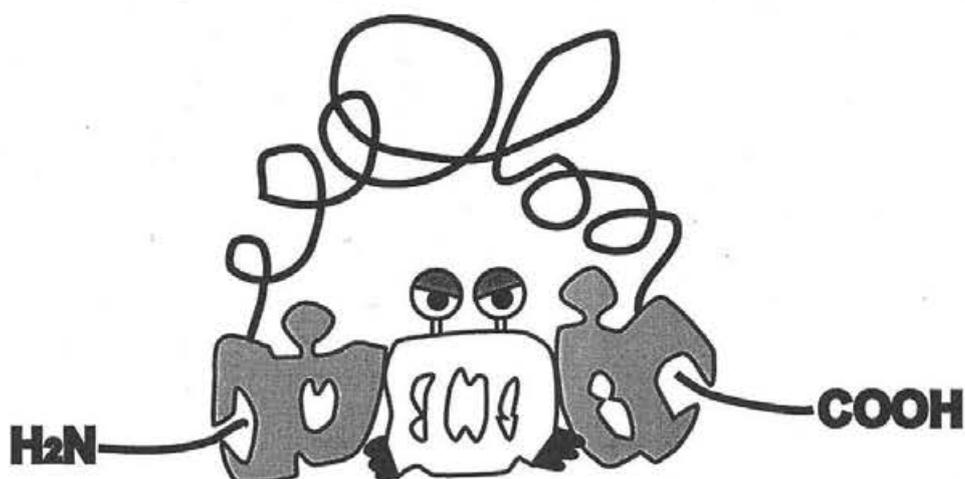


重点領域研究

「蛋白分解のニューバイオロジー」ニュース

ぷろておいしす



第2号（平成8年11月発行）

文部省科学研究費重点領域研究「細胞内蛋白分解」事務局

目次

(1) はじめに

(2) 平成8年度重点研究班会議日程

- 1 第一回公開シンポジウム
- 2 第一回班会議
- 3 第二回総括班会議

(3) 活動および関連事業

- 1 班員名簿・”ぶろておりしす”誌第一号
- 2 出版案内
- 3 学会・集会案内
- 4 第一回総括班会議：報告

(4) 学会・集会報告

- 1 12th International Symposium of FAOBMB (Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists) : Biological Functions of Proteases, July 29-31, 1996, Tokushima
- 2 Gordon Conference : Hormonal and Neural Peptide Biosynthesis, July 28-Aug 2, 1996, New Hampshire, USA
- 3 第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同大会 (Aug 26-30, 1996、札幌) から：
 - a シンポジウム “プロテアーゼバイオロジー研究の新展開”
 - b イブニングセミナー “AAAスーパーファミリー蛋白：新しい ATPaseファミリーの構造類似性とその多様な細胞機能”
 - c イブニングセミナー “タンパク質の分泌障害とその小胞体内分解”
- 4 11th ICOP Meeting : Proteolysis and Protein Turnover, Sept. 8-11, 1996, Turku, Finland
 - a ICOP 96 報告 “学会印象記”
 - b ICOP 96 報告 “リソソームプロテアーゼの機能”
 - c ICOP 96 報告 “オートファジー分野に関連して”
 - d ICOP 96 報告 “ユビキチンとプロテアソーム”
 - e ICOP 96 報告 “プロテアーゼと病態”

(5) ミニレビュー

- 1 液胞への道は何通り？
- 2 カルパインとカルパインファミリーの構造と生理機能、そして、カルパインの遺伝学の可能性について
- 3 HIVレセプター研究の最新動向とプロテアーゼ
- 4 アルツハイマー病アミロイド前駆体蛋白質の代謝
- 5 アポトーシスとプロテアーゼ

(6) トピックス

- 1 酵母のプロテアーゼ：酵母ゲノムプロジェクト完結によるプロテアーゼ情報の解析
- 2 HslV-HslUプロテアーゼの発見
- 3 MHCはクラス I 抗原提示装置か？

(7) 掲示板コーナー

伝言板：インターネットで探るプロテアーゼ情報
Proteolysisの「訳語」募集と応募
その他：インフォメーション

(8) 編集後記

(9) 発表論文の概要紹介：巻末添付

(1) はじめに

平成8年度から始まりました重点領域研究「蛋白分解のニューバイオロジー」（略称「細胞内蛋白分解」）は発足から約半年が過ぎました。本重点領域研究では「選択的な蛋白分解の分子機構」と「蛋白分解のバイオモジュレーター作用」を研究目標の二本の柱とし、その発展としての蛋白分解の異常に基づく病態および蛋白分解の研究手法の開発を副研究課題として「細胞内蛋白分解の分子機構の解明」および「蛋白分解の新しい意義」を目指しております。

最近、バイオロジー・病態におけるproteolysisの関与・役割の解析は、この「ぷろておりしす」誌2号にも掲載されておりますように、益々盛んにおこなわれつつあります。例えば、まだまだ、新しいプロテアーゼの発見があり、重要なプロテアーゼの高次構造の解析、ノックアウト動物による機能解析、病態への関与の解析が進んでおります。細胞周期における蛋白分解の役割の進展は勿論、やや解析が遅れていた小胞体やミトコンドリアの蛋白分解にも大きな発展がありました。本重点領域研究もこの研究の促進に大いに貢献していかなければならないと思います。

今年が初年度ということで、平成8年7月に行われましたワークショップでは班員全員に、短時間ではございましたが、研究計画についてお話しをしていただきました。しかし、次年度以降は年度末の班員会議で全員の班員の皆様に成果報告をしていただき、夏のワークショップでは国内外の講師を迎えて演題数を制限し、十分な討論時間を設けた会にして本研究班のさらな

る活性化を目指すことを考えております。

今年度のシンポジウム「蛋白分解の分子機構－生理機能と病態を巡って」は12月18日（水）、東京ガーデンパレスで行われます。班員のみならず、できるだけ多くの方に参加していただき、活発な討論をお願いしたいと思います。来年度以降のシンポジウムではメインテーマを決め、その年のトピックスを取り上げることも検討いたしており、ご意見を頂きたいと存じます。

シンポジウム、ワークショップとは別に、若手だけのシンポジウムの企画を進めております。毎日遅くまで実験に携わり、悩み、奮闘している若手研究者が身近な情報交換の場を、また発表の場をもちたいという希望が強く、シンポジウムを具体化すべく動き出しております。企画が固まり次第、「ぷろておりしす」誌などを通じて発表する予定です。さらに、「ぷろておりしす」誌1号で提案されましたプロジェクト研究など、その他の企画についても、具体案がまとまり次第、お知らせいたします。

12月の班員会議では、班員の先生方の素晴らしい研究の成果のご報告があり、本研究領域全体が大きく飛躍することを期待いたしております。

平成8年10月

重点領域研究「細胞内蛋白分解」副領域代表者
木南英紀（順天堂大学医学部生化学第一講座）

(2) 平成8年度重点研究班会議日程

1 第一回公開シンポジウム：蛋白質分解の分子機構—生理機能と病態を巡って

主催：文部省科学研究費重点領域研究「細胞内蛋白分解（略称）」総括班

領域代表者：鈴木紘一（東大・分生研）

日時：平成8年12月18日（水）午後1時～5時

会場：東京ガーデンパレス・錦（2階）

〒113東京都文京区湯島1-7-5 電話：03-3813-6211

JRお茶の水駅下車 徒歩5分

プログラム

1:00 領域代表者挨拶

1:05 菊池淑子（東大・院理）「ユビキチンシステムと細胞増殖」

1:35 佐方功幸（九大・理）「Mosの発現制御と機能をめぐる蛋白質分解の問題」

2:05 西村いくこ（基生研）「液胞の機能分化を担う液胞プロセシング酵素」

2:35 榎森康文（東大・院理）「カルパインの生理的な基質は何か、その機能は何か、という課題の解明に向けて」

3:05 休憩20分

3:25 内山安男（阪大・医）「アポトーシスの実体：プロテアーゼとBcl-2の関与の仕方」

3:55 西道隆臣（都臨床研）「痴呆に至る神経変性疾患におけるプロテアーゼの役割」

4:25 木戸 博（徳島大・酵素研）「ウイルス感染を制御するプロテアーゼ群とインヒビター」

4:55 副領域代表者閉会の辞

5:00 終了予定

問い合わせ先：木南英紀（順天堂大・医）

2 第一回 班会議

平成8年12月19日（木）～20日（金）

東京ガーデンパレス

3 第二回 総括班会議

平成8年12月18日(水) 18時～20時、東京ガーデンパレス

総括班メンバー

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

議案

- 1 経過報告。
- 2 本年度の活動報告、総務、研究・企画など。
- 3 来年度の活動計画。
- 4 その他。

(3) 活動および関連事業

1 班員名簿：平成8年6月作成

重点ニュース“ぶろておりしす”誌 第1号：平成8年6月発行

2 出版案内

"Intracellular Protein Catabolism" (Eds by Suzuki, K. and Bond, J.S.) Adv. Exp.

Med. Biol. vol. 389, 1996, Plenum Press, New York, 306pp.

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：臨時増刊号（平成9年夏頃発行予定）“プロテオリシス：
蛋白質分解の分子機構とバイオロジー”（編集：鈴木紘一、木南英紀、田
中啓二）

"Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases" (Ed by Barrett, A.J.)

Methods Enzymol 244; 1994, Academic Press, Inc; 765pp.

"Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases" (Ed by Barrett, A.J.) Methods
Enzymol 248; 1995, Academic Press, Inc; 813pp.

"Aspartic Proteinases: Structure, Function, Biology and Biomedical Implications" (Eds
by Tanahashi, K.) 1995, Plenum Press; 644pp.

"Aspartic Proteinases: Physiology and Pathology" (Eds by Fusek, M. and Vetvicka,
V.) 1995, CRC Press, Inc; 320pp.

3 学会・集会案内

国際学会

- (1) 2nd Workshop on Proteasomes and Related Complexes, March 19 - 21, 1997, Clenmont-Ferrand, France. (Y. Briand et al.).
- (2) Calpain Symposium, April 14 - 15, 1997, Oxford, England. (D. Bozycko)
- (3) FASEB Summer Research Conference "Ubiquitin and Protein Degradation"
Tentative schedule, June 28 - July 3, 1997, Saxtons River, Vermont, USA
(A.L. Haas)

4 第一回 総括班会議の報告（領域代表者：鈴木紘一）

日時：平成8年7月8日（月）、16時～17時30分

場所：富士ビューホテル

- 議題： 1. 重点領域発足までの経過報告
2. 本年度（平成8年度）の研究組織と活動計画、総務、研究企画などについて
 3. 来年度（平成9年度）の活動計画
 4. その他

上記の議題について報告ならびに討議をし、平成8年度の活動計画について合意した。しかし、平成9年度の活動計画については、総括班員の出席があまり良くなかったため、改めて次回に討論することにし、事務局側の案を披露しただけで終了した。なお、平成8年12月18日（水）～20日（金）、東京ガーデンパレスで公開シンポジウムと班会議を行う予定であるが、その際12月18日（水）18時～20時、同所で第2回の総括班会議を行うことにした。

(4) 学会・集会報告

1. 12th International Symposium of FAOBMB : Biological Functions of Proteases

1996年7月29～31日、FAOBMB (Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists), IUBMB, 日本生化学会, 日本分子生物学会, 日本ビタミン学会の後援のもとに、徳島文理大学健康科学研究所長の勝沼信彦教授を大会会長として第12回FAOBMB国際シンポジウムが徳島で開催された。この会は1972年よりこれまでアジアオセアニアの生化学者と分子生物学者の研究成果の発表と交流の場として、2年に1回の大会と、大会のない年に開催されるシンポジウム形式で運営されてきた。今回の第12回の国際シンポジウムは日本における2回目の開催であった。

今回のシンポジウムの主題は "Gene Regulation of Biological Functions" で3つのトピックス 1) Age-related Diseases, 2) Signal Transduction and Molecular Recognition, 3) Biological Functions of Proteases が取り上げられ66題のシンポジウムと137題のポスター発表が行われ、約500人の参加者による活発な討議が行われた。"Biological Functions of Protease" のセッションでは欧米から8名、日本から9名、アジアから6名のシンポジストが招待され、58題のポスター発表があり、普段アジアの研究者に接することの少ない我々にとって、アジアの国のプロテアーゼ研究の現状を知る絶好の機会であったと思う。この紹介の項では、今回のシンポジウムに発表された日本以外のアジアのプロテアーゼの研究の動向と、プロテアーゼの生理作用と病態との関係についての研究の中で印象に残った発表について紹介したい。

アジアの国々の発表は、それぞれの国の経済や地域の事情を色濃く反影している発表が多かったように思えた。中国からの発表は、Shanghai Institute of Biochemistry の C.-W. Chi 博士の発表に代表されるように、食物、中でも豆類の貯蔵蛋白として多くの割合をしめるセリン性プロテアーゼインヒビターの遺伝子クローニング、様々な種類の豆からの遺伝子クローニング、この遺伝子を用いた変異体の作成、さらに遺伝子導入によるトランスジェニックプラントの作成と品種改良に関

する発表が印象的であった。プロテアーゼインヒビターを遺伝子導入して害虫被害の少ない作物を作る試みは、日本では東京大学農学部の荒井綜一博士のオリザスタチンの例があるが、国際的にも様々な試みが行われており、今後の発展に期待のもてる実用的分野である。胃癌を材料にしたカテプシンBの発現と癌転移との関係を詳細に調べた L.Yi 博士の発表も印象的であった。多数の韓国研究者の発表の中で、Seoul National University の C.H.Chung 博士の発表は本誌の別の項で取り上げられるのでその他のグループの発表を紹介する。Yunsei University の D.S.Kim 博士や Korea Advanced Institute of Sci. and Tech. の S.M.Byn 博士, K.W.Kang 博士, Ulsan University のグループ等に代表されるように、植物やへび毒、ヒルなど様々な生物材料に由来する新規の線溶プロテアーゼやインヒビターの同定と遺伝子クローニング、変異体の作成に関する仕事が多く、今後薬物としての医学的応用を考えている。研究テーマとしてのプラスミノゲンアクチベーターや線溶系酵素、あるいはエラスターゼは、血栓症、癌転移、炎症への重要性から世界各国の製薬会社が特に注目している領域で、競争が激しくこれら新規物質の応用が期待された。

癌転移に関しては、我が国の清木博士が、膜結合型メタロプロテアーゼ (MT-MMP) の発見から、MT-MMP による Pro-gelatinase A の活性化機構、さらに胃癌、肺癌、脳腫瘍、大腸癌を材料にした MT-MMP の発現と癌細胞の転移と浸潤の相関関係を詳細に解析して発表した。また MT-MMP を遺伝子導入した癌細胞の浸潤性の変化を *in vitro* と動物実験系で見事に証明していた。ノックアウトマウス作成の試みが進行しており、今後癌転移の機序の解明が大いに進展することが期待された。プロテアーゼインヒビターの医学的応用に関する研究分野では、勝沼博士がカテプシン B の三次元構造解析とカテプシン L の推定三次元構造から、それぞれに特異的なインヒビターをドラッグデザインし、それぞれの特異的なインヒビターを得ている。カテプシン L インヒビターでは破骨細胞による骨破壊の阻止を、カテプシン B インヒビターでは抗原提示の阻止と IgG1, IgE の産生阻止を指標にその阻害効果の判定を行っていた。なお、カテプシン B インヒビターによる抗原プロセッシングの阻止は CD4⁺ Th 細

胞の分化にも影響を及ぼし、Th1-型T細胞が優位に誘導されることを見出しており注目された。破骨細胞のカテプシン群についてはCiba-Geigyと名海大学のグループがカテプシンK, L, SをRT-PCRを用いて定量し、破骨細胞ではカテプシンKが極めて優位に発現していることを証明し、今後この方面の論議を活発にするものと思われた。

その他、数多くの欧米および日本の研究者の優れた発表があり、シンポジウムは大変情報量に富むものであったが、ICOPや日本生化学会での発表と重複するため、それらの紹介は、別の項にゆずった。今回のシンポジウムは、全体としてアジアの研究者、特に若い研究者の熱意と勢いがとても印象に残った会であった。

(木戸博：徳島大・酵素科学センター)

2. Gordon Conference: Hormonal and Neural Peptide Biosynthesis” に参加して

この夏（1996年7月28日－8月2日）米国・ニューハンプシャー州の山深い緑豊かな環境で "Hormonal and Neural Peptide Biosynthesis" という Gordon Conference の一セッションが、インスリン研究で有名な D.F. Steiner らを中心として催された。Gordon Conference には "Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors" というセッションがあるので、「ぶろておりしす」の読者諸氏は「何故このようなセッションを紹介するのか？」とお思いかもしれない。しかし、このセッションも実はプロテアーゼ研究者のためのセッションと言ってもいいようなセッションで、実際このミーティングでの発表演題の半分以上がプロテアーゼについてのものであった。

ペプチドホルモンやニューロペプチドの多くは、最初から生理活性を持ったかたちで合成されるのではなく、まず不活性な高分子前駆体として生合成される。これらの不活性前駆体が生理活性を持つようになるためには、細胞から分泌される途中での様々な翻訳後修飾過程（プロセッシング）が必須である。この生体制御に重要な問題が本ミーティングの主題であるが、その中でもプロインスリンやプロオピオメラノコルチン (POMC) などの活性化において見られる様な、高分子前駆体の塩基性

アミノ酸対部位 (Lys-Arg、Arg-Arg) でのエンドペプチダーゼによる限定分解や、その後のカルボキシペプチダーゼによる塩基性アミノ酸の除去はペプチドホルモン活性化の主要な過程であり、多くの生理活性ペプチドで共通に見られる現象である。この様に生理活性ペプチドを活性化するためには各種のプロテアーゼがクリティカルな役割を果たしているわけであるが、その生化学的実態はあまり明らかにされてこなかった。

今回で2回目を迎えた本ミーティングでのプロテアーゼの発表の中でも特に発表が集中したのは、前述の塩基性アミノ酸対部位を認識するプロテアーゼ（いわゆるプロセシング酵素）についてであった。この様な活性を持つプロテアーゼには様々な種類のものが報告されているが、最近特に関心を集めているのは、Kexin family protease と呼ばれる subtilisin 様の触媒領域を持つ一連のカルシウム依存性セリンプロテアーゼ群で、筆者らもこのプロテアーゼの研究に携わっている。このプロテアーゼファミリーは、現在までに哺乳類で7種類が同定されている他、ショウジョウバエや線虫など種々の動物からも同定されおり、前駆体タンパク質のプロセシングにおいて中心的役割を果たしていると予想されている。今回のミーティングでもノックアウトマウスの作成など最新の成果が報告された。又その一方で、同様の活性を持つ他の種類のプロテアーゼについての発表も活発になされ、これら多くのプロテアーゼと Kexin family protease が協調して複雑な生理活性ペプチドの生成機構を調節している可能性が示唆された。

その他に、カルボキシペプチダーゼもペプチドの生理活性調節にとって重要なプロテアーゼであり、今回も新しいタイプのカルボキシペプチダーゼについての報告などがなされた。又このミーティングのもう一つの大きな特徴として、ペプチドホルモンの生合成に必要な酵素そのものについての研究の他に、これらの酵素や基質である前駆体タンパク質の細胞内輸送、特に分泌顆粒の形成や、顆粒へのタンパク質の選別輸送のメカニズムに大きな比重を置いた研究が多いことが挙げられる。生理活性ペプチドの翻訳後修飾と細胞内輸送とは密接な関係があり、生理活性ペプ

チドの生合成機構を十分に解明するためには両方からの研究が大切であるという考えによるのであろう。

このミーティングの良い点は、比較的限定された領域の研究者が一堂に会し、寝食を共にし（食事はまあ普通だが、宿泊施設は学校の寮なのでかなりひどい）共通の興味について語り合うということで、各発表の際の質疑応答、ディスカッションも非常に自由な雰囲気の中で活発に行われることであろう。夜のセッションが10時頃に終わった後も、多くの人がバーに集まり夜な夜なビールを酌み交わし、夜中まで語り合う（丁度オリンピックの時だったので話題は仕事の事だけに留まらない）。このような機会は日本においても設けられるべきだと思うが、残念な点は、この領域の研究者が日本では若干すくないことである。本カンファレンスでも、参加者95名のうち日本からの参加（アメリカ在住のポスドクを除く）は私たちのグループ一つであった。多くの方々がこの領域に関心を持っていただければと思う。

（長浜正巳：徳島大学・工・生物工）

3. 第69回日本生化学会・第19回日本分子生物学会合同大会から

本年は生化学大会と分子生物学会年回との合同であったこともあり、プログラムの編成も従来の年次会議とは大きく異なった形式で組織されたので、3つの「蛋白分解」関連会議への“観客の入り具合”が多少とも危惧されたが、何れの会議も盛会であったと風聞している（自慢する訳ではないが、私は全ての会議に参加していた。但しイブニングセミナーではサッポロ生ビールを飲んでいたので不覚にもぐっすりと眠っていたとの批判もあったが）。これは「蛋白分解」の世界がかって経験したことのないような“時代の波”に乗っていることを意味しているのかもしれない。オーガナイザーの全てが本重点領域研究のメンバーであったので、会議の内容について記事にして頂いた（編集部）。

a. シンポジウム“プロテアーゼバイオロジー研究の新展開”

本シンポジウムは私と鈴木絃一領域代表者で組織させて頂いた。これまでプロテアーゼに関するシンポジウムは本大会でも幾度となく催されたが、「プロテアーゼバイオロジー」の用語（造語？）使用は初めてと思われる。趣旨はプロテアーゼの研究ではなくバイオロジーの研究が大事との認識を喚起することである。この視点を強調する意図をもって「プロテアーゼバイオロジー」という用語をあえて造成した。この趣旨を述べたのち、以下の講演が多くの聴衆の前で発表された（比較的大きな会場であったにも拘わらず、“立ち見”の聴衆もかなりいたようである）。講演者の大半が本重点領域の班員であったので、個々の発表については、演題と発表者（敬称略）を列記するに止めその詳細には触れない（抄録参照のこと）。最初に「リソソーム系の蛋白分解」として木南英紀（順天堂大・医）が“オートファジーおよびヘテロファジーの機序と蛋白分解”について、また大隅良典（基礎生物学研究所）が“酵母の液胞におけるタンパク質分解”の演題で発表した。次いで鈴木絃一（東大・分生研）が“カルパイン：構造とバイオロジー”の演題、田中啓二（都臨床研）が“プロテアソーム：構造とバイオロジー”の演題で代表的な二つの細胞内プロテアーゼ研究の最近の話題について講演した。このように、リソソーム・カルパイン・プロテアソームの古くて新しいプロテアーゼ系の話の後に、藤沢淳子（国立精神神経センター・遺伝子工学部）が“膜貫通型メタロプロテアーゼ-ディスインテグリンMELTRIN”のタイトルで新しい話題を提供した。この講演は研究の糸口・展開とも意外性があり、また切り口が新鮮で多く聴衆を魅了した。後半の話題は「ユビキチン化と細胞周期」に関するトピックスについて日本における最先端の研究成果が発表された。最初に山尾文明（国立遺伝研）が“ユビキチン結合酵素の細胞周期制御における特異性”の演題、ついで宇津木孝彦（東大・理）が“出芽酵母のE3：ユビキチンリガーゼの機能と制御”の演題で、最後に熊田和貴（京大・理）が“染色体分配に必須なCut1, Cut2を含む複合体と20Sサイクロソームの機能的関連”について講演した。これらはユビキチンシステムを構成する結合酵素E2とリガーゼ

E3の細胞周期制御における役割についての最新の話題であり、伝統的なプロテアーゼの世界を大きく変貌させる可能性を秘めた話題の提供であった。とくに宇津木孝彦と熊田和貴はそれぞれ、菊池淑子研究室および柳田充弘研究室の博士課程大学院生であり、現場の若手研究者の最先端の話題が熱く語られた。このような講演は「蛋白分解」の世界では稀であり、今後も定着してゆけば頼もしい限りで、「蛋白分解」の将来も明るくなるとの印象を持った。おわりにオーガナイザーの鈴木絃一が演者と参加者に謝辞を述べるとともにこの比較的長時間のシンポジウムを総括して、「蛋白分解研究」の世界がもはや「プロテアーゼ」の研究から「バイオロジー」の研究の時代には入ったとの認識を示し、この観点から本シンポジウムは従来のこの分野の内容とは大きく異なることの感慨を述べ、さらに今後の「蛋白分解」領域の研究進展に期待感を表明してシンポジウムの幕を閉じた。

(田中啓二：都臨床研)

b. イブニングセミナー “AAAスーパーファミリー蛋白：新しいATPaseファミリーの構造類似性とその多様な細胞機能”

AAAスーパーファミリーは近年発見され、急速にその数が増している新しいATPaseファミリーである。そのメンバーは共通のATPase構造を持つにもかかわらず、一見共通性の無い多彩な細胞機能に関わることから、その名称がAAA (ATPases associated with diverse cellular activities)と付けられた。現在までに100を越えるメンバーが同定され、AAAモジュールの相同性から6つのファミリーに分類されている。このうち蛋白質分解系と深く関わるファミリーが2つある。1つはプロテアソームの制御ATPase群で、このファミリーはさらに6つのサブファミリーに分けられる。この数は26Sプロテアソームが6種類の異なるAAA ATPaseを制御ユニット内に含むことと一致しており、1分子のプロテアソームがそれぞれ6種類のATPaseを一個ずつ持つことを示唆しているように思われる。ただし、実際にすべてのプロテアソームが必ずしも6種類の異なるATPaseを含むかどうかは実証されていない。ちなみに、

古細菌は原核細胞でありながらプロテアソームを持ち、進化上真核細胞に近い。古細菌のプロテアソームのサブユニット構成は真核細胞のものに比べて単純で、触媒ユニットは α と β それぞれ1種類ずつで、制御ユニットに含まれるAAA ATPaseは2種類だけである。蛋白質分解に関わるもう1つのAAAファミリーは古細菌を除く原核細胞（真正細菌、マイコプラズマ、ラン藻など）や進化上細菌由来と考えられる細胞小器官（ミトコンドリアと葉緑体/色素体）に存在する膜結合型ATP依存性メタロプロテアーゼ群である。このうち大腸菌のFtsHと出芽酵母のミトコンドリアのYme1p（Osd1pまたはYta11pとも呼ばれる）、Yta10p（Afg3pとも）、Yta12p（Rca1pとも）はそれぞれ基質特異的なプロテアーゼであることが証明されている（FtsHについては「ぷろておりす」第1号を参照）。しかもYta10pとYta12pはヘテロオリゴマーを形成する。最近、Yta10p/Afg3pとYta12p/Rca1pがシャペロンとしても機能することが実験的に示された。これらのAAAモジュールは蛋白質分解において基質蛋白質の認識/巻き戻しなどシャペロ的な働きを持つことが予想されている。AAAスーパーファミリーの他の4つのファミリーは、膜融合や細胞小器官の形成/再構築など今のところ蛋白質分解とは直接関係がない細胞機能に関わる。AAA蛋白の共通の機能が何か、そしてそれがプロテアソームやAAAメタロプロテアーゼによる蛋白質分解においてどのような意味を持つのかは今後の課題として残されている。このイブニングセミナーではこれらのAAA蛋白のうち代表的な蛋白の構造と機能についての発表と討論が行なわれた。新しいタイプのファミリー蛋白ということで関心を集め、特に若い参加者が多く、活発な議論が行われた。AAAモジュールに共通するが他のATPase/GTPaseに存在しないモチーフSRH (second region of homology)の機能を解明することがAAA蛋白に特有の共通機能を知る有効な方法の一つであり、FtsHについてSRH領域の保存されたアミノ酸がプロテアーゼ活性に重要であるという結果が示された。このイブニングセミナーはAAAスーパーファミリー蛋白の多様な細胞機能とその共通分子基盤を探る第一歩と位置づけられる。（小椋光：熊本大学・医）

c. イブニングセミナー “タンパク質の分泌障害とその小胞体内分解”

表記のセミナーを立命館大・理工の菊池正和先生と小出が世話人となって開催した。既に周知の通り、分泌タンパク質は、リボソーム上でのペプチド鎖合成の後、小胞体内において適正な高次構造をとるようにfoldingされてその機能を獲得する。その過程で種々のアミノ酸の翻訳後修飾が行われるほか、N型糖鎖が付加される糖タンパク質では、グルコースおよびマンノースのトリミングが行われた後、ゴルジ体に輸送され、そこで複合型糖鎖が形成された後に細胞外へ分泌される。しかし、何らかの原因によって引き起こされた塩基の置換・挿入・欠失や翻訳後の修飾不良により生成された異常タンパク質は、細胞内移行が正常に行われずに、多くの場合、小胞体内で分解されてしまう。この異常タンパク質の選択的分解は、小胞体における"品質管理"機構に支配されていると考えられているが、このような機構の実態はごく最近注目され始めたもので、その解明に多くの努力が払われている。本セミナーでは、このような異常タンパク質の分泌障害とその小胞体内分解の細胞生物学的な研究例として以下の4演題の発表があり、それぞれの品質管理機構において異常分子を認識する分子シャペロンや分解に関与する小胞体内プロテアーゼについて討論した。まず、「分泌初期過程における品質管理機構（札幌医大・医：和田郁夫、加納英雄）」では、misfolding状態に発現させたトランスフェリンに対して、分子シャペロンのカルネキシンが分泌のごく初期の過程で会合し、速やかに解離すると共に、次にカルレティキュリンが会合するという分泌初期過程におけるグルコーストリミングによる品質管理機構が示された。次の「細胞内に蓄積された異常タンパク質の識別と分解（立命館大・理工：菊池正和、生物分子工学研：大津美枝子、サントリー基礎研：大村文彦、関西医大：吉森保、および京大食研：裏出令子、鬼頭誠）」では、酵母中に発現した人工作製リゾチーム変異体に対して小胞体タンパクであるPDI (protein disulfide isomerase) が会合し、その後、ALLNによって阻害を受けるシステインプロテアーゼによって分解されることが示された。さらに、in vitroで、変性リゾチームがER60プロテアーゼによって分解されることから、その関与が示唆された。

また、「家族性LCAT欠損症における分泌障害とその小胞体内分解（福岡大・医：護山健悟、高見昇、三角佳生、池原征夫、および札幌医大・医：和田郁夫）」では、HepG2に安定発現させたLCATのG344S変異体に対してカルネキシンとBiPが会合すること、さらに、インヒビターの特異性から変異体の分解にはプロテアソームの関与が示唆された。最後に、「クマリン型抗血栓薬（ワルファリン）投与時にみられるビタミンK依存性凝固因子の分泌障害とその小胞体内分解（姫路工大・理：徳永文稔、小出武比古）」では、ビタミンKの拮抗剤であるワルファリン存在下でBHK細胞に安定発現させた異常プロテインCが、小胞体に滞留し、選択的分解を受けることが示され、その際、GRP94、BiP、カルネキシン、カルレティキュリン及び未同定のp43とp45などが会合し、インヒビターの特異性からプロテアソームによって分解されることが示唆された。（小出武比古：姫路工大・理）

4. 第11回細胞内蛋白質分解に関する国際会議（The 11th International Conference on Proteolysis and Protein Turnover, ICOP）から

この会議には、本重点領域研究の班員を含め多数の国内研究者が参加した。本稿では、先ず日本ICOP委員会（JCOP）代表者である鈴木領域代表者（第10回国際会議の主催者）に会議の印象記とICOPメンバー会議の結果を報告して頂くとともに、本会議に参加した4名の研究者に項目別に発表・討議の内容について簡潔にまとめてもらった。

a. ICOP 96 報告“学会印象記”

日時：平成8年9月7日（土）～11日（水）、場所：フィンランド、ツルク市、ツルクテクノロジーセンター、パイオシティー。第11回ICOP国際会議はツルク大学医学部Vino Hopsu-Havu教授をオーガナイザーとして開催された。ツルク市はヘルシンキから西へ約200 km、アウラ川に沿うフィンランドの古都で、落ち着いた風情の古い町であった。学会の会場は中心街から少し離れたところにある

新しい建物、バイオシティで行われた。北欧、特にフィンランドはヨーロッパの中心から少し離れているため、参加者が少ないのではないかと心配されていたが、参加者は約260名で、心配は杞憂に終わり、丁度良い規模のまとまった学会だったと言えよう。前回、第10回のICOP会議が日本で行了されたこと、フィンランドが日本から飛行機で最も近いヨーロッパの圏であること、等の理由により、参加者の約1/5、50名が日本からの参加者で、地元フィンランドの参加者約60名に次ぐ規模であった。学会はツルク大学教授3人による“プロフェッサーズ・トリオ”の演奏で開会された。実際の会議は丸4日間で、初日を除き毎日朝8時30分に開始され、口頭発表70題、ポスター演題86題が発表された。日本人の活動も極めて活発で、15名が口頭発表を行った。夜の部は、ポスターセッションのほか、ツルク市美術館でのツルク市主催のレセプション、ツルク城での18世紀風のパーティー（お皿の代わりに平らなパンを使い、フォークの代わりに手を使う）、近くの島を巡るクルーズなどの企画があり、大変楽しませてくれた。ICOP会議はヨーロッパ、米国、日本の順にほぼ二年毎に開催する申し合わせがあり、次回12回の会議は米国で開くことが承認された。しかし、開催地とオーガナイザーは未定で、米国のICOP国際委員であるJ.BondとB.Sloaneが中心になって計画を煮詰めることが了承された。現在のところ、3年後の1999年7月にボストンで開催される可能性が高いとのことである。（鈴木絃一：東大・分生研）

b. ICOP 96 報告 “リソソームプロテアーゼの機能”

リソソームカテプシンに関する報告の中から二つ話題を取り上げる。

1) Brömmeによる特別講演：新しいカテプシン-組織特異的カテプシンについて。多くの組織・細胞に広く分布するカテプシン、カテプシンB, H, L（彼の講演はシステインを活性基にもつカテプシンに限られていた）以外に、組織特異的と呼んでよい新しいシステインプロテアーゼが次々発見された。いずれもカテプシンLに構造・酵素学的性質は類似している。Brömmeのグループが発表、未発表のものを

整理すると次のようになる。

組織分布：カテプシンK（破骨細胞、骨格筋）、カテプシンS（マクロファージ、脾臓リンパ球）、カテプシンW（T-リンパ細胞）、カテプシンU（胸腺、精巣）

カテプシンK：1995年に破骨細胞に高発現するカテプシンKをコードするcDNAクローニングの報告が三つの研究室から出された（Inaoka et al, BBRC, 206, 89-96, 1995; Shi, G.P., et al, FEBS Lett., 357, 129-134, 1995; Brömme, D. and Okamoto, K., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376, 379-384, 1995）。名前はそれぞれカテプシンK、カテプシンO、カテプシンO2であった。現在はカテプシンKに統一される機運にある。cDNAレベルの比較では、カテプシンKはカテプシンLの約10倍破骨細胞で発現しているという。このカテプシンKの組織特異的発現はin situ hybridizationや免疫組織学的検査でも確認されている（Drake, F.H. et al, J. Biol. Chem., 271, 12511-12516, 1996）。カテプシンKの酵素学的な性質は昆虫細胞で異所性に発現させたリコンビナントタンパクを使って解析されている（Bossard, M.J., et al., J. Biol. Chem., 271, 12517-12524, 1996）。最近カテプシンKが骨吸収における主要なプロテアーゼであることを支持する報告がなされた（Gerb, B.D. et al., Science 273, 1236-1238, 1996）。骨の硬化症と短軀を特徴とするPycnodysostosisは常染色体劣性遺伝であるが、その原因はカテプシンKの欠損によることが明らかにされた。患者細胞では、カテプシンK遺伝子のナンセンス、ミスセンス、停止コドンの変異が見いだされ、停止コドンの変異をもつcDNAの発現は、mRNAはつくるがタンパクは免疫学的に検出されなかった。今後、カテプシンKを標的とした骨粗鬆症やあるタイプのリウマチ性関節炎のドラッグデザインが検討されることになろう。

カテプシンS：カテプシンSの組織発現（mRNA、免疫組織学的検査）を詳細にみると、マクロファージ、Bリンパ球にほとんど限局して存在し、インターフェロン γ で誘導されるので、組織特異的カテプシンの範疇に入るとというのがBrömmeの主張である。また、カテプシンSが外来性抗原提示細胞における不変鎖のフラグメンテーションに関与することを示した（Riese, R.J. et al, Immunity 4, 357-366, 1996）。

カテプシンWおよびカテプシンU：cDNAからの塩基配列からみるとカテプシンLとの類似性が高いらしいが、まだ未発表データで詳しいことはわからない。

今後、さらに組織特異的カテプシンが見つかり、その組織特異的機能が明らかになっていくかもしれない。

2) カテプシン遺伝子のノックアウト

Petersがカテプシン群のノックアウトマウスの中間報告をした。カテプシンD以外はまだ未発表である。

カテプシンD：生後2週間は正常に発育するが、3週目で成長が止まり、生後26日前後で餌を取らなくなり死亡する (Saftig, P. et al, EMBO J., 14, 3599-3608, 1995)。生後3週間から回腸粘膜に委縮がみられ、その後腸管全体の壊死をおこす。生後24日では胸腺および脾臓のリンパ球がアポトーシスを受け、広範なリンパ組織の破壊がおこる。ノックアウトマウスでは脳の機能不全もおこるらしい。しかし、リソソームの蛋白分解およびMHCクラスIIの発現は全く影響は受けない。最近、カテプシンDがサイトカインによって誘発されるアポトーシスの経路で重要な役割をしており、カテプシンDアンチセンスRNAの発現やペプスタチンによってアポトーシスが抑制されるという報告がなされたが (Deiss, L.P., EMBO J., 15, 3861-3870, 1996)、ノックアウトマウスでの結果と一見矛盾している。カテプシンDの基質が細胞により異なり、ある場合はアポトーシスに参与する他のプロテアーゼの活性化に参与するのであろうか？今後の検証を待ちたい。

カテプシンL：生後2日目から毛の生育は遅延し、19日目からは部分的な無毛となるが、その後は発毛と脱毛をくり返すらしい。詳しいメカニズムはわからない。生育は順調にいくようである。

カテプシンBおよびカテプシンH：カテプシンBやカテプシンHのノックアウトも行っているとのことだが、報告はなかった。

(木南英紀：順天堂大・医)

c. ICOP 96 報告 “オートファジー分野に関連して”

肝細胞の単離・培養法を全世界に広め、かつ細胞内タンパク質分解の分野の重鎮の一人である P. O. Seglen 教授（ノルウェー）より、今度フィンランドの ICOP で初めてオートファジーのセッションを企画したからお前も話をしろとの招待を受けた。初めての海外からのお呼びでもあり、喜んで参加してきた。細胞内タンパク質分解という領域におけるこのオートファジーの分野について、我が班員の方々にぜひ知っていただきたく、興奮の冷めやらぬうちにと個人的な印象記をつづる次第である。

そもそもオートファジー（Autophagy, 自食作用）とは、細胞内でのリソソーム系タンパク質分解経路のうち、エンドサイトーシス（Endocytosis, Heterophagy）を除いた経路と考えてほぼ良い。つまり、これは個々の細胞内タンパク質はもちろんであるが、細胞内のオルガネラの量をも決定する機構と考えてよく、細胞内の構成装置全体のダイナミクスを考える上で絶対に無視することのできない機構である。かつては Christian de Duve を頂点として華やかな領域を形作っていたが、近頃は新しい展開が見られず、生化学や細胞生物学の教科書などにもほとんど顔を出さなくなってしまった。けれども、去年はわが国の細胞生物学会（仙台）で国際シンポジウム、今年は ICOP でのこのセッションの開催、とにわかに陽が当たりだした感がある。

森と湖の国、シベリウスを生んだ国、フィンランド。中でもスエーデン支配時代の雰囲気を色濃く残すという古都トゥルク（Turku）。この美しい小都市のなか、トゥルク大学に隣接したモダンな BioCity/Turku Technology Center という会場で、1996年9月8日から11日まで第11回 ICOP は開かれた。北緯60度を越すというのに、一番良い季節だったのか、トゥルクは快適そのものだった。9月に入ったせいも、白夜ももう見られず、毎朝、ホテルから会場まで30分ほどかけて古く美しい街並を通り抜けてゆくのが楽しい日課であった。今回の会議への参加者総数は264名、うち日本からは53名であった。口頭発表は71題、うち日本からは鈴木紘一教授の Plenary lecture を含め15題であった。ポスター発表は約140題であった。特にポスターの展示

が期間中ずっと継続されていたのは非常に良かった。こうした特定の分野の会議ではゆっくりと何度も見ることができ、またいつでも討論することができるのは大きなメリットだ。

オートファジーのセッションは第3日目の朝9時からであった。驚いたことに、当日会場にはボスの Seglen 教授が姿を見せなかった。どうも急病で入院してしまったということであった。急遽、最初のスピーカーである W. A. Dunn 教授 (Univ. Florida, U.S.A.) が司会をかねてセッションを開始した。最初の2題は酵母を用いての形態的・遺伝学的解析を紹介したもので、Dunn 教授は高等動物で知られているマクロ-とミクロ-オートファジーが酵母でも存在し得ることを強調した。この異なる二種のオートファジーについては概念上大きな問題をはらんでいるが、詳細は別の機会に論じたい。大隅良典教授 (基生研) は酵母で初めてオートファジーの変異株をとり、その遺伝子14種をクローニングし配列を解析し、そのうちの *APG1* 遺伝子が新規の Protein kinase をコードしていることを発見した。また、大隅教授の電顕写真はいつ見てもすばらしい。つづく6題はすべて動物細胞での話題であったが、P. Codogno 博士 (INSERM, France) はヒト大腸ガン HT-29 細胞を用い、heterotrimeric Gi3 protein によるオートファジーの開始段階の調節機構の存在を示した。特に $\alpha 13$ -subunit の変異株を用いた数種のキメラ蛋白質の overexpression により Gi3 の GDP 結合型が必須であることを証明した。これは、これまで生理的調節論や形態的議論が支配的であったこの領域にあって、いよいよこの分野にも分子生物学的手法が適用され始めたなという印象を深くした。つづく E. Knecht 博士 (F.V.I.B., Spain) は、ふつう非選択的分解といわれるオートファジーにあって、特に単離リソソームで選択的に蛋白質が取り込まれ分解されることを GAPDH や RNase A で証明した。これは J. F. Dice (Tufts Univ., USA) のグループとの共同研究である。なお、このオートファジーの選択性については、今回の発表にはなかったがリソソームと ubiquitination の話題も最近大きな注目を集め始めており、従来の考え方について再検討を要する興味深いテーマである。

Seglen教授のグループは、教授の代わりに大学院生の P. E. Stromhaug 君が発表したが、お得意の膨大な数の各種阻害剤を用いて、肝細胞オートファジーの開始段階には蛋白質リン酸化反応が関与していることを示した。現在、オートファジーの主たる生理的調節点（ホルモンやアミノ酸による）はその開始段階（autophagosomeの形成段階）にあると考えられている。つづく木南英紀教授（順天堂大）は現段階で可能な方法としてautophagosomeを含むautolysosomeを単離し、その膜面分中の蛋白質の分離同定を精力的に試みられていた。また、オートファジーは分泌や小胞輸送などと同じく細胞内膜の出芽や空胞化、融合などからなる現象ととらえることができるが、A. J. Meijer 教授（AMC, Netherlands）は、酵母で解明されつつあるPI 3-kinaseや p70 S6 kinase などによる調節を想定し、最も生理的な調節と言われるアミノ酸によるオートファジー調節機構もそれとの関連において議論していた。最後に筆者（新潟大）は、この分野におけるin vitro系導入の試みとして細胞膜に選択的に穴をあける溶血毒素 α -toxinとstreptolysin O (SLO)を用いたセミインタクト細胞（permeabilized cells）の確立について報告した。オートファジーは、その際立って複雑な機構のためか、これまで細胞を破壊するとどうしても再現できなかったが、 α -toxin処理により初めてin vitro系での完全なオートファジーが再現され、また、SLO処理によりサイトゾルとATPの共存下でその成熟段階のみが再現された。この二種の異なるセミインタクト肝細胞を用いて、開始・成熟両段階にGTP結合蛋白質が関与することを示した。

この他、ポスター発表においても、オートファジーの分野では14題の発表があったが、肝細胞でのタンパク質分解を調節するアミノ酸レセプターの存在の指摘、auto-phagosomeの単離・精製の試み、autophagic vacuolesの電顕観察のための新しいcryo-sectioning法の開発、老化におけるオートファジーの関与など、新しい意欲的な研究成果が続々と発表された。むしろ今回はこちらの方が新鮮でエキサイティングな刺激が大きかったように思われる。ともするとアメリカの情報ばかり入ってくる近頃であるが、こうしてヨーロッパの研究者の熱い情熱を直接肌で感じられたこと

は大変大きな収穫であった。かつては‘生理的タンパク質分解のリソソーム系’と呼ばれたものの、一時は消え去ってしまうかに見えたこの分野であるが、新しい装いで再び人々の注目を集めはじめていることが実感された。確かにタンパク質の分泌やエンドサイトーシスがこれだけ注目を浴びた現在、これから一旗挙げようとするものにとってはこのオートファジーが新たな標的と写ったとしてもまったく不思議ではない。また、個人的になるが、今回、筆者の米国留学時代の恩師 Glenn E. Mortimore 博士夫妻に三年ぶりに再会することができたことがなによりの喜びであった。肝臓灌流法の創始者であり、30年にわたり常にこの分野に君臨されてきた博士である。この夏とうとう現役を退いてしまわれ、一抹の淋しさも味わっておられたようだが、確実に動き始めた新しい潮流と久しぶりの活発な討論を大いに楽しんでおられた。

以上、Seglen 教授の突然の不参加が大変残念であったが、この分野の新しい胎動を実感することができ、力の湧いてくる会議であった。次回が楽しみである。

(門脇 基二：新潟大. 農)

d. ICOP 96 報告“ユビキチンとプロテアソーム”

フィンランドのトゥルク市において開催された本国際学会では総勢約260人が集まり4日間に渡って連日活発な討論が繰り広げられた。本稿では、プロテアソーム-ユビキチン系に関連したトピックスを中心に紹介するが、この分野も新しい未発表の知見が数多く報告され、大変充実した会合となった。特に今回の特色としては、従来は非常に曖昧な形で推察されていたのみであったプロテアソームの基質認識・切断のメカニズムが、構造解析等によりかなり明確に理解され始めたということが挙げられる。バイオロジカルな機能についても、最近の構造解析の進歩を基盤に新しい視点で考え直そうという気運が感じられた。以下にそのレポートを簡単にまとめてお届けする。

まずプロテアソームの基質認識のメカニズムについて、P. Young (Univ. Utah,

USA) は、26S プロテアソーム S5a サブユニット中のポリユビキチン鎖結合ドメインについて最新の解析結果を発表した。彼等は、S5a のディレーション変異株を作成してポリユビキチンとの結合能を測定した結果、アミノ酸 196-241 番の α -ヘリックス領域が特異的結合に最も重要であるとの結論に達した。彼等によると、この配列を有するペプチドは S5a と同等のポリユビキチン結合能を有し、かつ種々のイソペプチド結合様式で連結したポリユビキチン鎖を同等に認識できるらしい。興味深いことに、S5a 以外にもこの配列と弱いながらホモロジーを持つ 26S プロテアソームサブユニットが幾つか見つかったということで、26S プロテアソームの各サブユニットがどのように機能分担してポリユビキチン鎖を認識しているのかといった機構に興味を持たれる。

A. Ciechanover (Israel Inst. of Technology) は、転写調節因子 NF- κ B (p105) のプロセッシングとその蛋白性インヒビター I- κ B の分解について概説した後、p105 の適切なプロセッシングにはアミノ酸 370-404 番領域にあるグリシンリッチドメインが重要であること、このグリシンリッチドメインを欠失させた変異 p105 では、プロセッシングされずに完全分解にまで達してしまうことを示した。彼等は、またリン酸化型 I- κ B をビーズに固定化して I- κ B の分解を制御する E3 の単離を試みているようだ。現在とれているものは APC / サイクロソームと同様に高分子量の E3 様複合体であり、リン酸化型の I- κ B のみを認識するらしい。シグナル依存的な I- κ B の分解においてこの E3 複合体が中心的な働きをしていることも十分考えられる。

F. Papa (Univ. of Chicago, USA) は、脱ユビキチン化酵素である Doa4 についての発表を行った。彼らは Doa4 は 26S プロテアソームとゆるいながら物理的に相互作用していること、Doa4 の N 末端側領域に特異性を決めるエレメントが存在することなどを明らかにすると同時に、Doa4 は、26S プロテアソームによるユビキチン化基質の分解過程でもかなり後期に働くという考えを示した。つまり、ユビキチン化基質は 26S プロテアソームによって (ポリユビキチン化されたまま) ペプチドにまで切断されたあとに、Doa4 がペプチドから最終的に脱ユビキチン化するというモデルである。発表後、会場の Kisselev からポリユビキチン鎖は基質蛋白質と一緒に 26

Sプロテアソームの活性中心に入っていくのかという質問が出た。これに対して Papa はポリユビキチン化蛋白は全体としてプロテアソーム内部に入っていくことはなく、ユビキチン鎖は 26Sプロテアソーム外側のユビキチン結合部分についてそのまま蛋白部分のみが 26Sのホールに入っていくのではないかと答えた。Kisselevは、7~11 というプロテアソーム切断後のペプチド残基数はプロテアソームの α リングから活性サイトまで届く長さではないと彼自身の結果を引用しつつ反論し、脱ユビキチン化が分解後に起こるといふ Papa の考えに疑問を呈して、ポリユビキチン化された基質が最終的に分解される過程についての熱い議論が戦わされた。

ポスターにおいては、プロテアソームの基質切断のメカニズムについて **Baumeister** (Max-Plank 研)のラボから、古細菌 20Sプロテアソームの再構成系を用いた実験結果が次々と発表され圧巻であった。その一人である **I. Dolenc** は、プロテアソームの活性中心の数と基質切断能力との関わりについて巧妙な方法を用いて解析した。彼らは、野性型プロテアソームと活性中心をつぶした変異プロテアソームのサブユニットをpH変化によって各々解離した後、適当な比率で両者をませあわせることによって活性中心が1つしかないプロテアソームを再構成した。この変異プロテアソームと活性中心を7つ有する野性型プロテアソームを用いて基質を水解する速度を比較し解析した結果、過剰量の基質存在下において、両者の水解速度に大きな差異がないことを見出した。このことは野性型プロテアソームにおいて7つある活性部位のうちの1つに基質が結合することによって他の6つの部位は不活化してしまう（おそらくはサブユニット間のアロステリックな効果によって）を示唆している。このことは、プロテアソームの構造解析上のインパクトのみならず、NF- κ B p105 や抗原ペプチドのプロセッシングなどプロテアソームのバイオリジカルな機能を考える上でも大変に興味深い知見であるといえよう。同じく **Baumeister** 研の **F. Zuhl** らは、*Rhodococcus* プロテアソームの4種のサブユニット蛋白質 $\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2$ を種々の組み合わせで大腸菌中に発現再構成させるシステムを確立した。その結果、どのような α, β の組み合わせにおいても酵素として活性を持つプロテアソー

ムが再構成されるが、単一の α, β の組み合わせから再構成されたプロテアソームは全て野性型のものに比べて K_m 値が半分程度であることが明らかになった。この結果から、プロテアソーム複合体体内において異種サブユニットは互いに負の co-operativity を有している可能性を指摘し、Rhodococcus 20S プロテアソームのサブユニット配置のトポロジーについて2つの候補を提案した。これらの知見はプロテアソームの基質切断機構を考える上で大変刺激的なアイディアを与えるものであり、Dolenc にしても Zuhl にしても再構成系の確立ということが、プロテアソームの分子構造そして作用機構を理解するに上で如何に有用であるかを思い知らされる。

A. Goldberg のラボからただ一人参加した **A. Kisselev** (Harvard Med. Sch.) は、プロテアソームによりモデル基質蛋白質を分解させその産物を解析した結果を報告した。彼の発表によると、プロテアソームは基質蛋白質を7~11残基のオリゴペプチドに完全に裁断するまではその(切断中間体の)基質を遊離させることはなく、従ってあるひとつの基質切断を完全に終了する以前に別の基質に取りかかることはない。彼はこの様式を工程的切断 (Processive mechanism) と定義し、プロテアソームによる基質切断の分子定規仮説 (Molecular ruler hypothesis) と併せて議論を行った。

B. Dahlmann (Diabetes Inst. Dusseldorf) は、免疫電顕や化学架橋などの方法を用いて解析したヒト20Sプロテアソームサブユニット配置のトポロジーについてこれまでの成果をまとめ発表した。真核生物プロテアソームのサブユニット配置については、ごく最近、R. Huber のラボで酵母20Sプロテアソームの X 線結晶構造が2.2 Åでの解析に成功した結果、全てが判明した (R. Huber 教授は平成8年11月5-7日に開催された臨床研第11回国際カンファレンス: 構造生物学の最前線での Plenary lecture のために来日、その前日臨床研での非公式セミナーでその全貌を語った。論文は現在執筆中で本年末に投稿する予定とのことである)。

L. Kuehn (Diabetes-Forschungsinstitut, Germany) らは、プロテアソームそのものではなく、アクティベーター因子 PA28 α, β の遺伝子を用いてこれを in vitro で再構成する系を示した。彼等によると精製 PA28 複合体とほぼ同程度のプロテアソーム活性化能を得るためには PA28

α, β を同時に発現させることが必要で、 α 単独では活性化能は大きく減少、 β 単独では活性化能を持たなかった。 α, β の機能分担は不明であるが、互いに協調的に働く必要があるのかもしれない。今回の発表ではユビキチン系の話題は多くなかったが、**S. Wing** (McGill Univ.) らは E2 の特異性の問題について興味ある話題を提供した。ラット精巣 17 kDa E2 である 2E と 8A は互いにホモロジーが高いにもかかわらず、その基質特異性は大きく異なっている。ところが 8A の 4 残基を置換してみると 2E と同等の特異性を持った E2 に変換された。これら 4 残基は活性中心から遠く離れた E2 分子表面上にあるようで、これらの残基が基質特異的な E3 との結合面である可能性も考えられる。

プロテアソームは、真核生物のみならず好熱菌、好塩菌などの古細菌にも存在することが近年明らかになっている。Baumeister に代わって講演した**田村具博** (Max-Planck 研) は、好熱菌から 20S プロテアソームに対する活性化因子を探索した結果について発表した。その結果、好熱菌には真核生物の 19S や 11S に相当するものは見つからなかったが、その過程で、Tricorn Protease (TCP) と彼らが命名した全く新しいプロテアーゼを同定した。これはプロテアソーム同様多成分複合体からなる高分子量プロテアーゼであるが、120 kDa のサブユニットが Hexameric troid を形成しそれがさらに capsid 様構造を形成するという特異な構造のプロテアーゼ複合体である。オリゴメリゼーションは高濃度のサブユニット蛋白質存在下で自動的に進行し、いわゆる ATP に対する依存性はないが、TCP に結合する低分子蛋白質 (F1, F2 など) も幾つか同定しているようで、その構造と活性調節に興味を持たれる。**小椋光** (熊本大、医) は、AAA ファミリーに属する大腸菌 ATP 依存性プロテアーゼ FtsH についてこれまでの知見をまとめると同時に、FtsH は LPS などのリン脂質合成を制御していることなど幾つかの興味深い新知見を報告した。FtsH は短寿命転写因子の選択的分解を介して膜蛋白質、膜構成成分の両面から膜の動態を総合的に制御している必須遺伝子であるらしい。FtsH には幾つかの特徴的なモチーフが存在しているが、そのうち、AAA モジュールに共通して見つかった SRH (Second Region of

Homology of AAA) 配列の機能を調べるべく、この領域の変異体を作成して解析中と
のことで実験の結果が楽しみである。この AAA モジュールは、26S プロテアソーム
の ATPase サブユニットを含む広範囲な機能蛋白質に見い出されており、その共
通機能の解明は極めて重要な課題と思われる。

プロテアソームのバイオリジカルな機能という面からは、川島、横沢が基調的
な講演を行ない議論を先導した。川島誠一（都臨床研）は、MOLT 細胞におけるア
ポトーシスの誘導とプロテアソームとの関わりについて発表した。現在最も強力な
プロテアソーム阻害剤として知られる Z-Leu-Leu-Leu-H を世界に先駆けて発表して
いる彼のグループは、この阻害剤が放射線照射によって誘発されるアポトーシスを
抑制できないばかりか、逆にそれ単独でアポトーシスをひきおこすことを見出し、
その過程に癌抑制遺伝子産物 p53 の蓄積が関与していることを報告した。PC12 細胞
などでは、Z-Leu-Leu-Leu-H は分化誘導をも引き起こすことを川島らは以前に明ら
かにしている。このような細胞種による反応性の違いを統一して理解するべくアポ
トーシスに至る過程での細胞分化の関与についても議論を行なった。アポトーシス
にはプロテアソーム以外に ICE など多くのプロテアーゼの関与が示唆されており、
これらプロテアーゼ群の関連・協調性が今後の大きな興味になっていくと思われる。
横沢英良（北大、薬）は、これまでの研究におけるプロテアソームと細胞周期との
関係を総括した後、ホヤ、ウニ、カエルなど種々の受精卵におけるプロテアソーム
の制御と機能について議論した。細胞周期の制御における蛋白分解の重要性は最近
とみに注目を集めているが、現在の研究の多くは主に基質の修飾（リン酸化、ユビ
キチン化）に基づく分解調節であり、それらは基本的に CDK サイクルに依存してい
る。一方では、セントロソームの複製サイクルや細胞内カルシウムイオンのオシレー
ションは、サイクリンの蓄積サイクルとは独立であることも示されている。横沢ら
はカルシウムイオン濃度の変動に基づくプロテアソームの活性変化を示し、それが
細胞周期における各遷移点において機能しうることを、そしてプロテアーゼのレベル
でも制御機構が存在することを指摘した。

ポスターでは**沢田均**（北大・薬）らは、26Sプロテアソームの制御サブユニットに対するモノクローナル抗体の確立に成功し、それらを用いて行った実験結果について報告した。発表された2種の抗体のうち、MR-2はリン酸化型のATPaseサブユニットのみを認識する興味深いものであり、ATPaseサブユニットのリン酸化とプロテアソームの機能調節との関連を調べる目的に極めて有用であると思われる。沢田らはプロテアソームに内在する自己リン酸化活性と蛋白分解との関係について解析を続けており、プロテアソームの分解調節機構との関わりが明らかになる日が期待される。プロテアソームのリン酸化という面からは**G. Mason** (Univ. Leicester, UK)も発表を行った。彼等は、20SプロテアソームC8, C9サブユニットは細胞内でリン酸化を受けており、その脱リン酸化に伴ってペプチド性基質の水解活性が減少することを示した。細胞をオカダ酸などのホスファターゼインヒビターで処理するとプロテアソームのリン酸化はさらに促進されることから、プロテアソームは細胞内でフォスファターゼのターゲットになっている可能性も考えられる。一方リン酸化の真の機能的意義は相変わらず明らかではなく、機能面では理解が進んでいるとはいえないようだ。プロテアソームの分子生物学に関して、**鶴身知津子**（都臨床研）らは、26Sプロテアソーム制御サブユニットp97の遺伝子をクローニングし、その産物がTNFレセプター結合蛋白質TRAP-2と高い相同性を有していることを示した。さらに酵母におけるp97ホモログNas1遺伝子を破壊し、この産物が酵母のユビキチン依存的蛋白分解系に重要な役割を有していることを明らかにした。酵母については、その他、急遽Wolfに代わって登壇講演した**W. Heinemeyer** (Univ. Stuttgart)が、種々の酵母プロテアソームサブユニット変異とプロテアソームの酵素活性との関係についてこれまでの知見を総括した後、小胞体蛋白質CPYがユビキチン-プロテアソーム経路で壊されることを示した。**D. Attaix** (Centre de Recherche Nutrition Humaine, France)らは、無負荷状態の筋肉において、26Sプロテアソーム制御サブユニットおよびPA28のmRNA量が協調して増加することを見出し、無負荷筋での蛋白分解亢進現象との関連を議論した。**佐藤かおり**（都臨床研）

らは、cAMP 合成活性を指標にカルパインによって切断されたG α は未切断のものに比べ有意に活性が高いことを見出し、G 蛋白質活性化にカルパインが関与していることを明らかにした。さらに、それに引き続くG蛋白質の不活性化がプロテアソーム経路によることを阻害実験により示し、一連のG蛋白質の活性調節がカルパインとプロテアソームの協調によってなされていることを提示した。J. Beyette (Univ. Leicester, UK) らは、p53 依存的、非依存的なアポトーシスの過程において、いずれの系でも 26S プロテアソームの活性が変動すること、沢田美智子（北海試）らはヒトデ卵卵成熟におけるプロテアソームの役割について、種々の阻害剤と抗体を用いて解析した結果を報告した。いずれもプロテアソームがいかに細胞制御に関わっているかを指向したもので、今後も構造的な裏付けを得つつ進展していくものと考えられる。川原裕之（都臨床研）は、細胞周期におけるプロテアソームの機能について、S期の終了とM期の開始のいずれにもプロテアソームは不可欠であることを報告し、プロテアソームの制御と細胞周期における機能について議論した。プロテアソームと遺伝子複製制御との関連は新しいテーマであり、今後の細胞周期研究における興味の一つであろう。現在、ユビキチン化の制御がプロテアソーム系の蛋白分解制御の中心として脚光を浴びているが、果たしてプロテアソーム自身にも基質識別の機能が備わっているか否か、そしてその制御がバイオリジカルにどの程度の意味を持っているかを明らかにすることが今後のプロテアソーム研究の課題の一つと考えられよう。プロテアソームの複雑な分子構成の意味、そして個々のサブユニット特異的な役割分担等を高次な生物機能との関係で明らかにしていくことが重要であり、遺伝学的な解析を含めた幅広いアプローチがこれから行われていくものと思われる。このように、今回の ICOP ではプロテアソームに関して実に幅広い視点から発表が行われた。このような討論の場を企画していただいたオーガナイザーの先生方にこの場をお借りして心からのお礼を申し上げたい。なお文中、敬称は全て省略させていただいた。

（川原裕之：都臨床研）

d. ICOP 96 報告 “プロテアーゼと病態”

今回のICOPミーティングでは、プロテアーゼと病態の関係に言及した発表が全体の約3分の1近くを占め、プロテアーゼ機能の多様性と活性制御の問題に対して高い関心が寄せられていた。病態としては、悪性腫瘍に関するものが最も多く、次いでHIVなどの病原微生物による感染症、そしてアルツハイマー病、骨粗鬆症などが取り上げられていた。プロテアーゼと病態に関する発表はポスターでも数多く見られたが、ここではスピーカーとして招待された講演者の発表について、筆者なりの感想を書かせて頂くことにした。筆者の不勉強のため講演内容の把握が不十分である点をご容赦願いたい。

悪性腫瘍に関する発表で、Sloane (USA)はcathepsin Bの発現増大と癌の悪性化との相関を示し、癌細胞表面にcathepsin Bが結合することが癌細胞の浸潤・転移などの過程に重要であることを示した。清木（金沢大・がん研）は種々の癌組織に過剰産生された膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ(MT1-MMP)が、癌細胞表面に輸送された後、細胞外のプロゼラチナーゼAを活性化し癌細胞の浸潤活性を増強することを示した。この過程でTIMPがMT1-MMPとプロゼラチナーゼを結ぶ仲介役として重要な機能を担っていることも示唆した。Khokha (Canada)はTIMP-1の過剰発現系やTIMP-1のダウンレギュレーションを誘導したトランスジェニックマウスを用いた研究から、TIMP-1が癌化や転移に抑制因子として働いていることを示した。日和佐（千葉県がんセンター）はシステインプロテアーゼインヒビターのNIH3T3細胞のトランスフォーメーションに及ぼす影響を調べ、システインプロテアーゼ活性の抑制が正常細胞を潜在性細胞へ変換する可能性を示した。

病原微生物による疾患では、木戸（徳島大・酵素研）はHIV gp120のV3ループを特異的に切断する宿主細胞由来tryptase TL2、およびインフルエンザウイルスやセンドライウイルスの外膜蛋白質を分解する宿主クララ細胞由来tryptase Claraについて、それぞれの病態の発現機構における役割を報告し、各プロテアーゼをターゲットとした治療方法の確立の可能性を示した。Korant (USA)はHIV治療薬として開発した

HIV proteaseインヒビターについて報告し、患者に投与した際の有用性と問題点を示した。Blankenvoorde (Netherlands)は歯周病の主要な病原菌*P. gingivalis*の増殖がcystatin Sや卵白cystatinによって強く阻害されることを示し、作用機序は不明であるものの、これらのインヒビターが歯周病の成立に抑制的な効果をもつ可能性を示した。Kuuselaは細菌の膜表面レセプターに結合したplasminやplasminogenが内在性インヒビターによる阻害を免れ、細胞外マトリックスを破壊して感染成立に寄与していることを示した。

鈴木(東大・分生研)はplenary lectureの中で、肢帯型筋ジストロフィー症2A型の原因遺伝子としての筋肉特異的なcalpain(p94)に言及し、本酵素の存在様式や性状、および本酵素の点変異による活性抑制が本疾患の病因であることなどを解説した。勝沼(徳島文理大・健康科学研)は骨吸収機構における破骨細胞cathepsin Lの重要性について各種プロテアーゼインヒビターやホルモン、サイトカインを用いた実験から言及し、骨粗鬆症治療薬としてのcathepsin Lインヒビターの有用性を示した。Rantakokko (Finland)は骨粗鬆症モデルマウスを用いて骨吸収亢進時におけるcathepsin KおよびMMP-9のメッセージレベルの増大を示し、骨吸収機構における両酵素の重要性を指摘した。石浦(東大・分生研)はアミロイドタンパク質前駆体(APP)のプロセッシングとアルツハイマー病で蓄積する β /A4タンパク質の産生機構について概説し、正常なプロセッシングに関わる酵素の候補として細胞膜結合性cathepsin BやD-Asp specific peptide hydrolaseを示した。

プロテアーゼ機能と病態の関係の研究は、全体としてはまだまだ発展途上にあるという感じで、実験データもまだ断片的なものが多く、各研究者がそれぞれの実験系に基づいて仮説を立てているといった段階にあるように思われた。しかし、プロテアーゼ研究が基礎的レベルから応用レベルへ確実に領域を広げており、この領域の今後の発展が大いに期待される。(山本健二:九州大学・歯)

(5) ミニレビュー

1. 液胞への道は何通り？

プロテオリシスは細胞にとって重要な役割を担っているが、一方でそれは危険な作業でもあり、秩序だて行われなくてはならない。そのために、細胞はユビキチン-プロテアソーム系の様な高度な制御のもとに分解を行うという戦略の他に、分解のために特化した場をもうけるという戦略も採っている。酵母の液胞は動物細胞のリソソームに相当するいわば分解の場であり、そこには分解をする物、すなわち分解酵素、および分解をうける物が送られてくる。それらはどのような経路を通過して液胞へと送られてくるのであろうか。

液胞内分解酵素の多くはER, Golgiという分泌経路を経由し、そこから分岐して液胞へ輸送される(1)。またAminopeptidase I (API) という液胞酵素は、分泌経路に欠損を持つsec変異株でも液胞へと輸送されることから、分泌経路を経由しないで液胞へと輸送される事が知られている(2)。

一方、分解を受けるものに関しては、オートファジーすなわち自らの構成成分を液胞へと送り込み分解する現象がある。栄養飢餓条件下に細胞は自らの細胞質成分を非選択的に液胞に送り込む(3)。これは細胞質中にオートファゴソームという膜構造体が形成され、その形成過程に細胞質成分が非選択的にその内部に取り囲まれ、オートファゴソームが液胞と融合することで細胞質成分が液胞内に送られる(4)。また、ある条件下には、Fructose-1,6-bisphosphataseが選択的に液胞へと送られる(5)。これは少なくとも一部はマイクロオートファジー、すなわち液胞膜が内部に陥入することにより液胞内に送られるという報告もある(6)。その他に細胞膜の蛋白質は様々な生理的要求に応じてエンドサイトーシスによって液胞へと送られ分解される(7)。

さてこのように少なくとも5つの液胞への経路が報告されているが、最近興味深いことが明らかになった。大隅等は非選択的なオートファジーを行うことのできないapg変異株を14種類単離した(8)。一方、Klionsky等はAPIの液胞への輸送を行

えないcvt変異株を単離した(9)。驚くべき事にこれらの変異株の多くが互いに重複しており、しかも全てのapg変異株はAPIの輸送に欠損を持つ事がわかった(10)。またThumm等も独立にオートファジー欠損のaut変異株を単離したが、ここでも同じ事がみられた(11)。オートファジーとAPIの輸送は細胞質成分を液胞へと送るという共通点があるものの、その他の点では明らかに異なる性質をもっている。例えば、オートファジーは栄養飢餓条件下に誘導されるのに対し、APIの輸送は富栄養条件でも恒常的になされている(10)。またオートファジーの輸送は4%/hr程度の速さであるのに対し、APIの輸送はその何十倍もの速さで起こり、明らかに選択性がある(10)。

分解するものとされるものが同じAPG分子群を用い、しかも別の経路によって液胞へと輸送される。このことは何を意味しているのだろうか。我々は現在この謎を解明中である。

文献

- (1) S. D. Emr, B. Horaazdovsky and J. H. Stack, (1995), *Annual. Rev. Cell Devel. Biol.*, 11, 1-33
- (2) D. J. Klionsky, R. Cueva and D. S. Yaver, (1992), *J. Cell. Biol.*, 119, 287-299
- (3) K. Takeshige, M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda and Y. Ohsumi, (1992), *J. Cell Biol.*, 119, 301-311
- (4) M. Baba, K. Takeshige, N. Baba and Y. Ohsumi, (1994), *J. Cell Biol.*, 124, 903-913
- (5) H.-L. Chiang and R. Schekman, (1991), *Nature*, 350, 313-318
- (6) H.-L. Chiang, R. Schekman and S. Hamamoto, (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 9934-9941
- (7) L. Hicke and H. Riezman, (1996), *Cell*, 84, 277-287
- (8) M. Tsukada and Y. Ohsumi, (1993), *FEBS Lett.*, 333, 169-174
- (9) T. M. Harding, K. A. Morano, S. V. Scott and D. J. Klionsky, (1995), *J. Cell Biol.*, 131, 591-602
- (10) S. V. Scott, A. Hefner-Gravink, K. A. Morano, T. Noda, Y. Ohsumi and D. J. Klionsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press
- (11) T. M. Harding, A. Hefner-Gravink, M. Thumm and D. J. Klionsky, (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 17621-17624

(野田健司 基礎生物学研究所)

2. カルパインとカルパインファミリーの構造と生理機能、そして、カルパインの遺伝学的可能性について

カルパイン（の触媒サブユニット）の構造が最初に明らかになったのは、今からもう10年以上前のことになる(1)。その後、いくつかの紆余曲折はあったが、誰しもがカルパインと認める分子には、パパイン様のシステインプロテアーゼ領域（領域II）と、カルモデュリン様のカルシウム結合領域（領域IV）が存在する。そして、N末端側には、活性制御に関すると思われる数十から百数十アミノ酸残基の領域（領域I）があり、領域IIとIVの間には、機能不明の領域IIIがある。この図式は、10年余変化しておらず、今でも、典型的なカルパインの分子構造と云える。骨格筋特異的なp94（nCL-1）やショウジョウバエのカルパインには、飾りの領域が付加されているが、基本構造は変わらない。

10年の間に少し変化したのは、カルパインの一部の領域だけを含む分子や、これと他の機能領域が融合した分子が存在し、これらは、別の遺伝子から、あるいは、スプライシングの変化によって作られるのが判ったことである。このように、カルパインの親類が増えてカルパインファミリーが発展していくことは、カルパインの分子としての認知が広がることにつながり、喜ばしい限りである。しかし、現在なお不明であるカルパインの基本的な生理機能を考えたり、解析したりするとき、何をカルパインのアイデンティティと考えるかについて、少し慎重になる必要があると、個人的には考える。そこで、ここでは、2～3の基準を設けて考えてみることを提案したい。まず、（狭義の）カルパインは、4つの領域（IからIV）を含んでおり、いずれの領域に関しても、ある程度の機能的な、できれば、構造上の相同性がある分子とする。この理由は、カルパインのような活性調節機構が基質認識を含めた触媒作用と共に重要と考えられる酵素では、活性領域以外の部分が、他の因子と相互作用をして重要な生理作用に関連している可能性が高いからである。特に、領域IIIに関しては、現在は機能不明であるが、カルパイン分子種間のアミノ酸配列の相同性を見ると、分子内・間の認識という点で、カルシウム結合領域よりも重要

であることが予想される。したがって、最近、遺伝学的に捉えられた線虫のtra-3遺伝子産物(2)は、少し微妙な立場となる(領域IIIとIV、特に、領域IVの不完全さを許すか?)。その結果として、プロテアーゼ領域(パルパイン様と最初に述べたが、実際には、カルパイン様と呼ぶべきシステインプロテアーゼ領域である)やカルシウム結合領域(これも同様に、カルパイン様カルシウム結合領域と呼んだ方がよい—この点に関しては、臨床研の川崎さんに示唆を頂いた)だけを持つ分子、あるいは、まだ知られていないが領域IIIだけを持つ分子や、別種の機能領域と融合した分子を、カルパインファミリーの分子と定義してみたい。したがって、脊椎動物のカルパインの小サブユニットは、カルパインにいつも会合しているカルパインファミリーのタンパク質(カルシウム結合タンパク質)と定義することができるかもしれない。また、'ぷろておりしず' 1号の、反町さんのレビュー(3)のカルパイン様分子の多くは、私の個人的なカテゴリーからは当面抜けていただくことになる。

ここで、さらにもう1段、カルパインに選別を加えることにする。いくつかの状況証拠に偏見を加味すると、カルパインの生理機能の中には、少なくとも多細胞動物細胞にかなり普遍的な細胞機能が複数含まれていることが予想できる。もちろん、カルパインには特定の細胞の特有の生理過程に関わる機能があってもよく、それが単独の分子種にまで発展させた形態がnCL-1やnCL-2であろうが、これらは、ある種の機能分散(あるいは機能強化)の形態であると見なす作業仮設を取る。多くの細胞に存在して、おそらく複数の機能を持っている狭義のカルパインこそ真のカルパインであると設定した方が、現在未知のカルパインの基本的機能に関する概念を得やすいからである。こうした'排除の論理'を積み上げていくと、脊椎動物の μ 、 m 、 μ/m -カルパインと、ショウジョウバエの2種のカルパイン(Dm-カルパイン-D1あるいはCalpA遺伝子産物-と、もう一つ-D2-;未発表)だけが確実に残る(これで、我田引水の準備ができたことになる)。何故、このような排除の論理が必要かと云えば、これには次のような長い言い訳が理由となっている。長年(私などは、途中さぼりが多いので、長年とはいいがたいが)カルパインの研究を行っていて最も不

足に感じるのは、カルパインが実際に生きた細胞の中で正常な生理作用として、何を行っているかの解答である（つまり、カルパインは、筋ジストロフィー症になるためや、虚血によって組織が崩壊するために存在するのではない）。もちろん、様々な病態でのカルパインやカルパインファミリーのプロテアーゼの活性の動向や作用は、医療との関連だけではなく、以上述べた生理機能の解析にヒントを与えるという点からもきわめて重要であり、これらに関わる研究を誹謗中傷しようとするものではない。強調したいのは、カルパインに関しては、（１）現在、カルパインの“素顔”が見えていないことと、（２）病態での作用機序がわかり、‘真のカルパイン’以外の親類分子の生理機能がわかって、それでカルパインの主要な生理機能を知ったことにはならないこと、をあらかじめ認識しておく必要があることである。そうしないと、カルパインを深く知る立場にない研究者に、誤った概念、つまり、特殊なカルパインの機能形態がカルパインの代表的作用であるとの認識を与えてしまうからである。

以上、長い長い前置きで世間を狭くし、自分自身を縛ったときに残される問いは、「どうすれば、“カルパインの生理機能”を知ることができるのか」である。これまでの大風呂敷の割に、私自身は具体的な解答を、現在、持っていない（あるいは、持っていたら論文を発表している）。しかし、問いに対する概念的な解答は“遺伝学”であると考えている。この意味で、ショウジョウバエでの研究はきわめて重要である。しかし、ここで云う遺伝学とは、単に欠失変異体を得て、“カルパインは△△に重要”という、答えにならない答え（ここ2～3年のNature誌は、生化学的論理や方法論を基にしたときには納得できない、こうした主旨の論文に満ちている）を出すことではもちろんない。最近の米国の研究者のゲノムプロジェクトに関するレビュー(4)と、ショウジョウバエの良質な遺伝学的研究論文（たとえば、G. Rubinのグループによる複眼のR7細胞の分化に関する研究など）を、非常に注意深く、行間や方法論も含めて読めばわかるように、細胞にかなり普遍的な複数の作用を持つ遺伝子（タンパク質）の生理機能は、単にloss-of-functionの変異体を用いる

だけでは（もちろん、これだけでも、実験的には非常に大変であるが）、解析の入り口に立ったにすぎないのである。まだ、その入り口にも立っていない私がさらに風呂敷を広げるには、紙面も尽きたし時期尚早でもあろう。この続きは、他のreviewerか次にゆずるとして、本重点領域研究が主催するシンポジウムで発表する過分の機会が与えられているので、私達の具体的な準備状況をお聞きいただいて、「まだ、何も進んでいない」「こんなことでは、永久に解決できない」などの建設的な感想と意見をいただければ幸いである。いずれにしても、カルパインの生理機能の研究は、まだ、ほとんど始まっていない—他の多くのプロテアーゼと同じように。

文献

- (1) Ohno, S. et al., (1984) Nature 312, 566-570.
- (2) Barnes, T. M. & Hodgkin, J. (1996) EMBO J. 15, 4477-4484.
- (3) 反町洋之 (1996) ふろておりしす No.1, 7-9.
- (4) Miklos, G. L. G. & Rubin, G. M. (1996) Cell 86, 521-529.

(榎森康文：東京大学・院理学系)

3. HIVレセプター研究の最新動向とプロテアーゼ

外被蛋白質を持つウイルスは、いずれのウイルスも感染細胞の膜上のレセプターと結合した後、膜融合過程をへて細胞内に侵入する。ウイルスの外被蛋白質は感染細胞内で膜融合能のない前駆体の型で合成されてから融合能を持つ成熟型にプロセスされる過程で、細胞内あるいは細胞外のプロテアーゼによる活性化を受ける。このようなプロセッシングプロテアーゼとしての役割の他に、コロナウイルスに対するアミノペプチダーゼNのように、プロテアーゼ自体がウイルス蛋白と結合することによってウイルス侵入に関与しているプロテアーゼがある。HIVの場合、外被蛋白前駆体のgp160は細胞内で前駆体から膜融合能を持つ成熟型のgp120とgp41に変換され、Tリンパ球膜上のレセプターCD4分子と結合するが、このウイルスの場合、CD4とウイルス外被蛋白が結合しただけでは膜融合もそれに続くウイルスの細胞内侵入

もおきないことが知られている。このような現象観察から、ウイルスの侵入にCD4以外に複数の細胞側の因子が関与していることが推定され、そのような因子の解明がこれまでに試みられてきた。

研究の1つの流れは、エイズウイルス感染と膜融合を阻止する中和抗体がいずれの場合も、gp120蛋白のある特定の部位(V3領域)をエピトープとすることに端を発する。我々は、このエピトープのアミノ酸配列-GPGRAPHF-がKunitz型-type-IIプロテアーゼインヒビターの活性中心構造に類似していることから、このアミノ酸配列を認識して結合するプロテアーゼが存在するのではないかという仮説を提唱し、プロテアーゼ活性を持つT細胞膜のV3領域結合性蛋白質(tryptaseTL2)を見出した(1)。その後CD4レセプターの発見者の一人、Weiss, R.A.のグループは、HIV感染のさいにV3領域がプロセッシング受ける可能性を示唆した。T細胞以外でHIVが感染するマクロファージにおけるV3領域結合性プロテアーゼとして、Gauthie, F.のグループは膜結合型Cathepsin Gを(2)、パスツール研のHovanessian, A.G.のグループは dipeptidyl peptidase IV(CD26)を(3)、Bristow, C.L.は膜結合型 elastase様酵素を(4)、ごく最近ではマクロファージのurokinase-type plasminogen activator (5)が提唱されている。CD26については否定的見解も多いが、このようにV3領域と結合して切断するプロテアーゼの候補として多くのプロテアーゼがあげられてきたのは、感染する細胞によつて特異的なHIVのタイプがあり、それらのV3領域の一次構造がウイルスのタイプによって異なること、この領域が高度可変領域であるためいずれのタイプのHIVにも共通して作用するプロテアーゼがないからと思われる。一方、この発想の根底にあるV3領域とプロテアーゼとの結合、さらにV3領域のプロセッシングについては、Levy, J.A.のグループ(6)、Nara, P.L.のグループ(7)、さらにMorrison, S.A.のグループ(5)から、HIVの感染性とV3領域のプロセッシングがほぼ相関することが示され、この考えは広く認められつつある。しかし、V3領域の切断がウイルスの感染性獲得に必要な不可欠な因子になっているかについてはまだ異論もあり、結論を得ていない。このような議論はあるものの、細胞膜表面上で作用する蛋白性、またはペプチド性のプロテアーゼイン

ヒビターがHIV感染を阻止することも事実で、最近ではヒトの唾液中にある抗HIV物質がAntileukoproteaseであったとの報告(8)もある。

以上に述べたHIVgp120のV3領域を中心とした研究の流れの他に、本年になってHIV感染に関与するTリンパ球側の膜融合因子がexpression cloningによって同定された。最初に同定された因子は、これまで別の研究ですでに明らかにされていたT細胞に局在するCXC型の chemokine receptor (7回膜貫通型ドメイン受容体, FusinあるいはCXCR-4と命名)であった(9)。次いでマクロファージから、同じく7回膜貫通構造を持つCC型chemokine receptor(CC-CKR-R-5とCC-CKR-3)が同定された(10)。さらに最近、CXCR-4のリガンドとして従来白血球の遊走活性物質として知られたSDF-1 (Stroma cell-derived factor-1)が同定され、SDF-1に強い抗HIV活性があることが報告された(11)。このようなchemokine receptorの研究とgp120のV3領域、V3領域の分解との接点はいまのところ不明である。さらに、何らかのプロテアーゼがChemokine receptorのシステムに関与するかについても、V3領域との接点の解明と共に検討しなければならない。

この項ではHIVレセプターとプロテアーゼに関する最近の研究の動向を述べてきたが、このような研究の取り組み以外にも、ウイルスを取り巻くプロテアーゼ研究としては、各種のウイルス自体が持つプロテアーゼの阻害剤が抗ウイルス剤として有望であることが最近注目されており、ウイルス自体のプロテアーゼと感染に関与する宿主側のプロテアーゼについて、一層の研究の発展が期待されている。

文献

- (1) Kido, H. et al. (1991) *J. Biol. Chem.*, **265**, 21979-21985.
- (2) Avril, L.-M., et al. (1993) *FEBS Lett.* **317**, 167-172.
- (3) Callebaut, C., et al. (1993) *Science* **262**, 2045-2050.
- (4) Bristow, C. L., et al. (1995) *Int. Immunol.* **7**, 239-249.
- (5) Handley, M. A., et al. (1996) *J. Virol.* **70**, 4451-4456.
- (6) Werner, A and Levy, J. A. (1993) *J. Virol.* **67**, 2566-2574.
- (7) Moore, J. P. and Nara, P. L. (1991) *AIDS* **5**, S21-S33.
- (8) McNeely, T. B., et al. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 456-464.
- (9) Feng, Y., et al. (1996) *Science* **272**, 872-877.

(10) Drabic, T., et al. (1996) *Nature* 381, 667-673.

(11) Bleul, C. C., et al. (1996) *Nature* 382, 829-833.

(木戸博：徳島大学酵素科学研究センター)

4. アルツハイマー病アミロイド前駆体蛋白質の代謝

痴呆の原因としてアルツハイマー病が注目されている。その病理的な特徴は、細胞外に出現する老人斑と神経細胞内に蓄積する神経原線維変化である。アルツハイマー病における神経変性の原因がこの病理学的変化によるものなのか、あるいはこの病理学的変化は神経変性後のものであるのかについては決着がついていない。ある高名なアルツハイマー病の分子遺伝学者は（あるセミナー出席者からの間接伝聞なので名は伏せさせていただく）、老人斑や神経原線維変化を「墓石」と称したという。つまり、土葬が一般的な西洋の墓場には屍体が累々と埋葬され、そのうえには墓石が置かれている。だからといって、だれもその墓石が埋葬されたヒトの死因であるとは思わないであろう。つまり、老人斑にせよ神経原線維変化にせよ、なんらかの別の原因で神経細胞が変性をむかえた後に形成された結果であるという。たしかに、老人斑も神経原線維変化も非常に難溶性であり、変性の最終段階である可能性もある。ただ、神経変性の最初の原因の具体的な要因は、老人斑や神経原線維変化以外となると、未だ全く不明である。

老人斑の主成分はアミノ酸40個前後のアミロイドβタンパク質（Aβ）である。様々な議論はあるものの、神経毒性を持ったAβが神経を変性しつつ老人斑を形成するという仮説（アミロイド仮説）に沿った研究が進められている。Aβのクローニングからその前駆体（アミロイドタンパク質前駆体：APP）の存在が明らかになった。その機能は不明であるが、細胞接着などを介して細胞増殖に必須と考えられている。APPは短い膜貫通領域を持った膜タンパク質であり、Aβは膜貫通領域と細胞外領域（N末端側）の境界に位置する。

APPにはオルタネーティブ・スプライシングによりいくつかのサブタイプが存在する。代表的なのが比較的神経細胞に特異的なAPP695、普遍的に分布する

APP751とAPP770である。数字はアミノ酸数を示す。APP751/770はAPP695のN末端側にKunitz型のプロテアーゼ阻害配列が挿入されている。APPは正常状態でも発現されており、なんらかの異常代謝によってA β が神経を変性させながら蓄積するというのがアミロイド仮説である。APPの代謝で精力的に研究が進められているのがその分泌系である。最初に報告されたのがA β の配列内で切断してN末端側を分泌する α 分泌(α セクレターゼ)である。このN末端側の断片は、従来プロテアーゼ阻害因子として研究されていたNexin IIであった。

ところが、病的状態で初めて分泌されると思われたA β 自身も、微量ながら正常でも分泌されることが明らかになった。このA β の分泌は1993年のイタリアのアルツハイマー病国際会議で発表され、ベニス観光に浮かれていた筆者は愕然とした思い出がある。A β の分泌は β 分泌とよばれ、そのN末端側を切る酵素を β セクレターゼ、そのC末端側を切る酵素は γ セクレターゼと命名されている。正常状態でもA β が分泌されているとアミロイド仮説が揺らぐように思われる。しかし、A β のC末端側の長さによって、その性質が大きく変わることが報告された。アミノ酸40個のA β 40は可溶性で神経毒性も低い。しかし、アミノ酸42個のA β 42は凝集しやすく神経毒性が高い。しかも、微量のA β 42が凝集すると本来可溶性のA β 40も巻き込んで凝集していく、つまり老人斑を形成するというseed(種)仮説が提唱された。実際、病理学的にも、まずA β 42が沈着してからA β 40が溜まるという。また、家族性アルツハイマー病で見いだされたVal717変異もA β 42の比率を上昇させるし、新しい原因遺伝子として研究されているpresenilin-1やpresenilin-2の変異もA β 42を増加させることが明らかに成りつつある。つまりA β 42を増やすような異常によってアルツハイマー病が発症するという説が注目されている。

セクレターゼの性質はAPPを過剰発現する培養系を中心に詳しく調べられているが、いまだ実態は不明である。これらのセクレターゼは、アルツハイマー病の解明に直結するばかりでなく、プロテアーゼとしても興味深い。例えば、 α セクレターゼで切断される領域のアミノ酸を変異させてもその活性は全く変化しなかった。そ

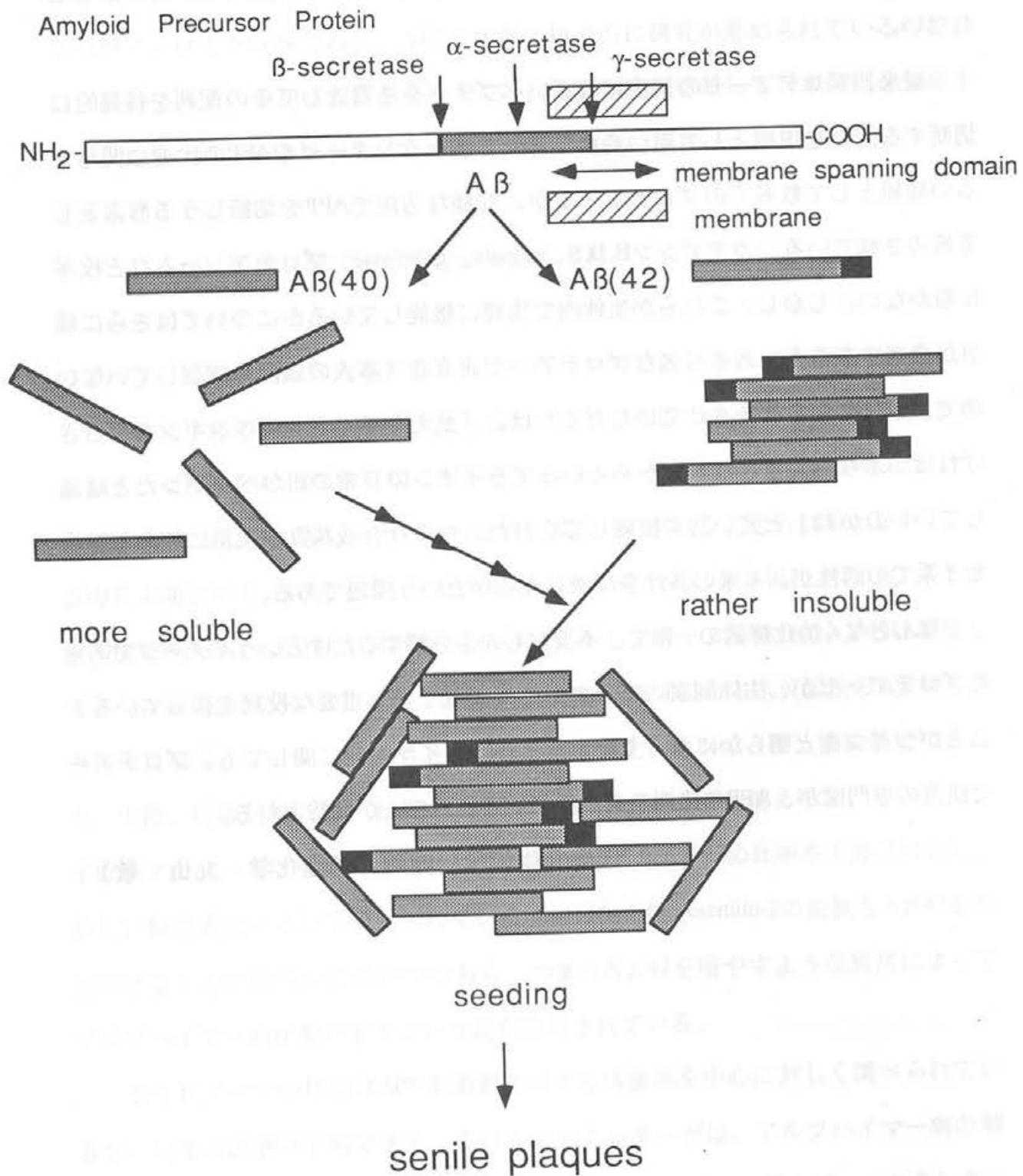
のため、 α セクレターゼはアミノ酸配列ではなくAPPの立体構造、おそらく膜からの長さを認識して切断する分泌複合体であることが考えられる。あるいは、一種類のプロテアーゼではなく多数のプロテアーゼがAPPの代謝に参加しているのかもしれない。

従来、プロテアーゼの同定には短いペプチドを基質としてその配列を特異的に切断する活性を指標として用いられてきた。各セクレターゼやAPPの代謝に関与するの候補として数多くのプロテアーゼが、同様な方法でAPPを切断しうる酵素として報告されている。カテプシンB,D,S、calpain、gelatinase、プロテアソームなど枚挙に暇がない。しかし、これらが生体内で実際に機能しているかについてはさらに検討が必要であろう。ある高名なプロテアーゼ研究者（本人の意図を確認していないので、やはり名を伏せさせていただく）は、「飢えたライオンにペンギンをぶらさげればかぶりつくだろう。だからといってライオンの日常の餌がペンギンだと結論していいのかね」と笑い話を披露してくれた。つまり合成基質を大量に加えたアッセイ系での活性が、本来の活性を反映しうるかという問題である。

なんとなく消化酵素の一種で、不要なものを分解するだけというイメージであったプロテアーゼが、生体制御の本質である（少なくとも重要な役割を担っている）ことがつきつきと明らかになっている。アルツハイマー病に関しても、プロテアーゼ研究の専門家が、APPの代謝を糸口に参加されることが期待される。

（国立生理学研究所 神経化学 丸山 敬）

A β Processing of Amyloid Precursor Protein



5. アポトーシスとプロテアーゼ

アポトーシスに陥る細胞は縮小化し、核クロマチンの濃縮と核を含む細胞の断裂化によってアポトーシス小体を形成する典型的な形態変化を伴い、細胞や細胞内小器官が膨化し、細胞膜の破壊を生じるネクローシスと異なることをKerrら(1)が報告して以来24年を経た。この間、核の形態変化には核の骨格蛋白の分解に加え、DNAのnucleosome単位でのfragmentationが生じることが明らかにされた。アポトーシスが様々な分野から注目され飛躍的に研究が進むに至ったきっかけは、線虫で細胞死が起きる時にはced-3遺伝子が不可欠であること、さらに、ced-3ホモログであるICE (interleukin 1 β converting enzyme)がrat-1 fibroblastsに細胞死を惹起することが明らかにされたことによる(2)。その後、数多くのICE/CED-3関連遺伝子がクローニングされ実際に細胞に発現させることで細胞死を起こすことが示されてきた。現在までに明らかにされたICE/CED-3関連遺伝子は、ICE, Nedd-2/ICH-1L, CPP32とICE関連のTX/ICH-2/ICERelIII/RIC-2, ICERelIII/RIC3、また、CPP32関連のMch3/ICE-LAP3/CMH-1, MCH2の7種類であり、CED-3を加えれば8種類となる(3)。これらのプロテアーゼに共通した最も長いアミノ酸配列はシステインプロテアーゼの活性部位に相当するQACRG構造である。ICE/CED-3プロテアーゼは確かにシステインプロテアーゼであるが、E-64に感受性がなくパンパン系のプロテアーゼと異なるユニークな構造をもつと考えられている。ICEは45kDの前駆体として存在し、CED-3との相同性は28%であり、活性化されると20kD(P20)と10kD(P10)のsubunitに切断され、これらsubunitの各2本づつからなる4量体として作用する。ICEに比べCPP32はCED-3との相同性が高く35%一致する。CPP32 (Yama/Apopain)は活性化されるとP17とP12のsubunitへと切断される。ICEはproIL1 β をAsp-Alaの間で切断し活性化する。一方、CPP32の基質としてはPARPやSREBPが知られている。ICEの基質であるproIL1 β の2箇所の活性化部位におけるP1-P4配列からYVADを、また、CPP32の基質であるPARPの切断部位に対応するDEVDをベースにした人工の基質が作られ、ICE様活性 (YVAD-AMC) やCPP32様活性 (DEVD-AMC) を測定することが可能で

ある。また、これらを基に、ICEやCPP32の特異的インヒビターとして AC-YVAD-CHOやAC-DEVD-CHOが作製されている。牛痘ウイルスにコードされている *cramA* 遺伝子産物はICEの特異的インヒビターとして同定されたが、現在では広くICEファミリープロテアーゼ活性を阻害することがわかっている。CramAはセリンプロテアーゼインヒビターとして知られるセルピンスーパーファミリーに属し、最近では細胞障害性T細胞から放出されアポトーシスカスケードを誘発するグランザイムBを阻害することも報告されている(4)。ICEはCPP32の上流に位置し、活性化されたICEがCPP32を活性化すると考えられている。今日、ICE/CED-3ファミリープロテアーゼがアポトーシスのカスケードの中で果たす役割が次第に明かにされつつある。しかし、問題となるのは個々の細胞の細胞死で、これらプロテアーゼファミリーの中でどのような酵素が関与し、それら酵素間でいかなる相互関係を有しているのか、等解決されねばならない問題が山積している。さらに問題は、最も重要な核DNAの断裂化を惹起するカスケードにつながるこれら酵素の基質が未だ不明な点である。最近、Deissら(5)は、ICE/CED-3ファミリープロテアーゼとは異なりリソゾームのアスパルギン酸プロテアーゼとして知られるカテプシンDが細胞死を惹起すると報告している。antisense cDNA expression librariesをHeLa細胞に遺伝子導入することにより、遺伝子をランダムに不活化した細胞系を作製し、interferon γ , Fas, TNF- α 等のアポトーシスを惹起する条件下で細胞培養し、生存する細胞を解析することによりカテプシンDの作用を明らかにしている。カテプシンDは指の形成過程において、指間間葉系細胞やapical ectodermal ridge areaに特異的に発現し、cyclophosphamide処理して指間間葉系細胞のアポトーシスを促進するとカテプシンDの発現も増強されるとの報告もあり、programmed cell deathにおいてもカテプシンDが何らかの形で関与することが考えられる(6)。今後、リソゾーム系プロテアーゼが細胞死にいかなる形で関与するのかが問題となろう。

文献

- (1) Kerr J.F.R., Whillie A.H., Currie A.R.: Brit. J. Cancer. 26:239-245, 1972

- (2) Miura M., Zhu H., Rotello R., Hartwig E., Yuan J.: Cell 75:653-660, 1993
- (3) Patel T., Gores G.J., Kaufmann S.H.: FASEB J. 10:587-597, 1996
- (4) Miura M., Friedlander R.M., Yuan J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8318-8322, 1995
- (5) Deiss L.P., Galinka H., Berissi H., Cohen O., Kimchi A.: EMBO J. 15:3861-3870, 1996
- (6) Moallem S.A., Hales B.F.: Teratology 52:3-14, 1995

(内山安男：大阪大学・医)

(6) トピックス

1. 酵母のプロテアーゼ：酵母ゲノムプロジェクト完結によるプロテアーゼ情報の解析

*Saccharomyces cerevisiae*のゲノム解析が完了したので、そのプロテアーゼに関して調査しろとのご下命でしたので、以下の表にまとめさせていただきました。この表は、Yeast Protein Databaseをもとにしているのですが、酵母のプロテアーゼのすべてを網羅していないかもしれないことをお断りしておきます。(データベースには、酵母のタンパク質はすべて登録されているそうですが、キーワードで、検索しているためです。) SWISS-PROT Protein Sequence Data Bankでは、peptidase familiesをその触媒活性部位によって、Ser-type, Thr-type (proteasome), Cys-type, Aspartic-type, Metallo-type, その他に分類しています。これらのtypeは、さらに、多くのfamilyに分類されています。表にもこの分類を入れるべきだったのですが、十分な時間がなく、触媒活性部位による分類のみ、示させていただきました。ここでは、Cys-typeのプロテアーゼについて、少し詳しく、述べさせていただきます。酵母には、19種のCys-typeのプロテアーゼが存在します。その内、13種はUbiquitin C-terminal hydrolase family 2 (C19)に分類されています。データベースで見つからない3種もC19であろうと思われます。YUH1は、Ubiquitin C-terminal hydrolase family 1

(C12)に分類されています。この2つのfamilyは、ubiquitinのC末端のGlyを認識して、そのイソペプチド結合（チオエステル結合も）を加水分解します。Human tre-2, mouse Ode-1などがC19に属します。哺乳類のubiquitin C-terminal hydrolase isozyme L1とL3はC12に属します。残りの2つは、papain family (C1)に属するLAP3と calpain family (C2)に属するYMR154Cです。LAP3はbleomycin hydrolaseに類似性を持っています。Berti & Storerは、papain superfamily (SWIS-PROTのC1とC2)を活性中心周辺のアミノ酸配列から3つのグループ、papain (cathepsin B, C, H, L & S), bleomycin hydrolase, calpainに、分類し(J. Mol. Biol 246:273-283, 1995)、バクテリア由来の配列が2つのグループ、calpain (*Porphyromonas gingivalis*, genbank:M84471)と bleomycin hydrolase (*Lactococcus lactis*, genbank:M86245)に見いだされることを報告しています。彼らは、*Lactococcus lactis*の配列は真核生物からのgene transferによるものだが、*Porphyromonas gingivalis*の配列はeukaryote/prokaryoteの分化以前の祖先配列から由来したものと推測しています。酵母にはpapain groupに属する配列は無いようです。Calpain groupの由来は古く、papain groupは比較的新しく分化してきたのでしょうか？

(都・臨床研・遺伝情報：川崎博史)

プロテアーゼ

gene	MW	type (active site)	knockout	
AAP1	97634	metallo	viable	Ala/Arg aminopeptidase
APE2	95294	metallo	viable	Leu aminopeptidase
APE3	56867	metallo	viable	Pro/塩基性アミノ酸 aminopeptidase, aminopeptidase Y
LAP4	51681	metallo	viable	aminopeptidase I
YIL137C	107706	metallo	?	aminopeptidaseと類似
YHR132C	47219	metallo	?	Carboxypeptidase?
YIL108W	77412	metallo	?	?
YKL134C	84034	metallo	viable	thiol dependent metallopeptidase
AXL1	138208	metallo	viable	α factor 前駆体を Asn/Tyr で切断
CPS1	60129	metallo	viable	Gly-X carboxypeptidase (Carboxypeptidase S)
PRD1	78726	metallo	viable	Proteinase YSCD, Saccharolysin
STE23	113256	metallo	viable	insulin-degrading enzyme のホモログ
AFG3	82180	metallo	?	AAA family, ftsH ホモログ
RCA1	88412	metallo	viable	ATPase, AAA protease, ftsH ホモログ
YME1	81768	metallo	viable	ATP-dependent neutral zinc-protease? <i>E. coli</i> ftsH に類似
PIM1	125001	Ser	viable	ミトコンドリア ATP dependent protease (<i>E. coli</i> La ホモログ)
PRB1	30013	Ser	viable	Protease B
YCR045C	53179	Ser	?	protease B and subtilisin に類似
PRC1	47158	Ser	?	Carboxypeptidase Y
DAP2	93373	Ser	?	Dipeptidyl aminopeptidase B/proryl oligopeptidase family
KEX1	79568	Ser	viable	Carboxypeptidase, 末端の Arg/Lys. を切断 α factor processing
KEX2	76571	Ser	viable	dibasic sequence を切断, α factor processing
YSP3	49772	Ser	?	Subtilisin-like protease III
IMP1	21432	Ser, Lys	viable	signal peptidase
IMP2	18170	Ser, Lys	viable	signal peptidase
SEC11	14686	Ser, Lys	lethal	signal peptidase
BAR1	61143	Asp	viable	α factor を分解
YAP3	57767	Asp	viable	paired basic sequence を切断, Aspergillopepsin I
YDR349C	64480	Asp	?	BAR1, YAP3 と aspartyl protease に類似
YLR121C	54573	Asp	?	YAP3 に類似

YIR039C	58179	Asp	?	aspartic proteaseに類似
MKC7	64204	Asp	viable	塩基性アミノ酸に特異的らしい
PEP4	35726	Asp	?	Protease A
CDC13	104893	Asp?	?	?
LAP3	55488	Cys	viable	aminopeptidase (酸性アミノ酸)
☆ YMR154C	83117	Cys	?	<i>C. elegans</i> calpainに類似
YUH1	26368	Cys	viable	ubiquitin C-terminal hydrolase
UBP1	92714	Cys	viable	ubiquitin C-terminal hydrolase
UBP2	146303	Cys	viable	ubiquitin C-terminal hydrolase
UBP3	101916	Cys	viable	ubiquitin C-terminal hydrolase
DOA4	105198	Cys	viable	ubiquitin C-terminal hydrolase
UBP5	92269	Cys	viable	ubiquitin C-terminal hydrolase
YFR010w	57109	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase (UBP6 ¹⁾)
UBP7	123133	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase
(Ubp8) ²⁾	54kDa	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase (Acc# P43593 ¹⁾)
UBP9	86241	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase
YNL186w	88492	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase (UBP10/Str4? ¹⁾ accession#から)
UBP11	82711	Cys	viable	ubiquitin C-terminal hydrolase
UBP12	143085	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase
UBP13	77177	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase
UBP14	91082	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase
(Ubp15) ²⁾	143kDa	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase (Acc# P50101 ¹⁾)
(Ubp16) ²⁾	57kDa	Cys	?	ubiquitin C-terminal hydrolase (Acc# U41849 ¹⁾)
YIM1	41652	?	?	ミトコンドリア内膜 protease, <i>E. coli</i> leader peptidaseに類似
YNL212W	88815	?	?	Cypro4 (<i>C. cardunculus</i> ; 植物)に類似, Cypro4はプロテアーゼに対する抗体と反応
MKT1	94475	?	viable	retroviral protease signature, DTG を持つ
YLR271W	32002	?	?	retrovirus-related proteaseに少し似ている
YLR424W	83017	?	?	N末端が少しだけretovirus-related proteaseに似ている

プロテアソームサブユニット

gene	α / β	knockout ¹⁾	synonym
PRE5	α	lethal	YM9924.06/YMR314W
PRE6	α	lethal	O2065/YOL038W
PRE8	α	lethal	Y7/YML092C/PRS4
PRE9	α	viable	PRS5/Y13/G6405/YGR135W
PRE10	α	lethal	YC1/O6650/YOR362C/PRS1/PRC1
PUP2	α	lethal	G9155/YGR253C
SCL1	α	lethal	PRC2/YC7 α /YC7/Y8/G3728/YGL011C/PRS2
PRE1	β	lethal	YER012W
PRE2	β	lethal	DOA3/PRG1/SRR2/P8283.15/YPR103W
PRE3	β	lethal	J1407/YJL001W
PRE4	β	lethal	YFR050C
PRE7	β	lethal	PTS1/YBL0407/YBL041W/PRS3
PUP1	β	lethal	O3554/YOR157C
PUP3	β	lethal	YER094C



ユビキチン依存性の蛋白質分解に関与するタンパク質¹⁾

gene	MW	knockout
E1-like (ubiquitin activating) enzymes		
UBA1	114094	lethal
UBA2	71236	lethal
YPR066w	33264	?
E2 ubiquitin-conjugating enzymes		
UBC1	24168	viable
RAD6	19551	viable
CDC34	34020	viable
UBC4	16322	viable
UBC5	16148	viable
UBC6	28378	viable
UBC7	18516	viable
UBC8	23209	viable
UBC9	17918	lethal
PAS2	21112	viable
YOR339c	17745	?
UBC12	21201	?
UBC13	17464	?
E3-like proteins		
Ubr1-related proteins		
UBR1	224770	viable
(Ubr2) ²⁾	217kDa	?
Hect-domain proteins		
RSP5	91805	lethal
(Ufd4) ²⁾	168kDa	viable?
(Tom1) ²⁾	374kDa	lethal
(Hct4) ²⁾	103kDa	?
(Hct5) ²⁾	168kDa	?

染色体# 1 2 187,664-193,282のORF (Acc# none¹⁾)

(Acc# P33202¹⁾)
 (Acc# U33050¹⁾)
 (Acc# P40985¹⁾)
 (Acc# none¹⁾)

1) Hochstrasser, M. Ann. Rev. Genet. 30:405-39, 1997

2) 対応する遺伝子をデータベースから見つけられなかった。

データベース

Saccharomyces Genome Database

<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

Yeast Protein Database

<http://quest7.proteome.com/YPDhome.html>

2. HslV-HslUプロテアーゼの発見 (Chin Ha Chung博士の講演から)

平成8年8月1日、韓国ソウル大学分子生物学研究所のChin Ha Chung教授が東京都臨床医学総合研究所で臨床研セミナーを行った。本稿はChung博士(以下敬称略)の講演とその後に討論した話題について整理したものである。Chungは私の親友であり、私が約15年前に米国ハーバード大学医学部生理学部門(現分子細胞生物学部門) Alfred L. Goldberg教授のラボにポスドク研究員として留学していたときの仲間である。爾来、友人としてまた共同研究者としての長い歳月を経て今日に至っている。さて、当時は大腸菌のATP依存性プロテアーゼとして唯一知られていた酵素がLONプロテアーゼであり、Goldbergのラボでの本酵素の研究は当時カルパインの酵素学研究者としても知られていたL. WaxmanとChungが互いに反目しながら活発に進めていた(幸いにも私はこの競合に加わらなかった)。思い返してみると当時のGoldberg研はATP依存性プロテアーゼの登場で従来のプロテアーゼ学を一変する息吹に燃えていたことが鮮やかに甦ってくる。その後、ChungはGoldbergとの共同研究としてNIHのGottesman(彼女もLONプロテアーゼの研究者で、Goldbergとは互いに意識しているか否かは側聞しないが、私は宿命のライバルのように眺めている: 勿論Goldbergは誰とでも敵対するのが得意であるが)らと同時期に第二のATP依存性プロテアーゼであるClp (Caseinolytic Protease: 私はこのセンスのなさの命名にいつも嫌悪すら覚える。皆さん命名はエレガントに行いましょう)を発見し、韓国に帰国後もこの酵素の研究を行ってきた。Chungは1992年にScience誌にClpのミニレビューを執筆したほか、毎年、J. Biol. Chem.に数編の原著論文を発表するなど、韓国を代表する若手研究者となった。その後の大腸菌のATP依存性プロテアーゼの研究史を緋けば、ClpはClpAPとClpXPの触媒サブユニット(ClpP)を共有しATPサブユニット(ClpAとClpX)の異なる二種の酵素として存在することが1992年頃に見い出され、さらに第4番目の膜結合型ATP依存性メタロプロテアーゼFtsHが小椋や秋山ら日本人のグループによって独立に発見されたのは1994年のことである(“ぶろておりしす”第1号所収: 小椋氏のミニレビュー参照)。そして、大腸菌

における第5のATP依存性プロテアーゼ“HslV-HslUプロテアーゼ”の発見は偶然であった。この酵素の発見に至る道程は、真核生物のATP依存性プロテアーゼである26Sプロテアソームの研究を抜きにしては語るができない。26Sプロテアソームが複数のATPaseサブユニットを含む調節ユニットとスレオニンプロテアーゼとしての触媒ユニット（20Sプロテアソームとして発見された）の複合体であることは、もはや周知の事実になっている（1）が、不思議なことにこれらは、Lon, Clp, FtsHなどの大腸菌ATP依存性プロテアーゼ群との構造類似性がほとんど存在しなかったのである。共通点と言えば、FtsHとプロテアソーム結合ATPaseのATP結合部位が、AAAファミリーATPase（2）に属することのみであった。

さて、話の発端はShuang-Enらによる大腸菌の新しい熱ショックタンパク質の「掘り起こし」の研究に遡る。彼らは、熱応答で上昇するタンパク質を詳細に研究し、それらをコードする遺伝子群Hsl (heat shock locus)を26個発見し、HslAからHslZまで名付けた（丁度26個と言うのは胡散臭いのであるが）（3）。そして、HslUとHslVの遺伝子がオペロンを構成していることが判明し、驚いたことに、HslUとHslVは各々26SプロテアソームのATPaseとスレオニンプロテアーゼサブユニットに高い相同性のあることが判明した。即ち、構造的にプロテアソームの祖先型遺伝子と想定されたのである。この発見に興味を持った研究者は世界に数多くいた。Shuang-Enらは勿論のことGoldberg教授もその一人であり、プロテアソーム関係のことなら何にでも興味を示す私もその中の一人であった。私はHslUとHslVの酵素学・蛋白化学解析を一刻も早く進める必要があると考え、このことをChungに提案した。彼はこのオペロン遺伝子を分離して早々と発現系を作製することに成功し、忽ちにHslUとHslVの純粋標品を持つ世界で最初の研究者となった。HslVの精製は他のグループも成功していたが、HslUの分離は容易でなかった。Goldberg教授もChungの成功を知り、共同研究を求めた。その結果、HslUがATPaseであり、HslVがスレオニンプロテアーゼであることが判明し、両者が共存するとATP依存性プロテアーゼとして作用することが判明した。これらの結果は、本年6月、Proc. Nat. Acad. Sci. USA（4）

とJ. Biol. Chem. (5) に同時に発表された。酵素学的性質の詳細は原著論文を参照されたい。これら二種の論文は、ほぼ同じ内容であり、しかもGoldberg教授とChungの名前が両方に入っている。Chungの話によると、当初はScienceに投稿することで議論を進めていて、彼は当然彼の大学院学生が筆頭著者になることを提案したが、Goldberg教授は彼のポストドク研究者を筆頭著者にと行って譲らないので、両者の筆頭著者論文を作製するために仕方なく二誌に別々に投稿したそうである。Chungは論文が二つになったから、「まあいいか」と言っていたが、彼の学生の貢献度が圧倒的に高いのにと少なからず不満げであった。Chungにとっては、Goldberg教授は言わば、かつての恩師でもあることを鑑み、東洋の謙譲の美德精神を発揮して「一步譲った」と強調していたが、この行為がGoldberg教授に伝わっているか否かは不明である（と言うのは、この美德精神は欧米人から共感を得ることは屢々困難である。なぜなら、議論から引き下がれば往々にして敗者の烙印を押されるからである）。しかし、話は片方からしか聞いていないので、次回にはGoldberg教授の言い分も聞いてみなければと思っている。現在、Chungの学生が博士後研究者としてGoldberg研で研究しているので、この件については勘定は合っているように思われる。

さて、これらのことから、大腸菌には少なくとも5種のATP依存性プロテアーゼが存在することになる。それらの構造特性を図に示した（本図は熊本大学・小椋氏より供与された）。最近、ChungはGoldberg教授及びW. Baumeister教授（独マックスプランク研究所）との共同研究で、HslUとHslVの電子顕微鏡撮影に成功した。不思議なことであるが、HslUとHslVとの複合体は、非常に不安定で分離精製できないそうである（分子篩クロマトグラフィーの操作ですら解離するとのことである）。従って、二量体としての分子構造は不明である。興味深いことは、HslUが7量体であるのに反してHslVが6量体であることである。これは、ClpAPの場合にはClpAが6量体で、ClpPが7量体であり、ATPaseユニットと触媒ユニットの分子構成が逆である。また、真核生物や古細菌プロテアソームの触媒ユニットが7量体のリングを形成していることと大きく異なる。しかも、真核生物プロテアソームの新しい活性

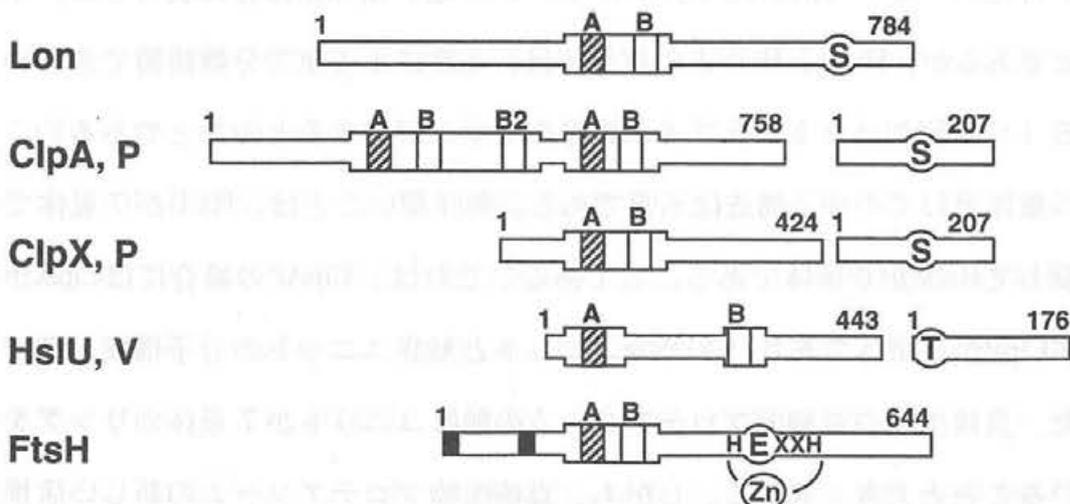
化因子として発見されたPA28が α と β の二種のサブユニットが $(\alpha\beta)_3$ の6量体であることも考え合わせると、摩訶不思議であると言わざるを得ない。もしかすると、分子シャペロンやATP依存性プロテアーゼは、このような大きなリング型構造をとることが大事で、それらが6量体であるか7量体であるかは大きな問題ではないのかも知れない（小椋氏：談）。いずれにしてもこれらの酵素の構造と機能に関する詳細は今後の研究の進展を待たねばならない。また、HslUとHslVの遺伝学的な機能解析についても早急に行われるべきであろう。このことに関連して言えば、HslUとHslVが熱ショック蛋白質として同定されたことは、この酵素の運命（生理的役割の解明も含めて）を決定的にする予感がする。言い換えれば、私の念頭から消えることのない“プロテアーゼ”と“分子シャペロン”の連携を示唆する新たな分子が登場したことになる。この視点からも興味の尽きない酵素でもある。

文献

- 1) Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A. L. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* 65, 801-847.
- 2) 小椋光 他、(1996) *細胞工学*, 15, 968-980.
- 3) Shuang-En, C. et al., (1993) *Gene* 134, 1-6.
- 4) Rohrwild, M. et al., (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93, 5808-5813.
- 5) Yoo, S.J., Seol, J.H., Shin, D.H., Rohrwild, M., Kang, M.-S., Tanaka, K., Goldberg, A.L., and Chung, C.H. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 14035-14040.

(田中啓二：都臨床研)

ATP-dependent proteases in *E. coli*



3. MHCはクラス I 抗原提示装置か？

哺乳類のMHCにはクラス I 抗原の提示に関与する遺伝子が集結している。クラス I a鎖の遺伝子は言うに及ばず、抗原ペプチドの切り出しに働くプロテアソーム・サブユニットのLMP2, LMP7、ペプチドの小胞体 (ER) 内部への輸送を司る膜トランスポーターTAP1, TAP2の遺伝子がクラスII領域のわずか40kbの範囲内に存在しているのは偶然とは考えにくい。更に、クラスIII領域に存在するHSP70も分子シャペロンとして抗原提示過程に関与している可能性が疑われているとなると、MHCは基本的にクラス I 抗原の提示装置の設計図なのではないかと思えてくる。構造上は、クラス I a, LMP, TAP, HSP70の間には際だった共通性は認められず、これらは機能相関、構造無関係遺伝子の複合体といえる。ここではMHCはクラス I 抗原の提示のために作られた遺伝子複合体であるという仮説を、LMP2, LMP7の起源と進化について最近判明した事実に基づいて検証したい。

LMP2, LMP7がそれぞれ対応する構成的サブユニットY, Xから遺伝子重複によって生じた事(1)に異論はないであろう。問題はその時期であるが、X/LMP7の系統発生的解析は、現存する最も下等な脊椎動物といわれる円口類からはXのみを、軟骨魚類、両生類からはX と LMP7の両者を検出し、この重複は脊椎動物の進化の過程で円口類の分岐以後、軟骨魚類の分岐以前に生じた事を示唆した(2)。同様にY/LMP2のペアについても、円口類からはYのみが、両生類からはY、LMP2の両者が確認され、この遺伝子重複も脊椎動物の進化の初期に、円口類の分岐後に生じた事が判明した(未発表)。これらの遺伝子重複は、脊椎動物がその出現当初に経験したとされる二度の四倍体化の際に生じたと考えるのが妥当であろう。興味深いことに、クラス I, II分子もほぼ同時期に出現したと考えられている。しかしながら、クラス I, II分子には直接の祖先は見あたらず、Y, Xという直接の祖先を有するLMP2, LMP7とは対照的に、これらの分子は四倍体化では説明できない新たな創造物と思われる。さて遺伝子重複の時期はほぼ特定されたが、それではLMP2, LMP7遺伝子がTAP遺伝子と入れ子になって存在する哺乳類MHCに見られる様な遺伝子配

置はどの様にできあがり、どの様な意味を持っているのだろうか？これらの疑問に答える一つの手がかりは、下等脊椎動物に於いてLMP2, LMP7遺伝子座を明らかにすることによって得られるであろう。アフリカツメガエルは下等脊椎動物としてはMHCの構造解析が進んでおり、これまでにクラスIa、クラスIib、補体C4, Bf、HSP70の遺伝子がクラスターを形成している事が判明していたが、LMP2, LMP7, X, Y遺伝子とMHCとのリンケージを検討したところ、LMP7のみがMHCと連鎖していた(3)。この結果はアフリカツメガエルのMHCが未完成の状態であることを示し、現在の哺乳類に見られる遺伝子配置が構成遺伝子の個別の集合によって出来上がったことを示唆している様に見える。しかしながら、一度は連鎖していたLMP2がアフリカツメガエルで二次的にMHC外へ移動してしまった可能性も否定できず、他の下等脊椎動物での情報が待たれるところである。硬骨魚メダカでの予備的な結果によれば、LMP2/7とクラスII遺伝子は連鎖していない様である(未発表)。これらの結果は、MHCが今日の哺乳類に見られる様な形で突然出現したのではなく、順番に各遺伝子が集まってきて出来上がったことを示唆している。ここで想像を逞しくすると、以下の様なMHCの進化の様子が見えてくる。”LMP, TAP, HSP70はいずれも、細胞の生存にとって必須であったそれぞれの祖先から、脊椎動物の出現直後の四倍体化によって余剰なコピーとして出現し、その頃創造されたクラスI遺伝子と偶然隣接することにより、抗原提示という特殊化した機能を獲得していった。その後、クラスII遺伝子や雑多なクラスIII遺伝子が加わり哺乳類型MHCが出来上がった。”それではなぜLMP2/7, TAP1/2遺伝子は哺乳類のクラスII領域に存在するのであろうか？この疑問にもアフリカツメガエルが答えてくれる。連鎖解析の過程で確認されたMHC内での組み換え体二個体の解析から、アフリカツメガエルMHCはサブ領域がクラスII-クラスI-クラスIIIの順に並んでいること、及びLMP7遺伝子はクラスIIとクラスIの間に存在するらしいことが示された(未発表)。従って、クラスI抗原の提示に関わる遺伝子がクラスII領域に存在する哺乳類MHCの不自然な配置は、MHC内における二次的な遺伝子再編の結果と理解される。ここに、MHCの原型はクラスI抗

原の提示装置であり、これは新たに出現したクラスI遺伝子が自分の近くに必要な遺伝子の一つずつ呼び集め、抗原提示に都合の良い様に教育し直す事によって形成されたとする考えを提唱したい。一方、笠原らは哺乳類ゲノム中にはMHCのコピーと考えられる領域が存在することを示し、これはおそらく四倍体化の名残でありMHCの重複時には既に複数のプロテアソーム・サブユニット遺伝子とトランスポーターの遺伝子がクラスターを形成していたと説明した(4)。クラスI遺伝子との出会いがMHCの成立に決定的な出来事であったとする点は同じであるが、その成立の過程はずいぶん異なる事になる。硬骨魚、軟骨魚のMHCの構造解析が、原始MHCの姿とその発展の様子を解き明かしてくれるだろう。

文献

- (1) Akiyama et al. (1994) Science 265:1231.
- (2) Kandil et al. (1996) J. Immunol. 156:4245.
- (3) Namikawa et al. (1995) J. Immunol. 155:1964.
- (4) Kasahara et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9096.

(名市大・医・野中 勝)

(7) 掲示板コーナー

“ぶろておりしす伝言板”

世に受け入れられない仮説も自由に発表できるコーナー。このコーナーでは、技術的な問題への質問コーナーとしても利用して頂くと共に回答コーナーを設け対処したい。また新しい有用な情報があれば、班員に知らせたい。本号では、年輩の研究者には頭の痛い“インターネット”（この言葉で吐き気がしませんか！）で「蛋白分解情報を探るノウハウ」を小椋氏にまとめて頂いた。

インターネットで探るプロテアーゼ情報

インターネットの普及により、生物学に関連する情報を迅速に手に入れることが可能になってきた。しかし、プロテアーゼの情報に関しては最近までリファレンスとなるべき良いサイトが無かったが、最近、「PROLYSIS: a protease and protease inhibitor Web server」という、プロテアーゼ関係の情報を網羅的に紹介しているサイトが立ち上がった。本重点の班員の大部分の研究と密接に関連する「PROLYSYS」を紹介する。「PROLYSYS」とはUniversity Francois RABELAIS, TOURSのMOREAU博士により作成されたウェブページで、プロテアーゼとそのインヒビターに関する情報を網羅的に整理している。しかも、アニメーションを用いるなど非常に興味深く紹介している。ホームページのURLは <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/> である。ではその内容をホームページの目次に沿って簡単に紹介する。**What's New at PROLYSIS?:** 最近二、三ヶ月の間に追加・変更された情報が掲載されている。Introduction to the proteases: プロテアーゼについての基本的な情報、たとえば、活性中心による分類とそれぞれの活性中心における基本機構についての図が紹介されている。**Nomenclatures:** ここでは、Rawlings & Barrett両博士によるpeptidaseの分類表とECナンバー表が掲載されている。分類表からはEMBLやSWISS-PROTのエントリーを孫引きすることができるようになっており、この表をダウンロードしておけば、現在知られているすべてのpeptidaseについて迅速に情報を検索できる。

Proteases as biochemical tools:プロテアーゼの実験的手法における利用を紹介している。まだ未完成。**Structure of the proteasome:**ここでは、Koop博士による *Thermoplasma acidophilum*, Rat skeletal muscle由来のプロテアソーム複合体の電子顕微鏡写真や、Lowe博士による *Thermoplasma acidophilum*由来の20Sプロテアソーム複合体のX線解析による構造イメージ (JPEGファイル) を閲覧、取得できる。**Protease inhibitors:** プロテアーゼインヒビターについての情報が紹介されている。まだ未完成だが、構造や阻害機構に加えて溶媒や使用濃度についての記述もある。**Synthetic substrates for proteases:** プロテアーゼ活性測定用の合成基質についての情報が提供されている。これも、構造や検出機構だけでなく、実際の用法にまで言及しているので有用である。**Some kinetics:** プロテアーゼのkineticsを研究するときに必要な教科書的情報がコンパクトにまとめられている。これを読めば教科書はいらない?**List of 3D structures:** Protein Data Bankに登録されているプロテアーゼの三次元構造データのコード名の一覧表である。**Image gallery of proteases and protease inhibitors :** Protein Data Bankに登録されているX線解析に基づくイメージ (JPEGファイル) を提供している。内容はプロテアーゼの活性中心や基質、インヒビターの結合状態などである。**Molecular animations:** Kinemageで作成されたアニメーションが紹介されている。閲覧にはMAGEと呼ばれるviewerが必要だが、これもこのページから取得できる。**Mailing lists and Newsgroups :** プロテアーゼ研究者のmailing listとプロテアーゼの話題を扱うニュースグループの情報。**Interesting Internet links:** プロテアーゼ関係のリンクを主にした生物情報や雑誌のリンク集。参考までに主な項目だけ挙げておく。How do cells know which proteins to degrade, and when ?/The HIV protease images home page/Insight Gallery of Carboxypeptidase A/The protein motions database/Guide to Protein and Peptide Cleavage Recipes/The RASMOL home page。**Some good references:** プロテアーゼ関係の本やReviewの情報。**Newsroom:** 最近のトピックについての簡単な要約とリファレンス。**Feedback form:** PROLYSISについての要望や感想を入力するためのフォームが用意されている。とにかく、百聞は一見にし

かず、一度アクセスしてご覧になっていただきたい。一見の価値は十分にある。なお、多少アクセスに難があるようなので、ネットワークの状況が良いときに接続されることをお勧めする。また、くれぐれもネットサーフし過ぎて研究をおろそかにしないように、上手に利用しましょう。PROLYSISを見ればプロテアーゼに関連するほとんどの情報を見ることが可能になったが、「細胞工学」7月号に「インターネットで情報収集：AAAスーパーファミリー、ユビキチン/プロテアソームの情報」というコラムを書かせていただいた。この記事を書いた時点ではPROLYSISの存在を知らなかったため、それ以外のサイトを紹介している。これも役に立つことがあるかもしれないので、内容はコラムの記事をご覧頂くことにし、紹介したURLを参考まで載せておく。

<http://ycamob.pci.chemie.uni-tuebingen.de/>

<http://www.blocks.fhcrc.org/>

<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html> (小椋 光・龍田高志：熊本大学・医)

Proteolysisの「訳語」募集!

英語のProteolysisはなかなか響きがよい言葉ですが、この単語を「蛋白分解」と訳すと、どうも負のイメージがあって生命科学研究領域に幅広くインパクトを与える用語にはなっていません。また、カタカナで「プロテオリシス」と書いてもどうも意味が十分に把握できない。そこで、適訳を募集します。意識、あるいは思い切って造語でも結構です。事務局において合意が得られれば、本重点研究で積極的に浸透させたいと考えています。採用されれば、その言葉の発明者として日本の生化学史上に燦然と輝き永遠に記憶されることになるでしょう。名前を売る絶好のチャンスです! 賞金は出ませんが、多くの応募があることを期待しています。締め切りは年内を目処にします。知恵を絞って下さい。

(重点領域研究「細胞内蛋白分解」事務局)

この募集に対して、これまでに、以下の応募がありました。

1：蛋白切断

Proteolysisの「訳語」については私も同感です。「蛋白分解」では、nickの入った生理的に重要な段階の表現としては不適切と思います。したがって、「蛋白変異」「蛋白変容」なども考えましたが、やはり直訳の「蛋白切断」が適当と考え提案致します。そうすると「細胞内蛋白切断」となりますが。（金田信、鹿児島大・理学部化学科）

2：プロテオアップ：Proteoup & プロテオアクティス：Proteoactis

共にタンパク質の潜在的な活性化を意味する造語。（森田隆司、明治薬大学）

3：蛋白生分解

「Proteolysis」の訳語の件ですが「蛋白生分解」と言うのを考えました。あまり変り映えのしない言葉で恐縮ですが、生合成に対応する概念を表したつもりです。（滋恵医大・高田耕司）

4：蛋白変身 & 蛋白分活

蛋白変身：プロテアーゼの作用によって基質のタンパク質は、ある場合には低分子ペプチドまで分解され（消化酵素）、あるものは限定分解によって活性化を受けるなど、蛋白質の姿が色々に変わるので「変身」。蛋白分活：これは全くの造語で、「分活」と言う言葉は辞典にも無い。蛋白質がプロテアーゼの作用を受けることによって低分子化されたり、活性化を受けたりすることから、「分解と活性」を合成して「分活」。（小出武比古：姫路工業大学理学部生命科学科）

5：蛋白改変、蛋白改編、蛋白再編、蛋白編集、蛋白編纂、蛋白更新、蛋白再新、蛋白質の分子変容、蛋白輪廻

（村上安子：慈恵医大）

ICOP (International Committee on Proteolysis) について

蛋白分解研究に関する国際的な組織として誕生。日本、米国、欧州に支部があり、本重点領域研究の代表者である鈴木絃一教授と副代表者である木南英紀教授が日本支部の組織委員である。主な活動としては2年毎に"Proteolysis and Protein Turnover"のICOP国際会議を開催すること(本年度は第11回会議が9月にフィンランドで開催された)とICOP Newsletter (J.S. Bond (USA), editor)を発行することである。ICOP Newsletterの主旨は「The purpose of this newsletter is to increase communication among scientists working on proteases (peptidases) and protein turnover」であり、国際会議や出版物の案内のほか、ミニレビューが載っている。日本における責任者は鈴木絃一教授及び木南英紀教授で、ICOP Newsletterの配布を希望する場合は、直接鈴木教授に申し込めばよい。(重点領域研究「細胞内蛋白分解」事務局)

書評

"Intracellular Protein Catabolism" (Eds by Suzuki, K. and Bond, J.S.) Adv. Exp. Med. Biol. vol. 389, 1996, Plenum Press, New York. 本書は本重点研究代表者である鈴木絃一教授が1994年10月に東京で開催した第10回 International Conference and Protein Turnover (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)

「新聞・ニュースから」のコーナー案内

本重点ニュースでは「新聞・ニュースから」のコーナーを設けますので、新聞・ニュース等において本重点研究班班員の記事が目にとまりましたら、自薦でも他薦でも結構ですので事務局にお知らせ下さい。ご存知のように研究成果を国民に還元することは重要であります。研究概要を国民に広く知って頂くためには研究成果が新聞・

ニュースなどのマスメディアに報じられることは、文部省において強く推奨されているところであり、また研究評価としても高く位置づけられています。従って、本重点班員の活躍の指標ともなりますので積極的に新聞・ニュースに登場することが期待されます。

(ぶろておりしす事務局)

(8) 編集後記

重点領域研究「細胞内蛋白分解」ニュース“ぶろておりしす”第2号をお届けします。“ぶろておりしす”第1号を班員以外の関係者にも配布したところ以外と好評(?)で印刷した300部は品切れとなっています(将来プレミアがつき高騰するかも知れませんが、大切に保存しておいて下さい。そんなわけないか!)。余ることを予想していたのですが、引き続いての配布の希望も殺到(?)しています。そのような訳で、一層の充実を計り本ニュース誌を発行し続けてゆきたいと思っています。本誌を良くするも悪くするも班員各位の協力次第です。原稿内容に文句はつきませんので、積極的な投稿を期待しています。次回の本ニュース誌第3号は平成9年2月中旬発行を予定しています。原稿締切は1月末です。原稿が集まらなかった場合には(いつもです:編集部の涙ぐましい努力を察して下さい。しかし驚いたことに第2号では予定外に原稿が集まりすぎて編集に苦勞する羽目になりました!)、1月最初頃に原稿依頼いたしますので、当たった幸運な(?)班員は宜しくお願いします(班員の場合一応、拒否できない仕組みになっているとお考え下さい)。日本語の原稿は細明朝体、英語の原稿はTimesで作成し、e-mailかdiskでお送り下さい。

(重点ニュース“ぶろておりしす”事務局:都臨床研 田中・川島)

(9) 発表論文の概要紹介

班員各位の研究進捗状況を把握する目的で随時発行（巻末添付）。いずれもオフセット印刷しますので、1ページ一杯に巧く記載して下さい。但し、図書・総説は除き原著論文に限定します。班員の自信作を数多く集めたいと考えていますので、“ぶろておりしす事務局”に送って下さい。研究成果を班員相互に素早く伝達する必要性からゲラ刷りの段階でも結構ですので、迅速に作成して頂きたいと考えています。

Cellular Basis for Protein C Deficiency Caused by a Single Amino Acid Substitution at Arg15 in the γ -Carboxyglutamic Acid Domain¹

Fuminori Tokunaga, Toshiro Tsukamoto, and Takehiko Koide²

Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Harima Science Park City, Hyogo 678-12

Protein C is a zymogen of an anticoagulant vitamin K-dependent serine protease. Inherited protein C deficiency is often associated with a high risk for venous thromboembolism. It is characteristic of protein C deficiency that most single amino acid replacements result in type I (secretion defect) deficiency. To determine the molecular and cellular bases of protein C deficiency, we expressed recombinant human protein C mutants in which Arg15 was mutated to either Gly, Trp, Gln, Leu, or Pro by a single base exchange. Arg15 is one of the conservative residues in the γ -carboxyglutamic acid (Gla) domains of the vitamin K-dependent coagulation factors, and is also one of the high frequency multiple mutation sites in protein C deficiency. In transient expression studies using human kidney 293 cells, the relative amounts of Arg15 mutants secreted into the medium and determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were as follows: Gly, 42%; Trp, 14%; Gln, 54%; Leu, 22%; and Pro, 13%, the amount of wild-type (Wt) protein C being taken as 100%. Thus, the order of the secreted amounts of the recombinant mutants was determined to be Wt > Gln > Gly > Leu > Trp, Pro. Pulse-chase experiments using both transiently-transfected and a pool of stably-transfected 293 cells, and stably-transfected BHK cells showed the same order of secretion efficiency. Since this order correlated well with that of the hydrophobicity scale of amino acid side chains, a conformational alteration of the Gla domain resulting in impaired secretion may be dependent on the hydrophobicity of the replaced amino acid. In transient cells, the relative radioactivities of pulse-labeled bands of all recombinant protein C were almost equal, suggesting that the same translational efficiency for Wt and all Arg15 mutants. All of the Arg15-mutated protein C precursors were shown to be located in the same organelle as protein disulfide isomerase (PDI), an endoplasmic reticulum-resident protein, and were sensitive to endoglycosidase H digestion. These results suggest that mutations of the highly conserved Arg15 in the Gla domain of protein C caused a secretion defect to variable degrees depending on replaced amino acid residue.

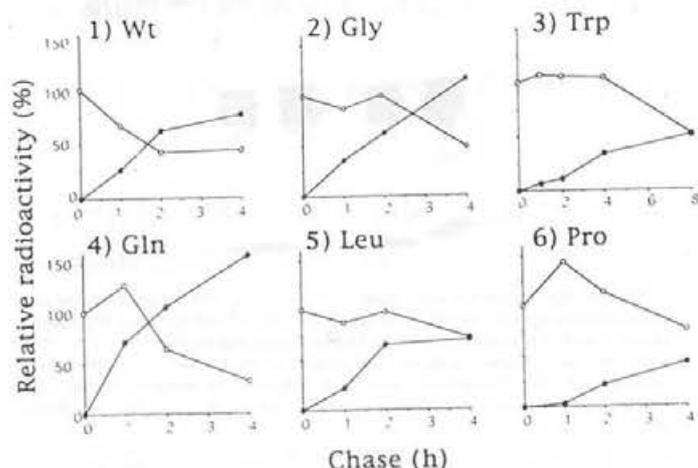


Fig. 5. Kinetic analyses of the secretion of Wt and Arg15 mutants of protein C. The relative radioactivities of intracellular and secreted fractions are shown by open and closed circles, respectively, taking the radioactivity values for the cell extracts immediately after pulse-labeling as 100%. Note that the Trp-mutant was chased for 8 h.

[要約] 遺伝性プロテインC欠乏症は、健常者600人に1人という高頻度に見られ、そのうち3万人に1人の割合で血栓症を引き起こす。プロテインC欠乏症は、血中抗原量と活性が平行して減少するI型（分泌異常型）と、活性のみ減少するII型（機能不全分子

産生型）に大別される。現在までに、350例近くの異常プロテインC遺伝子の解析が報告されたが、これらのうち γ -カルボキシグルタミン酸(Gla)ドメイン中のArg15の多重変異は興味深い臨床結果を示す。つまり、Arg15のGlyへの変異（プロテインC米子）はII型を示し、そのTrpへの変異は5例あるがI型とII型、Glnへの変異はI型となる。これは、変異するアミノ酸の性質により分泌に影響があることを示唆している。本研究で我々は、アミノ酸変異と分泌の相関を分子細胞生物学的に調べるため、Arg15の1塩基置換によって生じる可能性があるGly、Trp、Gln、Leu、Proへの置換体を作成し、293細胞またはBHK細胞を用いて、ELISAまたはpulse-chase法にてその分泌効率を調べた(Fig. 5参照)。その結果、一過性発現、安定発現の293細胞および安定発現のBHK細胞のいずれにおいても分泌効率は、正常型(Arg)>Gln>Gly>Leu>Trp、Proの順となった。この順序はアミノ酸の疎水性度と逆相関しており、側鎖の疎水性度の差によるGlaドメインの構造破壊が分泌効率の低下に関連するものと考えられる。また、全てのプロテインC変異体は細胞内では小胞体内に局在することから、分泌不全型プロテインCの一部は、小胞体内分解を受ける可能性がある。

Bul1, a New Protein That Binds to the Rsp5 Ubiquitin Ligase in *Saccharomyces cerevisiae*

HIDEKI YASHIRODA, TOMOKO OGUCHI, YUKO YASUDA, AKIO TOH-E, AND YOSHIKO KIKUCHI*

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Received 23 October 1995/Returned for modification 27 November 1995/Accepted 26 March 1996

We characterized a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* in which a mini-chromosome was unstable at a high temperature and cloned a new gene which encodes a basic and hydrophilic protein (110 kDa). The disruption of this gene caused the same temperature-sensitive growth as the original mutation. By using the two-hybrid system, we further isolated *RSP5* (reverses *Spt*⁻ phenotype), which encodes a *hect* (homologous to E6-AP C terminus) domain, as a gene encoding a ubiquitin ligase. Thus, we named our gene *BUL1* (for a protein that binds to the ubiquitin ligase). *BUL1* seems to be involved in the ubiquitination pathway, since a high dose of *UBI1*, encoding a ubiquitin, partially suppressed the temperature sensitivity of the *bul1* disruptant as well as that of a *rsp5* mutant. Coexpression of *RSP5* and *BUL1* on a multicopy plasmid was toxic for mitotic growth of the wild-type cells. Pulse-chase experiments revealed that Bul1 in the wild-type cells remained stable, while the bands of Bul1 in the *rsp5* cells were hardly detected. Since the steady-state levels of the protein were the same in the two strains as determined by immunoblotting analysis, Bul1 might be easily degraded during immunoprecipitation in the absence of intact Rsp5. Furthermore, both Bul1 and Rsp5 appeared to be associated with large complexes which were separated through a sucrose gradient centrifugation, and Rsp5 was coimmunoprecipitated with Bul1. We discuss the possibility that Bul1 functions together with Rsp5 in protein ubiquitination.

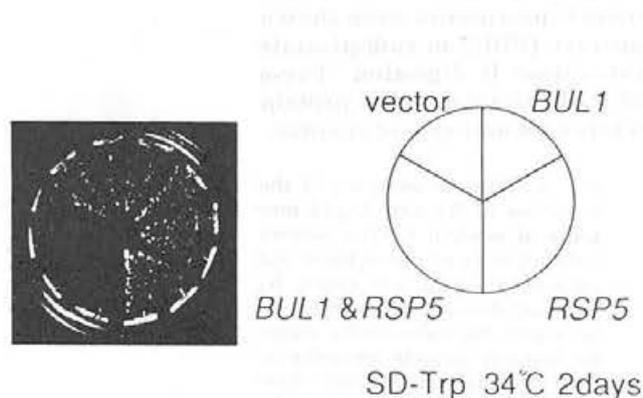


FIG. 6. Simultaneous overexpression of *RSP5* and *BUL1* inhibits wild-type cell growth. Multicopy plasmid p11Y18 (pW1-*BUL1*), p11Y17 (YEplac112-*RSP5*), or p11Y19 (YEplac112-*RSP5*, -*BUL1*) was introduced into wild-type strain KA31 at 25°C, and each transformant was streaked on a minimal medium plate which was incubated at 34°C for 2 days.

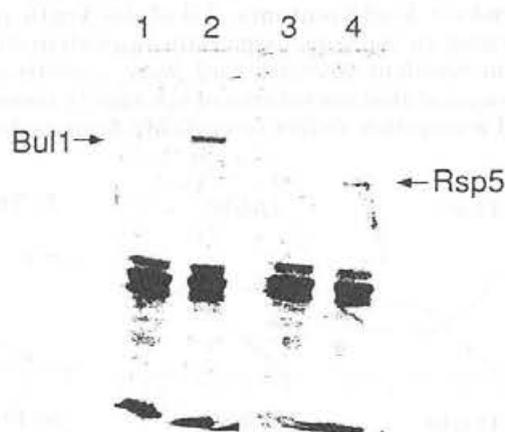


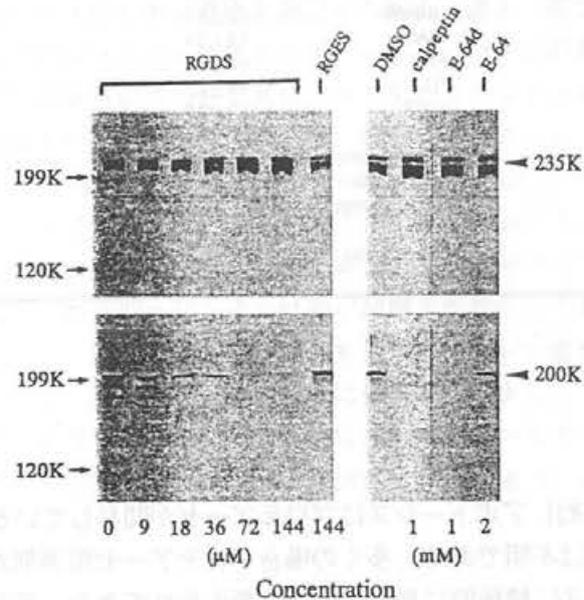
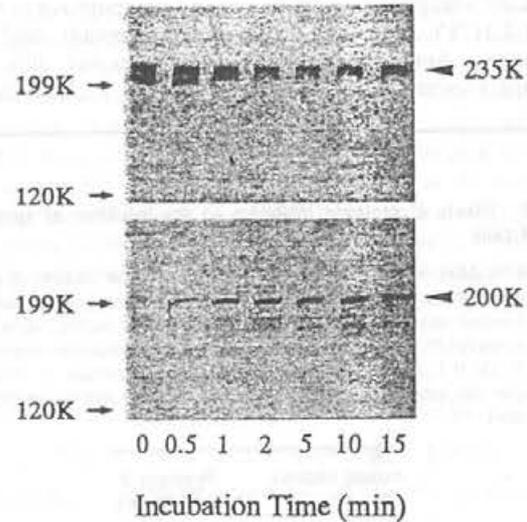
FIG. 9. Rsp5 coimmunoprecipitates with Bul1. The 40S fraction from the cell lysate containing both Bul1-HA and myc-Rsp5 (lanes 2 and 4) or myc-Rsp5 alone (lanes 1 and 3) was mixed with anti-HA antibody and incubated for 2 h, after which protein A-Sepharose beads were added and the mixture was incubated for another 2 h. The precipitates were then subjected to immunoblotting. The blotted membrane was treated with anti-HA (lanes 1 and 2) or anti-myc (lanes 3 and 4) antibody.

酵母ミニ染色体の安定性に関与するBul1は分子量110kdの塩基性蛋白であった。さらに2-ハイブリッド法によりユビキチンリガーゼをコードするRSP5を単離した。ショ糖密度勾配遠心や共沈実験からBul1とRsp5はin vivoでも大きな複合体(40s)を形成していることが分かった。ユビキチンを大量発現することでbul1の温度感受性が抑圧されたり、両遺伝子を同時に大量発現すると野生型細胞の増殖を阻害することなどからBul1もユビキチン経路に働いていると示唆された。また、パルスチエイス実験よりBul1はRsp5ユビキチンリガーゼの基質ではなく制御因子と考えられた。ユビキチン経路において基質に最も近い因子が大きな複合体を形成することで、より多様で複雑な制御機構が働いていると思われる。

Involvement of Calpain in Integrin-Mediated Signal Transduction

Mitsushi Inomata,^{*1} Masami Hayashi,^{*} Yoshiko Ohno-Iwashita,^{*} Satoshi Tsubuki,[†] Takaomi C. Saïdo,[†] and Seiichi Kawashima[†]

An antibody specific to the calpain cleavage site in talin, a cytoskeletal protein, was produced. This antibody selectively recognizes the C-terminal 200-kDa fragment generated when talin is digested by calpain and does not react at all with intact talin or the N-terminal 47-kDa fragment. To assess the involvement of calpain in the integrin-mediated signaling pathway, the effect of limited proteolysis of talin by calpain on platelet activation and aggregation was analyzed using this antibody. It was revealed that thrombin-stimulated platelet aggregation accompanies the autolytic activation of μ -calpain and the accumulation of the μ -calpain-generated 200-kDa fragment of talin. These changes were blocked by RGDS peptide which inhibits the binding of fibrinogen, an adhesive ligand, to the major integrin in platelets, α IIb β 3, while RGE8 peptide, which has no fibrinogen-binding-inhibitory activity, had no effect. Membrane-permeable calpain inhibitors calpeptin and E-64d inhibited platelet aggregation, μ -calpain activation, and the limited proteolysis of talin. These results strongly suggest that calpain is involved in the integrin-mediated signal transduction pathway. © 1996 Academic Press, Inc.



右上図. トロンビン刺激による血小板活性化・凝集におけるタリンのカルパインによる分解 (時間経過)

右下図. RGDSペプチドおよび細胞膜透過性カルパイン阻害剤によるタリン分解の阻害

いずれも、上段が抗タリン抗体、下段が抗タリン分解物抗体によるウエスタンブロット

【要約】血小板の活性化は、細胞内 Ca^{2+} の上昇を伴うドラスティックな変化を起こすため、カルパイン研究のよい系として用いられてきた。本論文では、カルパインの基質の一つとされ、かつ、細胞骨格とインテグリンをつなぐ役割を果たしているタリンに焦点を絞り、そのカルパインによる分解物に特異的な抗体を作成し、タリンの分解をカルパイン活性化の指標として血小板の活性化・凝集を解析した。

トロンビン刺激による血小板の凝集に際し、 μ -カルパインの自己消化的活性化とカルパインによるタリンの分解が起こる。血小板が凝集する際にフィブリノーゲンと結合するインテグリン α IIb β 3のアンタゴニストであるRGDSペプチドは、カルパインの活性化とタリンの分解を阻害した。また、細胞膜透過性カルパイン阻害剤は、カルパインの活性化・タリンの分解と共に血小板の凝集を阻害した。

これら一連の結果から、フィブリノーゲンの結合に引き続くインテグリンを介した情報伝達にカルパインが関与し、血小板の凝集へ至ると考えられる。

Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition

Kunio SHINOHARA*§, Masanori TOMIOKA*†, Hisako NAKANO*, Shigenobu TONE*, Hisashi ITO† and Seiichi KAWASHIMA‡

Proteases are known to be involved in the apoptotic pathway. We report here that benzyloxycarbonyl(Z)-Leu-Leu-leucinal (ZLLLal), a leupeptin analogue, can induce apoptosis in MOLT-4 and L5178Y cells. ZLLLal is a cell-permeant inhibitor of proteasome. Among the protease inhibitors tested, only calpain inhibitor I (acetyl-Leu-Leu-norleucinal) and ZLLLal caused a

marked induction of apoptosis in MOLT-4 cells. In contrast, Z-Leu-leucinal, a specific inhibitor of calpain, did not induce apoptosis. When MOLT-4 cells were incubated in the presence of ZLLLal, p53 accumulated in the cells. These results strongly suggest that inhibition of proteasome induces p53-dependent apoptosis and that proteasome can protect cells from apoptosis.

Table 2 Effects of protease inhibitors on the induction of apoptosis in MOLT-4 cells

Cells were incubated for 6 h in the presence of various protease inhibitors at a 100 μ M concentration. Controls were MOLT-4 cells incubated with 1% (v/v) DMSO instead of an inhibitor. Apoptotic cells were scored from morphological changes (nuclear fragmentation) as reported previously [20]. Results are the means \pm S.E.M. of three independent experiments. The effect of ZLLLal at 1 μ M concentration is also shown for comparison. No morphological changes other than apoptosis were detected in these experiments with the concentrations of inhibitors used.

Protease inhibitors (100 μ M)	Percentage of apoptotic cells
Control	1.9 \pm 0.2
Leupeptin	2.2 \pm 0.5
E64c	1.6 \pm 0.4
E64d	4.3 \pm 2.8
TLCK	8.4 \pm 2.7
PMSF	2.7 \pm 0.8
Pepstatin A	2.2 \pm 0.3
Phosphoramidon	2.2 \pm 0.9
Ac-YVAD-cmk	3.0 \pm 1.4
Calpain inhibitor I	52.2 \pm 6.5
ZLLal	5.4 \pm 1.4
ZLLLal (1 μ M)	42.7 \pm 5.2

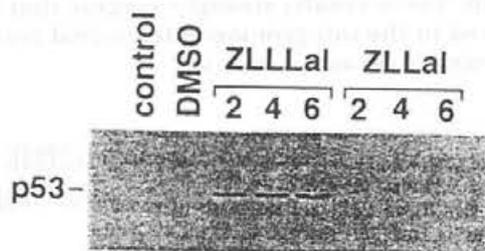
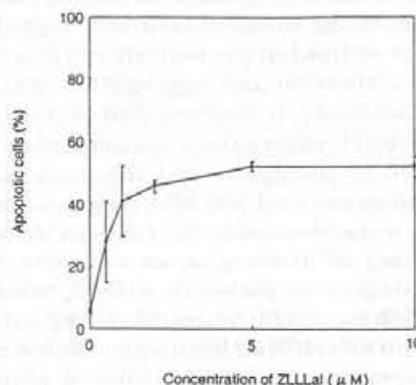


Figure 3 Accumulation of p53 in MOLT-4 cells treated with ZLLLal

Cell lysates from MOLT-4 cells cultured in the presence of 1 μ M ZLLLal or 100 μ M ZLLal were subjected to Western blot analysis. MOLT-4 cells were treated with ZLLLal or ZLLal for various time intervals (h).

【要約】アポトーシスにプロテアーゼが関与していることはかなり古くから知られているが、ICE 以外にはその実体は不明である。多くの場合プロテアーゼ阻害剤がアポトーシスを抑制することから、プロテアーゼはアポトーシスに積極的に働いていると考えられてきた。著者らは、放射線照射によるアポトーシスにカルパインが関与している可能性を検討するため、細胞膜透過性の高いカルパイン阻害剤Z-Leu-Leu-Leu-al (ZLLLal)の効果を調べた。すると、本阻害剤はアポトーシスを阻害するどころか、むしろ促進し、放射線照射抜きでも単独でアポトーシスと誘発した。ZLLLal はカルパインだけではなくプロテアソームをも強く阻害することから、この結果だけからでは、どちらがアポトーシスに関与しているか結論できない。そこで、カルパインを強く阻害するがプロテアソームに対する阻害活性が極めて低い Z-Leu-Leu-al (ZLLal)の効果を検討したところ、アポトーシス誘発活性はなかった。このことから、カルパインではなくプロテアソームの阻害がアポトーシスを起こすことが明らかになった。プロテアソームの阻害に伴って、通常はプロテアソームにより速やかに分解されているがん抑制遺伝子産物 p53が蓄積していた。このことから著者らは、p53の蓄積がアポトーシスを引き起こす要因の一つと考えた。

Ability of ubiquitin radioimmunoassay to discriminate between monoubiquitin and multi-ubiquitin chains

Koji Takada ^{a,*}, Nozomu Hibi ^b, Yutaka Tsukada ^b, Toshiaki Shibasaki ^c, Kiyoshi Ohkawa ^a

Abstract

Free ubiquitin (mainly monoubiquitin) and multi-ubiquitin chains coexist in eukaryote cells and serve distinct cellular roles. However, any immunoassay systems established previously have not been proved to be applicable for measuring the former without cross-reactive responses with the latter. For this purpose, we developed a radioimmunoassay specific to monoubiquitin by employing antiserum US-1 against ubiquitin. In this assay, ubiquitin-protein conjugates, prepared by a reticulocyte lysate fraction II and fractionated on Moro Q and Superdex 200 columns, exhibited practically no cross-reactivity. The cross-reactivity of fractionated ubiquitin-lysozyme conjugates was also analyzed as a function of their multi-ubiquitin chain size. As a result, the larger the conjugates were found to be, the weaker were the cross-reactive responses they showed, and the multi-ubiquitin chains ($n > \text{approx. } 20$) were substantially unreactive in the radioimmunoassay. By using the radioimmunoassay, heat-shock-induced decrease in the level of cellular free (mono)ubiquitin was detected. In addition, the standard preparation of multi-ubiquitin chains was not cross-reactive in all other five radioimmunoassays employing distinct antibodies to ubiquitin (four antisera and a monoclonal antibody). These data suggest that radioimmunoassays employing ubiquitin antibodies raised by the general methods can discriminate between monoubiquitin and multi-ubiquitin chains and quantitate cellular free ubiquitin.

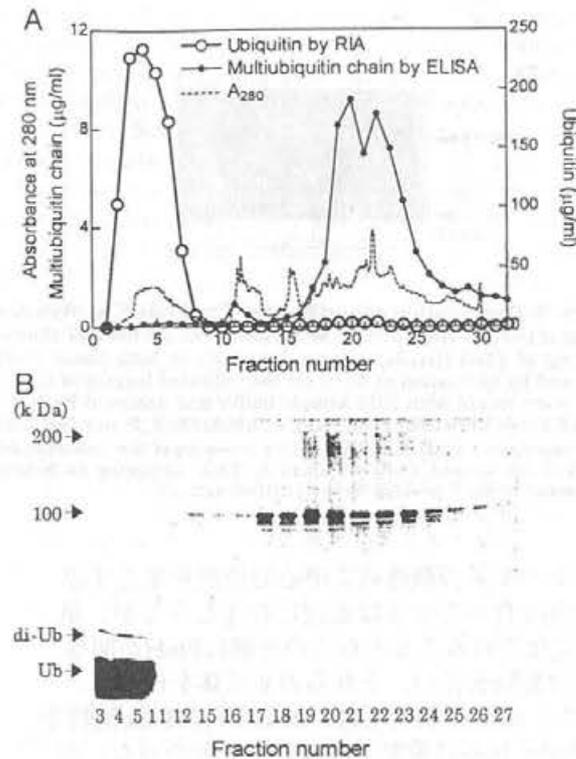


Fig. 2. Cross-reactivity tests of a fractionated ubiquitination mixture in the RIA and the ELISA. The mixture had been prepared *in vitro* by the reticulocyte lysate fraction II, and fractionated by Mono Q FPLC. A: ubiquitin (○) and a multi-ubiquitin chain (in terms of MUCRP1) (●) levels in each fraction were estimated by RIA using US-1 and multi-ubiquitin chain ELISA, respectively, and absorbance at 280 nm of the eluate (—) was monitored. B: ubiquitin and ubiquitin-immunoreactive proteins in each fraction were visualized by immunoblotting using anti-ubiquitin antibody [6]. Locations of ubiquitin and diubiquitin are indicated as Ub and di-Ub, respectively.

考察: 交叉実験の結果から、本 RIA は実用上、生体の遊離型ユビキチンに特異的と判断された。この測定系とマルチユビキチン鎖に特異的な ELISA (Takada et al., 1995) を併用することで、生体ユビキチンの詳細な分析が可能となった。本 RIA の特異性は、抗体の性質よりも、RIA の原理 (競合阻害能) に起因していると思われる。

緒言: 生体のユビキチンの一部は、標的蛋白質と結合し、蛋白分解シグナル“マルチユビキチン鎖”を形成している。すなわち、“遊離型ユビキチン”と“マルチユビキチン鎖”が共存しているが、その機能は別個である。

体内のユビキチン濃度を測定するため、過去に複数のイムノアッセイ系が開発された。しかし、いずれの系も特異性の検討が不十分であり、交叉するユビキチンの型が明確でない。そこで、我々は、新たなラジオイムノアッセイ (RIA) を構築し、その特異性を検討した。

結果: ユビキチン抗体 US-1 を用いた RIA によって、モノユビキチンは検出されたが、網状赤血球ライセートで作成した結合型ユビキチンは殆ど認識されなかった (Fig. 2)。この RIA への交叉性は、モノユビキチンで最も高く、マルチユビキチン鎖の長さに依存して減少した。こうした特異性は、種々の方法で作成した他のユビキチン抗体による各 RIA に共通して認められた (Fig. 6)。

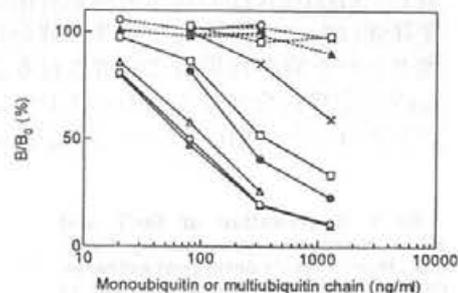


Fig. 6. Discriminating ability of various ubiquitin RIA between monoubiquitin and multi-ubiquitin chains. Competitive inhibition curves by monoubiquitin (—) and multi-ubiquitin chains (MUCRP1) (—) in RIA systems using antisera US-1 (▲), US-2 (△), AUB-1 (□), NBUB-1 (●), NBUB-2 (○) and antibody 2F11 (×) against [¹²⁵I]monoubiquitin. B/B_0 is the ratio between the amount of tracer bound to antibody in the presence (B) and in the absence (B_0) of unlabeled ubiquitin.

FtsH (HflB) Is an ATP-dependent Protease Selectively Acting on SecY and Some Other Membrane Proteins*

(Received for publication, June 12, 1996, and in revised form, September 17, 1996)

Yoshinori Akiyama†, Akio Kihara, Hajime Tokuda‡, and Koreaki Ito

From the Department of Cell Biology, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606-01, Japan and the ‡Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

The FtsH protein is a membrane-bound ATPase of *Escherichia coli* that was proposed to be involved in membrane protein assembly as well as degradation of some unstable proteins. SecY, a subunit of protein translocase, is FtsH dependently degraded *in vivo* when it fails to associate with its partner (the SecE protein). We constructed a series of mutants in which mutations were introduced into conserved residues in the two ATP binding consensus sequences or the zinc binding sequence of FtsH. We purified wild-type and mutant FtsH proteins by making use of a polyhistidine tag attached to their carboxyl termini. Complementation analysis and ATPase activity assays *in vitro* indicated that, of the two sets of ATP binding sequence motifs, the one located C-terminally (A1) is essential for ATPase activity and *in vivo* functioning of FtsH. Wild-type FtsH protein degraded purified SecY in an ATP hydrolysis-dependent manner *in vitro*. Mutant proteins without ATPase activity were inactive in proteolysis. A zinc binding mutant showed a decreased proteolytic activity. SecY and FtsH were cross-linkable with each other in the membrane, provided that FtsH had an ATPase-inactivating mutation. These results demonstrate that FtsH binds to and degrades SecY, its A1 motif and the zinc binding motif being important for the proteolytic activity. FtsH-dependent proteolysis was also demonstrated for SecY in crude membrane extracts, whereas a majority of other membrane proteins were not degraded, indicating that FtsH has high selectivity in protein degradation.

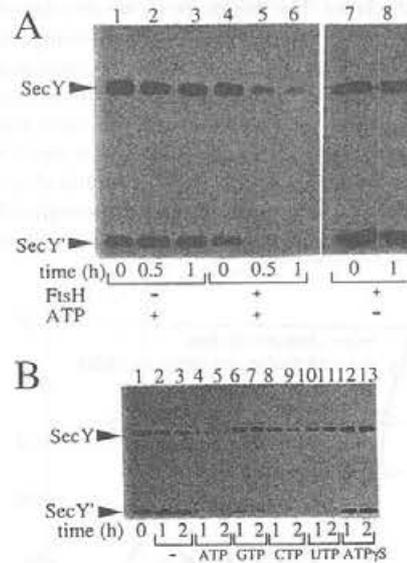
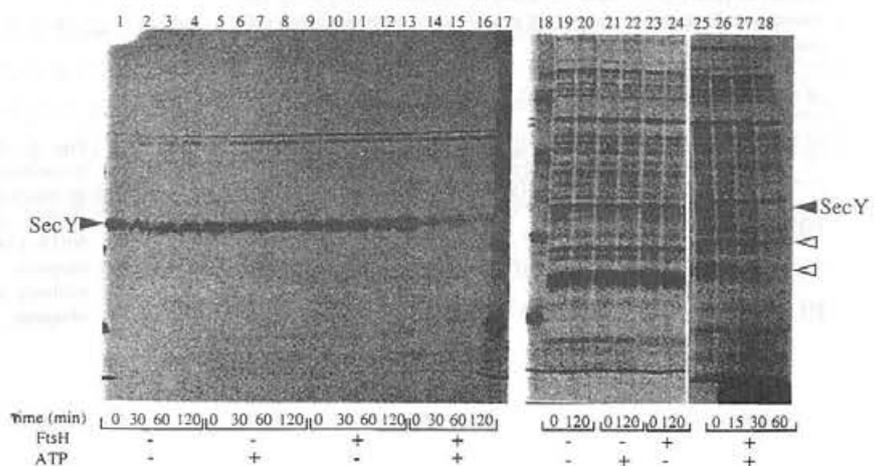


FIG. 3. Degradation of purified SecY by FtsH-His₆-Myc. A, about 19 ng of purified SecY protein were mixed with 3.3 mM ATP (lanes 1-3), 930 ng of FtsH-His₆-Myc (lanes 7 and 8), or both (lanes 4-6) and followed by incubation at 42 °C for the indicated lengths of time. Samples were mixed with SDS sample buffer and analyzed by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-SecY. B, purified SecY was incubated with FtsH-His₆-Myc in the presence of the indicated nucleotides (3.3 mM) and analyzed as in A. SecY' indicates an N-terminal fragment of SecY present in the purified sample.

【要旨】大腸菌FtsHは膜結合型AAA ATPaseである。タンパク質の膜透過に中心的役割を果たす膜タンパク質SecYは同じく膜タンパク質であるSecEと複合体を作ったときは安定に存在しうるが、単独では迅速に分解される。ftsH変異株では単独SecYが安定化されることからこの分解にFtsHが関与する。FtsHは二つのATP結合コンセンサス配列とZinc結合配列を持つ。それらの変異体を作製し、野生型と共にC-末端に付けたHis₆タグを利用して精製した。in vivo相補活性、in vitro ATPase活性を調べた結果、AAA相同領域のATP結合コンセンサス配列がそれらに重要であることが分かった。精製したFtsHはATPの加水分解依存的に精製SecYを分解した(Fig. 3)。ATPase変異体やZinc結合配列の変異体はSecY分解活性が消失、或いは低下していた。また、可溶化膜を用いた実験から、幾つかの膜タンパク質が特異的に分解されることが分かった(Fig. 5)。クロスリンク実験からin vivoでFtsHがSecYに直接結合することが示された。FtsHは特異性の高いプロテアーゼであり、膜のクオリティコントロールに働いていることが推定される。

FIG. 5. Degradation of SecY and other membrane proteins by FtsH-His₆-Myc in crude detergent extracts. Cells of AD373/pKY6 were exposed at 42 °C and pulse-labeled with [³⁵S]methionine for 5 min. Total membranes were prepared, solubilized with 0.5% Nonidet P-40, and incubated at 42 °C in the presence or absence of FtsH-His₆-Myc and ATP as indicated. Samples were subjected either directly to SDS-PAGE (lanes 19-28) or to anti-SecY (lanes 1-16) immunoprecipitation before SDS-PAGE. Lanes 17 and 18 were for molecular mass markers (from top to bottom, 97.4 kDa, 69 kDa, 46 kDa, 30 kDa, and 18.4 kDa). Open arrowheads indicate positions of proteins affected by FtsH-His₆-Myc.



A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY

Akio Kihara, Yoshinori Akiyama and Koreaki Ito¹

Department of Cell Biology, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606-01, Japan

¹Corresponding author

Escherichia coli FtsH (HflB), a membrane-bound ATPase is required for proteolytic degradation of uncomplexed forms of the protein translocase SecY subunit. We have now isolated SecY-stabilizing mutations that cause an amino acid substitution in the HflK-HflC membrane protein complex. Although HflKC protein was believed to have a proteolytic activity against λ cII protein, deletion of *hflK-hflC* did not stabilize SecY. Instead, the mutant alleles were partially dominant and overexpression of *ftsH* suppressed the mutational effects, suggesting that the mutant proteins antagonized the degradation of SecY. These results raise the possibility that even the wild-type HflKC protein acts to antagonize FtsH. Consistent with this notion, the *hflK* null mutation accelerated degradation of the SecY24 protein. Furthermore cross-linking, co-immunoprecipitation, histidine-tagging and gel filtration experiments all indicated that FtsH and HflKC form a complex *in vivo* and *in vitro*. Finally, purified HflKC protein inhibited the SecY-degrading activity of purified FtsH protein *in vitro*. These results indicate that the proteolytic activity of FtsH is modulated negatively by its association with HflKC.

Keywords: AAA family/FtsH/HflKC/protease/SecY

【緒言】大腸菌の膜ATPase、FtsHはAAAファミリーと呼ばれる一群のATPaseの一つである。AAAファミリーATPaseは生物界に広く存在し、タンパク質の小胞輸送、分解、細胞内小器官の生成など広範な細胞内現象に関与することで注目されている。FtsHは膜における蛋白質分泌装置の中心的サブユニットSecYやF₁F₀ATPaseのサブユニットaの分解に関与する、特異性の高いプロテアーゼである。これらの膜蛋白質は他のサブユニットと複合体を形成した状態では安定に存在しうるが、単独ではFtsHにより速やかに分解される。さらに、FtsHは熱ショック因子 σ^{32} やラムダファージの溶菌・溶原化決定に関わる因子cIIの分解も司り、遺伝子制御においても重要な役割を持つ。FtsHは膜においてプロテアーゼ・分子シャペロン複合機能を持つクオリティーコントロールマシンを形成している可能性がある。

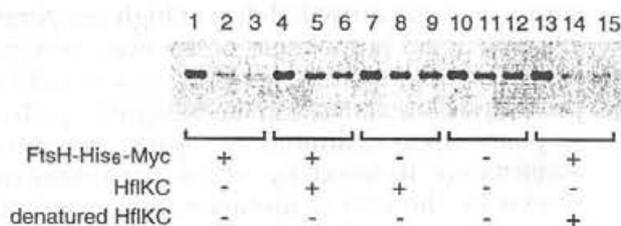


Fig. 8. *In vitro* effects of HflKC on FtsH-mediated degradation of SecY. The following samples were pre-incubated at 4°C for 1 h: lanes 1-3, FtsH-His6-Myc alone; lanes 4-6, FtsH-His6-Myc and HflKC; lanes 7-9, HflKC alone; lanes 10-12, buffer alone; lanes 13-15, HflKC that had been denatured by incubation at 75°C for 15 min and FtsH-His6-Myc. Purified SecY was added to each sample and incubated at 37°C for 0 (lanes 1, 4, 7, 10 and 13), 0.5 (lanes 2, 5, 8, 11 and 14) and 1 (lanes 3, 6, 9, 12 and 15) h. Reactions were terminated by adding SDS sample buffer, and SecY was visualized by immunoblotting following SDS-PAGE.

【結果と考察】単独のSecYが安定化される変異株を分離し、*ftsH*変異株とともに*hflK*、*hflC*変異株を得た。HflKCは共に膜タンパク質で複合体を形成し、ラムダファージの溶菌・溶菌調節に関わるcIIタンパク質の分解活性を持つと報告されている。しかしながら、*hflK*欠失変異はSecYを安定化せず、逆にSecY24変異タンパク質の分解を促進した。また、変異型HflKCはSecY分解阻害に関して優性欠損を示し、それはFtsHの過剰生産により抑制された。これらのことからHflKCはFtsHと直接相互作用をし、FtsHのプロテアーゼ活性を阻害すると推定した。クロスリンク、免疫共沈降、ゲル濾過クロマトグラフィー、His₆-タグをつけたFtsHを用いたアフィニティー分離 (Fig. 5) の結果はFtsHとHflKCが複合体を形成すること支持した。また、この複合体形成はATPにより促進された。精製したHflKCは*in vitro*でのFtsHによるSecY分解を阻害した (Fig. 8)。HflKCはFtsHと複合体を形成し、そのタンパク質分解活性を負に制御すると考えられる。

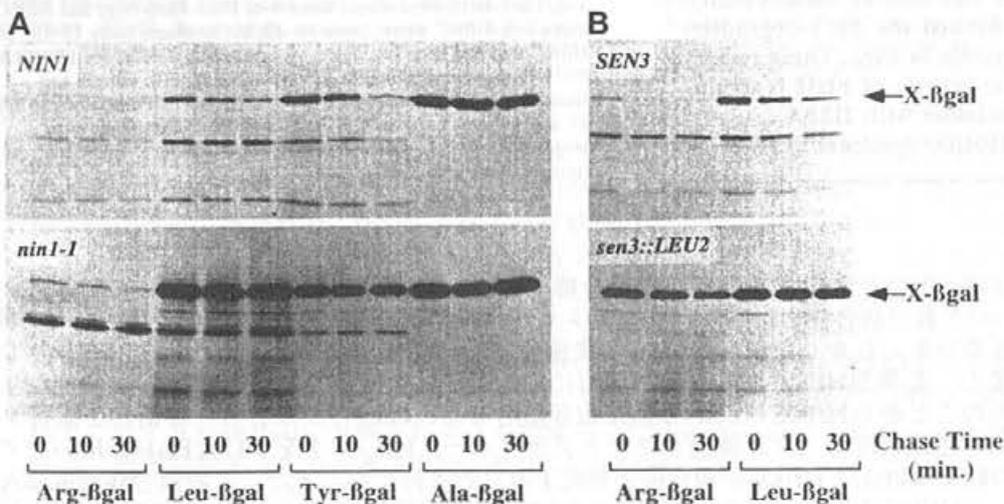


Fig. 5. Co-elution of HflKC with FtsH-His6-Myc in Ni-NTA-agarose affinity chromatography. Membranes prepared from AD202 (*ftsH*⁺; lanes 1-6) and AK1181 (*ftsH*⁺-*his6*-*myc*; lanes 7-12) were solubilized and subjected to Ni-NTA-agarose chromatography (load, lanes 1 and 7; flow-through, lanes 2 and 8). Proteins adsorbed to Ni-NTA-agarose were washed three times (lanes 3-5 and 9-11) and eluted with 250 mM imidazole (lanes 6 and 12). Proteins in each fraction were separated by SDS-PAGE and visualized by immunoblotting using antisera against FtsH (upper part) or HflKC (lower part). The asterisk indicates a non-specific background. FtsH' indicates the C-terminally cleaved product of FtsH-His6-Myc.

cDNA Cloning of p112, the Largest Regulatory Subunit of the Human 26S Proteasome, and Functional Analysis of Its Yeast Homologue, Sen3p

Kin-ya Yokota,* Susumu Kagawa,* Yoshihisa Shimizu,[†] Hiroshi Akioka,[†] Chizuko Tsurumi,[†] Chiseko Noda,[†] Masahiro Fujimuro,[‡] Hideyoshi Yokosawa,[‡] Tsutomu Fujiwara,[§] Ei-ichi Takahashi,[§] Masayuki Ohba,^{||} Moto-o Yamasaki,^{||} George N. DeMartino,[#] Clive A. Slaughter,** Akio Toh-e,^{††} and Keiji Tanaka^{††§§}

The 26S proteasome is a large multisubunit protease complex, the largest regulatory subunit of which is a component named p112. Molecular cloning of cDNA encoding human p112 revealed a polypeptide predicted to have 953 amino acid residues and a molecular mass of 105,865. The human p112 gene was mapped to the q37.1-q37.2 region of chromosome 2. Computer analysis showed that p112 has strong similarity to the *Saccharomyces cerevisiae* Sen3p, which has been listed in a gene bank as a factor affecting tRNA splicing endonuclease. The *SEN3* also was identified in a synthetic lethal screen with the *nin1-1* mutant, a temperature-sensitive mutant of *NIN1*. *NIN1* encodes p31, another regulatory subunit of the 26S proteasome, which is necessary for activation of Cdc28p kinase. Disruption of the *SEN3* did not affect cell viability, but led to temperature-sensitive growth. The human p112 cDNA suppressed the growth defect at high temperature in a *SEN3* disruptant, indicating that p112 is a functional homologue of the yeast Sen3p. Maintenance of *SEN3* disruptant cells at the restrictive temperature resulted in a variety of cellular dysfunctions, including defects in proteolysis mediated by the ubiquitin pathway, in the N-end rule system, in the stress response upon cadmium exposure, and in nuclear protein transportation. The functional abnormality induced by *SEN3* disruption differs considerably from various phenotypes shown by the *nin1-1* mutation, suggesting that these two regulatory subunits of the 26S proteasome play distinct roles in the various processes mediated by the 26S proteasome.



左図：酵母 *nin1-1* (p31ホモログ) と酵母 *sen3::LEU2* (p112ホモログ) の温度感受性変異株を制限温度下で培養すると、野生株と異なり (上パネル) N-末端側による蛋白分解がほぼ完全に抑制された (下パネル)。

分子量200万の巨大なATP依存性プロテアーゼである26Sプロテアソームは円筒型の触媒ユニットの両端にV字型の調節ユニットが会合したダンベル型の多成分複合体である。本研究では調節ユニットを構成する最大のヒトサブユニットp112の一次構造を明らかにした。その結果p112がtRNAのスプライシングに関わる因子として発見されていた出芽酵母SEN3の相同遺伝子であることが判明した。我々は細胞周期遺伝子NIN1のts-変異株*nin1-1*を用いた合成致死スクリーニングによっても同じSEN3を同定した。NIN1(調節ユニットを構成する別のサブユニット)はCdc28キナーゼの活性化に不可欠で細胞周期のG1/S転移、M期の進行に必須な遺伝子である。*sen3*破壊株は温度感受性増殖を示し、ヒトのp112-cDNAはこの変異を相補した。*sen3*破壊株を用いた解析からSen3pの会合した26SプロテアソームがN末端側を含むユビキチン依存性蛋白分解経路に関与していることが判明した。また*sen3*破壊株はカドミウム負荷に高感受性であることやモデル蛋白質の核移行活性に障害のあることが判明した。これらの*sen3*欠損株に見られる表現型は*nin1-1*株とは似て非なる動態を示し、プロテアソームの細胞機能における役割が多様であることを示唆した。

