大脳基底核や大脳皮質が、スキル学習は主に小脳が担当している (Ito, 1989)。Gordon Holmesは第一次世界大戦の時に銃弾で小脳に損傷を負った兵士達について報告しており、小脳損傷は随意運動自体が失われる運動麻痺、運動喪失 (paralysis) を引き起こさないが、眼球の動きの異常や統制のとれない四肢の運動など各種の運動失調 (ataxia) を引き起こすことを報告している。小脳失調症に近い症状は、アルコールを飲み過ぎた時に見られる千鳥足の人で容易に観察することができる。

小脳は、非陳述記憶に属する運動学習というヒトの基本的な行動に大切な役割を果たすにも関わらず、記憶学習機構においては忘れられがちな存在である。小脳の神経可塑性は、長期抑圧 (LTD) と呼ばれる神経活動依存的な伝達効率の低下である。小脳LTDは東京大学の伊藤正男により発見された日本オリジナルの神経可塑性である (Ito, 1989)。

さて、小脳の関与する学習の代表的なモデルに、前庭動眼反射順応 (Vestibulo-ocular reflex adaptation) がある。前庭動眼反射は簡単に観察することができる。目の前で手を左右あるいは上下に振ると、手は“ぶれて”見える。次に、手をみながら頭を左右あるいは上下に振ると、目が頭とは反対の方向に振られ、手は“ぶれない”で見える。これは、内耳にある前庭器官が頭の動きを感知して、反対方向に眼球を動かす反射機構が働くのである。そのため、頭を振っても外界の像がぶれずに見える。この前庭動眼反射は非常に順応性 (学習性) に富み、上下あるいは左右が反対に見える逆転プリズムをかけても、次第に慣れて頭の動きと反対に動いていた眼球が頭と同じ方向に触れるように順応 (学習) し、様々な行動を間違えずにできるようになる。

4) 記憶学習機構とプロテアーゼ

様々な細胞内情報伝達機構に関与する分子群が記憶学習機構に関与することが示されてきたが、その分子機構においてあまり大きな進展が見られていない領域は

以下のとおりである。： 1. 長期記憶に関与する分子機構の解析。 2. 神経可塑性に必須であるCREBなどの転写因子群により活性化あるいは不活性される遺伝子群の同定。 3. 神経細胞外で神経可塑性に関与する分子群の同定。 4. 神経可塑性に伴ったシナプスあるいは神経細胞の形態変化に関与する分子群の解析。 5. 神経可塑性に伴う細胞内でのエネルギーあるいはその他の基礎代謝変化に関与する分子群の解析。いずれも非常に扱いにくい課題ではあるが、少しずつその解決への努力が始まっている。例えば、DNA microarrayの利用により短期のあるいは長期の神経可塑性に伴う数千の遺伝子発現の変化を容易に観察できるようになり、細胞外分子群の特異的同定のためにsignal sequence trap (SST) 法が考案され (Tashiro, 1999)、また、神経活動に伴った神経細胞の形態変化についても様々な手法を用いた報告が相次いでいる (Agnihotri, 1998; Engert and Bonhoeffer, 1999; Toni, 1999; Trommald, 1999)。さらに、解像度の点ではまだ難はあるが、fMRI (functional Magnetic Resonance Imaging) 等の利用により脳の各部位で神経活動に依存した代謝変化を解析することが可能となった。筆者らも、SST法を用いて小脳に存在する細胞外分子群の遺伝子の同定を終え、神経可塑性に伴うこれらの遺伝子群の挙動をDNA microarrayを用いて解析中である (遠藤、池田、糸原、伊藤、未発表)。このような記憶に関与する様々な分子が同定される中で、少し取り残された感のあるプロテアーゼの神経可塑性への関与について述べ、この文章の締めくくりとしたい。

a) カルパインと神経可塑性

神経可塑性への関与が示唆された最初のプロテアーゼは、1980年代の中頃にG.Lynchらにより海馬のLTPへの関与が示唆されたカルパインであろう (Lynch and Baudry, 1984,)。時あたかもLTPの分子機構が様々な角度から研究されはじめた頃である。神経可塑性において、 Ca^{2+} は神経活動依存性を反映する存在、すなわち、どのシナプスの神経伝達が制御されるのかという神経可塑性の特異性を決定するための重要な因子であると考えられている。海馬LTPにおけるカルパインの作用は次

のように考えられている。神経活動依存的にpostsynapseに流入したCa²⁺はカルパインを活性化する。活性化されたカルパインはPKCを限定分解し、constitutively activeなPKCを生成する。PKCはLTPの惹起に必須である事が示されており(総説、Muller et al, 1991; Angenstein and Staak, 1997)、このようにしてPKCが永続的に活性化されることがLTPに必要であろうと考えられている。実際、(Sessoms, et al, 1992)カルパイン阻害剤がLTPを阻害することや (Denny et al, 1990; Lovinger et al, 1987)、カルパスタチンノックアウトマウスにおけるLTPの亢進が観察されている (Muller et al, 1995)。しかし、カルパイン/カルパスタチンのバランスをくずしてカルパインの活性を亢進させたラットでは空間学習の能力が低下することから (Toth et al, 1996)、恒常的な高カルパイン活性は神経可塑性に必ずしも有利には働かず、必要な時に必要なだけ必要な場所でカルパインが活性化されることが神経可塑性に必須であると考えられる。さらに、カルパインは細胞骨格を構成するタンパク質をも基質とすることから (総説、Chan and Mattson, 1999)、神経活動に伴い細胞内に流入したCa²⁺依存性のシナプスの形態変化とも密接に関わっている可能性が考えられる。

b) tPAと神経可塑性

次に関与が示唆されたプロテアーゼはtPA (tissue-type plasminogen activator) である。海馬LTPには少なくとも2つの相 (early-phase LTP (E-LTP) とlate-phase LTP (L-LTP)) が存在し、L-LTPには新しいタンパク質の合成、すなわち、遺伝子の転写翻訳が必要である事が知られている。この特徴は先に述べた長期記憶の性質と一致していることから、L-LTPは長期記憶を支える機構のモデルとして考えられている (総説、Shuman, 1997)。

LTP、seizure、kindling等の神経活動によって誘導される最初期遺伝子 (immediate early gene, IEG) として同定されたtPAは、脳全体に発現しているが (Qian et al, 1993)、その活性は内在性の阻害タンパク質や細胞表面の受容体LRP (low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein) により巧みに制御されている (Bu et al, 1994; Orth et al,

1992)。tPAの合成はcAMP-PKAを介した経路によって増加し (Baranes et al., 1998)、また、神経活動によりLTPのpostsynaptic細胞にあたる海馬の錐体細胞 (pyramidal cell) においてtPAのmRNAの発現が増加することが観察されている (Qian, 1993)。tPA遺伝子欠損マウスではE-LTPはほとんど影響を受けないが、転写-翻訳依存性のL-LTPのみが著しく減少していることが観察された (Carmeliet et al., 1994; Frey et al., 1996; Huang et al., 1996)。一方、tPAをoverexpressionさせたマウスでは、LTPの増強作用、さらに、空間学習の向上が報告された (Madani, et al, 1999)。これらの事から、tPAはL-LTPを介して長期記憶の形成に重要な役割を果たすと考えられている。tPAはどのようにL-LTPに寄与しているのだろうか？ 現在、少なくとも以下の2つの可能性が考えられている。

1. tPAが神経組織の再構築に関与する。LTPを引き起こす神経活動依存的にtPAが分泌されることが示されており (Guarandis, et al, 1996)、さらに、tPAがCAMの細胞外ドメインにある配列を含むMCA基質を非常によく分解すること、セリンプロテアーゼの阻害剤によってL-LTPが阻害されることが示されている (Hoffman et al, 1998a, 1998b)。細胞外マトリックスの構築を制御するMMP類活性化の第一段階に各種のセリンプロテアーゼが関与することが示され、tPAにより活性化されるplasminもその一つである (総説、岡本ら1999)。また、tPA自身あるいはtPA-plasmin系を介して活性化されたMMP類による細胞接着分子 (CAM, cell adhesion molecule) 分解や細胞外マトリックス分解を含む神経細胞周囲の環境変化は、シナプス形成やシナプスの形態変化を促進し神経可塑性に大きな影響を与えたと考えられる。

2. 細胞表面上に存在するLRP (low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein) のligandとして働くことで細胞内信号伝達系に関与する。LRPが中枢神経系に高度に発現していることが知られていたが、その機能は全く不明であった。LRPはapoE、lipoprotein、APP、 α 2-macroglobulinなどを含む10種類ほどのタンパク質をligandとする事が明らかにされ (Krieger and Herts, 1994)、最近、tPAもLRPのligandである事が示された (Zhuo et al, 2000)。LRPの特異的なantagonistであるRAP

(receptor-associated protein、RAPはLRPの folding時に chaperoneとして働くと考えられている)がtPAの結合を阻害し、さらに、RAPはL-LTPも阻害した (Zhuo et al., 2000)。tPA-LRP系はthrombin-protease-activated receptor (PAR)と同様の機構を介している可能性もあるが詳細は不明である (総説、Coughlin, 1999)。tPA投与によりPKA (cAMP-dependent protein kinase)が活性化されることから、tPAはLRP結合後G-proteinを介した信号伝達系を活性化していると考えられる (Zhou et al, 2000)。PKA活性化により、さらなるtPAの転写翻訳が増加する可能性も指摘されている (Baranes et al., 1998)。PKA活性の長期的維持がgatingの機構としてL-LTPに必須であることが示唆されており (Iyenger, 1996; Blitzler et al, 1998)、tPAによるPKA活性化とそのL-LTPにおける役割が注目されている。

c) アメフラシの神経可塑性とプロテアーゼ

アメフラシのエラやサイホンの引き込み反射の感作は、数分間持続する短期感作と数週間持続する長期感作に分けられる (Byrne, 1987)。長期感作では、知覚神経細胞-運動神経細胞間で神経伝達の長期促進 (long-term facilitation) が起こる (Bailey et al, 1996)。また、転写・翻訳阻害剤を用いると、短期感作への影響なしに長期感作のみが影響を受けることから、長期感作には遺伝子の転写翻訳が必要であることが明らかとなっている (Castellucci, et al, 1989)。

アメフラシの長期感作に伴って、知覚神経細胞の形態が著しく変化する (Bailey et al, 1983;1988;1993; Cleary, 1998)。知覚神経細胞の神経繊維の枝別れやバリコシティー (varicosity、シナプス様構造)が増加し、知覚神経細胞の標的細胞である運動神経細胞への接点が増加する可能性も示唆され、記憶学習の機構に、一般組織細胞の分化成長と類似の機構が働いていることが考えられる (Marcus et al. 1994)。

長期感作に伴う知覚神経細胞の顕著な形態変化には分化成長に関わる遺伝子の関与が考えられる (Marcus et al, 1994)。apTBL-1 (Liu, et al, 1997)は長期感作に伴い発現し、金属プロテアーゼドメインを持つ。apTBL-1と類似の構造を持った分子

は他の動物でも同定されており、例えば、ショウジョウバエのtolloidは体軸形成に、哺乳類のBMP-1 (bone morphogenetic protein-1) は骨の形成や成長に関与している。さらに、これらの分子は成長因子TGF- β (transforming growth factor- β) スーパーファミリーに属するタンパク質を介して、各種遺伝子の転写を制御している (Massague, 1998)。組織中の不活性な前駆体TGF- β 類はapTBL-1のようなプロテアーゼにより活性化されるのかも知れない。TGF- β はアメフラシの知覚神経細胞-運動神経細胞間の神経伝達を促進し (Zhang, et al. 1997)、TGF- β 投与後数時間以内の伝達効率増強は引き起こさないが、24時間、48時間の促進を引き起こした。さらに、生理的な神経調節分子として神経伝達を促進するセロトニンにより引き起こされるシナプス伝達効率の増強がTGF- β の阻害剤により完全に阻害されることから、セロトニンによるシナプス伝達の長期増強作用はTGF- β を介していることが示唆された (Zhang, et al. 1997)。これらの結果は、アメフラシのシナプスの長期増強作用には体細胞の分化成長に類似した機構が関与することを示しており、TGF- β による転写因子SMADを介した遺伝子の発現制御と知覚神経細胞の形態変化との関連について、今後の研究が注目される。また、班会議で報告したように、アメフラシのMMP活性がTGF- β やセロトニンにより増加することが観察された。このことは、セロトニン-TGF- β -SMADの下流でMMPの転写翻訳が制御され、長期感作に伴いMMPによる細胞外マトリックスの再構築が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

長期感作には新しい遺伝子の転写・翻訳が必要であることから、アメフラシ感作に伴いその発現量が増加するようなmRNA分子群の同定も行われた。そのようなmRNA分子がコードする蛋白質の中には、細胞内主要タンパク分解系であるユビキチン-プロテアソーム系に属する脱ユビキチン化酵素 (Ap-Uch) があり、この酵素が知覚神経細胞-運動神経細胞間の神経伝達の促進に必須であることが示された (Hegde, et al. 1997)。Ap-Uchに対する抗体やAp-Uchのアンチセンスオリゴヌクレオチドを知覚神経細胞に注入しておくことで、セロトニンによる知覚神経細胞-運動神経細胞間の神経伝達の長期促進のみが阻害され、短期促進は影響を受けなかった。

Ap-Uchはタンパク分解酵素プロテアソームと結合してタンパク質の分解を促進するが、Ap-Uchの結合により活性化されるプロテアソームの内在性基質として、PKAの制御サブユニット (regulatory subunit, R subunit) が考えられる。長期感作に伴い知覚神経細胞内で制御サブユニットが長期的に減少することで (Bergold, et al. 1992) PKAが長期的に活性化され、知覚神経細胞-運動神経細胞間の神経伝達の促進に寄与していると考えられる (Chain, et al. 1995)。これらのことから、Ap-Uchの役割はセロトニン依存的にPKA制御サブユニット分解を促進する細胞内機構であると考えられる (Hegde, et al., 1997)。長期促進にはPKA-CREB系が関与しており、PKAの活性が持続することで転写翻訳が制御されて、神経可塑性では長期促進が、そして、行動面では長期感作が引き起こされると考えられる (Milner et al., 1998)。

おわりに

過去数十年間の記憶学習機構の研究では、心理学や生理学が大きな成果をあげてきた。近年の分子生物学の著しい進歩により分子レベルでの記憶学習機構の研究そして神経可塑性の研究が可能となり、様々な分子の関与が示唆されてきた(総説、Milner et al, 1999—この数十年間の記憶学習機構研究が要領よくまとめられています。記憶学習や神経可塑性に少しでも興味のある方に、お勧めいたします)。あまり関わりがないと思われてきたプロテアーゼも神経可塑性に関与する事が示唆され、tPA、calpain、ubiquitin-proteasome、BMP1-tolloidが神経可塑性に関与するとの報告がなされた。これらのプロテアーゼ類は、神経可塑性以外の様々な系でも不可欠な役割を果たしているものばかりである。他の系で得られているこれらのプロテアーゼの解析手法が神経可塑性に関与するプロテアーゼの生理的役割の解析に大きく寄与する事を期待したい。

記憶学習機構の心理学レベルから分子レベルの話まで、長い間おつきあい頂きありがとうございます。御質問、御意見等ございましたらぜひお聞かせ下さい。

文献

- Angenstein F and Staak S (1997) Receptor-mediated activation of protein kinase C in hippocampal long-term potentiation: facts, problems and implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21,427-454.
- Agnihotri N, Lopez-Garcia JC, Hawkins RD, Arancio O (1998) Morphological changes associated with long-term potentiation. *Histol Histopathol* 13, 1155-1162.
- Bailey CH, and Chen M (1983) Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science* 220, 91-93.
- Bailey CH, and Chen M (1988) Long-term sensitization in *Aplysia* increases the number of presynaptic contacts onto the identified gill motor neuron L7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9356-9359.
- Bailey CH and Kandel ER (1993) Structural Changes Accompanying Memory Storage *Annu. Rev. Physiol.* 55, 397-426.
- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93,13445-13452.
- Baranes, D, Lederfein, D, Huang, YY, Chen, M, Bailey, CH, Kandel, ER (1998) Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813-825.
- Bergold PJ, Beushausen SA, Sacktor TC, Cheley S, Bayley H, Schwartz JH (1992) A regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase down-regulated in *Aplysia* sensory neurons during long-term sensitization. *Neuron* 8, 387-397.
- Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM (1998) Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 280, 1940-1942.
- Byrne, JH (1987) Cellular analysis of associative learning. *Physiol. Rev.* 67, 329-439.
- Bu, G, Maksymovitch, EA, Nerbonne, JM, Schwartz, AL (1994) Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J. Biol. Chem.* 269, 18521-18528.
- Carmeliet, P, Schoonjans, L, Kjecken, L, Ream, B, Degan, J, Bronson, R, DeVos, R, Van den Oord, JJ, Collen, D, and Mulligan RC (1994) Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368, 419-424.
- Castellucci VF, Blumenfeld H, Goelet P, Kandel ER (1989) Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurobiol* 20,1-9.
- Chan, S.L., and Mattson, M.P. (1999) Caspase and calpain substrate: Roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res.* 58, 167-190.
- Chain DG, Hegde AN, Yamamoto N, Liu-Marsh B, Schwartz JH (1995) Persistent activation of cAMP-dependent protein kinase by regulated proteolysis suggests a neuron-specific

- function of the ubiquitin system in Aplysia. *J Neurosci* 15, 7592-7603.
- Chain DG, Casadio A, Schacher S, Hegde AN, Valbrun M, Yamamoto N, Goldberg AL, Bartsch D, Kandel ER, Schwartz JH (1999) Mechanisms for generating the autonomous cAMP-dependent protein kinase required for long-term facilitation in Aplysia. *Neuron* 22,147-156
- Cleary LJ, Lee WL, Byrne JH (1998) Cellular correlates of long-term sensitization in Aplysia. *J Neurosci* 18, 5988-5998.
- Coughlin SR (1999) How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96,11023-11027.
- Denny JB, Polan-Curtain J, Ghuman A, Wayner MJ, Armstrong DL (1990) Calpain inhibitors block long-term potentiation. *Brain Res.* 534, 317-320.
- Engert F, Bonhoeffer T(1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.
- Frey, U, Muller, M, Kuhl, D (1996) A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J. Neurosci.* 16, 2057-2063.
- Guarandis, A, Jones, TE, Strickland, S, Tsirka, SE (1996) Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J. Neurosci.* 16, 2220-2225.
- Hegde AN, Inokuchi K, Pei W, Casadio A, Ghirardi M, Chain DG, Martin KC, Kandel ER (1997) Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell* 89, 115-126.
- Hoffman KB, Martinez J, and Lynch G (1998a) Proteolysis of cell adhesion molecules by serine proteases: a role in long term potentiation? *Brain Res.* 811, 29-33.
- Hoffman KB, Larson J, Bahr BA, Lynch G (1998b) Activation of NMDA receptors stimulates extracellular proteolysis of cell adhesion molecules in hippocampus. *Brain Res.* 811, 152-155.
- Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan R, Collen D, Carmeliet P (1996) Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8699-8704.
- Ito M (1989) Long-term depression. *Annu. Rev. Neurosci.* 12, 85-102.
- Iyengar R (1996) Gating by cyclic AMP: expanded role for an old signaling pathway. *Science* 271, 461-463.
- Krieger, M, and Hertz, J (1994) Structure and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* 63, 601-637.
- Liu QR, Hattar S, Endo S, MacPhee K, Zhang H, Cleary LJ, Byrne JH, Eskin A (1997) A developmental gene (Tolloid/BMP-1) is regulated in Aplysia neurons by treatments that

- induce long-term sensitization. *J Neurosci* 17, 755-764.
- Lovinger DM, Wong KL, Murakami K, Routtenberg AC (1987) Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 436, 177-183.
- Lynch G and Baudry M (1984) The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* 224, 1057-1063.
- Madani, R, Hulo, S, Toni, N, Madani, H, Steimer, T, Muller, D, and Vassalli, JD (1999) Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18, 3007-3012.
- Marcus EA, Emptage NJ, Marois R, Carew TJ (1994) A comparison of the mechanistic relationships between development and learning in *Aplysia*. *Prog Brain Res* 100, 179-188.
- Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20,445-468.
- Muller D, Buchs PA, Stoppini L, Boddeke H (1991) Long-term potentiation, protein kinase C, and glutamate receptors. *Mol Neurobiol* 5, 277-288.
- Muller D, Molinari I, Soldati L, Bianchi G (1995) A genetic deficiency in calpastatin and isovaleryl carnitine treatment is associated with enhanced hippocampal long-term potentiation. *Synapse* 19,37-45.
- Orth K, Madison EL, Gething MJ, Sambrook JF, Herz J (1992) Complexes of tissue-type plasminogen activator and its serpin inhibitor plasminogen-activator inhibitor type 1 are internalized by means of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7422-7426.
- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361, 453-457.
- Sessoms JS, Chen SJ, Chetkovich DM, Powell CM, Roberson ED, Sweatt JD, Klann (1992) Ca^{2+} -induced persistent protein kinase C activation in rat hippocampal homogenates. *Adv. Second Messengers Phosphoproteins Res.* 14, 109-126.
- Shuman, EM (1997) Synaptic specificity and long-term information storage. *Neuron* 18, 339-342.
- Tashiro K, Nakamura T, Honjo T (1999) The signal sequence trap method. *Methods Enzymol* 303, 479-495.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402, 421-425.
- Toth E, Bruin JP, Heinsbroek RP, Joosten RN (1996) Spatial learning and memory in calpastatin-deficient rats. *Neurobiol. Learn Mem.* 66, 230-235.
- Trommald M, Hulleberg G, Andersen P (1996) Long-term potentiation is associated with new

excitatory spine synapses on rat dentate granule cells. *Learn Mem* 3, 218-228.

Zhang F, Endo S, Cleary LJ, Eskin A, Byrne JH (1997) Role of transforming growth factor-beta in long-term synaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 275,1318-1320.

Zhuo, M, Holtzman, DM, and Li, Y, Osaka, H, DeMaro, J, Jacquin, M, and Bu, G (2000) Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 20, 542-549.

岡本竜哉、赤池孝章、前田浩 (1999) マトリックスプロテアーゼ (MMP) の活性化機構. *生化学*, 71, 1387-1401.

遠藤昌吾 (理化学研究所脳科学総合研究センター・記憶学習機構研究チーム)

5. 哺乳類RAD23ホモログの多様な機能

はじめに

遺伝情報を担うDNAは化学的反応性に富み、活性酸素に代表される内的因子、あるいは放射線や化学物質等の外的因子によって絶え間なく傷つけられている。DNA損傷は、DNA複製や転写をブロックすることで細胞の死や機能異常をもたらす可能性があるほか、突然変異を誘発することにより長期的には発がんや老化の原因ともなりうる。従って、ゲノム中に生じた有害なDNA損傷を見つけだして速やかに取り除く、いわゆるDNA修復の機構は生物にとって大変重要である。

一口にDNA損傷と言っても、塩基の酸化やアルキル化といった比較的小さな構造変化から、近隣の塩基間に生じる架橋やDNA鎖の切断に至るまで、その種類は非常に多岐にわたっている。このように多様なDNA損傷に対応するため、生物は様々なDNA修復機構を進化の過程で獲得してきている。なかでもヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) は、紫外線によって生じるピリミジン二量体をはじめとする広範なDNA損傷を取り除くことができる重要なDNA修復経路の一つである。特にヒトではNERに欠損を持つ遺伝性疾患がいくつか知られているが、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) はその代表的なもので、皮膚の日光に露出した部分でがんを含む様々な病変が見られる。筆者らの研究室では、XPの遺伝的相補性群

のうちC群で欠損しているDNA修復因子について研究を進めてきているが、これはXP-C群の患者で実際に変異を起こしているXPC遺伝子産物と、出芽酵母RAD23に相同な哺乳類ホモログの一つであるHR23B蛋白質 (Homolog of RAD23) の複合体である¹⁾。哺乳類にはもう一つのRAD23相同遺伝子としてHR23Aが発現しているが、最近の研究から酵母のRAD23、およびその哺乳類ホモログがユビキチン-プロテアソームを介した蛋白分解系と相互作用することが明らかになってきた。本稿ではRAD23ホモログの機能についてこれまでに得られている知見を紹介すると共に、蛋白分解系との関連を議論してみたい。

1. RAD23ホモログの構造とNERにおける役割

酵母のRAD23遺伝子、および二つの哺乳類RAD23ホモログのドメイン構造を図1に示す。いずれもN末端にユビキチンと相同性の高い領域を持つのが特徴で、この部分のユビキチンとのアミノ酸配列の同一性は25-31%、類似性は55-59%にのぼる¹⁾。ただし、ユビキチンのC末端で他の蛋白質とイソペプチド結合を形成する際に必要なグリシン残基は保存されておらず、RAD23やそのホモログのN末端部分が切断されて他の蛋白質に転移する可能性は低いと考えられる。また、マルチユビキチン化の際にイソペプチド結合を形成するユビキチンの48番目のリジン残基はRAD23およびそのホモログでもすべて保存されているが(図2)、この部位で実際にユビキチンやその類似蛋白質と結合するかどうかは、現時点では明らかになっていない。酵母のRAD23破壊株は紫外線に対して比較的穏やかな感受性を示すが、N末端のユビキチン相同配列を欠失した変異RAD23遺伝子は紫外線感受性を相補できなくなることから、この領域がRAD23の機能に重要な役割を果たしていると考えられる²⁾。RAD23とその哺乳類ホモログの一次構造上のもう一つの特徴は、いわゆるUBAドメイン (ubiquitin-associated domain)³⁾と呼ばれるモチーフが2コピーずつ存在することである。UBAドメインは、一部のユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) や脱ユビキチン化酵素に存在することからこの名がつけられて

おり、ユビキチン代謝と何らかの関係があるものと推測されている。しかしながら、すべてのE2、E3、脱ユビキチン化酵素にこのモチーフが存在するわけではなく、その具体的な機能は不明である。

損傷を与えたプラスミドDNAを基質としてNER反応を試験管内で再現する無細胞系が確立されているが、この系でXPC-HR23B複合体は最初のDNA損傷認識と修復反応の開始を行なう必要不可欠な因子である⁴⁾。細胞内においてXPCはHR23Bと定量的に複合体を形成しているが、HR23BはXPCに対して大過剰に発現しており、大部分はXPCフリーの状態で存在している。HR23Bの種々の欠失変異体を用いた結合実験から、XPCとの結合領域が二つのUBAドメインには含まれた領域にマップされているが、この領域のアミノ酸配列はHR23Aでもよく保存されている(図1)⁵⁾。実際、組換え蛋白質を用いた限りではHR23AもHR23Bと同程度の親和性でXPCと結合できるが、細胞抽出液から精製されたXPC蛋白質画分にはHR23Aはほとんど含まれていない。二つのRAD23ホモログの蛋白質発現レベルには顕著な差が見られないことから、細胞内ではXPCがHR23Bと選択的に結合する何らかのメカニズムが存在すると考えられる。無細胞NER反応系において組換えXPC蛋白質は単独ではほとんど不活性で、HR23Bと複合体を形成することによってはじめて活性を発揮する。この系でHR23Aも同様にXPC促進活性を示すことから、二つのRAD23ホモログ間で(少なくとも潜在的には)機能的互換性があるものと考えられた⁶⁾。興味深いことに、無細胞NER系でのXPC促進活性にはRAD23ホモログのXPC結合領域が必要かつ十分である⁵⁾。このことは、酵母RAD23のユビキチン相同領域が紫外線感受性の相補に必要であることと一見矛盾するが、ユビキチン相同領域やUBAドメインはNER反応のコア部分には必要ではなく、無細胞系ではこれらの領域が関与した機能が反映されていないのかも知れない。

2. RAD23ホモログとプロテアソームとの相互作用

上述のように、哺乳類のRAD23ホモログがユビキチンとの関連を示唆する一

次構造上のモチーフを含むことや、大部分がXPCと結合しない状態で存在することから、NER以外の別の生物機能にも関与している可能性が考えられた。そこで我々は、酵母の2ハイブリッド系を用いてHR23Bと相互作用する因子のスクリーニングを行なった。その結果、プロテアソームの19S制御複合体のサブユニットの一つで、マルチユビキチン鎖結合活性を持つことで知られるS5a蛋白質が同定された⁷⁾。細胞抽出液をグリセロール密度勾配遠心で分画したり、プロテアソーム・サブユニットに対する抗体で免疫沈降することにより、HR23AとHR23Bのいずれも、少なくとも一部は細胞内で実際にプロテアソームと結合していることが示唆された。そこで、HR23BとS5aそれぞれにおける結合領域を決定するために大腸菌で種々の欠失蛋白質を作成し、試験管内での結合実験を行なった。その結果、HR23BについてはN末端のユビキチン相同領域がS5aとの結合に必要な十分であった。S5aはマルチユビキチン鎖に親和性を示すが、ユビキチンの単量体にはほとんど結合しないことが報告されている。実際、HR23BのN末端部分をユビキチンそのもので置き換えたキメラ蛋白質は、S5aに対してほとんど親和性を示さなかった。すなわち、N末端のユビキチン相同領域はユビキチンとは明らかに異なる機能を果たしており、見方を変えると単量体でS5aと結合できるようにユビキチンが変化したものにとらえることができる。酵母のRAD23についても、N末端のユビキチン相同領域が26Sプロテアソームと相互作用することが示されており⁸⁾、この相互作用が進化の過程で保存されてきたことを示している。しかしながら、酵母RAD23はN末端をユビキチンそのもので置き換えても正常に機能することが報告されている²⁾。

一方、S5a側については、以前に同定されたマルチユビキチン鎖結合領域⁹⁾と重複する形で、HR23B結合領域がマップされた。このことはRAD23ホモログが、ユビキチン化された分解基質蛋白質とS5aとの結合に対して拮抗的に作用する可能性を示唆する。そこで我々は次に、無細胞蛋白分解反応に対するRAD23ホモログの効果について検討した。ウサギ網状赤血球の抽出液にリゾチームなどの基質蛋白質を加えると、ユビキチン化を介してプロテアソームにより分解されることが知られて

いるが、この系に組換えS5a蛋白質を添加すると分解反応が阻害される。これは、外から添加したS5aがマルチユビキチン鎖と結合することによって、26Sプロテアソーム中のS5aとの相互作用をブロックした結果であると解釈される。興味深いことに、この系にHR23B蛋白質を加えると、やはり同様に蛋白分解の阻害が見られた⁷⁾。この阻害は、HR23BのN末端のユビキチン相同領域がプロテアソーム中のS5aに結合してブロックすることにより、マルチユビキチン化された分解基質がプロテアソームに結合できなくなったためであると考えられる(図3)。これまでマルチユビキチン化の前提となるリン酸化などの修飾段階で蛋白分解が制御を受ける例は数多く知られているが、RAD23ホモログはマルチユビキチン化が起こった後の段階で分解そのものを制御できる可能性を持っているわけである。上述の無細胞蛋白分解系は人工的なものであり、RAD23ホモログが実際に細胞内で何らかの蛋白質の分解制御に関わっているかどうかは現時点ではわかっていないが、ユビキチン-プロテアソームを介した蛋白分解系における新しいタイプの制御因子である可能性を秘めている。

3. 哺乳類RAD23ホモログの多機能性

HR23AがNERにおいてHR23Bの機能を代替し得るかどうか確かめることを主な目的として、筆者らはオランダ、エラスムス大学のJan H. J. Hocijmakers教授らのグループと共同で、それぞれのRAD23ホモログについて遺伝子ターゲティングによるノックアウトマウスの作成を進めてきた(投稿準備中)。HR23A遺伝子欠損マウスは、見かけ上まったく正常で、特に表現型を示さない。それに対して、HR23B遺伝子欠損マウスは胎仔期の後期から出生前後にかけて大部分が死亡し、メンデル則からの期待値の10%程度の頻度でしか得られなかった。また、生存した個体についても、顕著な成長遅延や口蓋裂などの発生過程の異常が観察された。さらにHR23Bを欠損した雄マウスでは、成長後も精子形成細胞の分化が見られず、完全な不妊となることがわかった(因みに、雌マウスは妊娠可能である)。これ以外にも実に様々

な異常が見つかっており、その詳細は本稿では省略するが、これらの表現型はXPC遺伝子欠損マウスやNER機能を完全に欠いたXPA遺伝子欠損マウスではほとんど見られないことから、HR23BがNER以外にも個体の正常な発生、分化、成長過程に重要な機能を果たしていることが図らずも明らかになった。さらに両ノックアウトマウスの交配が試みられたが、現在までに二重欠損マウスは得られておらず、おそらく個体としては致死的であると考えられる。これは酵母のRAD23遺伝子が生存に必須ではないことと対照的であり、この遺伝子が進化の過程で新たに重要な機能を獲得してきたことを明確に物語っている。

一方、HR23B遺伝子欠損マウスから単離した胎仔線維芽細胞は、HR23A遺伝子欠損細胞と同様に野生型レベルの紫外線抵抗性を示し、NERが正常に機能していることがわかった。さらに、上述のように二重欠損マウスは個体としては得られていないものの、8.5日胚から二重欠損線維芽細胞を単離することができた。この二重欠損細胞ではXPC蛋白質の発現レベルが著しく低下しており、XPC遺伝子欠損細胞と同程度の紫外線感受性が見られた。このことは、RAD23ホモログがNER機能に必須であり、この機能に関する限りHR23AとHR23Bの間に互換性があるという、無細胞系の実験から得られた知見⁶⁾とよく合致している。

おわりに

以上述べてきたように、RAD23ホモログは、一見まったく異なる多様な生物機能に関わっていることが明らかになってきた。しかしながら、その背後にはユビキチン-プロテアソームを介した蛋白分解系との相互作用が、共通の分子基盤として存在する可能性がある。NERに関して言えば、蛋白分解系が実際にどのように関わっているのか、またその場合の分解基質蛋白質は何なのかが今後の重要なテーマである。無細胞NER反応は精製した蛋白質による再構成系が既に樹立されているが、その中にはユビキチンやプロテアソームに直接関連する因子は含まれていないことから、蛋白分解はNER反応のコア部分ではなく、何らかの補助的な役割、あるいは

NERを取り巻くシグナル伝達経路などに関わっているのかも知れない。その一方で、酵母のNERにはプロテアソームの19S制御複合体が、蛋白分解とは無関係に必要であるという報告が最近なされている¹⁰⁾。これについてはさらに検討を要すると思うが、プロテアソーム（あるいはそのサブユニット）が蛋白分解以外の機能を持っている可能性も考慮しておく必要があるかも知れない。

文献

- 1) Masutani, C., et al. (1994) Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO J.*, 13: 1831-1843.
- 2) Watkins, J. F., et al. (1993) The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 7757-7765.
- 3) Hofmann, K., and Bucher, P. (1996) The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem. Sci.*, 21: 172-173.
- 4) Sugasawa, K., et al. (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol. Cell*, 2: 223-232.
- 5) Masutani, C., et al. (1997) Identification and characterization of XPC-binding domain of hHR23B. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 6915-6923.
- 6) Sugasawa, K., et al. (1997) Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 6924-6931.
- 7) Hiyama, H., et al. (1999) Interaction of hHR23 with S5a: the ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26S proteasome. *J. Biol. Chem.*, 274: 28019-28025.
- 8) Schaubert, C., et al. (1998) Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature*, 391: 715-718.
- 9) Young, P., et al. (1998) Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26S protease subunit 5a. *J. Biol. Chem.*, 273: 5461-5467.
- 10) Russel, S. J., et al. (1999) The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol. Cell*, 3: 687-695.

管澤 薫（理研・細胞生理学教室）

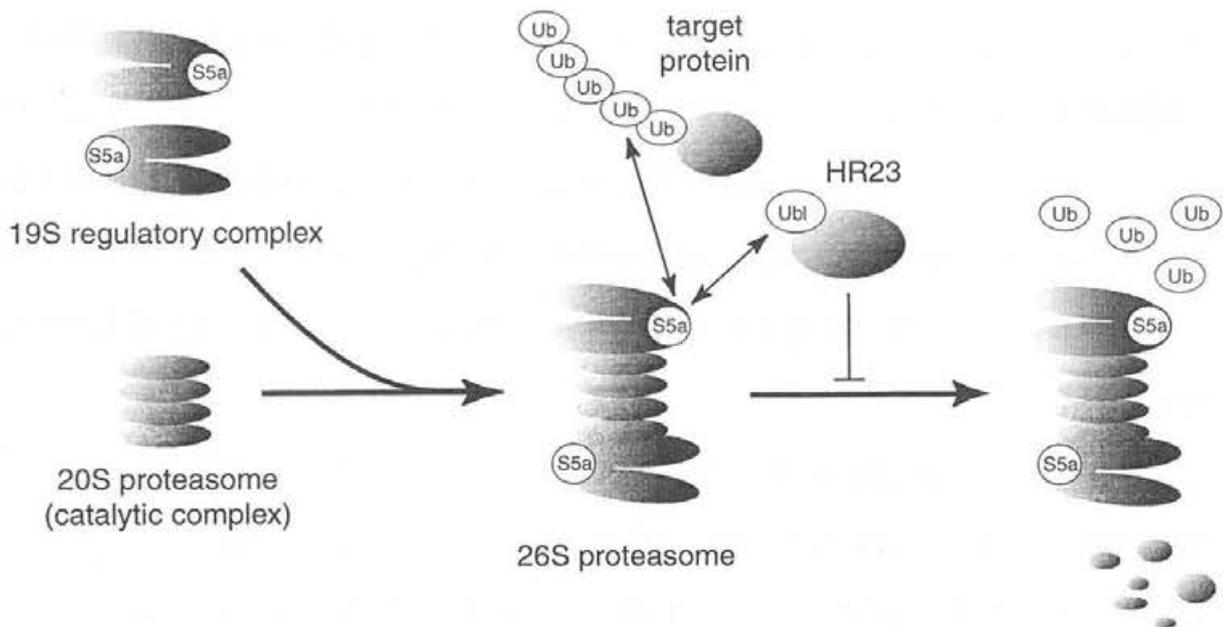


図3 RAD23ホモログによる蛋白分解阻害機構のモデル

6. 生物時計とプロテオリシス

”ぶろておりしす”最終号にして初登場ですので、また、肩の凝らないエッセイ風でもよいという依頼時のお言葉に甘えて、本論に入る前に少し自己紹介をかねた私とプロテオリシスとの関係？を述べてみたいと思います。

私は医学部学生時代より、基礎医学をやるに何がいいかを考えておりました。出した結論は、「基礎医学にはいろいろな講座があるけど、研究の基本的技術は大きくわけて3つ、すなわち、生化学的、形態学的、電気生理学的各手法である。生化学は臨床医学で言う内科みたいなもんやから、とりあえず生化学をやろう」ということで生化学の大学院生として、特に分子生物学をやることで研究生活をスター

トしました。 ”ぶろておりしす” 第10号の編集後記(1)にもありますように、約十数年前とはいえ、当時の生化学における「プロテアーゼ」はまさに酵素学のイメージが強く、正直なところ私には古い生化学のイメージを強く感じました。実際、当時徳島大の田中啓二先生(現東京都臨床研部長)が「プロテアソーム」をとられて、そのサブユニットの最初のcDNAクローニングのため、京大医学部の中西重忠教授の所に来られた時ですら、私は大学院の1年生で研究を始めたばかりで、昨今のホットな「プロテオリシス」研究への発展を予想できなかったことは言うまでもありません。

生物時計の仕事を始めてからも、勿論最初からプロテオリシスに「め」をつけていた訳ではなく、まず時計の部品(時計遺伝子)を単離していた所に、特定領域研究に「蛋白分解」の班があることを知り、公募研究に応募したという始末で、”ぶろておりしす” 第11号の巻頭言(2)の中で、「こじつけ的にプロテオリシス研究者を称した人達」という言葉をみた時、思わず「穴があったら入りたい」気持ちになったことは、これまた言うまでもありません。

さて、生物リズム、特に約24時間周期の概日リズム(circadian rhythm)は、ほとんどすべての生物にみられる基本的生命現象であります。生命の諸現象は、このリズムを発振する生物時計(circadian clock)の支配下において、互いに一定の時間関係を保って維持されています。概日リズムは、大きく、1)入力系(環境因子である光の網膜刺激によるリズム同調)、2)ペースメーカー細胞(哺乳類においては、脳視床下部の視交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)に存在する)、3)出力系(SCNから脳内他の部位、末梢へのシグナル伝達)にわけることができます。もっとも、最近はこのようにはっきりとわけることができるかどうかあやしくなってきたといえるかもしれません(3)。

概日リズムの表現型は、単に生殖、行動リズムだけではなく、特にヒトを含めた哺乳類においては、睡眠・覚醒、ホルモン分泌、ひいては摂食リズム等広く医学

に関連するものであり、哺乳類生物時計の分子機構を明らかにすることは医学生物学にとり必要不可欠な基本的事項と言えます。しかしながら、生物時計の分子レベルの研究はこれまで、分子遺伝学が比較的容易に行えるショウジョウバエ、アカパンカビを用いた研究が中心でした。特にショウジョウバエではその研究が比較的よく進み、periodやtimelessといった時計遺伝子の存在が明らかになっていました。ようやく約3年前から、我々を含め世界中のグループ(4-6)から、ヒトを含めた哺乳類にも数種類の時計遺伝子(Per1, Per2, Per3, Tim)が存在することが明らかになりました。生物時計本体(発振機構)としての時計遺伝子の発現制御機構には、種を越えた基本的機構があることがわかってきました。すなわち、時計遺伝子の発現はポジティブ因子とネガティブ因子の相互作用からなるフィードバック機構で調節されているということです(7)。

しかし、個々の因子の役割に関しては、ショウジョウバエと哺乳類(マウス)において相違点も明らかになってきました。まず、ショウジョウバエでは前述のごとく時計遺伝子としてper, timが存在し、それぞれの発現には著明な概日リズムがみられますが、転写のポジティブ因子としてのbHLH-PAS型転写因子であるdclock, dbmal1のヘテロダイマーがper, tim上流のE-boxに結合し、転写を活性化し、転写翻訳されたPER, TIMは結合することにより核内に移行し、自らの転写を抑えるネガティブ因子として働くというものです。

入力系の代表として、光による同調機構が知られていますが、ショウジョウバエにおいては、光同調はTIM蛋白の減少により、蛋白分解がフィードバックを止め再びRNAレベルを上昇させることとなります。このことが、光のあたる時間によって位相を進めたり遅らせたりして時計をリセットすることになる訳です。このTIM蛋白の分解機構が最近、明らかになってきました(8)。すなわち、プロテアソーム阻害剤であるALLN, MG115, MG132, lactacystinによりTIMの分解はin vitro, in vivoともに阻害されました。また、TIMは光によりユビキチン化されました。さらに、チロシンキナーゼ阻害剤genisteinによりTIMの分解は阻害され、光によりTIM蛋白自身が

チロシンリン酸化されることが明らかにされました。このような明期の状態のみならず、通常のフリーランニングの状態においても、このリン酸化とユビキチン化が重要なステップと予想されます。すなわち、TIMは夜の間にとんどんリン酸化されますので、さらに朝、光があたってリン酸化がより促進され、ユビキチン化されてプロテアソーム系に入り壊れていくと考えられます。

一方、哺乳類では、ポジティブ因子としてのCLOCK, BMAL1や時計遺伝子Perは存在します（ちなみに哺乳類には3種類のPERが存在する）。しかしながら、もう一つの時計遺伝子の本体と目されていたTimの発現は、網膜では概日リズムがみられますが、哺乳類リズムセンターであるSCNにおいては著明な発現が見られませんでした。しかも光により、少なくともSCNにおいてはTIMのmRNAレベルでの変化は見られず、むしろPERの転写が活性化され、光に対する反応性も異なることがわかりました。さらに、最近、植物やショウジョウバエにおいて光受容体とされていたCRY (cryptochrome)が哺乳類においては時計本体のフィードバック機構に含まれることが明らかになってきました (9)。

これまでわかったすべての時計遺伝子は、SCNや網膜のみならず、末梢においても発現していますが、培養細胞においても、血清ショックによりこれら時計遺伝子群が概日リズムを示す「動き」をとることが報告されました (10)。この系を使えば、比較的容易に哺乳類時計蛋白の「ふるまい」を見ることができます。で、一番聞きたい哺乳類の時計蛋白の分解はといいますと、ここまで読んできたのに「どうしてくれるんや」とお叱りを受けそうですが、未だなお検討中ですので、その結果は今少しお待ち下さい。

生物時計とプロテオリシス関連の仕事としてもう一つ付け加えますと、出力系の一つとして、一般にもおなじみの松果体からのメラトニン分泌があります。メラトニン合成酵素であるセロトニン-N-アセチルトランスフェラーゼの活性並びに蛋白量には、夜高くなる概日リズムがみられますが、光照射等により酵素活性や蛋白量が減少します。この蛋白分解もプロテオソーム系の分解であることが報告されて

います (11)。

生物時計の本体は時計蛋白質量の増減であり、その事自体がリズムの「もと」であります。ここからは筆者の独断ではありますが、哺乳類においても時計蛋白質群のうちのいずれかの蛋白質のリン酸化とユビキチン化が蛋白質量を決定しているはずだと思っております。この蛋白質の「リン酸化」と「ユビキチン化」、さらには(分解を逃れた)蛋白質の「核移行」がどれくらいの時間でおこなわれるかが周期を決める因子であり、24時間というリズムを形成していると考えております。

文献

- (1) 田中・川島 (1999) ふろておりしす、10、58
- (2) 川島誠一 (1999) ふろておりしす、11、2-3
- (3) R. G. Foster and R. J. Lucas (1999) *Nature Genet.*, 22, 217-219
- (4) T. Takumi, et al. (1998) *Genes Cells*, 3, 167-176
- (5) T. Takumi, et al. (1998) *EMBO J.*, 17, 4753-4759
- (6) T. Takumi, et al. (1999) *Genes Cells*, 4, 67-75
- (7) J. C. Dunlap (1999) *Cell*, 96, 271-290
- (8) P. E. Hardin and N. R. J. Glossop (1999) *Science*, 286, 2460-2461
- (9) N. Naidoo, et al. (1999) *Science*, 285, 1737-1741
- (10) A. Balsalobre, et al. (1998) *Cell*, 93, 929-937
- (11) J. A. Gastel, et al. (1998) *Science*, 279, 1358-1360

内匠 透 (神戸大学医学部)

(6) トピックス

m-カルパインの Ca^{2+} 非存在下での結晶構造を見て思うこと

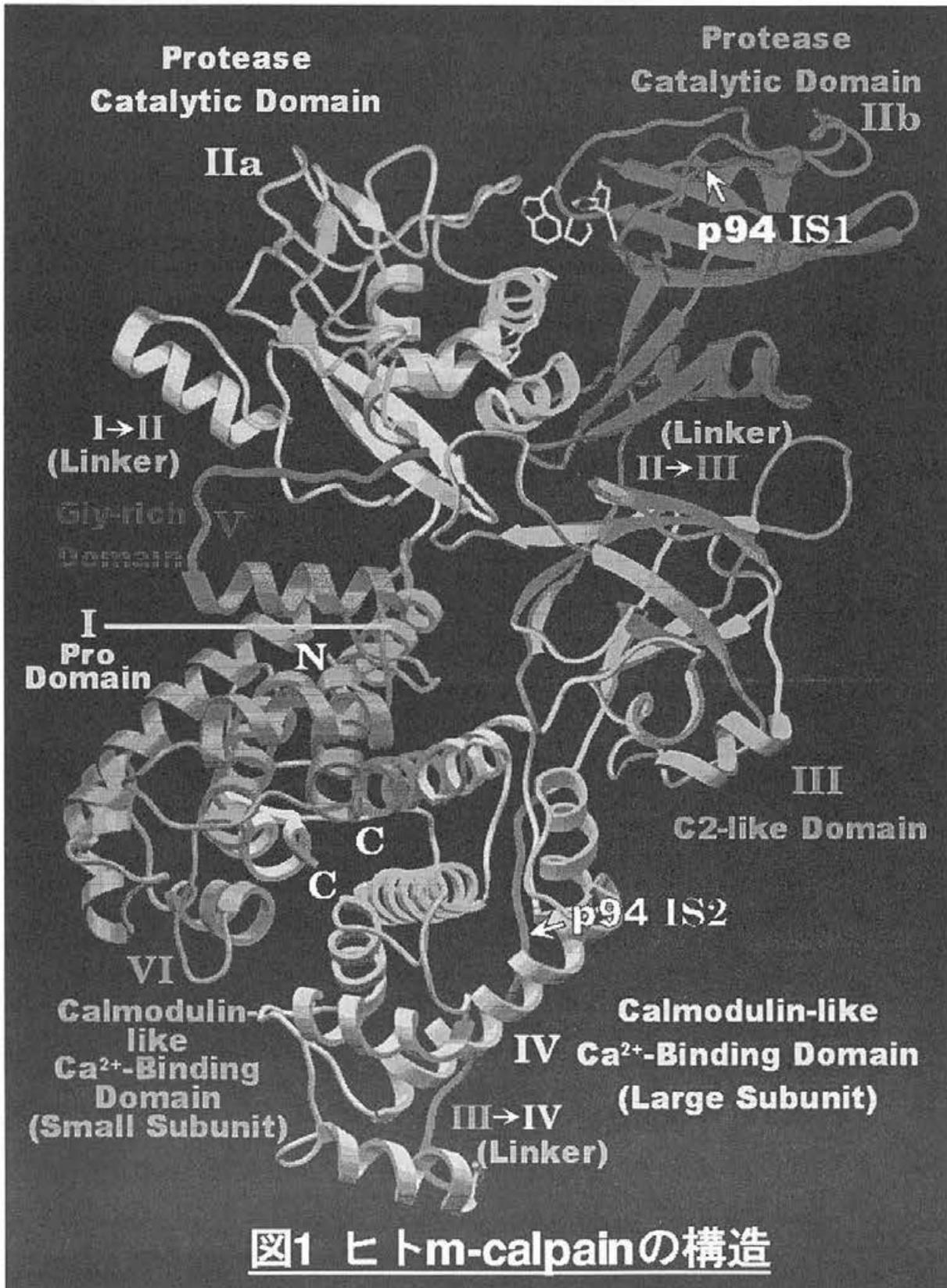
<はじめに>

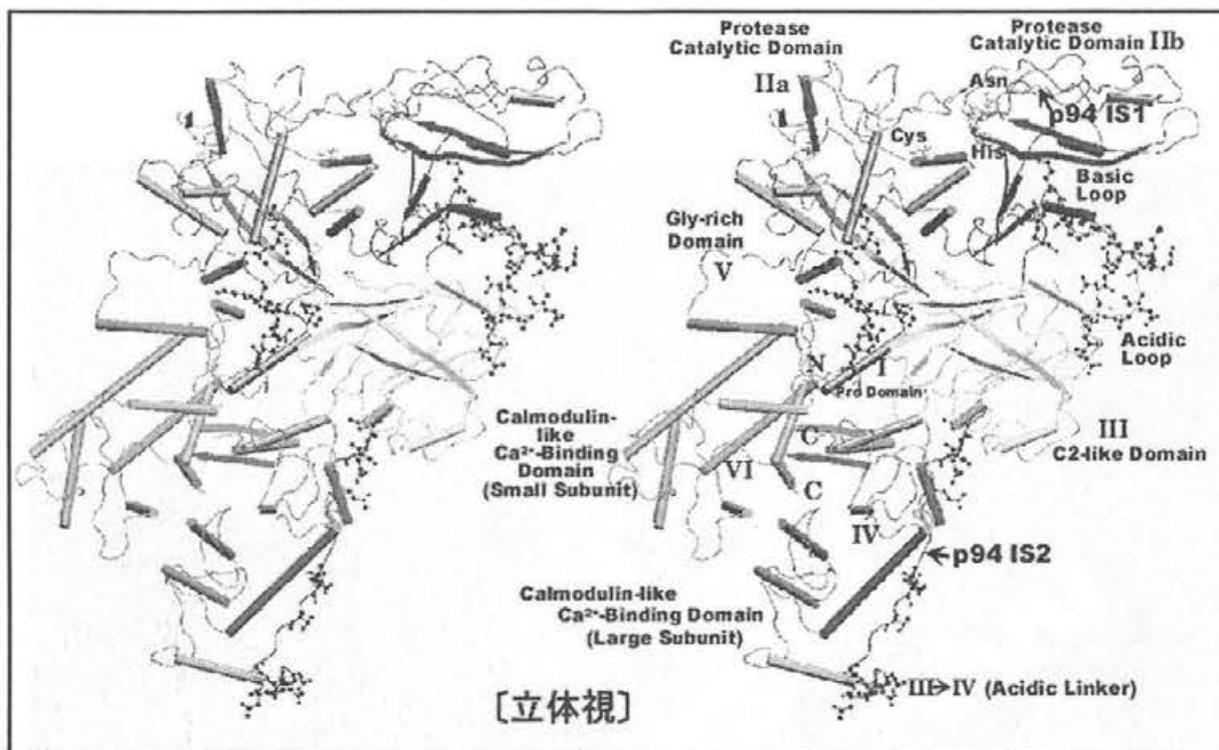
カルパインは、 Ca^{2+} によって活性化される細胞内システインプロテアーゼですが、*in vitro*におけるプロテアーゼ活性の発現には、 μ -カルパインで5~50 μM 、m-カルパインで、200~1000 μM と、生体内(100~300 nM)に比べ高濃度の Ca^{2+} を必要とします。そこで、*in vivo*においてカルパインが活性化するためには、 Ca^{2+} 要求性を低下させる活性化機構が必要であると考えられます。その活性化機構を明らかにすることが、カルパインの生理機能を明らかにする為の最初のステップであり、且つ最も重要な課題でもあります。

これまで主に生化学的解析が行われ、*in vitro*においてN末端の自己消化したカルパインやサブユニットに解離したカルパインでは、 Ca^{2+} 要求性の低下が観察されています。また自己消化や解離の Ca^{2+} 要求性を低下させる因子として、リン脂質やアクチベータータンパク質が報告されています。しかしこれらを総合しても、生理的 Ca^{2+} 濃度での活性化を完全に説明することはできません。

以上の事実を考え合わせて、 Ca^{2+} 要求性を低下させる活性化機構を理解するには、カルパインが活性化に伴いどのような構造変化を引き起こすかという点に関する、構造学的解析が不可欠であり、数年来カルパインの結晶構造解析が試みられてきました。そして最近ついに、マックスプランク研究所ボーデ教授と我々との共同研究グループと、カナダのエルス教授を中心としたグループが独立にそれぞれ、ヒト及びラットのm-カルパインの Ca^{2+} 非存在下での結晶構造をほぼ同時に発表しました (*EMBO J.* (1999) **18**, 6880-6889; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) **97**, 588-592)。

ここでは、三次元構造から明らかとなった事実を紹介し、活性化に伴う構造変化についてどのように予想されるか考えてみたいと思います。

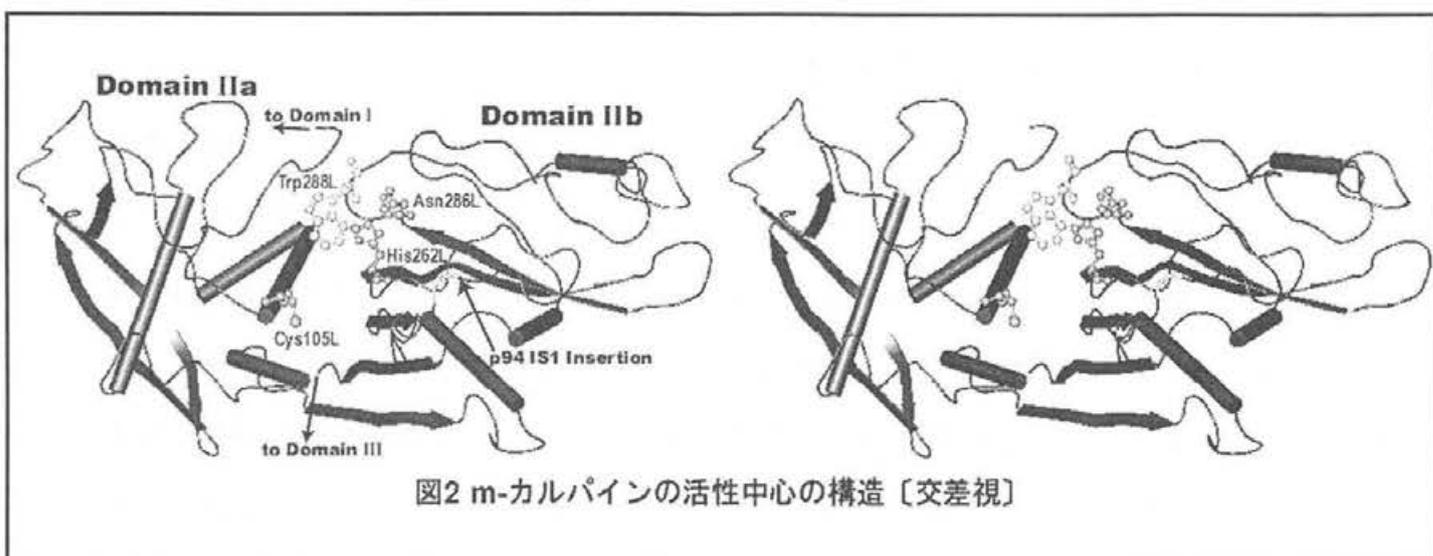




＜カルパインは Ca^{2+} 非存在下で活性中心が形成されていない。＞

結晶構造から明らかとなった最も重要な事実の一つは、カルパインが Ca^{2+} 非存在下で、活性中心が形成されていないという点です。 Ca^{2+} 非存在下でカルパインが活性を持たない事は、この理由であった事が明らかとなったわけです。構造が明らかになる以前は、N末端がプロペプチドとして活性中心を覆っているというモデルも予想されてはいましたが、実際にはプロペプチドはその様な構造をとっていませんでした。

プロテアーゼドメインであるドメイン II は2つのサブドメイン IIa と IIb に分かれており (図1)、活性中心を形成する Cys105L (以下、large subunit の105番目のシステイン残基をこのように表記します)、His262L、Asn286L の内、Cys105L はドメイン IIa に、His262L 及び、Asn286L はドメイン IIb に分かれて存在する事が明らかとなりました (図1、図2)。これまでに結晶構造が明らかとなっているシステインプロテアーゼでは、活性中心を形成する Cys 側鎖のイオウ原子と、His 側鎖の窒素原子と距離が 3.7\AA 以下であるのに対し、m-カルパインでは 10\AA 以上離れている事が明らかとなりました。



パピンの構造と比較すると、ドメイン IIa では余分な α -ヘリックスや β -ヘアピンを含むストランドがいくつか存在するものの、活性中心形成に重要な Gln99L、Cys105 や S2-P2 の結合に重要な Gly197L-Gly198L 付近の構造はよく似ています。また、パピンにおいて S2-S3 の認識に関与する Asp158、Tyr67、Pro68、Val133 は、カルパインでは Gly261L、Ala199L、Thr200L、Gly239L に相当し、小さなアミノ酸が多いことから、カルパインの基質シーケンス特異性が低いことが説明できるかもしれません。またドメイン IIb も、活性中心に存在する Asn286L-Pro287L-Trp288L ループが、パピンの Asn-Ser-Trp ループとは異なっていますが（後述）、基本的な構造はよく似ています。以上のことから、カルパインのドメイン II も活性化状態ではパピンと同様の構造をとる事が予想されますが、この為には、IIa と IIb の間で角度にして 50° 、距離にして 12\AA 動かなくてはなりません。

この様に大きな構造変化が Ca^{2+} により引き起こされると考えられる訳ですが、すべてのドメインがこの活性中心形成に影響を及ぼし得る事が予想されるため、ドメインごとに考察していきたいと思えます。

<ドメイン I とドメイン IV および VI>

これら 3 つのドメインは、以前からカルパインのプロテアーゼ活性発現に影響を及

ばす事が予想されていました。

まず、ドメイン IV、VI は共に Ca^{2+} 結合モチーフである EF-ハンドが 5 つ存在する事から、カルパインの Ca^{2+} 依存性を具現化しているドメインであると考えられてきました。以前に小サブユニット (30K) に存在するドメイン VI の構造解析が報告されており、C 末端の EF-ハンドはサブユニット間の相互作用に必要であり Ca^{2+} を結合しませんが、他の 4 つの EF-ハンドは Ca^{2+} 結合能を有する事が明らかとなっています。しかしこのドメインは Ca^{2+} が結合しても大きな構造変化はしない事が明らかとなっており、どの様にドメイン IV、VI がカルパインの活性を制御しているのか想像しにくいものでした。

またドメイン I については、カルパインの活性発現に並行して N 末端から順に 2 カ所切断される (m-カルパインでは 9 残基、19 残基が順に切りとられる) 事、また、切断を受けたカルパインの Ca^{2+} 要求性が低下している事から、ドメイン I が活性中心を覆っている様なプロペプチドである可能性も考えられており、切断 (自己消化) を受けたカルパインが活性型であるかどうかについて長い間、議論されてきました。

全体の構造から、m-カルパインは薄い円盤状の構造をしており、ドメイン IV、VI はその円盤上で、プロテアーゼドメインであるドメイン II と対局側に存在します (図 1)。ドメイン I の C 末は当然ドメイン II につながっていきませんが、N 末側はドメイン VI の疎水ポケットに埋め込まれている事が明らかとなりました。前述のように、この疎水ポケットに埋まっている部分の切断により Ca^{2+} 要求性が低下する事から、ドメイン I とドメイン VI が相互作用している事でドメイン IIa をドメイン VI の方向に引っ張り、ドメイン IIb から引き離している事が予想されます。また、サブユニットが解離したカルパインの Ca^{2+} 要求性が、自己消化したカルパインの Ca^{2+} 要求性と一致する事もこのモデルと一致しています。また、ドメイン I は 30K と相互作用している事から、その切断はサブユニットの相互作用自身にも影響を与える事も予想されますが、我々は実際に、N 末端を削ったカルパインはサブユニットが解離しやすくなるという結果を得ています。

ドメイン I の切断は、活性中心から遠く離れている事を考えると、分子間で起こると結論できますが、そうなる活性中心が形成された後でないと起こり得ないため、切断自身は活性中心形成には必要ではないはずです。また、切断部位はドメイン VI に埋もれている為、そのままでは切断を受けないはずです。そこで考えられるのが、 Ca^{2+} によりドメイン I がドメイン VI から放出されるというモデルです。それは、ドメイン VI に埋もれている α -ヘリックス上の Lys7L がドメイン VI の 2 番目の EF-ハンド (EF-2) に存在する Asp154S (以下 small subunit の残基をこう表します) と塩橋を形成しており、EF-2 に Ca^{2+} が結合する事でこの相互作用が解消され、ドメイン I が放出されるというものです。ドメイン I は α -ヘリックスを形成しており、 α -ヘリックスは一般に切断を受けにくい事が知られていますが、放出される事でヘリックスが N 末端から解けていくと仮定すれば、N 末端から順に自己消化を受ける事も説明がつきます。

しかし、ドメイン I だけの 2 次構造を予測すると、高い確率で α -ヘリックスを形成すると計算されるため、放出されたドメイン I のヘリックスが解ける事は少し予想し難い事です。また、カルパインは最終的に多くのサイトで自己消化を受けますが、これらの分解は、時間的にはドメイン I の切断よりも後に起こると考えられます。もしドメイン I が放出された時点で、プロテアーゼとして十分な活性を発現できる状態となっているのであれば、ドメイン I 以外の部分も同時に切断されるはずですし、 α -ヘリックスの解け難いドメイン I の切断はむしろ時間的に後になるはずです。ですから、ドメイン I の放出 \rightarrow α -ヘリックス崩壊 \rightarrow 切断 \rightarrow 活性化、というモデルだけでは説明は不十分と考えられます。

そこで考えられるのが、ドメイン I が切断された後でないと、その他サイトを切断する (即ち、1 つのカルパイン分子が他のカルパイン分子を基質とする) 事ができないというモデルです。実際これまでに、ペプチド基質の切断は自己消化の前に起こりますが、タンパク性の基質であるカゼインは自己消化の後に切断されることが報告されています。また、ドメイン I の切断部位に変異を導入したカルパインは、十分なペプチド基質切断活性を持つが、カゼインやカルパイン自身はほとんど分解できないと

いう結果を、我々は得ています。つまり、ドメイン I が残っていると、タンパク性の基質(この場合は、m-カルパイン自身)を分解する活性が極めて低いということです。そして、ドメイン I の切断と共に、更に構造変化を起こして、タンパク性の基質を切断するようになるというモデルです。

構造変化としては以下の様なモデルが考えられます。まず、ドメイン VI に Ca^{2+} が結合する事でドメイン I が埋まっている疎水ポケットが変形し、この変形によりドメイン I の α -ヘリックスが歪められ切断部位がループアウトします。この α -ヘリックスが壊れた時点でドメイン IIa への張力は失われ、他のドメインに Ca^{2+} が結合する事も並行して円盤状のカルパインとして活性中心が形成されます。更に、この活性型円盤状カルパインが Ca^{2+} 存在下で他のカルパイン分子と相互作用すると、ループアウトしたドメイン I が(双方の?) 活性中心に入り切断を受け、円盤状の構造は支点を失って壊れ、この構造をとって初めて、他の様々な部位を切断できるというモデルです。

ドメイン IV は結晶構造から、活性中心形成に大きな影響を及ぼす事は考えにくいですが、カルパインの基質としてカルモジュリン結合タンパク質が多く報告されている事、また、ドメイン IV に相互作用する分子がカルパインの基質となる事から、少なくとも一部のカルパインの基質にとっては、その結合ドメインとなっています。ドメイン IV は、円盤状の構造では活性中心の対局に存在しますが、円盤状の構造が崩れれば、活性中心の近くに来ることも可能と考えられます。

また、カルパインの内在性の阻害タンパク質であるカルパスタチンは、カルパインのドメイン IV とドメイン VI に Ca^{2+} 依存的に相互作用する部位と、活性中心付近に作用し活性を阻害する部位を有しています。即ち、カルパスタチンは Ca^{2+} 依存的にカルパインを阻害する際に、ドメイン IV、VI 及び活性中心付近の 3 カ所同時に相互作用すると考えられています。カルパスタチンは、明確な 3 次元構造を持たないランダムコイル状のタンパク質であると考えられており、このために円盤状のカルパインでも、そうでないカルパインでも自在に作用する事ができ、カルパインの自己消化も、自己消化したカルパインの活性も、効率的に阻害する事が出来るのかもしれませんが。

<ドメイン III>

結晶構造から得られたもう一つの重要な点は、これまで機能や構造の全く解っていないドメイン III の機能とその三次元構造から推測できたことです。ドメイン III は4本の逆並行鎖からなる β -シートが逆方向に重なった β -サンドイッチ構造をとっており、トポロジー的には TNF- α に似ており、多少異なりますが、構造的には PKC やフォスホリパーゼ C に存在する Ca^{2+} 結合ドメインである、C2 ドメインと似た構造をとっている事が明らかとなりました。ドメイン III に Ca^{2+} が結合するかどうかは、まだ確かめられていませんが、実際に Ca^{2+} 結合ドメインであるならば、カルパインは1分子に多くの EF-ハンドを持つだけでなく、更にもう一つ Ca^{2+} 結合ドメインを持つ事になり、こちらが EF-ハンドより重要な機能を果たしている可能性も考えられます。

ドメイン III は、ドメイン IIa と、 $\beta 3\text{III} \parallel \beta 4\text{III}$ (ドメイン III の3番目と4番目の β -ストランドに挟まれた β -ターンを以下この様にご書きます。) ループにおいて $\alpha 5\text{II}$ と、また、 $\beta 5\text{III}$ において $\alpha 6\text{II}$ や β -ヘアピンと、多くの構造において相互作用していますが、ドメイン IIb とは、酸性アミノ酸に富んだ $\beta 2\text{III} \parallel \beta 3\text{III}$ ループのみで相互作用しています。(図2参照)

ドメイン III が、活性中心形成に影響を与えるモデルは2つ考えられます。

1つ目は、活性中心形成をネガティブに制御しているモデルです。 Ca^{2+} がない状態では、ドメイン III の酸性ループがドメイン IIb を引っ張っており、プロテアーゼ活性中心が形成されないようなテンションを与えています。しかし、酸性ループに Ca^{2+} が結合することで酸性ループとドメイン IIb との相互作用が解消され、ドメイン IIb がドメイン IIa に接近するというものです。酸性ループに存在する酸性アミノ酸や、相互作用しているドメイン IIb の塩基性アミノ酸の数が μ -カルパインにおいて m -カルパインより少ない事から、このモデルでは、 μ -カルパインと m -カルパインの Ca^{2+} 要求性の違いを説明する事が出来ます。

もう一つは、活性中心形成をポジティブに制御するというモデルです。こちらのモ

デルはドメイン III に Ca^{2+} が結合しても酸性ループとドメイン IIb の相互作用は解消されず、 Ca^{2+} 結合によるドメイン III の構造変化により、酸性ループがドメイン IIa に近寄り、それに伴いドメイン IIb を積極的にドメイン IIa に接近させるというものです。酸性ループに変異を導入したカルパインでは、比活性自体が非常に低下しているという結果を我々は得ており、これは後者のモデルを支持しているかもしれません。即ち、ドメイン III が IIb を引っ張らなくては、活性化しないということです。

また、カルパインは Ca^{2+} 依存的に生体膜に移行する事が知られていますが、多くのタンパク質にある C2 ドメインは Ca^{2+} 存在下で生体膜にアンカリングする事が知られています。これまで、カルパインの膜への移行は Gly-rich なドメイン V が担っていると考えられて来ましたが、この機能は実はドメイン III が担っている事が強く示唆されます。ドメイン III が膜と相互作用する事で更に活性中心形成に影響を及ぼす事が予想され、以前から知られていた生体膜によるカルパインの活性化機構の分子構造的な理解に一步近づいたと言えます。

<ドメイン II>

プロテアーゼドメインであるドメイン II には、既知の Ca^{2+} 結合モチーフは存在しませんが、当研究室の秦らによりドメイン II だけを発現させた場合も、 Ca^{2+} 依存的な活性（ただし比活性は低い）を示す結果が得られています。即ち、ドメイン II だけでも Ca^{2+} 非依存的なプロテアーゼとはなりません。実際以下に述べるように、ドメイン II の局所構造にも活性中心形成を阻害していると思われる構造が存在します。

まず一つは、上記しました活性中心に存在する Pro287L-Trp288L ループです。他のシステインプロテアーゼでは Asn-Ser-Trp となっており活性中心の Asn に Trp が接近しており、活性中心の His と Asn の水素結合を助けていますが、カルパインでは Ser が Pro になっているため、活性中心の His と Asn の水素結合が十分でないと考えられます。また、Pro287L-Trp288L ループは物理的にもドメイン IIa と IIb の接近の妨げになる事が考えられます。

しかし、Ca²⁺非依存的なプロテアーゼ活性を持つカルパイン、p94 においてもこの付近のアミノ酸配列は保存されているため、このループの移動は必ずしも Ca²⁺によってではなくても可能であるとも考えられます。p94 は分子内に特異的な挿入配列、NS、IS1、IS2 を持っており、NS はドメイン I の代わりに、IS1 はドメイン IIb に挿入されており、IS2 はドメイン III と IV のリンカー部位に挿入されています。そして p94 が Ca²⁺非依存的なプロテアーゼ活性を有するのは、それら NS、IS1、IS2 が相互作用しドメイン IIa と IIb を接近させていると予想されています。もしそうであれば、ドメイン IIa と IIb が接近する事で Trp288L を物理的に動かし、Asn286L に近づけるのかもしれませんが。

また、ドメイン IIb には、シークエンスアラインメントと Ca²⁺結合実験から、His319L-Phe331L に 6 番目の EF-ハンドが存在するとも予想されていましたが、結晶構造から EF-ハンド構造をとっていない事が明らかとなりました。しかし、ここに含まれる Glu320L、Asn321L とその近傍に存在するドメイン IIa の Asp96L、Glu172L が共にネガティブチャージしている事から、反発してドメイン IIa と IIb を遠ざけている事も予想され、Ca²⁺結合が結合する事により中和される事も考えられます。ただし、既知の Ca²⁺結合モチーフが存在しない事から、単純にイオン強度に影響を受けるのかもしれませんが。また、ドメイン II が切り出された場合に His319L-Phe331L が EF-ハンドを形成して、ドメイン II のプロテアーゼ活性を制御するという可能性もあるかもしれませんが。

<おわりに>

以上に述べましたように、カルパインの活性化に伴う構造変化に関しては多くのモデルが考えられ、ここに記した以外にも多くの可能性が考えられると思います。今後は構造解析と生化学的な解析を並行して構造変化の詳細を明らかにする事が 1 つの目標です。また、最終目標は生理機能の解明、特に *in vivo* における活性化機構の解明です。そういった点から上述のモデルにおいて、特に活性中心形成に影響を与える

と思われる Ca^{2+} 結合部位に焦点を絞って、結合する因子を検索する事、特にこれまであまり注目されていなかったドメイン III をターゲットにする因子を、生体膜を含めて早急に解析する事が重要と考えられます。

また、円盤状活性型カルパインや、円盤構造が壊れた活性型カルパインが、実際に存在するかどうかを明らかにし、それらの性質を解析する事は、カルパインの基質選別機構の解明につながる可能性もあるので、興味を持っているところです。

以上は、まだ完全に固まっていない考えを、思いつくまま述べてしまったもので、論拠、論理に不備な点多々ありますが、カルパインの構造を考える上での一つのたたき台になれたならとても嬉しく思います。また、我々の考え方に対して、ご意見・ご批判などを頂けましたら幸いです (e-mail は、それぞれ ss97169 及び ahsori@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp です)。

中川和博 (東京大学分子細胞生物学研究所)

反町洋之 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

(7) 掲示板コーナー

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)

科学新聞

週刊

(金曜日発行)

発行所 科学新聞社

本社(〒105-0013)

東京都港区浜松町1-8-1

電話 03-3434-3741(代表)

振替 00170-8-33592

九州支局(〒802-0042)

北九州市小倉北区

足立3-7-8

電話 093-931-4001

振替 01720-5-2988

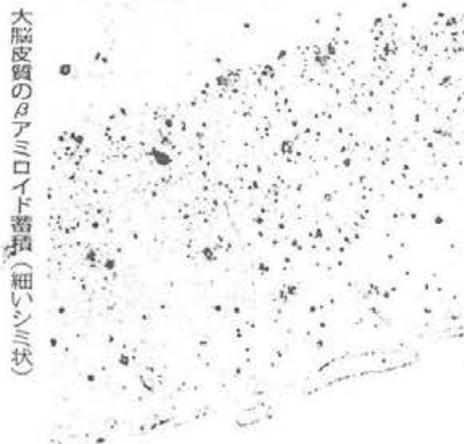
脳内βアミロイド分解系路を解明

研 アルツハイマー 理 予防へ道開く

アルツハイマー病にいたる。このβアミロイドの蓄積が根本的な原因と

されている。このβアミロイドは、生活ゴミとも呼ばれるものだが、正常な脳でも定期的に合成され、分解される。ただ、その合成過程については、かなり理解が進んでいるものの、分解過程となると全く未解明といってもよい。

理化学研究所脳科学総合研究センターの神経蛋白質制御研究チーム(西道隆臣・チームリーダー)ではこのほど、ラジオアイソトープを利用した新しい実験系を用いて、脳内βアミロイドの分解過程を明らかにすることに成功した。



新しい実験系とはまず、ラジオアイソトープで多重標識したβアミロイド(四十二個のアミノ酸より成るペプチド)を化学合成し、これをラ

ットの脳内の記憶に最も重要である海馬に微量注入する。そしてその分解過程を高速液体クロマトグラフィーで解析するというものである。

また、分解産物の構造をベプチドシークエンサーと質量分析装置を用いて決定する。次に、タンパク質分解酵素阻害剤を投与することで、分解

を担うタンパク質分解酵素を阻害剤を連続投与したところ、脳内のβアミロイドの量が減少し、蓄積することを突き止めた。このことは中性エンドペプチダーゼが内在性βアミロイドの代謝に重要な役割をしているだけでなく、その活性の低下が蓄積を引き起こし、アルツハイマー病の原因となり得ることを示しているという。

これらの成果は、アルツハイマー病の発症メカニズムの解明をはじめ、発症を予防・治療する上で重要な知見であり、今後の脳老化研究に大きなインパクトを与えるものだけに、動物モデルの作製などにより医学的な応用を探っている。

The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium

Stefan Strobl* ‡, Carlos Fernandez-Catalan* , Marianne Braun , Robert Huber , Hajime Masumoto §, Kazuhiro Nakagawa §, Akihiro Irie §, Hiroyuki Sorimachi §¶, Gleb Bourenkov †, Hans Bartunik †, Koichi Suzuki §, and Wolfram Bode **

Max-Planck-Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18a, D 82 152 Planegg-Martinsried, Germany; ‡ Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan; and † Arbeitsgruppe Proteindynamik Max-Planck-Gesellschaft Arbeitsgruppen für Strukturelle Molekularbiologie, c/o Deutsches Elektronen Synchrotron, D-22603 Hamburg, Germany

Contributed by Robert Huber, November 16, 1999

PNAS January 18, 2000 vol. 97 No. 2 pp.588–592

Calpains (calcium-dependent cytoplasmic cysteine proteinases) are implicated in processes such as cytoskeleton remodeling and signal transduction. The 2.3-Å crystal structure of full-length heterodimeric [80-kDa (dI-dV) 130-kDa (dVI-dVII)] human m-calpain crystallized in the absence of calcium reveals an oval disc-like shape, with the papain-like catalytic domain dII and the two calmodulin-like domains dIV/dVI occupying opposite poles, and the tumor necrosis factor α -like b-sandwich domain dIII and the N-terminal segments dI/dV located between. Compared with papain, the two subdomains dIIa/dIIb of the catalytic unit are rotated against one another by 50°, disrupting the active site and the substrate binding site, explaining the inactivity of calpains in the absence of calcium. Calcium binding to an extremely negatively charged loop of domain dIII (an electrostatic switch) could release the adjacent barrel-like subdomain dIIIb to move toward the helical subdomain dIIIa, allowing formation of a functional catalytic center. This switch loop could also mediate membrane binding, thereby explaining calpains' strongly reduced calcium requirements *in vivo*. The activity status at the catalytic center might be further modulated by calcium binding to the calmodulin domains via the N-terminal linkers.

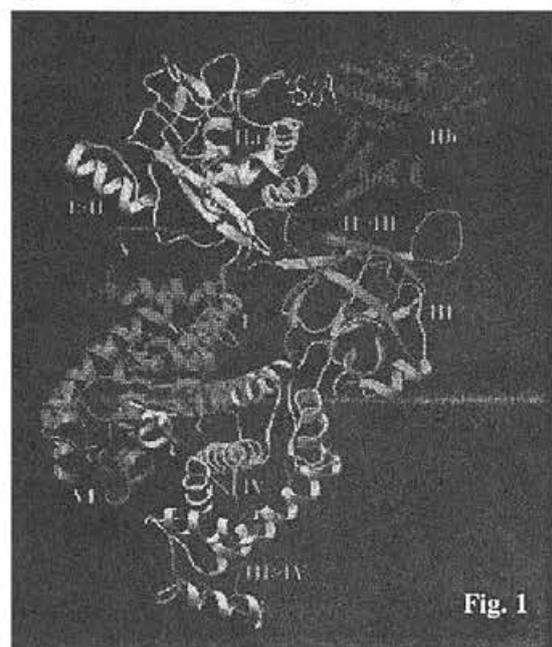


Fig. 1. Ribbon structure of human m-calpain in the absence of calcium, shown in reference orientation. The 80-kDa L-chain starts in the molecular center (green, dI), folds into the surface of the dIIa subdomain (gold, 13H linker), forms the papain-like left-side part of the catalytic domain dII (gold, dIIa) and the right-side barrel-like subdomain dIIb (red), descends through the open II-III loop (red), builds domain dIII (blue), runs down (magenta, III-IV), and forms the right-side calmodulin-like domain dVI (orange). The 30-kDa S-chain becomes visible from Thr95S onwards (magenta, dV) before forming the left-side calmodulin domain dVII (yellow). The catalytic residues Cys105L, His262L, and Asn286L together with Trp106L, Pro287L, and Trp288L (top) are shown with all non-hydrogen atoms. The figure was made with SETOR (34).

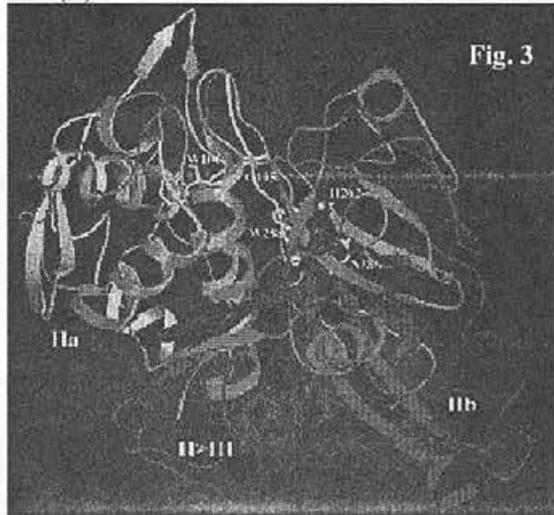


Fig. 3. Superposition of the m-calpain catalytic domain and papain. The papain-like part of the catalytic domain (gold, dIIa) and the barrel-like sub-domain dIIb (red) are superimposed with papain (18) (blue) after optimal fit of the left-side papain half to the helical subdomain dIIa. The active site residues Cys105L, His262L, and Asn286L, and Pro287L, Trp288L, and Trp106L are shown in full structure. This "standard view" of papain-like cysteine proteinases (18) is obtained from Fig. 1 by a 90° rotation around a horizontal axis. The figure was made with SETOR (34).

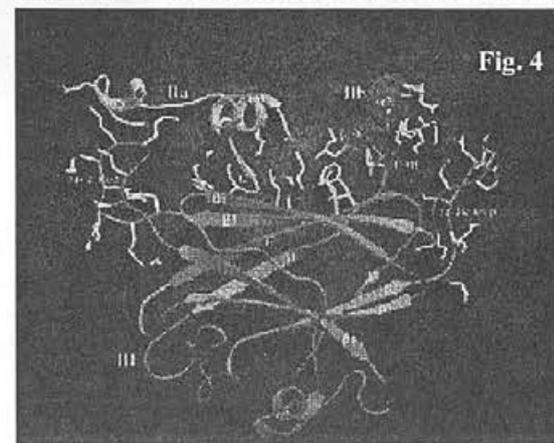
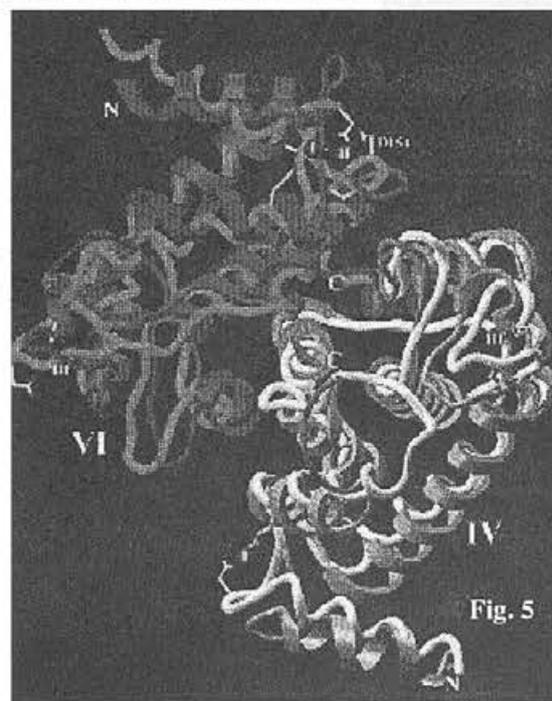


Fig. 4. Ribbon plot of domain dIII (blue) and contacting segments from subdomains dIIa (gold) and dIIb (red). The side chains of the right-side acidic loop and of the left-side basic loop, and some polar and hydrophobic residues forming the polar (center, left) and hydrophobic (center, right) interface between both catalytic subdomains and domain dIII are given. Reference orientation is as in Fig. 1. The figure was made with SETOR (34).

Fig. 5. Ribbon plot of the calmodulin-like domains dIV (yellow) and dVI (orange) superimposed with the calcium-containing rat dVI-dVII homodimer (8, 9) (white and green). Shown are also the 2/3 calcium ions (pink spheres I to III) and the acidic residues found in the homodimer at medium calcium levels and involved in calcium binding, respectively (8). Reference orientation is as in Fig. 1. The figure was made with SETOR (34).

Myopathy phenotype of transgenic mice expressing active site-mutated, inactive p94, skeletal muscle-specific calpain, the gene product responsible for limb-girdle muscular dystrophy type 2A

Kazuhiko Tagawa^{a,b,d}, Choji Taya^c, Yukiko Hayashi^d, Masahiro Nakagawa^d, Yasuko Ono^a, Rie Fukuda^a, Hajime Karasuyama^c, Noriko Toyama-Sorimachi^c, Yukiko Katsui^a, Shoji Hata^a, Shoichi Ishiura^{a,f}, Ikuya Nonaka^d, Yosuke Seyama^b, Kiichi Arahata^d, Hiromichi Yonekawa^c, Hiroyuki Sorimachi^{a,g,*}, and Koichi Suzuki^a

^aDepartment of Molecular Biology, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

^bDepartment of Physiological Chemistry and Metabolism, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

^cDepartment of Laboratory Animal Science, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan.

^dNational Institute of Neuroscience, NCNP, Tokyo, Japan.

^eDepartment of Immunology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan.

^fDepartment of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

^gPresent address: Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Hum. Molec. Genet. May 22, 2000 vol. 9 No. 9 in press.

Abstract

A defect of the gene for p94 (calpain 3), a skeletal muscle-specific calpain, is responsible for limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A) or "calpainopathy", which is an autosomal recessive and progressive neuromuscular disorder. To study the relationships between the physiological functions of p94 and the aetiology of LGMD2A, we created transgenic mice that express an inactive mutant of p94, in which the active site Cys-129 is replaced to Ser (p94:C129S). Three lines of transgenic mice expressing p94:C129S mRNA at various levels showed significantly decreased grip strength. Sections of soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles of the aged transgenic mice showed increased numbers of lobulated and split fibres, respectively, which are often observed in limb-girdle muscular dystrophy muscles. Centrally placed nuclei were also frequently found in the EDL muscle of the transgenic mice, whereas wild-type mice of the same age had almost none. There was more p94 protein produced in aged transgenic mice muscles and it showed significantly less autolytic degradation activity than that of wild-type mice. Although no necrotic-regenerative fibres were observed, the age-dependent and p94:C129S expression-dose-dependent phenotypes strongly suggest that accumulation of p94:C129S protein causes those myopathy phenotypes. The p94:C129S transgenic mice could provide us with crucial information on the molecular mechanism of LGMD2A.

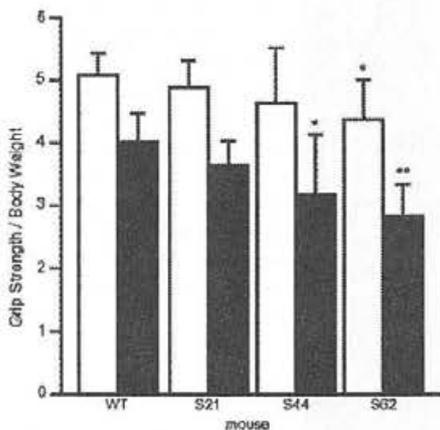


Figure 3. Grip strength of wild-type and p94:C129S-transgenic mice.

Average and the standard deviation of grip strength divided by the body weight of five independent trials in five different days (total of 25 trials for each mouse) of 4–10 independent female mice are indicated

for each line. Single and double asterisks stand for significant difference from that of wild-type at 5% and 0.5% significance levels, respectively. Open and closed columns indicate 20- and 32-week-old mice, respectively.

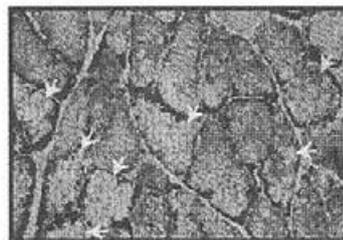


Figure 5. Increased number of lobulated fibers in EDL muscle of 106-week-old S62 mice.

Arrows indicate a location of lobulated fibres, which is one of the most significant characteristics of limb-girdle muscular dystrophy type 2A. a: transgenic mouse, b: wild type

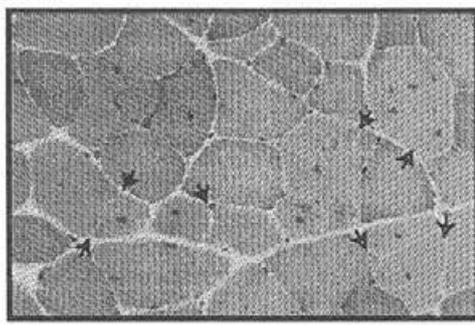
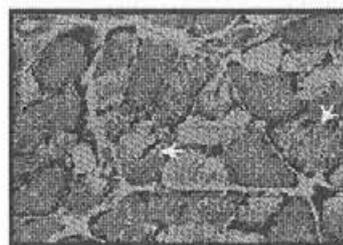


Figure 6. Fibre splitting observed in skeletal muscle of 106-week-old S62 mice.

Frozen sections of EDL muscle of 106-week-old S62 mice were stained with H&E. Closed and open arrows indicates a location of fibre splitting and possible split fibres, respectively. Bar: 100 μ m.

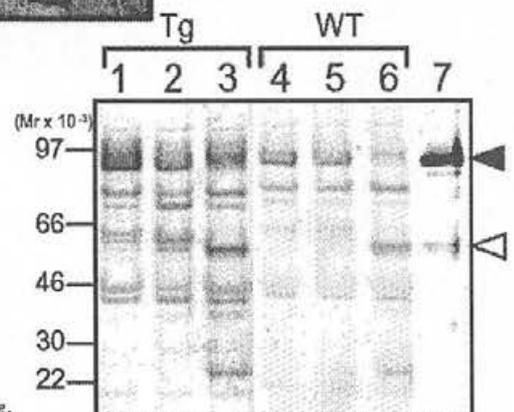


Figure 7. Detection of p94 protein in skeletal muscle of 106-week-old S62 and wild-type mice.

B, The above fractions were incubated at 4°C (lanes 2 and 5) or 37°C (lanes 3 and 6) for 15 minutes in the presence of E-64 and EGTA. Closed and open arrowheads indicate 94-kDa and the degraded 55-kDa p94 bands, respectively. Lanes: 1 and 4, time 0; 1-3, S62; 4-6, wild-type; 7, wild-type p94 protein expressed in SF9-baculovirus system for positive control.

(8) 編集後記

“ぶろておりしす”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きました。さて、本特定研究もミレニアム2000年3月をもって、終了します。従って、本号は、最終(12)号となります。“ぶろておりしす”誌は、班員の皆様および班員以外でもプロテオリシス領域で活躍している若手研究者達のご協力に支えられ、毎号かなり充実した内容として発行できたのではないかと考えています。ご協力して頂いた皆様に事務局として心より御礼申し上げます。年3回の編集は、当初は班員の意気込みもあって、さほど「苦」にはならなかったのですが、後期になってきますと、多少「負担」となってきたのは、正直申して事実であります。しかしながら、前号・本号においても話題満載とはゆきませんが、それなりに新しい情報が提供できているのではないかと考えています。これは、編集事務局の力量というよりも、「プロテオリシス」の領域が、正に成長期の科学であることによると言うべきでしょう。この4年間に発行した“ぶろておりしす”第1～12号を繚き、その目次を見てみると、その折々に登場してきた新しい話題が、「ミニレビュー」「トピックス」として掲載されていることに驚きます。まさに「蛋白分解のバイオロジー」そのものを描出していると言っても過言ではないようです。この意味では、プロテオリシス研究が限りなく発展してきたことを示唆しており、本特定研究班の存在意義が十分に裏付けられていることの現れと捉えることができるのみならず、この発展に本“ぶろておりしす”誌も少なからず貢献できたのではないかと自負している次第であります。しかしながら、プロテオリシス研究は、決して終焉した訳ではありません。否、今後益々その重要性を領域内外に提示してゆく必要であることに、誰も異論のないことと思われれます。従って、時空を超えて、近い将来に、類似の企画が組織されることを願わずにはられません。そして、このような情報交換を目的とした非営利的なミニコミ誌の類が再度発行されることを願わずにはられません。本特定研究の班員の中から、意欲を持ってこのような企画を現実化させる猛者の登場を期待する次第であります。皆さん！長い間のご愛読を有り難う御座いました。また、原稿執筆や情報提供など様々な暖かいご支援に心より感謝申し上げます。本誌は、本号にて終了しますが、これは第1部の完結であり、近未来において、装いも新たに“ぶろておりしす”誌の発行が第2部・第3部へと継承されることを祈念して、お別れ致します。さようなら!!!

(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)