

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3号（平成9年2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) 巻頭言

(2) 活動および関連事業

- 1 班員名簿発行
- 2 重点ニュース誌”ぶろておりしす”発行
- 3 出版案内
- 4 学会・集会案内
- 5 第一回班会議：報告
- 6 第二回総括班会議：報告

(3) 学会・集会報告

- 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

(4) ミニレビュー

- 1 Caspaseプロテアーゼ研究の新展開
- 2 Proteolysisにおける分子シャペロンの役割
- 3 ATP依存性プロテアーゼ群の分子進化
- 4 鉄イオン代謝を制御するRNA結合蛋白、IRP2 (iron regulatory protein 2)の分解機構
- 5 PI-3 kinaseと細胞内蛋白分解
- 6 形態形成とプロテアーゼカスケード
- 7 受精とプロテアーゼ

(5) トピックス

- 1 分泌型リソソームとChediak-Higashi症候群
- 2 細胞周期のG1-S移行における蛋白質分解の役割

(6) 掲示板コーナー

伝言板：

Proteolysisの「訳語」募集と応募（第2回）

その他：インフォメーション

(7) 編集後記

(8) 発表論文の概要紹介：巻末添付

(1) 巻頭言：泊まり木

特定の木にたくさんの鳥が集まって騒いでいる光景をごらんになった方も多いことと思う。私が知っている大学の敷地では、東工大の大岡山キャンパスの本館脇の木は一見の価値がある光景で、夕刻に数百と思われる鳥が集まり大騒ぎをする。これほどの規模ではないが、京大原子炉研究所の構内でも見たことがある。

夕刻に集まった鳥はこのまま木に泊まるのだそうである。

「止まり木」ならぬ「泊まり木」らしい。何のために集まるのかは、正確には分かっていないらしい。集まることで集団防衛かということ、大騒ぎをして目立つからわざわざ敵に存在を教えているようで、納得のいく説明でない。集まることで情報交換し、翌日どの方向へ餌を求めるかを決めるという説を聞いたことがある。なるほど、これは重点領域の班に似ている。泊まり木がうまく機能しないと、餌にありつく機会が減って、そこに集まる鳥の集団はやがて衰退していくのであろう。

重点領域研究という日本独特の研究スタイルは、そうでないと閉鎖的になり個々に孤立しがちな日本の研究社会に適している研究組織である。新たにスタートした本研究班は、従来の考え方より広い分野の研究者を集めており、この特徴を生かして成功して欲しい。ここに集うことで今までには得られにくかった研究情報が交換でき、思いもしなかった方に研究が進む、そんな発展的な「泊まり木」になって欲しいと望んでいる。幸い、「ぶろておりしす」を分けて欲しいという班員以外の研究者が多いと聞いた。あそこに行けばよい情報が得られるということで、新しい泊まり木を目指す鳥が増えてきていると喩えてよいであろう。

平成9年2月

重点領域研究「細胞内蛋白分解」総括班メンバー

大島泰郎（東京薬科大学生命科学部）

(2) 活動および関連事業

1 班員名簿（平成8年度）：平成8年6月作成

2 重点ニュース誌“ぶろておりしす”発行

第1号：平成8年6月発行

第2号：平成8年12月発行

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

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

"Intracellular Protein Catabolism" (Eds 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）

4 学会・集会案内

国内学会

- (1) “選択的タンパク質分解による生理機能の調節” 第20回日本分子生物学会年回シンポジウム、1997年12月16-19日（京都）。

国際学会

- (1) "Proteasomes and Related Complexes" 2nd Workshop, March 19 - 21, 1997, Clenmont-Ferrand, France. (Y. Briand et al.).
- (2) "Switzerland-Japan Chromosome/Cell Cycle Workshop", March 27-28, 1997, Kyoto University (M. Yanagida et al.).
- (3) "Calpain Symposium", April 14 - 15, 1997, Oxford, England. (D. Bozycko).
- (4) "Biology of Proteolysis", April 23-27, 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (C. Craik et al.).
- (5) "EMBO Workshop on Cellular Functions of AAA Proteins", May 19-21, 1997, Tutzing Academy at Lake Starnberg near Munich, Germany (T. Langer, A. Lupa, H. Feldmann)
- (6) "Ubiquitin and Protein Degradation" FASEB Summer Research Conference, Tentative schedule: June 28 -July 3, 1997, Saxtons River, Vermont, USA (A.L. Haas).
- (7) " International Symposium on Dynamic Aspects of Lysosomal/Vacuolar System", November 3-6, 1997, Conference Center of Okazaki National Research Institutes, Okazaki, Japan (Y. Ohsumi)
- (8) "The UK-Japan Cell Cycle Workshop", November 24-27, 1997, Kyoto (M. Yanagida et al.).

5 第1回班会議報告

重点領域研究「蛋白分解のニューバイオロジー」の第一回班会議は、平成8年12月19日(木)、20日(金)の2日間東京ガーデンパレスにおいて行われた。前日行なわれたシンポジウムでの発表者7人を除き、全班の代表者あるいは代理人49人が課題研究の進捗状況を報告した。初日は午前9時25分から鈴木紘一領域代表者の挨拶に始まり、昼食の時間を除き、休憩を取らず、一気に5時過ぎまで発表が続いた。一人当たり発表、質問、討論、交代時間を含めて12分という短い持ち時間ではあったが、各班員は非常に要領よくまとめて報告された。さすがに午後になって討議が一時活発でなくなったこともあったが、概ね活気ある会議であった。この日の午前はプロテアーゼの構造と機能に関する研究5題、プロテアーゼと病態生化学に関する研究8題、午後は主としてプロテアーゼと細胞機能に関する研究発表があった。内訳はアポトーシスの分子機構に関する研究2題、カルパインの構造と機能に関する研究3題、プロテアーゼと分子シャペロンに関する研究3題、プロテアーゼ作用と機能発現に関する研究5題、リソソーム酵素と蛋白分解に関する研究5題であった。会議終了後、場所を移して懇親会がもたれた。討論時間が足りないのを補い、方法論を含めた細かい質問ができる機会と疲れを癒すのに貴重な一時であった。

翌20日も午前9時15分から午後1時まで、休憩なしで発表が続けられた。内訳はプロセッシング酵素と細胞内局在化に関する研究7題、ユビキチンシステムと標的分解に関する研究5題、プロテアソームの構造と機能に関する研究6題であった。途中、文部省学術国際局学術調査官の甲斐知恵子さんから本重点領域研究の発展と成果への期待並びに科学研究費全般に対するご説明があった。本重点領域研究は蛋白分解とバイオロジーとの関係を解析することを大きな目標として出発したが、班会議での発表の多くはこの線に沿ったものであった。明年度は大きなトピックスになるような研究の発表と領域研究全体の活性化が期待される。年度末の研究成果報告会としての班会議は班員全員が発表する形式をとらざるを得ず、どうしても持

ち時間は短くなる。来年度はもう少しゆとりのあるプログラムが組めるよう努力したい。

(木南英紀：重点領域研究 副代表者)

6 第2回 総括班会議報告（領域代表者：鈴木絃一）

出席者： 岩永貞昭、勝沼信彦、矢崎義雄、矢原一郎、石浦章一、
上野 隆、川島誠一、木南英紀、鈴木絃一、田中啓二、
以上10名

日時： 平成8年12月18日（水） 18時～20時

場所： 東京ガーデンパレス、桂の間

- 議案： 1) 本年の活動計画並びに今後の予定
2) 本年度の活動計画
3) その他

第1回公開シンポジウム終了後、同東京ガーデンパレスで第2回総括班会議を開催し、本年度の活動についての経過状況を報告し、本年度中に行う活動について討論を行った。その結果、平成8年度中にニュースレターをもう一回発行するほか、若手研究者を中心に、実験手法など身近な問題に関する情報交換の場を提供することを目的に、若手シンポジウムを企画する事で具体案を煮詰めることになった。その他、本研究班全体の活動についての討論を行った。来年度の活動については、特にワークショップについて開催地、時期、費用などについて、本年度のワークショップの経験をもとに討論を行い、種々の有益な意見が提出された。この討論の結果を踏まえてワークショップの実施案を作ることになった。

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

(3) 学会・集会報告

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・錦の間（2階）

昨年（平成8年）の12月18日（水）（13:00～17:00）に文部省科学研究費重点領域研究「蛋白分解のニューロバイオロジー」の第一回公開シンポジウムが東京ガーデンパレスで開催されました。本シンポジウムに参加するに当たって、総括班の某先生から筆者の弱点を巧みに突いた説得工作（？）を受け、見聞記を書く破目になりました。お陰様で舟を漕ぐ余裕もなく緊張感を持って勉強したつもりですが、何分にも能力不足で講演内容が十分把握できたとは言えません。あくまでも筆者なりの感想ということでお許し戴きたいと思えます。

シンポジウムは「蛋白質分解の分子機構—生理機能と病態を巡って」と題し、ユビキチン/プロテアソーム系、リソソーム/液胞系、カルパイン系に関する研究並びにアポトーシス、神経変性、ウイルス感染等における蛋白質分解の研究で最先端のお仕事をされている7名の先生方が講演された。当日は、「蛋白質分解」に対する注目度を示すように非常に多くの参加者（主催者の予想を大幅に上回ったようで、通路は補助椅子で一杯、用意された抄録集も途中で品切れの状態であった）があり、様々な角度から活発な討論が展開されたことをまずお伝えしておきます。

本シンポジウムのトップバッターである菊池淑子先生（東大・院理学系）は「ユビキチンシステムと細胞増殖」と題して講演された。これまで蛋白質のユビキチン化に関わる酵素としてはユビキチン活性化酵素（E1）やユビキチン結合酵素（E2）の研究が中心であったが、細胞増殖制御に関与するp53やサイクリン等がユビキチンリガーゼ（E3）を介してユビキチン化されることが明らかとなり、俄然

E3の存在が脚光を浴びている。菊池先生は、ヒトのユビキチンリガーゼであるE6-APのC-末端領域（ユビキチンのアクセプターであるシステイン残基を含む）と相同な、いわゆる hect-domain を有する Rsp5 と Tom1 と呼ばれる2種類のE3を出芽酵母から単離し、その諸性質を解説した。その中で Rsp5が細胞増殖に必要な因子であることや Rsp5と複合体を形成する Bul1 と呼ばれる蛋白質が Rsp5の調節因子であることを示した。また、Tom1が核の構造維持や mRNA のエクスポート（核輸送）等に関与することが示され、大変興味深いものであった。今後、これら E3の標的蛋白質の同定や調節因子の解析から、細胞周期における基質蛋白質の選別機構並びにタイムリーな蛋白質分解の仕組みが解明されることを期待したい。

佐方功幸先生（九大・理）は「Mosの発現制御と機能をめぐる蛋白質分解の問題」と題して講演された。c-mosががん遺伝子産物である Mosは、卵成熟の初期には代謝的に不安定であるが、後期には安定化して卵成熟を第2減数分裂中期で停止させる。しかし、受精と共に再び不安定となって急速に分解消失する。つまり、Mosの機能発現は Mos自身の安定性/不安定性に深く関わっているが、佐方先生はこの問題を種々の変異体蛋白質を用いて見事に解明した。それによると MosのN-末端（3番目）のセリン残基がリン酸化されると安定化し、脱リン酸化されるとリジン残基（34番目）がユビキチン化されてプロテアソームによって分解されるという。蛋白質分解がリン酸化・脱リン酸化によって制御されていることが示されたことは大変興味深く、今後、この反応に関わるキナーゼやホスファターゼの同定が楽しみである。また、N-末端のプロリン残基（2番目）も不安定性を規定する重要な要素であることも示した。更に、Mosの強制発現で起こる NIH 3T3細胞のがん化は、c-Fosが Mos/MAPキナーゼ系でリン酸化を受けて安定化するためであることも明らかにした。

西村いくこ先生（基生研・細胞生物）は「液胞の機能分化を担う液胞プロセシング酵素」と題して講演された。液胞プロセシング酵素（VPE）は、元々種子の蛋白質蓄積型液胞の構成蛋白質の成熟に関わる酵素として発見されたものであるが、最近、葉や花芽等に特異的に発現する3種類のホモログ遺伝子（ α -VPE, β -VPE, γ

-VPE) がアラビドプシスから単離されている。西村先生は、これらの遺伝子を導入した形質転換植物の解析から γ -VPE が細胞死を予定されている組織に特異的に発現していることを示した。また、 γ -VPE がセネッセンスストレスによって液胞内に発現誘導される種々のシステインプロテイナーゼ（不活性型）を活性化することが細胞死に重要なステップであることも明らかにした。この様にプロテアーゼカスケード（ γ -VPE 自身も不活性な前駆体として合成され、液胞内で自己消化的に活性化するらしい）が細胞死の制御に関わることは、動物の細胞死でも知られており興味深い事実である。今後は、液胞内で活性化されるシステインプロテイナーゼの標的蛋白質が同定され、細胞死シグナルの下流への伝達機構がより明確になることを期待したい。更に、植物細胞でも良く発達しているいわゆるプロテアソーム系との関連性も興味深い点である。

榎森康文先生（東大・院理学系）は「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」と題して講演された。カルパインは、生化学的・分子生物学的手法による解析から酵素としての諸性質や分子構造の特徴等はほぼ明らかにされている。しかし、最も肝心の生理機能に関する研究は著しく遅れており、何が真の標的蛋白質であるのかも未だ良く解っていない。榎森先生はこの様な現状を踏まえ、ショウジョウバエの組織普遍的カルパインの生理的基質を明らかにすべく種々の解析系（先生ご自身の表現を借りれば、オーソドックスな解析法から深い洞察力に基づく解析法まで）を構築した。その結果、細胞膜受容体の一種である Notch 遺伝子産物、アクチン結合蛋白質であるゲルゾリン、蛋白質合成延長因子である EF1 α 等の興味深い蛋白質がその候補として浮かび上がってきた。中でも Notch 遺伝子産物に対するカルパインの作用は特徴的で、細胞内ドメインに存在するアンキリンリピートの両側に作用してその部分を切り出すという。この事実は、カルパインが情報伝達系において新たな機能蛋白質を創り出す可能性を示しており興味深い。残念ながら living cell における確認は未だなされていないが、今後の展開が大変楽しみである。

内山安男先生（大阪大・医）は「アポトーシスの実体：プロテアーゼと Bcl-2 の関与の仕方」と題して講演された。線虫の細胞死に不可欠な遺伝子 *ced-3* のホモログである ICE (interleukin 1 β converting enzyme) が線維芽細胞の細胞死を惹起することが明らかにされて以来、蛋白質分解の役割がアポトーシス研究の主流となっている。一般的には、細胞死誘導刺激で活性化された ICE ファミリープロテアーゼが CPP 32/Yama プロテアーゼを活性化し、細胞死シグナルを下流に伝えて細胞死に至ると考えられている。しかし、内山先生は種々のプロテアーゼ阻害剤を用いた解析から、この経路の他にリソソームカテプシン群のみで細胞死を制御できる新たな機構が存在することを示した。また、これまで細胞死抑制活性を有する Bcl-2 はミトコンドリアの外膜、小胞体、核膜に局在すると考えられていたが、詳細な検討の結果、大半がミトコンドリアの内膜に存在することを明らかにした。何れも新たな知見であり、2系列のプロテアーゼカスケードの相関関係（役割分担）やミトコンドリア内膜に局在する Bcl-2 が如何なる機構でリソソームを介した細胞死を抑制するのかなど、今後の展開が楽しみである。

西道隆臣先生（都臨床研・遺伝情報）は「痴呆に至る神経性疾患におけるプロテアーゼの役割」と題して講演された。これまで、虚血で誘導される遅発性神経細胞死はカルパインが活性化される細胞で起こると考えられてきた。しかし西道先生は、フォドリンのカルパインによる分解産物を特異的に認識する抗体を用いた解析から、カルパインの活性化が遅発性神経細胞死の生ずる領域とは異なる細胞でしかも細胞死に先立って起こることを明らかにした。また、カルパインによる蛋白質分解が何らかの病的シグナルを作り出している可能性も指摘した。更に、アルツハイマー病における β アミロイドの蓄積機構を種々の分解産物に対する特異抗体を用いて解析し、 β アミロイドのアミノ末端側の分解が代謝の律速を担っていることを突き止め、「アミノペプチダーゼ仮説」を提唱した。これらの結果は、西道先生が確立した蛋白質分解反応を特異的に認識する抗体の作製とその応用によって初めて明らかになったものである。今後、この研究法が種々のプロテアーゼの生理的ある

いは病理的な役割を解明する上で大いに貢献するものと思われる。

木戸 博先生（徳島大・酵素研）は「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」と題して講演され、インフルエンザウイルスや AIDS ウイルスの感染成立における宿主細胞由来プロテアーゼの役割を解説した。インフルエンザウイルスは気道でのみ感染増殖するが、これは気道の粘膜上皮細胞（クララ細胞）が分泌する tryptase Clara がウイルスの外被膜蛋白質を限定分解し、ウイルスに膜融合活性と感染性を与えるためであることを明らかにした。また、AIDS ウイルスの感染においては、細胞内でウイルス外膜蛋白質前駆体 gp 160 の限定分解に関わるカルシウム非依存性プロテアーゼ（既知の furin はカルシウム依存性）を見出すと共に、ウイルスが細胞内に取り込まれる際に重要である gp 120 の V3 領域（膜融合に関与）を切断するプロテアーゼとして tryptase TL2 を明らかにした。この tryptase TL2 は NDP キナーゼ活性も合わせ持つことが明らかとなり、膜融合過程で両酵素活性がどのように共役するのか大変興味深い点である。この分野の研究では、ウイルス自身のプロテアーゼを扱ったものが多い。その中で木戸先生の研究は、宿主細胞のプロテアーゼとその制御因子に焦点を当てたものであり、生体防御システムの解明や抗ウイルス薬の開発において新展開が期待される。

以上、各先生方の講演内容を簡単に紹介させていただきましたが、本シンポジウムでは「蛋白質分解」が細胞の増殖・分化はもとより各種疾病の発症に至るまで様々な過程で重要な役割を担っていることが明らかにされました。「蛋白質分解」の研究がもはや限られた分野の学問ではなく、生命現象そのものを理解する上で欠くことのできない幅広い学問になっていることを強く感じさせ、重点領域研究「蛋白分解のニューバイオロジー」のスタートを飾るに相応しいシンポジウムであったと思います。最後に、大変興味深い話題を提供して戴いたシンポジストの先生方並びにシンポジウムを企画して戴いたオーガナイザーの先生方に感謝申し上げます。

（猪股光司：都老人研・酵素生化学）

(4) ミニレビュー

1 Caspaseプロテアーゼ研究の新展開

Caspaseとは何か？ ICE/CED-3ファミリープロテアーゼの新名称である。1993年の11月に線虫*Caenorhabditis elegans*の細胞死遺伝子*ced-3*の遺伝子配列が発表され、哺乳動物の遺伝子interleukin-1 β converting enzyme (ICE)とのホモロジーが明らかになった。その後、ICEとホモロジーをもつシステインプロテアーゼ遺伝子の存在がたくさんのラボから報告された。現在ヒトでは10種類の遺伝子が発表されている。遺伝子をクローニングしたラボで独自に名前を付けたので、同じ遺伝子に複数の名称が与えられ混乱していたが、この分野の主だった人たちが集まり"Caspase"という名称に統一することを提案した。そして、発表された順番に番号を付けて呼ぶことになった。しかしながら、研究が進むにつれて、このCaspaseファミリーは遺伝子構造の比較からいくつかのサブファミリーに分類され、さらにそのサブファミリーが機能的にも違うことが私たちのグループの研究から分かってきた。

私たちは、このプロテアーゼ群の生理的機能を明らかにする目的で、これら遺伝子のノックアウトマウスを作製してきた。まず、ICEのノックアウトマウスを作製した(1)。このマウスにおいては、ICEのターゲットであるinterleukin-1 β (IL-1 β)の分解が起これず活性型のIL-1 β が生成されなかったが、当初興味をもたれていたアポトーシスに関する変異は、抗Fas抗体による胸腺細胞死以外には観察することができなかった。その後の私たちの解析では、ICEノックアウトマウスの胸腺細胞はFasリガンドに対して正常マウスと同等の感受性をもち、また末梢リンパ球ではFas抗原によるアポトーシスに異常を認めることはできなかった。しかし私たちは、炎症や感染症のモデル実験より、ICEノックアウトマウスがinterferon- γ (IFN- γ)の発現誘導に異常があることに気がついた。この原因として私たちが注目したのは、IFN- γ -inducing factor (IGIF/IL-18)と呼ばれるサイトカインである。このサイトカインは、マウスに*Propionibacterium acnes* (P. *acnes*)とLipopolysaccharide (LPS)を投与することに

よりマクロファージ系の細胞より分泌され、T細胞およびNK細胞に作用しIFN- γ の発現を誘導する因子である(2)。このサイトカインは24 kDaの前駆体として翻訳され、その後18 kDaの活性型サイトカインとして細胞外に分泌される。しかし、そのN端にはシグナル配列が存在せず、切断部位のアミノ酸配列はICEの認識配列に合っていた。さらに、IGIF遺伝子を単独で細胞に導入しても分泌されないことが明らかになった。その後、アメリカのDNAXのグループよりIGIFの三次構造がIL-1によく似ていることが発表された(いまのところ一次構造上IGIFにホモロジーもつ遺伝子は分かっていない)(3)。そこで私たちは、IGIFがICEおよび他のCaspaseファミリー分子により修飾をうけるか否かを調べた(4)。まず、COS細胞を使った遺伝子導入の実験により、IGIFはICE(caspase-1)およびTx(caspase-4)により生理的なサイトで切断され、細胞外に分泌された。アポトーシスの実行分子として注目を集めているCPP32(caspase-3)はIGIFを分解するものの、その切断するサイトは違い、18 kDaの成熟型IGIFを生成することはできなかった。大腸菌を用いてそれぞれの精製品を作り、それらを使ったin vitroの実験においても同様の結果が得られたが、TxのIGIFに対する親和性はICEに比べて約100倍低く、生理的にはICEがIGIFを成熟させる可能性が高くなった。次に私たちは、ICEノックアウトマウスに*P. acnes*とLPSを投与する実験系を用いてIGIFおよびIFN- γ の分泌を解析した。このノックアウトマウス系においては、IGIFの発現の高い肝臓のKupffer細胞からの活性型IGIFの分泌が検出できなかった。また、血清中のIGIFおよびIFN- γ の値がICEノックアウトマウスにおいて有意に低下していることが明らかになった。これらの実験結果より、IGIFがICEの第二の生理的基質であることが明らかになった。

次に私たちが注目したCaspaseファミリー分子はCPP32(caspase-3)である。ここ数年の研究から、CPP32はファミリーの中でアポトーシスの実行分子としての可能性がいちばん高いことが示唆されていた。CPP32の活性中心をコードするゲノム遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子で置換したベクターを構築し、定法によりノックアウトマウスを作製した(5)。ホモマウス(CPP32^{-/-})はヘテロ間の掛け合わせにより生まれ

てきたマウス全体の約7%しか検出されなかった。このことは胎生期に半数以上のマウスが死亡していることを示唆している。また、生まれてきたCPP32ノックアウトマウスは脳神経系に異常をきたしており、3週間以内にすべてのマウスが死亡した。その他の臓器に関しては、組織学的に検索した限り異常を認めることはできなかった。神経系の異常は大腦、小脳、そして眼に認められた。たとえば、眼では網膜は層構造は保つものの隆起した部分が存在した。また、大腦においては異所性の細胞集団が存在し、特に大腦基底核と海馬の間で顕著であった。その異所性の細胞集団には神経細胞とグリア系細胞が正常と同じ比率で混在し、BrdUで染色されなかった。このことは、この細胞集団が腫瘍や未分化細胞の異常増殖とは違うことを示唆した。小脳においては、外顆粒細胞層が正常マウスにおいては消失する時期においても観察され、内顆粒細胞層への移動が終了していなかった。また、内顆粒細胞層が厚く、正常に比べてCPP32^{-/-}マウスでは顆粒細胞の数が増加していることが分かった。これらの結果は、CPP32ノックアウトマウスでは神経系発生過程においてアポトーシスが正常に起こっていないことを強く示唆した。さらに胎生12日の胎児の神経組織を検索した結果、アポトーシスをおこした細胞(Pyknotic cell)の集団がCPP32ノックアウトマウスにおいては存在しないことが明らかになった。その他の系におけるアポトーシスの異常を調べるために、胸腺細胞をモデルとして実験を行った。胸腺細胞は成熟過程において自己反応性細胞がアポトーシスにより除去されることが分かっているが、細胞表面のマーカールによる解析ではその違いを見いだすことはできなかった。さらに、胸腺細胞にアポトーシスを起こす薬剤（デキサメサゾン、スタウロスポリン、セラミド）および抗体（抗Fas抗体、抗CD3抗体および抗CD28抗体の組み合わせ）を用いて解析したが、正常マウスとCPP32ノックアウトマウスの間に有意な差を見いだすことはできなかった。さらにCPP32の基質と考えられているポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼおよびD4-GDI (GDP dissociation inhibitor)はアポトーシスの刺激により分解されることが分かった。これらの結果は、神経系以外のアポトーシスにはCPP32以外のCaspaseファミリープロテアーゼが重要であることを示唆する

ものと考えられる。

これらふたつのノックアウトマウスの解析結果より、Caspaseファミリーには機能的に少なくとも二種類のサブファミリーが存在することが明らかになった。そのひとつはICEのサブファミリーであり、サイトカインの活性化および分泌に関与する。もうひとつはCPP32のサブファミリーであり、アポトーシスの実行分子である。CPP32に関しては、ノックアウトマウスの異常が神経系でのみ観察されたことから、他のメンバーが組織特異的に働く可能性がある。また、Caspaseファミリープロテアーゼの中にはサイトカインの活性化やアポトーシスの実行以外の機能をもつものも存在すると予想される。これら分子のひとつひとつの機能を明らかにするために、私たちは他のファミリーの遺伝子のノックアウトマウスを作製する計画を持っている。さらに、このプロテアーゼファミリーが基質を限定的に分解することにより生ずる生理的機能を生化学的に明らかにしていきたいと考えている。

文献

- (1) Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., et al. (1995) *Science* 267, 2000-2003.
- (2) Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., et al. (1995) *Nature* 378, 88-91.
- (3) Bazan, J.F., Timans, J.C. & Kastelein, R.A. (1996) *Nature* 379, 591.
- (4) Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., et al. (1997) *Science* 275, 206-209.
- (5) Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., et al. (1996) *Nature* 384, 368-372.

(杭田 慶介：都臨床研・免疫)

2 Proteolysisにおける分子シャペロンの役割

分子シャペロン（以下シャペロンと略）とは、蛋白質に可逆的に結合し安定化して、その蛋白質の凝集、まちがったfoldingあるいは分子間相互作用を防ぐことによって、正しいfoldingやassemblyを助ける一群の蛋白質である(1)。この中では、熱ショック蛋白質であるHsp70とシャペロニンと呼ばれるHsp60やGroEL、そしてそれらと共に働く蛋白質（Hsp40/DnaJ, GrpE, GroES等）の解析が最も進んでおり、又最近ではHsp90などの他のシャペロンの研究も活発に行われている(1, 2)。大抵どのシャペロンも種間の相同性が高い。また真核生物では、ミトコンドリアや小胞体などの

細胞内器官も一群の独自のシャペロンを持つ。

これらシャペロンの研究者は、以前からシャペロンと蛋白分解はどこかで関係しているだろうと考えていた。なぜならシャペロンの研究者は、もともと熱ショック蛋白質の解析を発端に研究を始めており、熱ショック蛋白質にはシャペロン以外にも、分解に関わる分子が次々に発見されていたからである(2, 3)。確かに、熱ショック時にシャペロンのみならず分解に関わる分子の発現が誘導されるのは、細胞にとって合理的な現象である。熱ショックなどのストレスによって、ダメージを受け folding がおかしくなった異常蛋白質が細胞内に蓄積する。これら異常蛋白質は何らかの運命の選択を受けて、シャペロン系によって再生されるか、分解系によって分解されなければならないからである。近年、ATP 依存性プロテアーゼの研究が進み、またいくつかのシャペロンとプロテアソーム複合体の高次構造の類似性も明らかになり、両者の関係が急にクローズアップされてきた。ここでは、これまでの知見と個人的な意見を交えて、蛋白分解におけるシャペロンの役割を考えてみたい。

(A) 分解される基質の凝集、不溶化の防止

大腸菌をピューロマイシン処理し翻訳を阻害すると、リボゾームから翻訳途中のポリペプチドが遊離する。これらは“できそこないの蛋白質”なので、不安定ですぐに分解される。ところが、DnaK (大腸菌のHsp70), DnaJ, GrpE, GroELらシャペロンの変異株では、このようなポリペプチドが安定化され分解されにくくなった(4)。また後に、プロテアーゼFtsHによって分解されることがわかった大腸菌の熱ショック応答因子 σ^{32} は短命な蛋白質である(5)。この σ^{32} もDnaK, DnaJ, GrpE変異株では安定化され、更にこれらシャペロンとの直接の結合が示された(6, 7)。したがってこれらの実験から、シャペロンが異常蛋白質や短命な蛋白質の分解に積極的な役割を果たしていることが、まず明らかになった。

出芽酵母のPim1はミトコンドリア膜にあるATP 依存性プロテアーゼで、大腸菌のLonのホモログである。Langerらのグループは、Pim1が基質を分解するのに先立ってSsc1(ミトコンドリアのHsp70)が基質と結合している必要があることを示した(8)。

Ssc1変異株では、基質は凝集してしまい分解されなくなるのである。またMdj1（ミトコンドリアDnaJ）の欠損株では、基質とSsc1の結合が減少し、基質の多くが不溶性画分に入ってしまった(8)。さらにGottesmanらは、大腸菌のDnaJの欠損株でも、RcsAというLonの基質は凝集を起こしてしまい分解されにくくなる事を示した(9)。Foldingがおかしくなった蛋白質は、本来蛋白質の内部にあるはずの疎水性部分が露出し、不可逆的に凝集してしまいやすい。シャペロンは、このような蛋白質が分解される際にこれらを凝集、不溶化しないように保ち、プロテアーゼによって速やかに分解されるようにしているのである。

(B) 分解される基質の認識、選択、改変？

しかし、シャペロンの機能は単に基質を凝集しないような状態に保つだけではないだろう。GoldbergらはYdj1（出芽酵母のDnaJ）のある変異株では、長命な蛋白質の分解は影響を受けないが、いくつかの短命な蛋白質や異常蛋白質の分解が起こりにくくなっていることを示した(10)。テスト基質として用いた異常蛋白質の一つは、このyjd1変異株中でも水溶性でfoldingも正常のようだった。しかし、ユビキチン化されている基質の量が野生株に比べて減少していることがわかった。さらにYdj1とこの基質の結合も確認されたので、Ydj1は基質に直接結合してこれがユビキチン化されるのを助けていると考えられる。非天然構造を認識するシャペロンの特技から考えて、シャペロンは分解されるべき基質を認識し選択するのではないか。そして、それが分解系（例えばユビキチン結合酵素 E2 やユビキチン識別酵素 E3）に認識されるようなコンフォメーションに変わるのを助けているのかもしれない。又、分解系のcofactorかもしれない。この辺の研究はわかっていない部分が多く、E2 やE3 のからみとあわせて興味深い所である。また、Ciechanover達はreticulocyteのin vitro系で、Hsc70を除いてしまうとヒストン2Aのユビキチン化が起こらなくなり、Hsc70もユビキチン化に必要であることを示した(11)。

(C) 分解machinery の制御？

また、シャペロンは分解される基質に働くのではなく、分解のmachinery そのも

のに働くことも考えられる。そして、シャペロンはそれらを安定化したり、machineryの集合(assembly)や解離(disassembly)を助けて、もっと活性の高い(又は低い)ものに変換する制御機構として働いているのかもしれない。柳田らのグループは、Cut4がユビキチンリガーゼ活性(E3)を持つ分裂酵母の20Sサイクロソーム複合体(M期後期への移行やBサイクリンの分解を担う複合体)の構成成分であることを示した(12)。このcut4の高温感受性変異を多コピーで部分的に抑制する遺伝子としてSti1(p60)が得られ、Sti1(p60)の大量発現によって、cut4変異体中の20S複合体の形成が若干回復した(12)。一方、通常Sti1(p60)はHsp90と結合している分子である(13, 14)。哺乳類細胞では、転写因子であるステロイドホルモンレセプターは、Hsp90やイムノフィリンなどと不活性な複合体を形成して、ホルモンによって活性化されるのを待ちうけている(15)。Sti1(p60)は、この複合体になる前の中間体の成分として、複合体形成に働いている(最終複合体に含まれるのかどうかははっきりしない)(16)。Sti1(p60)が、このように20Sサイクロソームにも直接に働いているのかどうかはわからない。しかし、興味深い事には、Sti1(p60)は、20Sサイクロソーム複合体の他の構成成分であるCdc16(Cut9), Cdc23, Cdc27(Nuc2)と同様に、TPRモチーフ(tetratricopeptide motif; 蛋白質間の相互作用に関係すると推定されているモチーフ)を持つ(17)。Sti1(p60)はTPRモチーフを介して20Sサイクロソームの複合体形成に参加しているのかもしれない。

また、20SプロテアソームのY7サブユニットの高温致死変異を多コピーで抑える遺伝子として、出芽酵母よりSSB1(Hsp70 family)がとられている(18)。この場合のSsb1のターゲットは明らかではないが、プロテアソームは多数の分子の複合体であるから、Ssb1はひょっとすると複合体の集合や解離に関わっているのかもしれない。

(D) ATP依存性プロテアーゼ：シャペロンとプロテアーゼの複合体

ATP依存性プロテアーゼの研究は、蛋白分解におけるシャペロンの役割をさらに明らかにすると期待されている。というのは、これらの研究によって、ATP依存性プロテアーゼは、ATPaseとシャペロン機能を持つ分子(又は領域)とプロテアーゼ活

性を持つ分子（又は領域）との複合体であるという考えをもたらし、この考えを支持する実験データが次々と得られているからである(19)。

大腸菌のClp AP プロテアーゼは、プロテアーゼ活性を持つClpP分子とATPase 活性を持つClpA分子から構成されている(9)。ClpPとClpAはATP存在下で26Sプロテアソームに似た四次構造の複合体を形成し、ATP依存性プロテアーゼ活性を示す。In vitroの実験から、ClpAはそれ自身にシャペロン機能があることがわかった。RepAというDNA結合蛋白質は、通常DNA結合能のないダイマーで存在しているが、DnaK/DnaJ/GrpEの3つのシャペロンによって、DNA結合能のあるモノマーに変換される。この系でClpAはDnaK/DnaJ/GrpEの代わりを果たすことができたのである(20)。ちなみに、ここにClpPが共存するとRepAは分解されてしまう。

またAAAファミリー(ATPase associated with a variety of cellular activities)に属する出芽酵母のYta10/Yta12は、複合体ではATP依存性プロテアーゼ活性を示し、さらにYta10、Yta12それぞれにシャペロン機能がある(21)。

では、シャペロンの機能は、ここではどのような役割を果たしているのだろうか？ ClpXというClpAに良く似た分子も、ClpPと複合体を形成して、ATP依存性プロテアーゼとして働く。ところが、ClpA/ClpP複合体とClpX/ClpP複合体では異なる基質特異性を示し、Clpファミリーでは、シャペロン活性を持つ分子の方がプロテアーゼ複合体の基質特異性を決めている事がわかった(9)。ClpX、ClpA中にはそれぞれに特有の基質結合部位があるのかもしれない。

それではこれらシャペロン機能領域中で保存されているATPaseは何をしているのだろうか？ 話は少しそれるが、ATPase活性を持つシャペロンの中で、最も研究が進んでいるのはDnaK(大腸菌のHsp70)である(1, 22)。DnaKは大きく分けて2つのドメインから成り、N末側にATPaseドメイン、C末側にペプチド結合ドメインを持つ。DnaKのATPase活性はこれ自身では大変弱く、結合したATPはADPにほとんど水解されない。したがって、通常DnaKはATPが結合した形で存在している。このATP結合型DnaKは基質との結合性が低く、速い速度で基質と結合、解離を繰り返している。

ところが、DnaKのATPase活性を促進するDnaJによってATPase活性が強められると、DnaKは主にADP結合型になる。このADP結合型DnaKは今度は基質親和性が高い。そして、ATP(ADP)交換機能のあるGrpEによってADPがDnaKから遊離し、そしてまたATPが結合するまでDnaKは基質と安定な複合体を形成するのである。つまり、DnaKのATPaseは、DnaKがATP結合型とADP結合型という異なる基質親和性を持つように働いているのである。したがって、もしこのDnaK ATPaseのアナロジーが成り立つならば、ATP依存性プロテアーゼのATPaseは基質との結合と解離に必要であり、この分子のどこかにある基質結合部位を制御していることが考えられる。

シャペロンは、以上述べた以外にも、様々な形で蛋白分解に関わっていると思われる。例えば、ミトコンドリアや小胞体への蛋白質の移行には、シャペロンの助けをかりて蛋白質がほぐれた形で膜を通過するように、プロテアソームの中に基質が入り込むときにシャペロンが手を貸しているというのも魅力的な仮説である。また、現段階ではうまく説明のつかない現象もある。Craigらは、出芽酵母の*ssa1ssa2* (Hsp70 familyで4つの相同遺伝子のうち主な2つを破壊したもの)変異株の高温致死性を多コピーで抑える分子としてUBP3(deubiquitinating enzyme)を単離しているが、どうしてこの遺伝子が得られたのかまだわからない(23)。また、生化学的解析から、Hsp90がプロテアソームの阻害因子として得られている(24)。これらの問題を含め、蛋白分解にシャペロンがどう関わるかを解明することは、ひるがえってシャペロンの機能をもっと理解することにつながると思う。さらに、もし、アルツハイマー病もプリオン病もプロテアーゼによって分解されなくなるような蛋白質の蓄積が病因ならば、蛋白質の凝集、不溶化を防ぐシャペロンと分解を司るプロテアーゼを共に研究することが、その治療、予防に重要になると期待される。

文献

- (1) Hartl, F.U. (1996) *Nature* 381:571
- (2) Parsell, D.A., and Lindquist, S. (1994) In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (ed. R.I. Morimoto et al.) CSHL Press pp.457
- (3) Goldberg, A.L. (1992) *Eur. J. Biochem.* 203:9
- (4) Straus, D.B., Walter, W.A., and Gross, C.A. (1988) *Genes and Dev.* 2:1851

- (5) Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B. et al. (1995) *EMBO J.* **14**:2551
- (6) Straus, D.B., Walter, W.A., and Gross, C.A. (1990) *Genes and Dev.* **4**:2202
- (7) Gamer, J., Bujard, H., and Bukau, B. (1992) *Cell* **69**:833
- (8) Wagner, I., et al. (1994) *EMBO. J.* **13**:5135
- (9) Gottesman, S., et al. (1995) In *Protein Kinesis: The Dynamics of Protein Trafficking and Stability*. CSHL press pp.533
- (10) Lee, D.H. , Sherman, M.Y. and Goldberg, A.L. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**:4773
- (11) Ciechanover, A., et al. (1995) In *Protein Kinesis: The Dynamics of Protein Trafficking and Stability*. CSHL press pp.491
- (12) Yamashita, Y.M. et al., (1996) *Nature* **384**:276
- (13) Smith, D.F. and Toft, D.O. (1993) *Mol. Endocrinol.* **7**:4
- (14) Chang, H.-J. and Lindquist, S.(1994). *J. Biol. Chem.* **269**:24983
- (15) Bohen, S.P. and Yamamoto, K.R. (1994) In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (ed. R.I. Morimoto et al.) CSHL Press pp.313
- (16) Smith, D.F. (1993) *Mol. Endocrinol.* **7**:1418
- (17) Lamb, J.R., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995) *TIBS* **20**:257
- (18) Ohba, M., (1994) *FEBS Lett.* **351**:263
- (19) 田中啓二 (1995) *実験医学* **13**:1032
- (20) Wickner, S., et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12218
- (21) Arlt, H., et al. (1996) *Cell* **85**:875
- (22) McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein J., and Bukau B. (1995) *J. Mol. Biol.* **249**:126
- (23) Craig, E.A. et al., (1994) In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (ed. R.I. Morimoto et al.) CSHL Press pp.31
- (24) Tsubuki, S., Saito, Y. & Kawashima, S. (1994) *FEBS Lett.* **344**:229

(木村洋子：都臨床研・腫瘍細胞)

3 ATP依存性プロテアーゼ群の分子進化

これまでに原核生物から真核生物に至る生物から多数のATP依存性プロテアーゼが発見され、それぞれの機能の解析はまだ多く残されたままであるが、その同定はほぼ終わりに近づいている状況と思われる。真正細菌、古細菌、真核生物のいずれについても全ゲノム配列が明らかにされた例が発表され、比較検討が可能になった。そういう観点でこれらの多様なATP依存性プロテアーゼ群を眺めることが、多少なりとも機能や生物学的意義を考えるヒントになるかも知れない。ただし、初めにお

断りしておくが、私自身は蛋白の進化をコンピューターで解析しているプロでは無く、不十分な解析しか出来ないで、「分子進化」といえるような高尚な話にはなりそうもない。私見を交えていくつかのポイントを指摘してみることにする。

いくつかの種について、ATP依存性プロテアーゼを表にまとめてみた。一応、全ゲノムの明らかになったものについて、現時点でATP依存性プロテアーゼとして同定されたものおよびそのホモログをピックアップした。これら以外にも新たなプロテアーゼが見つかる可能性もあるし、逆に後で述べるようにClpBについてはこれまでのところプロテアーゼ活性は見いだされていない。話の都合上、表に入れておいた。まずこの表を見て気づくことは、真核生物では、細菌起源とされる細胞小器官を除けば、基本的にATP依存性プロテアーゼはプロテアソームだけであるのに対して、原核生物は複数の異なるATP依存性プロテアーゼを持つことである。これは、細胞の複雑性という点からは、一見不思議な気がする。ただ、プロテアソームはそれ自体何十ものサブユニットからなる巨大な複合体で、機能的にも多機能であることからすれば、原核生物と真核生物は別の方法を選択したということであろうか。では、原核生物のATP依存性プロテアーゼの機能をすべて兼ね備えたのがプロテアソームであろうか？あるいは、どれかがプロテアソームの原型（プロトタイプ）であろうか？表に挙げた生物のうち、出芽酵母は間違いなく真核生物であるし、最近の知見を踏まえれば古細菌も細菌という名にかかわらず真正細菌よりむしろ真核生物に近縁らしい。そこで最近では、Archaeobacteriaではなく単にArchaea（何と訳すのでしょうか？始原細胞という訳語を見たこともあるが）と呼ぶことが提唱されている。実際、ATP依存性プロテアーゼの観点からも真核生物に近いことがうかがえる。そのサブユニット構成は、かなり単純ではあるが、確かにプロテアソームを有している。そして、それ以外にはLonプロテアーゼを持つ。Lonの機能はプロテアソームでは代用できないということか？ただし、後で述べるように古細菌のLonは真正細菌のLonとは異なる起源かもしれない。原核生物は大別して4種類のカテゴリーのATP依存性プロテアーゼを持つ。FtsH、Lon、ClpとHslVUである（これらのプロテアーゼ

の全体的な構造の特徴は「ぶろておりしす」第2号の58ページに載っている)。Clpプロテアーゼの場合には、触媒サブユニットとしてClpPを共通に含むClpAPとClpXPの少なくとも2種類があるので、プロテアーゼの数としては5種類以上ということになる。

さて、表には大腸菌からラン藻まで4種類の真正細菌を挙げたが、これらの原核生物が持つATP依存性プロテアーゼのセットはそれぞれ異なり、どれ一つとして同じセットのものは無い。またまた原核生物の多様性である。しかし、細かく見ていくと興味深い側面が見えてくる。まず、これらすべてに共通するのはFtsHである。しかも、ラン藻ではその数4つ。御存じのように、FtsHはこの表に挙げたプロテアーゼの中で唯一膜結合型のプロテアーゼである。ラン藻と真核生物の葉緑体は共通の祖先から進化したと考えられていて、細胞膜のほかにチラコイド膜を持つ。このことと、4種類のFtsHを持つことが深く関わりと想像されるが、ここでの本題ではないので話を先に進める。次に、ラン藻を除けば、Lonが共通に存在する。HslVUは大腸菌とインフルエンザ菌に存在し、「ぶろておりしす」第2号のChin Ha Chung博士の講演記事ですでに紹介されたように、HslVがプロテアソームの触媒サブユニット β と相同性があることから、これこそがプロテアソームのプロトタイプとして注目を集めているプロテアーゼである。HslVUは枯草菌などグラム陽性菌にも存在することが分かっている。しかし、果たして本当にHslVUがプロテアソームのプロトタイプであると結論してよいだろうか？二つの点を指摘したい。一つは、確かにHslVがプロテアソームの β サブユニットのホモログであるのは間違いないと思われるが、HslUはプロテアソームの制御ATPaseのプロトタイプとは言い難い。この表に挙げたすべてのATP依存性プロテアーゼのATPaseドメインはWalkerモチーフA、Bを共通に持ち、互いに似てはいるが、HslUがプロテアソームのATPaseに一番近いかというと、そうではない。表に挙げたすべてのATP依存性プロテアーゼといくつかの近縁のATPaseのATPaseドメインについて、CLUSTAL Wというソフトを用いて解析した系統樹を図に示した(脚注)。ご覧のとおり、どちらかといえばそれほど似ていない。

では、どれがプロテアソームのATPaseに似ているか？ FtsHである。FtsHとプロテアソームのATPaseのアミノ酸配列は極めて相同性が高く、ともにAAAスーパーファミリーに属するATPaseである。もう一点は、すでに述べたようにプロテアソームは真核生物と古細菌に共通して存在し、FtsHは真正細菌に共通して存在する。そして、細胞小器官を除けば、真核生物と古細菌にはFtsHは存在せず、プロテアソームは真正細菌には存在しない。ちょうど裏返しの関係にある。

進化の過程で以下のことがあったのではないだろうか？ 基本的にはプロトタイプ
のATPaseから様々なATPaseが派生・進化し、真正細菌はこれらすべてを引き継いだ。
一方、真核細胞はプロテアーゼATPaseとしてはAAAだけを引き継いだのではないか。
最初はすべてのセットを引き継いだか、プロテアソームが出現した後、それ以外の
ものは不要となってどんどん失われたのかもしれない。いずれにしても、プロテア
ソーム以外を捨てた真核細胞では、細菌の細胞内共生によりミトコンドリアや葉緑
体といった細胞小器官が形成され、再びFtsH, Lon, Clpを獲得することになったと思
われる。これらの遺伝子はその後核に移行した。下等な植物（ケイ藻など）の葉緑
体（色素体）のゲノムにはFtsHホモログの遺伝子が今も存在するものがあるが、酵
母のミトコンドリアや高等植物の葉緑体に存在するFtsHホモログはすべて核遺伝子
によってコードされている。酵母の細胞質に存在するClpBホモログHsp104蛋白の遺
伝子も、もしかすると今はミトコンドリアになった共生細菌が本来持っていたもの
かもしれない。

そもそもこれらのATPaseはすべて、本来プロテアーゼの制御ユニットとしての必
然性があったと考えるより、今で言う広義のシャペロンとして機能していた（いく
つかは今でも）と考える根拠がある。まず、表に挙げた蛋白がすべてプロテアーゼ
であるかという点、ClpBは疑問である。ClpBについてはプロテアーゼとしての証拠
はなく、シャペロンであるとされている。残念ながら、*in vitro*系での証明はまだの
ようであるが、シャペロン機能を示唆する*in vivo*の証拠は数多い。マイコプラズマ
にはClpBが存在するが、触媒サブユニットのClpPが存在しないこともClpBがプロテ

アーゼではないことを示唆している（表）。逆に現在プロテアーゼであることが確実なものについて、そのATPaseサブユニット/ドメインが実際にシャペロンとして機能することが明らかになったものがある。ClpAとClpXのシャペロン機能はin vitroでも証明されている。また、酵母のFtsHホモログ（Yta10p/Yta12p複合体）とLonホモログや大腸菌のFtsHについてもシャペロン活性を示唆する結果が得られている。これらのATPaseは蛋白質と相互作用するATPaseとして進化し、その後プロテアーゼ活性モチーフを分子内にジョイントするかあるいはプロテアーゼ活性サブユニットと会合することにより、プロテアーゼとして機能するようになったものと考えられる。つまり、本来ATPaseユニットとプロテアーゼ活性ユニットは機能的にも物理的にも別々の単位として存在していたと考えれば、現在でもこれらのATPaseがシャペロン機能を持つことやAAAグループ、HslUグループがそれぞれ真正細菌ではFtsH, HslVUに、真核生物と古細菌ではプロテアソームへと、全く異なる組合せの方向に進化したことが説明しやすい。この考えを支持するいくつかの事実がある。真正細菌にはLonの他にこれに似た2種類の蛋白が存在する。一つはRadA/Smsで、大腸菌、インフルエンザ菌とラン藻に存在する。枯草菌などにも存在することが分かっている。RadA/SmsはLonのプロテアーゼ活性ドメインと相同なドメインを持ち、Lonとは異なるタイプのATPaseドメインを持つ（図：脚注）。しかし、RadAはDNA修復に働く蛋白のようで、どうもプロテアーゼではないらしい。大腸菌とインフルエンザ菌のRadA/SmsではLonの活性部位に相当するSer残基が保存されているが、枯草菌やラン藻のSmsのその部位はAlaに変化していることからプロテアーゼではないことがうかがえる。もう一つは、大腸菌やインフルエンザ菌で見つかったLonBである。この蛋白はLonのプロテアーゼ活性ドメインと相同なドメインを持つが、ATPaseドメインを持たない。プロテアーゼかどうかはまだ不明である。古細菌のLonのATPaseドメインは真正細菌のそれとは異なるグループに属する（図：脚注）。さらに、真正細菌のマイコバクテリウムには、FtsHとは異なりプロテアーゼの活性ドメインを持たないAAA ATPaseが見つかった。これらの事実は、ATPaseドメインと

プロテアーゼ活性ドメインが本来別々に存在した可能性を示唆する。DNA組換えや修復に働くDNAヘリカーゼRuvBなどもかなり近縁のATPaseである(図)ことから推論すれば、これらのATPase群の祖先型は蛋白に限らず核酸などを含めた高分子と相互作用するATPaseであったのかもしれない(脚注)。そう言えば、LonのATPase活性はDNA存在下で促進される。

Clp ATPase群について少し述べておく。ClpA, B, C ATPase群は間違いなくファミリーを形成しており、しかもこれらはN末端側とC末端側に2つのATPaseドメインを持つ。これらのタイプ分けはATPaseドメイン以外の部分の特徴によるもので、ATPaseドメインの相同性はClpABC共通にN末端側ドメイン同士、C末端側ドメイン同士で高いが、同じ分子内のN末端側ドメインとC末端側ドメインはそれほど似ていない(図)。ClpABCはATPase遺伝子の重複によってできたと考えるより、それぞれのATPaseは別々に進化し、あとで遺伝子融合が起こったと考えた方が理解しやすい。そう考える根拠として、ClpABCのC末端側ATPaseと相同性の高いATPaseを一つだけ持つ蛋白が見ついている。図に示したシュードモナス菌のAmiBやマウスのSKD3などである。これらの蛋白の機能については分かっていないが、ATPaseドメインよりさらにC末端側もClpABCと相同性がある。上に述べたHslUやClpXもATPaseドメインを一つだけ持つが、これらもATPaseドメインよりC末端側にClpABCファミリーと共通のモチーフを持つ。このためHslUはClpYとも呼ばれている。しかし、ATPaseの相同性はClpXとHslU(Cl pY)ではかなり高いが、ClpABCのATPaseと比べるとN末端側、C末端側いずれともそれほど似ていない。なお、HslUのATPaseドメインにはWalkerモチーフAとBの間に他のATPaseには存在しない百数十アミノ酸残基の挿入配列があるので、ここに示した系統樹の解析ではその配列を除外して比較している。

電顕観察により蛋白分子複合体の構造解析が進み、プロテアーゼ分子についても高次構造がかなり分かってきた。そこからここで述べたプロテアーゼに共通する特徴が見え始めた。その一つはこれらのプロテアーゼの多くは多量体を形成し、リング構造をとることである。ClpA, P, HslU, V, プロテアソームの触媒ユニットがそう

である。どうやらClpXとFtsHもそうらしい。分子シャペロンGroEL/ESが7回回転対称のリング構造をとることはよく知られている。これもプロテアーゼのATPaseがシャペロン機能を持つことと関連するのであろうか？ところが、これらのリング構造が何回回転対称構造をとるかという点については、2つのミステリーがある。いずれも6回回転対称か7回回転対称のリングであるが、まずパートナーとなる組合せでその対称性が合わない場合がある。ClpAPでは制御ATPaseユニットClpAが6回回転対称であるのに対して触媒ユニットClpPは7回回転対称となっている。HslVUではすでに「ぶろておりしす」第2号で紹介されたように、制御ATPaseユニットHslUが7回回転対称であるのに対して触媒ユニットは6回回転対称という知見と、いずれも6回回転対称であるという説があって、HslUの構造については確定していない。ClpPと会合するもう一つの制御ユニットClpXも6回回転対称構造をとるらしく、この場合にも対称性が合わない。もう一つのミステリーは、6回回転対称のリングを形成するHslVと相同なプロテアソームの β サブユニットは7回回転対称のリングを形成することである。制御ATPaseユニットの対称性と触媒ユニットの対称性が合わないClpAPについては、制御ATPaseユニットリングが触媒ユニットリングに対して回転するというモデルが提唱されている。上に述べたRuvBヘリカーゼも6量体（6回回転対称）のリング構造をとることが明らかにされており、2つのRuvB 6量体リングはHolliday junctionに結合したRuvA 4量体を挟んで結合し、ATP加水分解のエネルギーを使ってDNAを回転させるモーターと考えられている。条件の違いによって6量体であったり、7量体であったりする例があるので、実際にin vivoでは何量体で、対称性が合うのか合わないのかについては、今後の解析を待たねばならない。

多量体形成とATPaseとの関係はどうか？これについては、ClpA, Hsp104, HslUについてATPaseドメインの関与が示されている。Hsp104についてはN末端側ドメインとC末端側ドメインのそれぞれに変異を導入してどちらのドメインが重要か調べられ、6量体形成にはC末端側ドメインが重要で、ATP結合が必要（加水分解は必要ではない）だが、ATPase活性（ATP加水分解）にはN末端側ドメインが重要という結

果が報告されている。ところが、ClpAについても同様の解析がなされ、この場合にはN末端側ドメインが6量体形成に重要で、ATP加水分解にはC末端側ドメインが重要であるという。またまた困惑するデータである。いずれの蛋白についても、蛋白が機能を発揮するには両方のATPaseドメインが共に必要であるという結果なので、どちらかが多量体形成で、どちらかがATPの加水分解という厳密な役割分担が決まっているのではないのかもしれない。

以上述べてきたように、ATP依存性プロテアーゼのATPaseは単にプロテアーゼの制御ユニット/ドメインとしてだけでなく、構造的にも機能的にも他の多くのATPase群と関連しており（脚注）、ATPaseの分子生物学としても興味が尽きない。今後解析が進めばさらに予期せぬ事実が判明するかもしれない。なお、誌面の都合で参考文献は割愛させていただいた。

種々の生物種におけるATP依存性プロテアーゼ

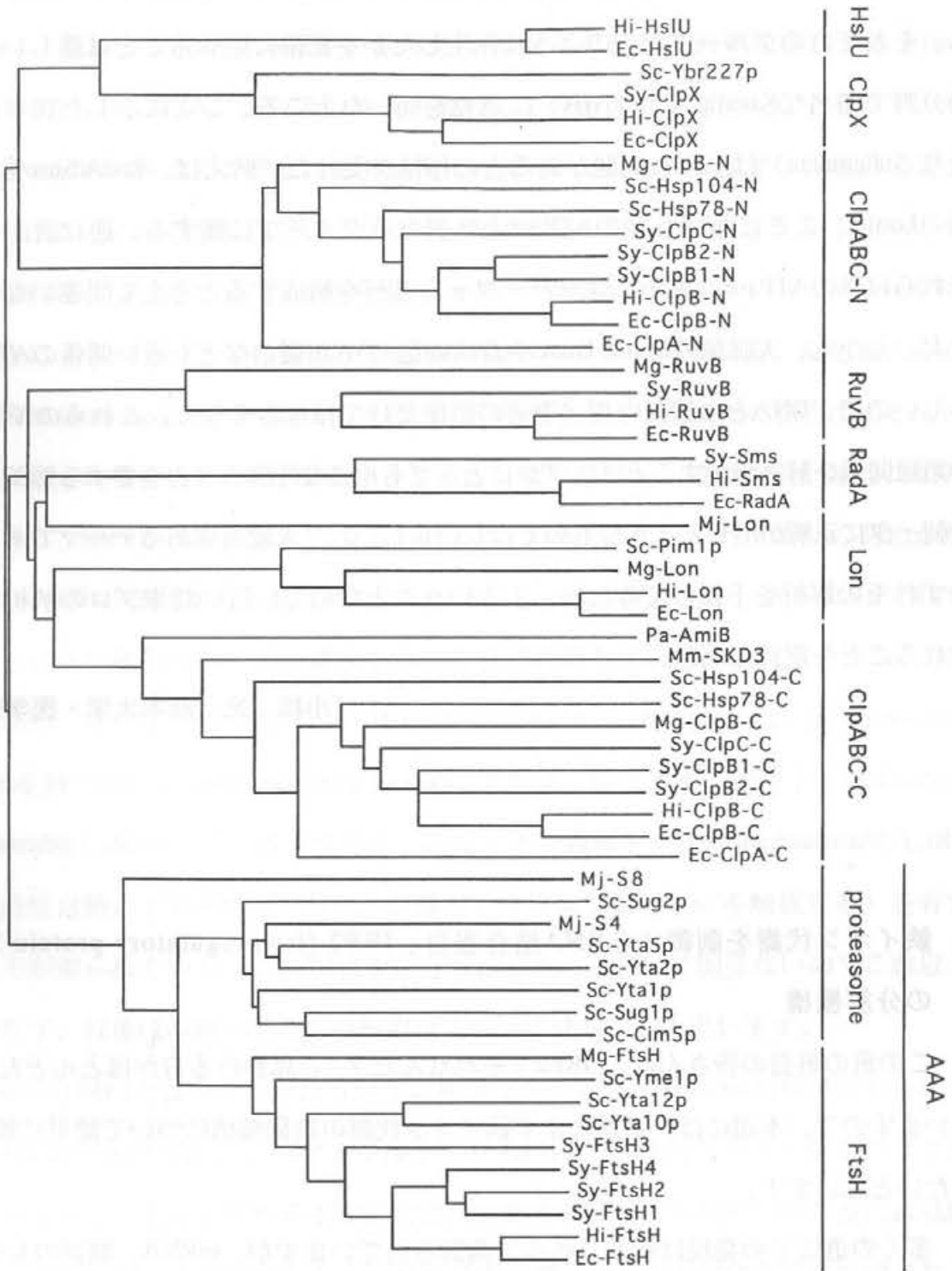
生物種	FtsH	Lon	ClpA/B/X/C	ClpP*	HsIU	HsIV* beta*	Proteasome alpha*	ATPases
大腸菌	1	1	A/B/X	1	1	1	-	-
インフルエンザ菌	1	1	B/X	1	1	1	-	-
マイコプラズマ	1	1	B	-	-	-	-	-
ラン藻	4	-	B/B/X/C	4	-	-	-	-
古細菌	-	1	-	-	-	1	1	2
出芽酵母	(3)	(1)	B(B/X)	-	-	7	7	6

*印は非ATPaseの触媒サブユニット。HsIVはプロテアソームのβサブユニットと相同的。

FtsHのATPaseとプロテアソームのATPaseは相同的。

()内はミトコンドリアに存在。ミトコンドリアのFtsHホモログはYta10p(Rca1p)、Yta12p(Afg3p)とYme1p(Osd1p)の3つ、LonホモログはPim1p、ClpB、ClpXホモログはそれぞれHsp78、Ybr227pである。細胞質のClpBホモログはHsp104。

プロテアーゼ関連ATPase群の系統樹



Ec: 大腸菌、Hi: インフルエンザ菌、Mg: マイコプラズマ、Sy: ラン藻、Mj: 古細菌 (メタン細菌)、
 Sc: 出芽酵母 (Pa: シュードモナス菌、Mm: マウス)。
 ClpA, B, CはATPaseドメインを2つ持つので、N末端側、C末端側のドメインをそれぞれClp*-N, -Cで示した。

脚注：CLUSTAL Wという系統樹作製ソフトはインターネット上に公開されており、素人にも簡単に使えるが、精度という点では問題があり、図に示した系統樹から、それぞれのグループがどのように派生したかを正確に述べることは難しい。その分野で著名なKoonin博士（NIH）に意見を聞いたところ、ここに示した図（の元となるalignment）はかなり問題があるとの指摘を受けた。例えば、RadA/Smsや古細菌のLonは、ここに挙げた他のATPaseとは異なるグループに属する。逆に言えば、それら以外のATPaseは確かにスーパーファミリーを構成すると考えて間違いのないようだ。しかも、大腸菌のDnaA, DnaCや真核細胞のMCM蛋白なども近い関係のATPaseらしいので、DNAとの相互作用は筆者の想像だけではなさそうだ。これらのATPaseの類縁関係を解き明かすことは、プロにとっても相当な時間と労力を要する難問で、一朝一夕に正解が出せるようなものではないらしい。「大変興味あるテーマであり、いずれその解析を手掛けてみたい。」ということなので、近い将来プロの解析が成されることを期待したい。

（小椋 光：熊本大学・医学部）

4 鉄イオン代謝を制御するRNA結合蛋白、IRP2 (iron regulatory protein 2) の分解機構

この班の班員の皆さんは "IRP2? それなんだ?" と思われる方がほとんどだと思いますので、本題にはいる前にまず鉄イオン代謝の制御機構について簡単に概説したいと思います。

多くの遺伝子の発現は転写レベルで調節されていますが、mRNA、翻訳のレベルでpost-transcriptionalに制御されている遺伝子群も報告されている。その中で鉄イオン代謝に関与する遺伝子の発現はhigher eukaryotesにおいて最もよく研究されている系の1つである。鉄イオンと言っても、ピンと来られない方が多いと思いますが、

鉄イオンは、ヘモグロビンのみならず、電子伝達系やDNA合成に必須である ribonucleotide reductase等のelectron transferを触媒する酵素群の活性中心として機能する生体に必須の栄養素であるが、鉄イオンは酸素存在下で過剰量存在するとfree radicalを産生し、DNA、蛋白等の生体内機能分子を傷害する毒性も有するので、その代謝は細胞内鉄イオン濃度により厳密に制御されている。鉄イオン代謝の主要メンバーは鉄イオン貯蔵蛋白であるferritinと鉄イオンの取り込みにかかわるtransferrin receptor(TfR)であるが、これらの発現はferritin mRNAの5'UTに1つ、TfR mRNA 3'UT上に5つあるstem-loop構造をしたiron responsive element(IRE)と、細胞質に存在するIRPs (iron regulatory proteins)と呼ばれるRNA結合蛋白が特異的に結合することにより制御されている。IRPsのIRE結合活性は細胞内鉄イオン濃度が低い場合にのみ検出され、IRPsがIREに結合することにより、ferritinの場合はtranslationの開始が阻害され、TfRの場合はmRNAのendonucleaseによる分解が阻害され、mRNAが安定化することにより細胞内鉄イオン濃度を高める様に作用している。これまでIREに同等の親和性、特異性を持ったIRP1、IRP2の2種のIRPsが同定されている。iron-sulfur clusterを持つIRP1はdual functioning moleculeであり、低鉄イオン濃度下ではclusterがdisassemblyしIRE結合活性を有するが、高鉄イオン濃度下ではclusterがassemblyしIRE結合活性を持たずaconitase活性(クエン酸-イソクエン酸の反応を触媒する)を有することが知られている(1)。IRP1は蛋白分解には全くと言って関係ないのでこれ以上は触れず、以後は本題のIRP2の分解機構について述べたいと思います。

IRP2はIRP1とは全長にわたり58%の相同性があるが、aconitase活性は持たない専門のIRE結合蛋白であり、73アミノ酸からなるIRP2に特異的なドメインを持っている。鉄イオンの存在に係わらず安定な蛋白であるIRP1とは異なり、IRP2蛋白は低鉄イオン濃度の存在下でのみ存在し、高鉄イオン濃度の存在下では急速に分解されることにより制御されている(2,3)。非常によく似ているIRP1が安定な蛋白であることから、IRP2に特異的なドメインの存在が鉄依存性の分解には必須である可能性が考えられた。そこで、IRP2特異的ドメインを相同領域を持つIRP1ミュータント

(IRP1+73)、特異的ドメインを欠失したIRP2 ミュータント(IRP2-73)を作製したところ、IRP2に特異的なドメインを持った蛋白(IRP2,IRP1+73)だけが鉄依存性に分解され、また、そのドメインにある5個のcysteine残基の内の3個をserineに変えたミュータント(IRP2-LCS)は鉄依存性に分解されなかった。また、培養系への各種のプロテアーゼ阻害剤の添加実験でプロテアソーム阻害剤であるMG132、LactacystinによってのみIRP2の鉄イオン依存性分解が阻害されたことから、鉄イオンによってIRP2に特異的なドメインに何らかの修飾を受け、IRP2はプロテアソームで分解される可能性が強く示唆された(4)。

鉄依存性に分解されるIRP1+73とIRP2が*in vivo*において鉄イオン存在下でのみユビキチンにより修飾されたことから、IRP2の鉄依存性分解はユビキチン依存性と考えられた。これまでシグナル依存性にリン酸化されることによりユビキチン修飾される蛋白がいくつか報告されており、IRP2のユビキチン修飾にもリン酸化が関与する可能性も考えられる。しかしながら、鉄イオンは細胞内環境下でのoxido-reductionに重要な位置を占める事が知られており、鉄イオンが蛋白と結合することにより鉄結合部位近傍のアミノ酸残基が酸素と還元剤の存在下でmetal catalyzed oxidation(MCO)と呼ばれる機構で酸化的修飾を受けることも知られていた(5)。それゆえ、酸化的な蛋白修飾がユビキチン修飾のシグナルになっている可能性が考えられた。実際、IRP2は*in vitro*において鉄イオン存在下でのMCOにより急速に酸化的修飾を受けたが、IRP1は受けなかった。また、*in vivo*において鉄イオンの存在に関わらず安定なIRP1、IRP2-73は鉄イオンの有無で酸化的な修飾に差を認めなかったが、鉄イオン存在下で急速に分解される、IRP2に特異的なドメインを持ったIRP2、IRP1+73は細胞内で鉄イオンの存在下で酸化による修飾が増強した。さらに、*in vitro*でまずMCOによる酸化反応を行った後のユビキチン化反応で、酸化的修飾を受けたIRP2のみがユビキチン修飾を受けた。加えて、マウスの赤白血病細胞株であるMEL cellのcytoplasmic extractを用いた*in vitro* degradationの実験で、IRP2はATP非存在下では鉄イオンの有無に関わらず分解されず、鉄イオン、ATP存在下でユビキチンによ

る修飾と分解が認められた。ユビキチン化を阻害しないが26Sプロテアソームによる分解は阻害するATP γ Sの存在下では、ユビキチン化されたIRP2の蓄積が認められ、IRP2の分解は抑制された。これらの結果より、IRP2は鉄イオン存在下でMCOにより生じた酸化的变化がシグナルとなりユビキチンにより修飾され、26Sプロテアソームで分解されることによりその活性が制御されていることが明らかとなった(6)。

IRP2の分解機構の解析から、リン酸化のみならず酸化修飾がユビキチン修飾のシグナルとなることが初めて見出された。これまでに多くの蛋白が酸化修飾を受けることにより活性を消失し、高次構造に変化を生じて分解されることが知られていることから、IRP2のユビキチン修飾に参与するE2、E3を同定することで、酸化ストレスによって障害され異常になった蛋白の分解機構を明らかに出来る可能性もあると思われる。また、バクテリアにおいてはoxidative stressがシグナル伝達に重要な機能を果たしていることはよく知られた事実であり、またhigher eukaryotesにおいてもAP-1, NF- κ B等の活性がoxido-reductionにより制御されていることが知られており、酸化修飾もリン酸化同様に細胞内シグナル伝達、蛋白の機能制御の上で大きな役割を果たしていると考えられて来ている。加えて、膜蛋白の分解、エンドサイトーシスの制御、ある種のキナーゼの活性制御等、種々の新しいユビキチンの機能も明らかにされつつある。それゆえ、oxidationによるユビキチン修飾は蛋白機能の新たな制御機構の1つを担っている可能性も考えられ、今後の研究の発展が期待される。

文献

- 1) Klausner, R.D., Rouault, T.A. and Harford, J.B. Cell 72, 19-28, 1993.
- 2) Guo, B., Yu, Y. and Leibold, E.A. J. Biol. Chem. 268, 24252-24260, 1994.
- 3) Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K. et al. J. Biol. Chem. 269, 30904-30910, 1994.
- 4) Iwai, K., Klausner, R.D., and Rouault, T. A. EMBO J. 14, 5350-5357, 1995.
- 5) Stadtman, E. R. Annu. Rev. Biochem. 62, 797-821, 1993.
- 6) Iwai, K. et al. in preparation

(岩井 一宏：京都大学・医学研究科免疫細胞生物学)

5 PI-3 kinaseと細胞内蛋白分解

(A) p110/p85型PI-3 kinaseとエンドサイトーシス

PI-3 kinaseは様々な受容体の下流に位置するlipid kinaseであり、110kDaのkinase活性を有するサブユニットとチロシン残基にリン酸化を受けることによりkinase活性を調節する85kDaのサブユニットからなるheterodimerである。それぞれのサブユニットは複数存在し、様々な二量体を形成している。このPI-3 kinaseはphosphatidylinositolよりもphosphatidylinositol-4,5-bisphosphateを良い基質とし、受容体活性化直後に増加するphosphatidylinositol-3,4,5-triphosphateの生合成を担っている(1)。このPI-3 kinaseは試験管内で50nM wortmanninや50 μ M LY294002で阻害されることから、この2種類の阻害剤で阻害される細胞膜のラッフリングやエンドサイトーシス、受容体のリソゾームへの移行、さらにはある種の細菌の細胞への侵入に関与していると考えられている(2)。PDGF受容体のadd back mutant (受容体の下流に存在する分子と結合する全ての部分を変異し、一つの分子とのみ結合するように再度変異させたもので、PDGF受容体の場合、PI-3 kinaseやGAP、PLC- γ , Syp binding siteのチロシンをフェニルアラニンに変異させたものにそれぞれの分子が結合するところをチロシンに戻したもの)を用いた解析では、PI-3 kinaseはリガンド-受容体複合体のエンドサイトーシスには関与せず、むしろエンドゾームからリソゾームへの移行に関与していることが明らかにされた(3)。また、受容体を介しないファゴサイトーシスでは大きな分子の貪食ほどwortmanninに感受性が高く、wortmanninによって膜のラッフリングや擬足形成は阻害されることなく、貪食の最終段階である膜の融合のみが阻害された(4)。別のグループの報告では、エンドゾーム同士の融合を調節しているG蛋白質であるRab5の活性化型への変換を介して、PI-3 kinaseはエンドゾーム同士の融合を調節していることが示されている。活性化型Rab5変異体(Q79L)を導入した細胞ではwortmanninの効果は認められず、in vitroのendosome fusion再構成系でも同様の結果を示していた(5)。

これらの結果は、阻害剤を使用した場合を含めて、最も見やすいところが見えて

いることもあり、使用した細胞の違いやリガンドの違いがあることもあり、統一した結果は得られていないのが実情である。更に、それぞれのサブユニットが複数あることも解析の結果が一致していない原因であると思われる。

(B) Vps34pとリソゾーム蛋白質の細胞内移行

酵母の液胞に局在化する蛋白質が蓄積されなくなるVPS mutant (Vacuolar Protein Sorting) の一つに、vps34がある。このvps34の遺伝子産物は動物のPI-3 kinaseのkinaseドメインと相同性を有しており、VPS34 mutant ではphosphatidylinositol-3 phosphateが減少していることから実際にPI-3 kinaseである事が確認されている(6)。このvps34pに相当するPI-3 kinaseは動物にも存在しており、cDNA cloningの結果から、100kDaの蛋白質として全ての細胞に存在している事が示された(7)。この動物のvps34pは、酵母のものと同様にphosphatidylinositolのみを基質にしその3位をリン酸化すること、150kDaのセリン・スレオニンキナーゼと複合体を形成していることが、確認された。このPI-3 kinaseはこれまでに知られているPI-3 kinase と異なり、wortmanninに対して低感受性であり、チロシンリン酸化による活性調節を受けないとされている。動物細胞をwortmannin処理すると、濃度は細胞によって異なるが、リソゾーム酵素が分泌されることが報告されている(8, 9)。更に、培養細胞に活性型Ras遺伝子を一過性に発現させるとこのvps34pの活性が抑制されるという事実は、活性型Ras遺伝子の発現に伴ってリソゾーム酵素の前駆体が分泌されてくる事実と良く一致していた。しかしながら、v-Ha-rasを持つトランスフォーマントやそのリバータントでは、リソゾーム酵素の前駆体が分泌されているにもかかわらず、免疫沈降されるvps34pの蛋白量は親株細胞、トランスフォーマントやそのリバータントの間で変化は認められない。むしろ抗リン酸化チロシン抗体によって免疫沈降されてくる活性化されたp110の蛋白量が、リソゾーム酵素前駆体の分泌量と逆相関していた。これらの結果は、先述したようにp110/p85 PI-3 kinaseはエンドゾームからリソゾームへの蛋白質の輸送にも関与している事実や細胞分画実験から得られているリソゾーム蛋白質がエンドゾームを経由してリソゾームで成熟化しているという結果とも矛盾しない。実際、

K562細胞ではvps34pを阻害しない10nM wortmanninでリソゾーム酵素が分泌されるようになることから、p110/p85型 PI-3 kinaseがリソゾーム酵素のリソゾームへの局在に
関与している可能性は否定できない。酵母ではvps34を破壊すると本来液胞に局在し
ている蛋白質が液胞に局在できなくなることは間違いないにしても、液胞には動物
細胞のリソゾームに相当する蛋白質を分解する液胞と動物細胞に相当するものな
い貯蔵型液胞があるため、酵母で液胞に局在することが動物細胞においてリソゾ
ームに局在することと同じとはいえない。動物細胞のvps34pが本当にリソゾーム蛋
白質のリソゾームへの局在に関与しているのだろうか？

文献

1. Phosphoinositide 3-kinase and membrane traffic. Shepherd, P.R., Reaves, B.J., and Davidson, H.W. *Trends in Cell Biology* (1996) 6, 92-97.
2. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. Ireton, K., Payraastre, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M., and Cossart, P. *Science* (1996) 274, 780-782.
3. Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required at a postendocytotic step in platelet-derived growth factor receptor trafficking. Joly, M., Kaulauskas, A., and Corvera, C. *J. Biol. Chem.* (1995) 270, 13225-13230.
4. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. Araki, N., Johnson, M.T., and Swanson, J.A. *J. Cell Biol.* (1996) 135, 1249-1260.
5. Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M.A., Roberts, R.L., Klippel, A., Williams, L.T., and Stahl, P.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92, 10207-10211.
6. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., and Emr, S.D. *Science* (1993) 260, 88-91.
7. A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the Vps34p-Vps15p protein sorting system. Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesssebroeck, B., MacDougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C., and Waterfield, M.D. *EMBO.J.* (1995) 14, 3339-3348.
8. Role for phosphatidylinositol 3-kinase in the sorting and transport of newly synthesized lysosomal enzymes in mammalian cells. Brown, W.J., DeWald, D.B., Emr, S.D., Plutner, H., and Balch, W.E. *J. Cell Biol.* 130, (1995) 78111-796.
9. Wortmannin causes mistargeting of procathepsin D. Evidence for the involvement of a phosphatidylinositol 3-kinase in vesicular transport to lysosomes. Davidson, H.W. *J. Cell*

6 形態形成とプロテアーゼカスケード

(A) はじめに

生物の形作りのメカニズムの解析を学部学生の時から志して以来、いつの間にか10年が経過した。この間に数々の発生を制御する遺伝子が単離されてきたが、これを可能にしたのは、ショウジョウバエに代表される変異体を用いた解析である。変異を引き起こす原因遺伝子が次々に単離された結果、大変奇妙なことに、いやむしろ予想された当然の結果というべきか、転写因子がたくさん同定された。その結果、背腹軸、前後軸の決定などいくつかの生物の発生に重要な現象が、転写因子の言葉に翻訳され、語られるようになった。これはもちろん大変大きな進歩であるが、意外とその後の解析が進んでいないものが多いように思う。突き止めた転写因子が制御する下流に位置する遺伝子を見つけることは可能であり、実際に行われているが、なかなか現象をよく説明するような作用分子まで到達するのは難しいらしい。運良くその遺伝子が細胞増殖因子であったり接着因子であったりして、その役割が予想可能な場合は一応ほっとするのかもしれないが、逆に興奮する度合いも一挙に減ってしまうこともあろう。まして、その関連遺伝子がプロテアーゼに突き当たるかどうかは、全く運次第ということになる。筆者も最近、ショウジョウバエを用いた解析を始めているが、プロテアーゼに関する限り、生化学的に基質蛋白を地道に同定するという作業をすることを優先させている。遺伝学は、基質蛋白が限定されているプロテアーゼに対してにしか、今のところ有効となりにくいと思っている。

さて、こういった筆者の独善的な観点から見ても、これから御紹介させていただこうと思っているショウジョウバエの背腹軸を決定するmorphogen、dorsal proteinの活性化に至るまでのプロテアーゼカスケードは、注目に値すると思われる。これは、現在までに遺伝学を用いて示された数少ない形態形成（胚発生）に関わるプロ

テアーゼカスケードである。

(B) dorsal proteinの活性化に関わるプロテアーゼカスケード

ショウジョウバエの背腹軸の決定には母親由来の遺伝子群が関与し、卵成熟の過程でmRNAあるいは蛋白の形で卵に供給される。dorsal proteinの活性化は背腹軸の決定に必須のステップであり、dorsal変異体では腹側構造が形成されず胚全体が背側化する。従って、dorsal proteinは腹側構造の形成に必要な蛋白である。dorsal proteinは、mRNAの形で卵に取り込まれ、受精後蛋白に翻訳される。しかし、その局在は胚全体にわたっており、腹側に局在してはいない。したがって、dorsal proteinが腹側でのみ活性化されるのは、その活性化のシグナルが、腹側に存在する細胞にしか伝達されないためである。図には、dorsal proteinを活性化するシグナル伝達メカニズムの概略を示した。このうち、プロテアーゼによるステップを*で強調してある。

最初の重要なステップは、胚を取りまく vitelline膜上の腹側に形成されるプロテアーゼ複合体の活性化である。vitelline膜上に存在する3つの蛋白質 nudel、windbeutel、pipeは、卵を取りまく濾胞細胞によって合成され、vitelline膜上に埋め込まれる。nudelはセリンプロテアーゼとしての活性ドメインを有しており、ここからプロテアーゼカスケードが始まる。そして、gastrulation-defective、snake、casterの3つのセリンプロテアーゼが次々に活性化（プロセッシング）される。次にcasterプロテアーゼによってプロセスされたspatzleが細胞膜に存在するTollに結合すると、その情報を受けたdorsal蛋白はcactusと解離し、その後、核へ移行して関連遺伝子を活性化する。この一連の反応では、プロテアーゼカスケードが腹側に局在していることがポイントである。細胞膜上のレセプターであるTollは、胚細胞膜に均一に分布しており、腹側に局在しているわけではない上、そのリガンドであるspatzleは、perivitelline fluid中を拡散するだろうからである。従って、プロテアーゼ群が腹側でspatzleを活性化することが、dorsalの活性化、ひいては腹側化を規定しているといってもよい。それでは、このようなプロテアーゼカスケードが存在する生物学的な意義、合目的性とは、一体何であろうか。なぜプロテアーゼであり、しかもカスケー

ドを形成していなければならないのであろうか。

生物の形作りにおいて、背腹軸の形成は、その後の胚葉分化、器官形成を可能にするために厳密に規定されなければならないだろう。軸形成を逆戻りさせず安定に保持するためには、プロテインキナーゼのように可逆的な反応を触媒する分子よりも、プロテアーゼのように不可逆的な反応分子を用いることの方が、進化的に有利に働いたとは考えられないだろうか。そうだとすれば、よく細胞内情報伝達機構で指摘されるようなプロテインキナーゼ間のクロストークといった情報伝播を増幅させるシステムは不要で、むしろ厳密な基質特異性を持ったプロテアーゼが連続的に作用することで、正確に、しかも一方向に情報を伝えるシステムの方が、理にかなっているように思われる。これは、とくに細胞間で機能する情報伝達システムとして有効であるように思われ、細胞増殖因子のような細胞間情報伝達分子も、プロテアーゼカスケードの変形として進化したと考えると、HGFやNGFがプロテアーゼと構造的に類似したドメインを持っていることにも納得がいく。

(C) おわりに

以上、随分と自由に（勝手に）述べさせていただき、いろいろとお聞き苦しい点があるとは思いますが、どうかご容赦頂きたい。dorsal活性化に至るプロテアーゼカスケードの解明は、遺伝学を用いたアプローチの有効性を示した好例といえる。ただし、プロテアーゼとしての生化学的な性質は、ほとんどわかっておらず、遺伝的に上流、下流であるかを決定した結果のみから判断したスキームであることは、やはり注意して見る必要がある。極めて当たり前のことであるが、プロテアーゼの機能を解析するのに、遺伝学的解析のみ、生化学的解析のみでよいはずがない。

最後に、dorsal活性化に至るプロテアーゼカスケードに関する参考文献として、単行本（教科書）として出版されているDevelopmental Biologyが、歴史的にこれらの研究をさかのぼるためによく、また、各々のプロテアーゼに関しては、Cell誌のnudelに関する論文(1995) 82, 785-794.から調べることが可能かと思う。

（本間 光一：東京大学・薬学部発生細胞化学）

7 受精とプロテアーゼ

(A) はじめに

有性生殖系の生物は、すべて精子と卵という配偶子を形成し、受精を通して生命を連続させている。生体内において、哺乳動物精子が卵との間で受精を成立させるには、卵の細胞外マトリックスである透明帯を通過することが必要不可欠である。この透明帯は単なる精子侵入の障害物としてだけではなく、厳密な認識機構に基づいた精子の付着や結合の役割を果たしていることが明らかになってきている。一方、精子はその頭部先端に先体胞（アクロソーム）とよばれる加水分解酵素を含む細胞内小器官をもっており、透明帯からの「刺激」によって引き起こされるアクロソーム反応により、これらの加水分解酵素を放出して精子の透明帯通過を容易にしているものと考えられている。アクロソームが多くの加水分解酵素を含むことから、細胞中での消化を営むリソソームと対比される。しかし、リソソームは不要になった物質をエンドサイトーシスにより取り入れて細胞内で分解作用を行うのに対し、アクロソームはエキソサイトーシスで加水分解酵素などの内容物を放出していることから明確にリソソームと区別することができる。アクロソームが精子特異的に存在する細胞内小器官であるので、その内容物は受精の際に重要な役割を果たしていると考えるのが自然である。

一方、精巣で作られる精細胞は、分化してハプロイドの精子となる。その精子の形成過程は、精細管内部で進行し、精原細胞を生じる過程、2回の減数分裂により半数体細胞（球状精細胞）を生じる精母細胞過程、球状精細胞が成熟精子へと変態を遂げる過程から成っている。この分化過程において、精巣に特異的なタンパク質を含むさまざまな遺伝子が、それぞれ選択的に活性化、あるいは不活性化されることが知られており、このような遺伝子の発現制御が精子形成・分化に不可欠であると考えられる。また、このような遺伝子の精子形成過程での発現は、あらかじめプログラミングされていると考えられることもでき、そのスイッチをオンの状態にする因子を探ることも興味深い。いずれにせよ、アクロソームタンパク質

をコードする遺伝子の構造や発現調節機構を調べることは重要であり、精子形成という未知の課題に多くの知見が得られるものと期待できる。精子アクロソーム特異的な主要タンパク質として存在するアクロシンが、精細胞の分化・形成、アクロソームの形成、受精での精子機能などの解析におけるひとつのモデルとして詳しく調べられてきている。

ここでは受精、特に精子の透明帯侵入・通過機構についてのこれまでの知見を紹介し、ついでアクロシンに関する著者の研究室で得られたこれまでの研究成果を紹介する（肩のこらいないように書くつもりでしたが、根が真面目なものでつい固く書いてしまいそうです）。

(B) 透明帯への精子侵入機構に関するふたつの仮説

精子の透明帯侵入・通過機構に関しては、現在までにふたつの仮説が提唱されている⁽¹⁾。すなわち、精子が物理的な力によって透明帯を通過していくという説と、アクロソーム内にあるタンパク質分解酵素をはじめとする酵素によって透明帯が限定分解され精子自身の運動性により通過するという説である。

(1) 酵素に依存しない物理的・機械的な侵入機構

この仮説にしたがえば、アクロソーム中の加水分解酵素には特別な役割はなく、アクロソーム反応によって露出されたアクロソーム内膜がいわゆる「ドリルの先端」のように機能し、精子の運動性により透明帯が物理的に切断される。このことを支持するいくつかの研究がすでに報告されている。

1) 透明帯中での精子の運動力は、透明帯の共有結合を物理的に切断するのにじゅうぶんである。

2) 精子が透明帯に侵入した時には、カミソリの刃で透明帯を切ったような形跡が電子顕微鏡レベルで観察することができる。また、透明帯通過中の精子の周辺には、透明帯の物理的な力による分解物と思われる微小繊維が認められる。

3) タンパク質分解酵素の阻害剤を用いた研究から、その阻害剤は精子の透明帯侵入と通過ではなく透明帯との結合を妨げ、一度透明帯と結合したものは阻害剤の有

無にかかわらず透明帯を通過することができる。

4) 透明帯通過の際に重要な役割を果たしていると思われるセリン系のプロテアーゼアクロシン(後述)は、アクロソーム反応後にアクロソーム内膜に十分な量存在していないという観察がある。

以上の根拠によって、「アクロソーム酵素」不要説が成立しているわけであるが、もしそれが正しいとすれば、前述のようになぜ精子特異的にアクロソームのような細胞内小器官があり、しかもそのなかにはアクロシンのような精子特異的なプロテアーゼが存在しているのかという疑問が改めて生じる。また、この場合には「アクロソーム酵素」がアクロソーム反応を起こさせるために存在していると考えることができる。すなわち、アクロソームが受精には邪魔な存在であり、それを除去するために酵素があるということになる。同様に、プロテアーゼ阻害剤に関する研究は一部の研究者だけから報告されていて、いまだにそのデータを確証している研究報告がない。さらに、体外受精法の確立しているマウスなどでは、アクロシンに関する生化学的なデータの蓄積が乏しく、そのマウスタンパク質に特異的な抗体も著者が知っている限りでは国内外を通して得られていない。このように、この仮説の解釈には少なからず注意が必要である。

(2) アクロソーム酵素に依存した侵入機構

もうひとつの仮説は、精子の透明帯侵入・通過はアクロソーム内にある加水分解酵素作用に依存しているという仮説である。しかし、この場合でも精子自身の運動性は必要であると考えられる。透明帯が糖タンパク質から構成されていることから、精子の透明帯通過に必要な酵素はプロテアーゼかグリコシダーゼ、あるいは両方ということになるが、グリコシダーゼが必須であるという証明はなく、精子の透明帯侵入にはプロテアーゼが重要な役割を演じていると考えるのが自然である。それではいったいどのようなプロテアーゼがアクロソーム中に含まれているのかという疑問になると、その数はかなり少なく、また生化学的にしっかりと同定され性質が詳しく調べられているものとなるとさらに数が少なくなる。結局、現在までにそ

これにあてはまるものとなると、アクロシンだけということになる。そのほかにも、メタロエンドペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ、カルパインなどがあるが、それらの性質はある程度調べられているものの詳細については不明な点が多い。

アクロシンは、アクロソーム中では酵素的に不活性な前駆体プロアクロシンとして存在しており、アクロソーム反応に伴い自己触媒的に活性型のアクロシンに変換される(後述)。透明帯自体が、プロアクロシンの活性化に関与しているという報告もある。いずれにしろ、活性化されたアクロシンは、透明帯を構成する糖タンパク質を溶解することによって精子の透明帯侵入と通過を助けていると長い間信じられてきた。また、プロアクロシンとアクロシンが、透明帯やフコースをはじめとするいくつかの糖に結合するレクチン様の活性を持っていることも見いだされている^(2, 3)。したがって、このタンパク質が精子の透明帯侵入・通過だけでなく、精子と透明帯との種特異的結合、アクロソーム反応の誘起などにも関与している可能性がある。しかし、筆者が調べた限りでは、プロアクロシンもアクロシンもたとえばウシ血清アルブミンなどのタンパク質に非常によく付着することから、一種の「粘着性」をもったタンパク質であるということができ、透明帯への結合が意味のあるものなのか否かについてはさらに検討が必要である。また、そのことも含め、アクロシンの受精での真の機能・役割、すなわち透明帯の限定分解などについての直接的な証明はいまだに皆無である。これは、よく研究されているアクロシンが主にヒト、ブタ、モルモット、ウサギ精子由来のものであり、ラットやマウスなどのげっ歯動物に関しては研究の余地が相当に残されていることがひとつの理由である。

以上のように、透明帯への精子侵入と通過の機構に関しては、そのアウトラインはある程度確立されているものの、詳細となると不明な点が山積みされているのが現状である。したがって現時点では、アクロシンを含むプロテアーゼと、やや否定的ではあるが一部のグリコシダーゼが透明帯を限定分解して精子の透明帯侵入を助けており、一度侵入したものはおもにその運動性によって透明帯を通過していると考えるのが妥当である。

(C) 哺乳動物精子アクロシンの構造

哺乳動物由来のアクロシンは、遺伝子クローニングによって、まずブタ⁽⁴⁾から、続いてヒト⁽⁵⁾、マウス⁽⁶⁾、ラット⁽⁷⁾、ウサギ⁽⁸⁾からそれらのタンパク質構造が決定されている。報告されてはいないが、モルモットの配列（未発表）もすでに明らかとなっている。いずれも一本鎖のプレプロアクロシンとして合成され、アミノ末端から新生タンパク質膜通過の際に機能するシグナルペプチド、成熟タンパク質の軽鎖に相当する配列、重鎖に相当する配列の順に構成されている。ブタ、ヒト、マウス、ラットの4種間のアミノ酸配列の相同性は、およそ60%以上であり、軽鎖の構成アミノ酸の数、セリンプロテアーゼとしての活性アミノ酸残基の位置、N結合型糖鎖の付加可能なアスパラギンの位置、12個のシステインの位置などは、4種間ですべて保存されている（図1）。ただし、マウスには13個のシステインが含まれており、この余分の1個のシステインは、分子中ではスルフヒドリル基になっているはずであり、これがプロテアーゼ活性などどのように関係しているかは不明である。さらに、軽鎖およびプロテアーゼ活性残基近傍の領域では、ブタ、ヒト、マウス、ラット4種間で非常に高い配列の相同性が認められるが、重鎖のカルボキシル末端近傍の相同性は、ブタアクロシン中間体のプロセッシング部位付近（後述）以外はそれほど高くない。特に、ブタ、ヒトで見られるプロリンの連続配列が、マウスやラットにはほとんど存在しない。さらに詳しい検討が必要であるが、このカルボキシル末端近傍の配列は、げっ歯と非げっ歯動物により区別されるように思われる。これらの結果から、一本鎖プロアクロシンは、軽鎖に相当する23アミノ酸残基の配列と重鎖に相当する配列の間で二つのジスルフィド結合によって連結されており、それらの配列間のペプチド結合の切断によって、二本鎖成熟アクロシンへと変化することが明らかとなった。したがって、アクロシンは、シグナルペプチドを含むプレプロアクロシンとして生合成され、シグナルペプチドの除去後酵素的に不活性なプロアクロシンとしてアクロソームに運搬、保存されており、さらにアクロソーム反応前後にアクロシンに変換されると考えることができる。

(D) プロアクロシンのプロセッシングと活性化

プロアクロシンの一般的な生化学的性質は、精製方法の確立されているブタ射出精子からのものについて詳しく検討されている⁽⁹⁻¹¹⁾。ブタプロアクロシンを用いて、その生体外でのプロセッシングと活性化の機構を調べた^(4, 12, 13)。精製したプロアクロシン（通常は55, 53キロダルトンの混合物として精製される）を弱アルカリ性のpHで反応させると、55キロダルトンのプロアクロシンは、反応初期に53キロダルトンのプロアクロシンに変換され、さらに49, 43キロダルトンの中間体を経て、最終的に35キロダルトンの成熟アクロシンに変化した（図2）。ブタプロアクロシンのプロセッシングを明確にするために、5種類の異なる分子量のプロアクロシン、アクロシン中間体、成熟アクロシンを単離し、各々についてアミノ末端とカルボキシル末端からのアミノ酸配列について解析した^(4, 12, 13)。55と53キロダルトンのプロアクロシンは、どちらもアルギニンで始まる単一のアミノ末端配列であった⁽¹²⁾。このことは、プロアクロシンが一本鎖のポリペプチドであることを示しており、さらに興味深いことに、1番目から23番目までの配列はアクロシン軽鎖のものと完全に一致し、重鎖の配列がそれに続いていた。一般的に、セリンプロテアーゼ前駆体は、活性型の酵素に変換する際に切断される活性化ペプチド断片をアミノ末端に持っている。したがって、アミノ酸23個よりなるアクロシン軽鎖は、その活性化ペプチドに相当していると考えられる。実際に、49, 43, および35キロダルトンのアクロシンからは、軽鎖と重鎖に対応する2通りのアミノ酸配列が見いだされた。カルボキシル末端アミノ酸配列を解析すると、53キロダルトンのプロアクロシンと49キロダルトンのアクロシン中間体は、まったく同じカルボキシル末端配列を有していた（383番目のアルギニンがカルボキシル末端アミノ酸）。また、55, 43, および35キロダルトンのプロアクロシン、アクロシン中間体、成熟アクロシンのカルボキシル末端アミノ酸は、それぞれ397番目のプロリン、365番目のリシン、322番目のアルギニンと決定された。アミノ末端アミノ酸配列を考慮すれば、この53と49キロダルトンのタ

ンパク質の構造上の相違点は、アミノ末端より23番目のアルギニンと24番目のバリンの間のペプチド結合が切断されているか否かだけである。55と53キロダルトンのプロアクロシンは酵素的に不活性であったが、49、43、および35キロダルトンのアクロシン中間体と成熟アクロシンはすべて活性型であったので、そのペプチド結合の切断がプロアクロシンの活性化、すなわちアクロシンタンパク質分子内の立体構造の変化にともなう活性部位の形成などに関与していることが判明した。また、プロアクロシンのアミノ末端付近でのプロセッシングが軽鎖と重鎖間のペプチド結合の切断だけということは、プロアクロシンから成熟アクロシンへの変換の間に起こる分子量の変化は、カルボキシル末端からのペプチドの除去であるということを反映している。以上の結果より、55キロダルトンのプロアクロシンは、アミノ末端近傍のペプチド結合の切断とカルボキシル末端からのいくつかのペプチド断片の除去という二つのプロセッシングにより成熟アクロシンに変換されることが明らかとなった⁽⁴⁾。

ところで、49キロダルトンのアクロシン中間体が43キロダルトンのものにプロセッシングされる時の切断点近傍のアミノ酸配列は、動物種にかかわらず高い相同性を有している(図2)。われわれは、最近、プロアクロシンに特異的に結合するタンパク質(sp32)をブタ精子より精製することに成功した⁽¹⁴⁾。このプロアクロシン結合タンパク質は、その相同性の高い切断部付近の配列を認識し結合している可能性が見いだされた。また、ブタやマウス、ヒトより卵透明帯結合タンパク質sp38を同定してcDNAクローニングを行ったが、sp38中の11残基の配列がこのアクロシン中間体の切断点近傍のアミノ酸配列と高い相同性を示すことが判明した^(15, 16)。実際に、これらの配列に対応するペプチドを作製して卵透明帯との結合能を調べたところ、両方ともにその活性を有していることが明らかとなった⁽¹⁶⁾。このことが生体内でどのような意味を持っているのか、またプロアクロシンのプロセッシングにともない遊離されるカルボキシル末端にあるペプチド断片の生理的意義など、今後明らかにしなければならない課題は多い。

(E) 精子形成過程でのアクロシン遺伝子の発現

精子形成は精細管内部で進行し、2回の減数分裂によりハプロイドの球状精細胞を生じて精子へと変態を遂げる。アクロソームが前期球状精細胞の生成直後に形成され始めることから、アクロシンを含むアクロソームタンパク質は減数分裂後に生合成されていると考えることができる。事実、間接蛍光抗体法により、前期球状精細胞の初期にアクロシンの合成が開始され、成熟精子でも高いレベルでそのタンパク質が保持されていることが報告されている。一方、精子細胞特異的に発現されるタンパク質に対する遺伝子が同定・単離され、それらの遺伝子の精子形成過程での転写・翻訳時期がこれまでにマウスを中心として詳しく調べられてきた⁽¹⁷⁾。しかし、残念なことにアクロソームに局在するタンパク質の遺伝子発現に関する情報はひとつも報告されていなかった。これは、とりもなおさずそれらの遺伝子が単離されていなかったためである。われわれは、アクロシンをはじめとするいくつかのアクロソームタンパク質遺伝子を指標として、精子形成過程でのアクロソームの形成とアクロソームタンパク質遺伝子の発現について調べた^(6, 18)。

まず、アクロシン遺伝子の発現の有無を明らかにするために、マウスの精巣を含む各組織と生後14日から70日までの精巣よりRNAを調製し、アクロシンcDNAをプローブとしてノーザンブロット分析を行った(図3)。アクロシン遺伝子は精巣特異的に発現しており、そのmRNAは、生後18日の精巣ではっきりと検出され、それ以後その量は著しく増加していた⁽⁶⁾。マウスでは生後18日目の精巣精細管中の精子細胞は、前期球状精細胞がほとんど含まれておらず、その後になってその細胞が増加していく。したがって、この結果はみかけ上、アクロシンが減数分裂後の半数体精細胞で生合成されていることを示唆している。このことを確かめるために、精細管よりパキテン期精母細胞、前期球状精細胞、残余小体を含む後期精細胞を分画・精製してノーザンブロット分析を行った⁽¹⁸⁾。アクロシン遺伝子は、パキテン期精母細胞ですでに発現しており、前期球状精細胞でその発現は最大のレベルに達し、その後急速に減少することが明らかとなった。また、パキテン

期精母細胞と前期球状精細胞を用いたポリソームの解析を行い、アクロシンmRNAは、アクロソームが形成されはじめる前期球状精細胞より以前の減数分裂期にすでに翻訳されていることを明確にした⁽¹⁸⁾。さらに、アクロソームタンパク質であるsp38とsp32についても、まったく同じ結果が得られた(未発表)。したがって、アクロシンを含むアクロソームタンパク質は、減数分裂期にそれらの遺伝子発現が開始されていること、また合成されたタンパク質がゴルジ装置に輸送され、そのオルガネラ由来のプロアクロソーム顆粒を生じて半数体精細胞期にこれらが集合することによりアクロソームが形成されていると考えることができる。

(F) アクロシンの受精での機能解析

前述のとおり、哺乳動物精子アクロソームに局在するアクロシンは、そのセリンプロテアーゼ活性により卵透明帯を限定分解するために、精子の透明帯通過に不可欠なものであると長い間考えられてきた。しかし、アクロシンの受精での真の機能・役割についての直接的な証明は得られていなかった。アクロシンの生体内での役割を明確にすることを目的として、標的遺伝子相同組換え法を用いてアクロシン欠損マウスを作製することを試みた⁽¹⁹⁾。

マウスアクロシン染色体遺伝子は、4個のイントロンにより分断される5個のエクソンより構成されており⁽²⁰⁾、15番目のマウス染色体上にシングルコピーとして存在している^(21, 22)。また、セリンプロテアーゼとしての活性残基であるヒスチジン、アスパラギン酸、およびセリンは、それぞれ第2、第3、第5エクソンに位置している。ほかのセリンプロテアーゼ遺伝子と比較すると、アクロシン遺伝子はトリプシンやカリクレイン遺伝子と起源を同じくし、その進化過程で軽鎖やカルボキシル末端部分に対応する領域が付加され、さらに、雄性生殖細胞特異的発現の特徴を獲得したものと考えられる。

標的遺伝子相同組換え法によりアクロシン欠損マウスを作製するために、マウスアクロシン染色体遺伝子の第2エクソンの一部と第3エクソンを含む領域をネオマイシン耐性遺伝子で置換したようなベクターDNAを構築した(図4)。もし正

常に相同組換えが生じれば、これらのエクソン中にはプロテアーゼ活性のための3個の活性残基のうち2個が、また、分子内のジスルフィド結合に関与しているシステインが5個含まれているので、結果として正常なアクロシン遺伝子転写物が生成されないか、たとえ生成されたとしても不活性なアクロシンしか生産されないはずである。構築したDNAをA3-1胚性幹細胞に電氣的に導入して、G418による選別後、相同組換えの起こった細胞株をPCRとサザンブロット分析により同定し、胚盤胞に注入して仮親に移植した。生まれたキメラマウスからのヘテロ接合体同士との交配により変異遺伝子に関してホモのマウスを得た。まず、野性型、ヘテロ、ホモマウスの精巣よりRNAを調製してノーザンブロット分析を行い、アクロシン遺伝子の発現の有無を調べた(図5)。予想したとおり、ホモマウスでは正常なアクロシン遺伝子転写産物がまったく存在せず、ヘテロマウスでは野性型マウスの約半分量しか見いだされなかった。また、精巣上体精子の酸抽出液を調製して合成基質を用いてアクロシンプロテアーゼ活性を測定したところ、ノーザンブロット分析の結果と同様、ホモマウスではまったくプロテアーゼ活性が検出できなかった。以上の結果から、作製したホモマウスがアクロシンを完全に欠損していることを確認した。ホモマウスでの精巣精細管中の各種精子細胞の形態と精巣上体精子のアクロソームの形態にもまったく異常がなく、精子の運動性も野性型のものと同じであった。もし、アクロシンが精子の透明帯通過に必要であるとすれば、作製したアクロシン欠損マウスは受精能力を欠いているはずである。しかし、F2とF3のアクロシン欠損オスマウスはすべて受精能力を有しており、自然交配により正常な子孫を得ることができた。さらに、体外受精試験を行い、アクロシン欠損マウス精子の透明帯通過能と卵との受精能を確認することができた(表1)。これらの結果から、アクロシンは受精に必須の分子でないと結論した。しかし、興味深いことに、野性型と比べてアクロシン欠損マウス精子は、媒精後短時間では透明帯通過と受精に時間的遅れを生じていることが判明した(表1)。

哺乳動物精子のセリンプロテアーゼ活性が精子の透明帯通過に不可欠であると

いう仮説が真実ならば、アクロシン以外のプロテアーゼが精子に含まれているはずである。アクロシン欠損マウス精子の酸抽出液を用いて、ゼラチン存在下でSDSポリアクリルアミド電気泳動を行い、そのことについて検討した。驚いたことに、アクロシンを完全に欠損するアクロシン欠損マウスにも、42キロダルトンのゼラチン分解活性を持つプロテアーゼが見いだされた⁽¹⁹⁾。また、各種プロテアーゼ阻害剤を用いた実験から、そのゼラチン分解活性を持つ新規タンパク質がセリンプロテアーゼのファミリーに属することや、アクロシンがそのプロテアーゼの活性化を助長していることも明らかとなった。マウス精巣球状精細胞由来のポリ(A)⁺RNAを鋳型としたRT-PCRを行い、そのセリンプロテアーゼ(一応、カップインと命名)候補遺伝子のcDNA断片を、ついでその全長cDNAと染色体遺伝子を単離することができた(ここから先は班会議でも話をしているので、その変異マウスの表現型が明確となり、しかるべきところに論文を掲載したあとで、またいろいろと書かせていただきます)。現在、遺伝子相同組換え法によりこのカップイン欠損マウスを作製中である。

(G) おわりに

○ アクロシンの受精での機能と役割が卵透明帯の限定加水分解であり、その作用によって精子の透明帯通過が助長されていると疑う余地がなかった。しかし、それが精子の透明帯通過に必要な不可欠のものでないことが証明された今、あらためてその生体内での役割を考え直す時期がきたといえる。はたして、アクロシンが存在する生理的意義は何なのか？また、その生体内での真の基質は何なのか？アクロシン欠損マウス精子の透明帯侵入・通過の遅延とアクロシンによる新規プロテアーゼ活性化助長の結果は、アクロシンが直接、精子と卵の相互作用に参加しているというよりもある種のモジュレーターとして機能しており、そのタンパク質分解活性によってほかの精子タンパク質に機能を与えているという可能性を示唆している。新規プロテアーゼカップインの一次構造から推測されるその活性化機構も、あまりにもその可能性に合致している。今後の詳細な検討により、アクロシンの受精での機能・

役割を明らかにしていくと同時に、カッパインの役割も早急に明らかにしていきたいと考えている。

文献

- 1) Yanagimachi, R. (1994) In *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E. and Neill, J., eds.), pp. 189-317, Raven Press, New York
- 2) Jones, R. and Brown, C. (1987) *Expl. Cell Res.*, **171**: 503-508
- 3) Tfer-Petersen, E. and Henschen, A. (1987) *FEBS Lett.*, **226**: 18-42
- 4) Baba, T., Kashiwabara, S., Watanabe, K., Itoh, H., Michikawa, Y., Kimura, K., Takada, M., Fukamizu, A., and Arai, Y. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**: 11920-11927
- 5) Baba, T., Watanabe, K., Kashiwabara, S., and Arai, Y. (1989) *FEBS Lett.*, **244**: 296-300
- 6) Kashiwabara, S., Baba, T., Takada, M., Watanabe, K., Yano, Y., and Arai, Y. (1990) *J. Biochem.*, **108**: 785-791
- 7) Kremling, H., Flake, A., Adham, I. M., Radtke, J., and Engel, W. (1991) *DNA Sequence*, **2**: 57-60
- 8) Richardson, R. T. and O'Rand, M. G. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**: 215-218
- 9) Polakoski, K. L., McRorie, R. A., and Parrish, R. F. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**: 8178-8182
- 10) Polakoski, K. L. and Parrish, R. F. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**: 1888-1894
- 11) Parrish, R. F. and Polakoski, K. L. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**: 8428-8432
- 12) Baba, T., Michikawa, Y., Kawakura, K., and Arai, Y. (1989) *FEBS Lett.*, **244**: 132-136
- 13) Baba, T., Michikawa, Y., Kashiwabara, S., and Arai, Y. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**: 1026-1032
- 14) Baba, T., Niida, Y., Michikawa, Y., Kashiwabara, S., Kodaira, K., Takenaka, M., Kohno, N., Gerton, G. L., and Arai, Y. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**: 10133-10140
- 15) Mori, E., Baba, T., Iwamatsu, A., and Mori, T. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**: 196-202
- 16) Mori, E., Kashiwabara, S., Baba, T., Ishikawa, M., and Mori, T. (1995) *Dev. Biol.*, **168**: 575-583
- 17) Hecht, N. B. (1986) In *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development* (Rossant, J. and Pedersen, R. A., eds.), pp. 151-193, Cambridge University Press, New York
- 18) Kashiwabara, S., Arai, Y., Kodaira, K., and Baba, T. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**: 240-245
- 19) Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S., and Toyoda, Y. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**: 31845-31849
- 20) Watanabe, K., Baba, T., Kashiwabara, S., Okamoto, A., and Arai, Y. (1991) *J.*

Biochem., 109: 828-833

- 21) Kremling, H., Keiime, S., Wilhelm, K., Adham, I. M., Willison, K., and Engel, W. (1991) *Genomics*, 11: 828-834
- 22) Bucan, M., Budarf, M., Baba, T., Nadeau, T., and Emanuel, B. S. (1991) *Cytogenet. Cell Genet.*, 58: 2045

(馬場 忠 : 筑波大学・応用生物化学系)

表1 アクロシン欠損マウス精子の生体外受精試験

Incubation time	Acrosin gene	No. of oocytes examined	No. of zonae penetrated ^a	No. of oocytes fertilized ^a			
				Total	Ana-telo II ^b	Pronuclei ^b	Polyspermic ^b
<i>h</i>							
0.5	+/+	164	101 (62%)	49 (30%)	100% (49)	0% (0)	2% (1)
0.5	+/-	125	71 (57%)	26 (21%)	100% (26)	0% (0)	0% (0)
0.5	-/-	87	18 (21%)	3 (3%)	100% (3)	0% (0)	0% (0)
1	+/+	111	99 (89%)	97 (87%)	100% (97)	0% (0)	10% (10)
1	+/-	106	90 (85%)	89 (84%)	100% (89)	0% (0)	7% (6)
1	-/-	187	104 (56%)	86 (46%)	100% (86)	0% (0)	0% (0)
2	+/+	127	117 (92%)	116 (91%)	100% (116)	0% (0)	15% (17)
2	+/-	193	186 (96%)	186 (96%)	100% (186)	0% (0)	9% (17)
2	-/-	110	89 (81%)	87 (79%)	100% (87)	0% (0)	5% (4)
3	+/+	106	99 (93%)	99 (93%)	22% (22)	78% (77)	13% (13)
3	+/-	109	102 (94%)	102 (94%)	25% (26)	75% (76)	4% (4)
3	-/-	93	83 (89%)	73 (78%)	40% (29)	60% (44)	4% (3)
4	+/+	77	76 (99%)	76 (99%)	0% (0)	100% (76)	18% (14)
4	+/-	60	60 (100%)	60 (100%)	2% (1)	98% (59)	8% (5)
4	-/-	99	97 (98%)	97 (98%)	19% (18)	81% (79)	5% (5)

^aOocytes, which had sperm within their perivitelline space and/or on the vitellus, were defined as "zonae penetrated." If the oocytes penetrated had either an enlarged sperm head with anaphase II to telophase II (Ana-telo II) chromosomes, or had a female and male pronucleus (lei) with fertilizing sperm tail(s) in the vitellus, they were considered as "oocytes fertilized." The oocytes with more than one enlarged sperm head or male pronucleus in the vitellus were classified as "polyspermic."

^bValues are indicates as percent of total fertilized oocytes with actual numbers in parentheses.

図1 ブタ (P), ヒト (H), マウス (M), およびラット (R) のプロアクロシンの一次構造の比較

セリンプロテアーゼとしての活性アミノ酸残基, システイン, N結合型糖鎖の付加可能なアスパラギンをそれぞれ黒シカク, 黒マル, 星印で示してある。アミノ末端近傍の矢印は, 53キロダルトンのプロアクロシンから49キロダルトンアクロシン中間体を生じる際の軽鎖と重鎖間のペプチド結合切断部位を示している。同様に, カルボキシル末端近傍の矢印は, カルボキシル末端側から55キロダルトンプロアクロシンから53キロダルトンプロアクロシンへの, 49キロダルトンアクロシン中間体から43キロダルトンアクロシン中間体への, さらに43キロダルトンアクロシン中間体から35キロダルトン成熟アクロシンへのプロセッシングの際に切断されるペプチド結合を示している。点線は, ブタ, ヒト, マウス, およびラットプロアクロシン間で相同性の高いカルボキシル末端近傍の配列を示している。

P	RDNATCDGPCGLRFRQKLESGMRVVGMSAEPGAWPVMVSLQIFMYHNNRRYHTCGGILLNSHWLTAAHCFKNNKKVTDWRLIF	85
H	K*****NPOG*V*I**KA*QH*****T*_*SH*****S****R*****VG*NN*H****V*	84
M	K**T*****NSQA*T*I*S*Q**QL*****TS**S****A***S*****D*****Y****V*	85
R	K**T*****NPQA*I*I**QTSSRW*****TS**S****A***S*****D*****Y****V*	85
P	GANEVVWGSNKPVKPPLQERFVEEIIIEKYVSGLEINDIALIKITPPVPCGPFIFGPGCLPQFKAGPPRAPQTCVVTGWGYLKEK	170
H	**K*ITY*N*****A*V***Y**K*****N*AT*G****VE****IS**R*****HL***L**GS*S****A****IE**	169
M	**Q*IEY*R*****E*Q***Y*QK*V*****NVVT*G*****L*****T**N***C***H*****QI*H**Y*****I**	170
R	**H*IEY*R*****E*Q***Y*QK*V*****NAV*G*****L*V*****T**D*V*****H**S*****I*H**Y*****I*DN	170
P	GPRTSPITLQEARVALIDLELCNSTRWYNGRIRSTNVCGAYPRGKIDTCQGDSSGGPLMCRDRAENTFVVVGITSHWVGCARAKRPG	255
H	A**P*SI*M****D****D*****Q*****VQP*****V*****K*SK*SAY*****	254
M	A**P**V*M****D****D*****Q*****VT*****NVDSP*****	255
R	A**P**V*M****D****D*****Q*****VT*****E*****TRRQP-*I*****	254
P	VYTSTWPNLWNIASKIGSNALQMVLQGTPPRPSTPAP--PVRPP-SVQTPVRPPWYQRP--PGPSQQ---PGS-RPRPPAPPPP	331
H	I**A*****R*I*SA**P*T*RP---I***F*HPISAHL*****P*PR*L*PRP---AA-Q****PS**	333
M	***A**D**D*****P***HLI*PA**HP*T*RH*MVSFH**SL-----*****HLPSRPLYLRPLR*LLH**SSTQTSSS	335
R	***A**D**D*****PT**HLI*PA**HP*T*Q*VISFH**-*TPPSLVL*TPVSSAAL*T*PRP----LLHQ*SSVHTSSA	334
P	PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPQOVSAPKPPQALSFAKRLQQLIEALK-----GTAFSSGRSY-YETET-TDL----QEL-PAS	399
H	*****AS*L*****TPSST*L*G*****V*-----*KTY*D*KNH-*DM*-E*-----P**TST*	402
M	LM-*LLS**T*AQ*ASFTIATQHMRHRTT****R****R*****MRTYPMKHPSQY*GP*N*H*RFS*FEP*SNKPS*PFLH*	417
R	*VI*LLSLLT*VQ*VSFTLAAYHTRHHTT*****SA**H*****MRTYPIKYSRY*GPVN*QHRFS*FEP*SNKPS*PLLH*	417

図2 ブタプロアクロシンの自己触媒的活性化と成熟酵素へのプロセッシング機構

A, 生体外でのブタプロアクロシンの成熟酵素への変換。精製した55と53キロダルトンのブタプロアクロシンをpH 8.5で反応させ、時間ごとにサンプリングしてSDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。55キロダルトンのプロアクロシンが、53キロダルトンプロアクロシン, 49キロダルトンアクロシン中間体, 43キロダルトンアクロシン中間体, 35キロダルトン成熟アクロシンへと変化するのわかる。B, ブタプロアクロシンの成熟酵素へのプロセッシング機構のモデル。まず, 55キロダルトンのプロアクロシンは, カルボキシル末端の16アミノ酸残基よりなる配列SIIIが除去されて53キロダルトンのプロアクロシンに変化する。ついで, 軽鎖と重鎖に相当する配列間のペプチド結合が切断されて, 酵素的に活性型の49キロダルトンのアクロシン中間体になり, カルボキシル末端の18, 43アミノ酸残基よりなるSII, SIが順次取り除かれて35キロダルトンの成熟アクロシンにプロセッシングされる。

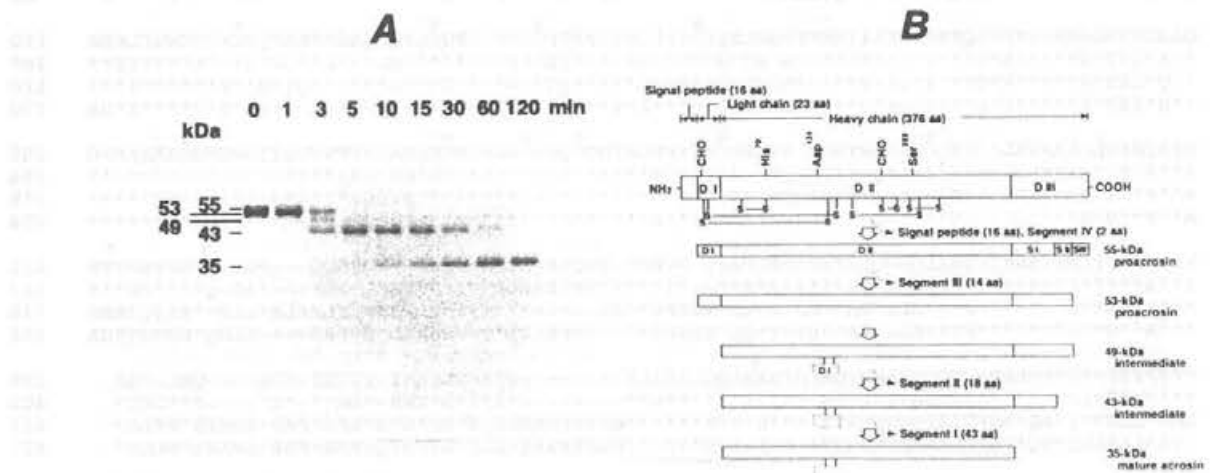


図3 マウスアクロシン遺伝子の雄性生殖細胞での発現

A, マウス各組織由来のRNAを用いたノーザンブロット分析。アクロシン遺伝子は、精巣特異的に発現していることがわかる。T, 精巣; B, 脳; Su, 下あご腺; Lu, 肺; Li, 肝臓; P, 膵臓; Sp, ひ臓; K, 腎臓; O, 卵巣; U, 子宮。
 B, 生後14日から70日までのマウス精巣由来のRNAを用いたノーザンブロット分析。アクロシン遺伝子は、すくなくとも生後18日目の精巣から発現しはじめていくのがわかる。
 C, パキテン期精母細胞, 前期球状精細胞, 残余小体を含む後期精細胞由来のRNAを用いたノーザンブロット分析。P17, 生後17日目のマウス精細管より調製したパキテン期精母細胞由来のRNA; P, 生後70日目のマウスより調製したパキテン期精母細胞由来のRNA; R, 前期球状精細胞由来のRNA; E, 残余小体を含む後期精細胞由来のRNA。左のパネルはアクロシンcDNAを, また右のパネルはβアクチンcDNAを用いてハイブリダイゼーションを行った。P17のサンプルには長さ1.5キロ塩基のβアクチンcDNAと反応するバンドが見られないことから, 前期球状精細胞由来のRNAの混入がないことを確認した。アクロシン遺伝子は, パキテン期精母細胞ですでに発現しており, 前期球状精細胞でその発現は最大のレベルに達し, その後急速に減少していくことがわかる。
 D, パキテン期精母細胞を用いたポリソームの解析。調製したパキテン期精母細胞の細胞質をMgCl₂ (上段), あるいはEDTA (下段, EDTAは, ポリソームからmRNAを解離させる) 存在下でショ糖密度勾配の遠心を行い, ポリソームを形成していない画分(1-5)と形成している画分(6-10)に分けた。おのおのフラクションからRNAを調製して, アクロシン (左のパネル) とβアクチン (右のパネル) cDNAをプローブとしてノーザンブロット分析を行った。アクロシンをコードするmRNAがポリソームを形成していることから, そのmRNAは, アクロソームが形成され始める前期球状精細胞より以前の減数分裂期ですでに翻訳され, タンパク質として存在していることがわかる。

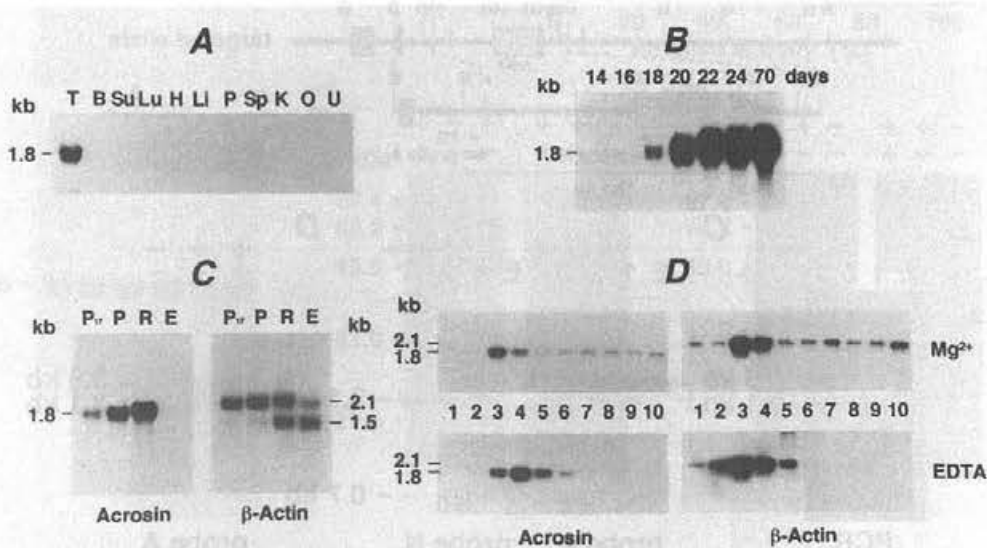


図4 遺伝子相同組換え法を用いたアクロシン欠損マウスの作製

A, マウスアクロシン染色体遺伝子と相同組換え用のDNA構築物の制限酵素地図。黒ヌリのボックス (E1, E2, E3, E4およびE5) は、エクソンを示している。E2の一部とE3をネオマイシン耐性遺伝子 (neo) で置換するように、また、アクロシン遺伝子の5'末端にはチミジンキナーゼ (HSV-TK) を連結させてポジティブ・ナガティブ選別ができるようにデザインされている。P1とP2, およびProbeAとProbeNは、それぞれ相同組換え判別のためのPCRプライマー, サザンブロット分析のプロープとして用いた。B, 相同組換えを起こしたES細胞由来の染色体DNAのPCR分析。ポジティブ・ナガティブ選別法によって単離したES細胞 (レーン1よりそれぞれA-17, A-18, A-19) と相同組換え用DNA構築物を導入していないコントロールES細胞 (レーンE) より, DNAを調製してPCRを行った。相同組換えを生じているものだけに, 1.8キロ塩基の長さのPCR産物が見いだされた。C, 相同組換えを生じたES細胞由来の染色体DNAのサザンブロット分析。ProbeAとProbeNをプロープとして用いて, BのパネルのDNAを制限酵素EcoRIとBamHIで切断してハイブリダイゼーションを行った。D, 作製したアクロシン遺伝子の変異に対して野性型 (+/+), ヘテロ (+/-), およびホモ (-/-) マウスのサザンブロット分析。ProbeAをプロープとしてCのパネルに準じて, サザンブロットハイブリダイゼーションを行った。アクロシン欠損 (ホモ) マウスには, 3.1キロ塩基の長さのバンドしか見いだせないことから, 相同組換えが完全に起こっていることが確認できた。

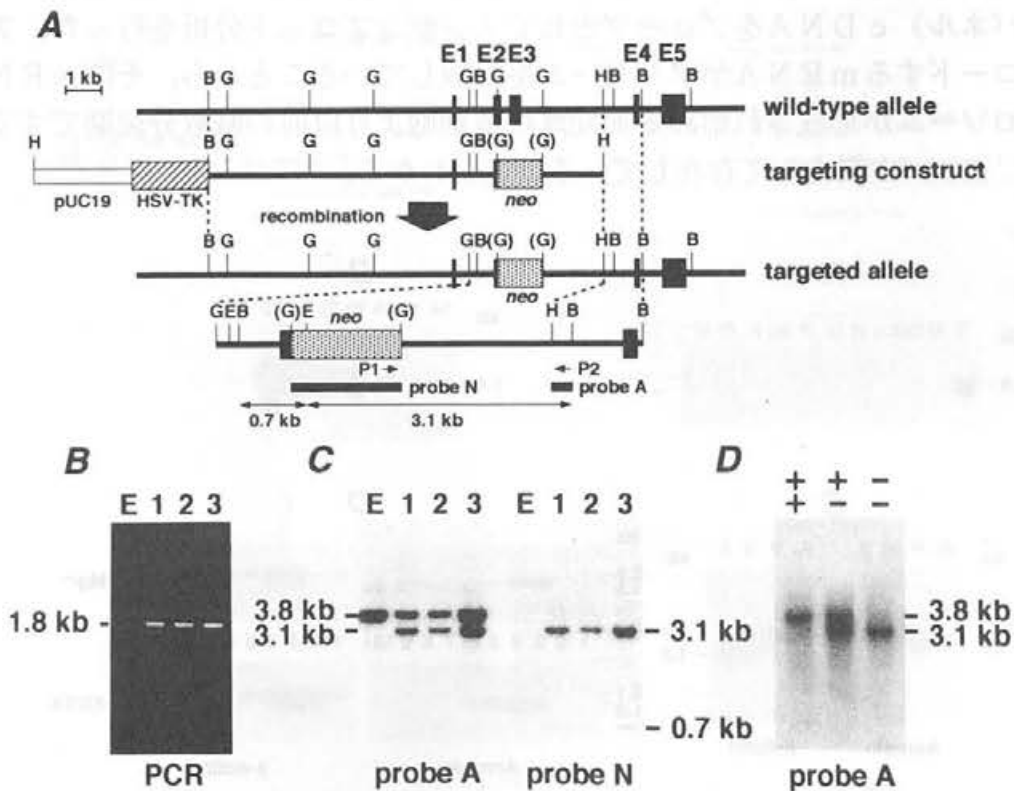
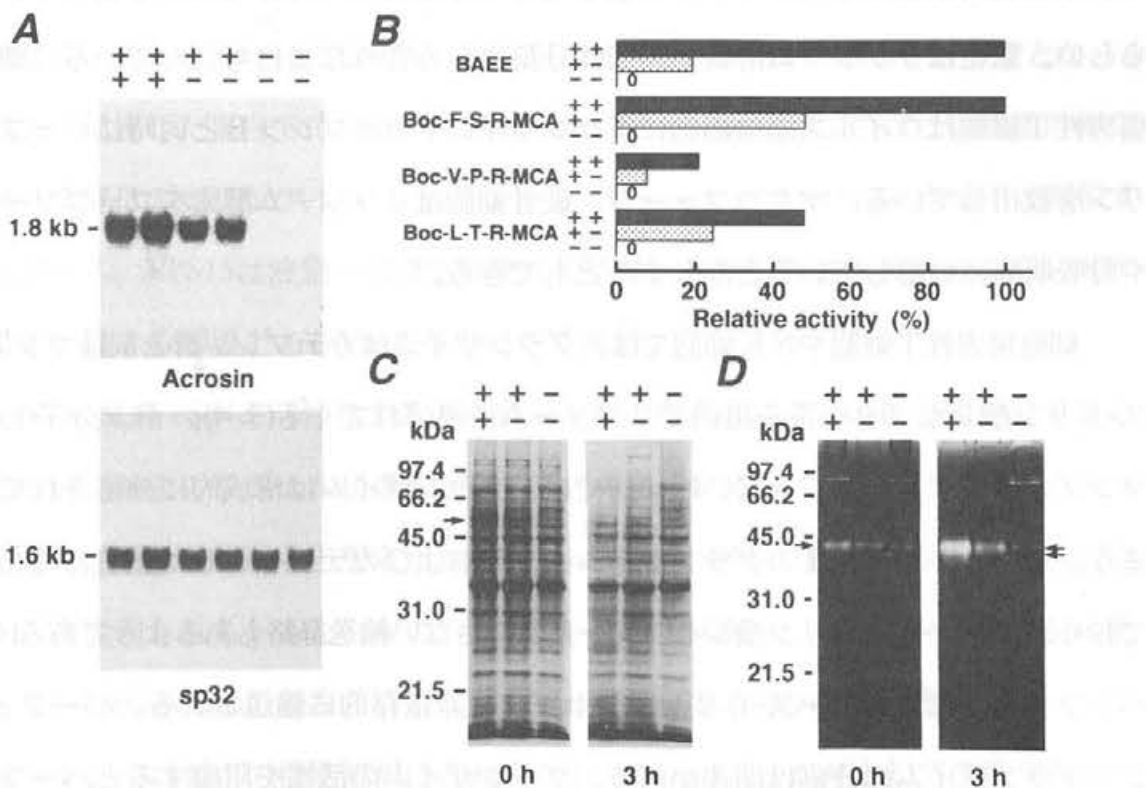


図5 アクロシン欠損マウス精子の性質の検討

A, マウスアクロシン遺伝子の変異に対して野性型 (+/+), ヘテロ (+/-), ホモ (-/-) のマウスより調製した精巣RNAを用いたノーザンブロット分析。アクロシン欠損 (ホモ) マウスでは, まったくアクロシン遺伝子転写物がないことがわかる。プロットをアクロシン cDNA で調べた後に, プロアクロシン結合タンパク質 sp32 をコードする cDNA 断片により, すべてのレーンの RNA の存在を確かめた。B, 合成基質を用いたマウス精子酸抽出液中のアクロシン活性測定。基質としてベンゾイルアルギニンエチルエステル (BAEE), プチルオキシカルボニルジペプチルアルギニン4メチルクーマリル7アミド (Boc-F-S-R-MCA, Boc-V-P-R-MCA, Boc-L-T-R-MCA) を使用し, BAEE と Boc-F-S-R-MCA の活性を 100% として計算した。アクロシン欠損マウスでは, まったく活性が見いだせなかった。C, マウス精子酸抽出液の SDS ポリアクリルアミド電気泳動。酸抽出液をそのまま (0h), あるいは pH 8.5 で 3 時間反応させたあとに電気泳動を行った。矢印で示されるところに, 53 キロダルトンのプロアクロシンに相当すると思われるタンパク質バンドが, 野性型とヘテロマウスだけに見いだされた。D, マウス精子酸抽出液のゼラチン存在下での SDS ポリアクリルアミド電気泳動。アクロシン以外のプロテアーゼ活性の存在の有無を調べるために, C のパネルに準じてゼラチン存在下で電気泳動を行った。野性型とヘテロマウスだけでなくホモマウス精子にも, 42 キロダルトンの新規プロテアーゼが見いだされた (左のパネル矢印)。3 時間の反応後では, 野性型とヘテロマウスだけに 41 キロダルトンのプロテアーゼ活性バンドが検出された。この 41 キロダルトンプロテアーゼは, おそらく成熟アクロシンのものと考えられる。興味深いことに, 42 キロダルトンのプロテアーゼ活性は, ホモマウスではそれほど変化がないのに, 野性型とヘテロマウスではその活性が増えていることがわかった。このことは, 42 キロダルトンのプロテアーゼは前駆体の形で存在しており, アクロシンの作用により活性化されることを暗示しているように思われる。



(6) トピックス

1 分泌型リソソームとChediak-Higashi症候群

リソソームによる蛋白分解は、分解される蛋白質が一旦種々の小胞に封じ込められた後、リソソームと融合してその中で分解されるのが主経路である。細胞外の蛋白質や膜蛋白質はエンドソームに、細胞内蛋白質はオートファゴソームに、また食細胞では細菌や寄生体がファゴソームにそれぞれ封入されることから分解は出発し、分解の速度は外部環境に大きく依存している。リソソームプロテアーゼ群の働く場は、したがって、多くの細胞では細胞内であり、分泌されて細胞外で働くものではない。リソソームプロテアーゼ群が細胞外に出れば、明らかに病的である。重篤な脳虚血性疾患(1)やアルツハイマー病末期の脳では、細胞外にリソソームプロテアーゼ群が漏出する(2)。しかし、血球系細胞は例外である。細胞傷害性T細胞やNK細胞、好中球、好塩基球、マスト細胞、マクロファージ、破骨細胞などにみられる細胞内顆粒はリソソームの性格と調節性分泌顆粒の両方の性格を備えているらしい。顆粒はリソソーム酵素も調節性分泌される特殊な蛋白も含んでいる。細胞傷害性T細胞はウイルス感染細胞にグランザイムやカテプシンBと同時にパーフォリンを放出している。マクロファージ、破骨細胞はリソソーム酵素をファゴソームや骨吸収窩に分泌しているとみなすこともできる。

細胞傷害性T細胞やNK細胞では、グランザイムはカテプシン群と同様マンノース-6リン酸レセプター系を用いてリソソームに運ばれてくる(3, 4)。酵素分子上のマンノースをリン酸化できないI-cell病では、グランザイムは構成的に分泌されてしまう。しかし、30%程度のグランザイムA、BおよびカテプシンBは顆粒に局在しており、マンノース-6リン酸レセプター系を介さない輸送経路もあるようである(4)。パーフォリンはマンノース-6リン酸レセプター非依存的に輸送される。パーフォリンとグランザイムの分泌は関連があり、グランザイムの活性を阻害するとパーフォリンの分泌も抑制される(5)。刺激がくるとこれらの酵素、蛋白は分泌系リソソーム

から放出されるが、放出のメカニズムはホルモンなどの調節性分泌とは異なるようである。好中球はシナプトソームに存在する分泌のためのサブセットの半分ぐらい (syntaxin-4, VAMP-2, SCAMPなど) をもっており(6)、分泌性リソソームにおける調節性分泌には特殊なメカニズムがあるようだ。

Chediak-Higashi症候群 (CHS) はこの血球系細胞における分泌の障害による疾患で、巨大リソソームを特徴とする(7)。巨大リソソームはすべての細胞にみられるが、障害があらわれるのは血球系細胞だけであり、顆粒成分を放出できないため免疫反応が障害され、感染を受けやすくなる。また、色素沈着が少ないのも特徴の一つであるが、メラノソームの機能異常によると考えられる。本症の血球系細胞ではファゴリソソームの融合や脱顆粒がみられないが、例外は破骨細胞で、骨吸収が障害されている事実はなさそうである。最近、原因遺伝子が解明された(8)。従来、マウスで同じ様な障害を示すものとしてbeigeマウス(9)があり、モデルとして使用されていたが、そのcDNAをプローブとしてヒトCHS cDNAが分離・構造決定された。

CHSは3801個のアミノ酸からなり、分子量は約43万と推定された。膜貫通蛋白ではなく、むしろそれに結合するような蛋白で、HEAT repeat motifをもつことから小胞輸送に関連した蛋白ではないかと推測されている。興味深いのは、CHS蛋白のC末部分が酵母のセリン/スレオニンプロテインキナーゼ、VPS15の基本構造と類似する点である。VPS15は液胞への選別輸送ができず、可溶性液胞水解酵素を前駆体型のまま放出する40以上あるVps変異の一つである。

VPS15はVPS34を活性化するのに要求され、両者は膜結合の複合体を形成して細胞内蛋白輸送のシグナル伝達を制御すると考えられている。CHSがVPS15と同じ様な機能を果たしていると想定すれば、Chediak-Higashi症候群でみられる分泌異常の一部は説明されるかもしれない。リソソーム酵素の輸送、リソソームと小胞の融合あるいはexocytosisの際みられるリソソームと細胞膜の融合の分子機構は全くわかっておらず、CHS蛋白の機能解析はこれらに迫るための手がかりとして注目される。

文献

- (1) Kohda, Y., Yamashima, T., Sakuda, K., Yamashita, J., Ueno, T., Kominami, E., and Yoshioka, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 228, 616-622, 1996
- (2) Cataldo, A.M., Paskevich, P.A., Kominami, E., and Nixon, R.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10998-11002, 1991
- (3) Burkhardt, J.K., Hester, S., and Argon, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7128-7132, 1989
- (4) Griffiths, G. M., and Isaacs, S.: *J. Cell. Biol.*, 120, 885-896, 1993.
- (5) Hudig, D., Allison, N.J., Pickett, T.M., Winkler, U., Kam, C., and Powers, J.C.: *J. Immunol.*, 147, 1360-1368, 1991
- (6) Brumell, J.H., et al.: *J. Immunol.*, 155, 5750-5759, 1995
- (7) Burkhardt, J.K., Wiebel, F.A., Hester, S., and Argon, Y.: *J. Exp. Med.*, 178, 1845-1856, 1993
- (8) Nagel, D.L., et al.: *Nature Genetics*, 14, 307-311, 1996
- (9) Perou, C.M., et al.: *Nature Genetics*, 13, 303-308, 1996

(木南英紀：順天堂大学・医学部)

2 細胞周期の G1-S 移行における蛋白質分解の役割

本稿は、*Science* 274 (1996) 1652-1659 に掲載された King らの総説 "How Proteolysis Drives the Cell Cycle" の一部、特に G1-S 期に焦点を当て訳出したものである。

真核生物における細胞周期の進行には、一群のサイクリン - サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体が関与する。出芽酵母においては、G1 サイクリンである CLN1、CLN2、CLN3 が CDC28 キナーゼ (分裂酵母の CDC2 のホモログ) を活性化することで G1 期が駆動される。さらに、別種のサイクリン CLB5 と CLB6 が S 期進行、CLB1 ~ 4 が M 期進行に関与する CDK の活性化を推進する。高等真核生物においても細胞周期での同様の時期に働く機能上のホモログがあり、サイクリン D と E が G1 期、サイクリン E と A が S 期、サイクリン A と B が M 期で機能している。本総説では、これらのサイクリン群を機能的に類別するため、G1 サイクリン、S 期サイクリンまたは M 期サイクリンと単純化して呼ぶことにする。それぞれのサイクリンによって活性化されたキナーゼ複合体は G1 期 CDK、S 期 CDK、M 期 CDK と定義する。

出芽酵母における G1-S 移行に必須な遺伝子である CDC34 (ユビキチン結合酵素 UBC3 と同じ分子) が分子クローニングされたことから、DNA 複製が開始する直前にユビキチン依存性の蛋白質分解が必須な役割を担っていることが判明した。CDC34 がコードするユビキチン結合酵素 (1) - いわゆる E2 - は多様な蛋白質、たとえば G1 サイクリンである CLN2 や CLN3 (2, 3) 以外にも細胞周期の制御には直接的には関与しない複数の蛋白質 (4) の分解に関わっている。しかし、これらの基質蛋白質の蓄積では *cdc34^{ts}* 変異株でみられる細胞周期の停止を説明できない。CDC34 の標的であり G1-S 移行において決定的な役割を果たしている蛋白質に関しては、遺伝学的研究によってその性質に関する最初の示唆が得られた。すなわち S 期サイクリンと M 期サイクリンのすべてを欠失した酵母の表現型が *cdc34^{ts}* 変異株と酷似していることから、CDC34 経路は活性型 S 期 CDK の生成に不可欠であることが示唆されたのである (5)。 *cdc34^{ts}* 変異株から調製した抽出液は S 期 CDK を阻害するので、CDC34 は CDK 阻害蛋白質の分解に必要とされるらしい。この阻害蛋白質の候補として考えられたのは、S 期 CDK に強く結合する阻害蛋白質 p40^{SIC1} (以下 SIC1 と表記) であった (6, 7)。SIC1 は、野性型株では通常 S 期に入ると分解を受けるが、*cdc34^{ts}* 変異株では蓄積する。*cdc34^{ts}* と *sic1 Δ* の二重変異株は非許容温度条件下においても DNA 複製を開始できるようになる (5)、SIC1 蛋白質こそが *cdc34^{ts}* 変異株において G1 から S 期への進行を抑制している決定的な基質であるらしい。この推定を裏付けるように、非分解型の変異 SIC1 を野性型株で発現させると、細胞分裂周期は G1-S 移行において停止した (8)。したがって、CDK 阻害蛋白質をユビキチン依存的に分解することが、S 期の開始を制御する仕組みとして最も重要であると考えられる。

さらに興味深いことに、出芽酵母における G1-S 移行には、CDC34 遺伝子以外に *CDC4* (9)、*CDC53* (10)、*SKP1* (11) の 3 種の遺伝子が必要であることがわかっている。いずれかの遺伝子に温度感受性変異をもつ株は *cdc34^{ts}* 株と同様の表現型 (すなわち G1 期停止) を示し、どの変異株も *SIC1* 遺伝子が欠失すれば S 期に進行

して DNA を複製できるようになる。CDC53 (10) と SKP1 (11) の遺伝子は共に保存性の高い多重遺伝子族のメンバーを構成しているが、両者の生化学的な機能についてはほとんど情報が無い。CDC4 遺伝子には、他の多数の蛋白質群においても同定されている 2 つの認識配列モチーフが存在する。それらは、SKP1 と相互作用するドメインとして機能する F ボックス (11) と、蛋白質同士が相互作用する際の足場として機能する可能性が示唆されている 8 回反復の WD-40 配列である (12, 13)。

CDC53、CDC4、SKP1 を発現させた昆虫細胞のライセートに CDC34、ユビキチン、E1 を添加すると SIC1 のユビキチン化が持続的に進行するので、3 成分の一つが E3 (ユビキチンリガーゼ) として機能することが示唆されている (14)。また、直接的な相互作用については明確でないが (15)、CDC53 は CDC34 経路を介する別の基質として G1 サイクリンも認識しているらしい。CDC4 と SKP1 の機能については未だに不明であり、CDC53、CDC4、SKP1 のいずれの蛋白質も既知の E3 とは一次構造上の類似性は見い出されていない (16, 17)。

CDC34 経路を構成する分子群の物理的相互作用についてはまだ十分に解明されていないが、これらが複合体を形成し E3 として機能することを示唆する遺伝学的証拠が得られている。例えば、SKP1 変異株の間では、CDC34 経路で分解される基質の安定性に差異が認められるので (11)、SKP1 を含む複数の高次複合体がユビキチンを介した蛋白質分解に関与している可能性が示唆されている。CDC4 以外にも多くの蛋白質が潜在的には SKP1 に結合する F ボックスをもっており、その中にはカタボライト・リプレッションに不可欠な GRR1 も含まれている (11)。grr1 変異株は CDC34 経路の基質である CLN2 を分解できないにもかかわらず S 期に速やかに移行するので、SIC1 の分解は正常に行われているらしい (18)。SKP1 は CDC34 経路に関連した役割に加えて、セントロメアに結合する CBF3 複合体の必須サブユニットとしても同定されているので、多岐にわたる細胞機能に関わっているらしい (19)。

(訳者注：余談ではあるが、SKP1 という名称は、S phase kinase-associated protein 1 の略称であると同時に suppressor of kinetochore protein 1 の略称でもある。別々の機能

を指標として二つの研究室で独立に同定・命名された蛋白質が実は同一蛋白質であったわけであるが、偶然にもその略称が同一であったという興味深い例である。)

CDC34 経路の制御 同じCDC34 経路で分解される細胞周期に関与する基質蛋白質であっても、その分解される時期は若干異なる場合がある。例えば、出芽酵母のG1 サイクリンは細胞周期を通じて常に速やかに代謝回転している(15) (訳者註: この記述は誤解を招くおそれがあるので、実際のG1 サイクリンの動態について説明を加えておく。CLN1、CLN2 はG1 期に認められるようになり、G1-S 移行期にピークとなりS 期に入ると消失する。一方、CLN3の発現は細胞周期を通じてほぼ一定である)。非分解型の変異G1 サイクリンを発現させるとG1 期の通過が加速されるが(20)、G1 期の進行を制御するためにG1 サイクリンの分解速度が調節を受けているという証拠は得られていない。むしろ、構成的に速やかな代謝回転を受けているため、G1 サイクリンの存在量は一見して転写速度に同調しているように見える。同じような動態は動物細胞のサイクリンEの量的調節の場合にも観察されている(21)。これらの知見とは対照的に、SIC1 はG1 期には安定であるがS 期に入ると急速に分解される(5, 22)。

CDC34 経路で分解される基質の代謝的安定性が個々の蛋白質で異なり、これらが固有の制御をうけている原因は、特異的な基質のリン酸化に起因している可能性が高く、このリン酸化がCDC34 依存的なユビキチン化の引金となるらしい(図1)。実際、CLN2 と CLN3 は CDC34 依存的なユビキチン化を受ける前に CDC28 キナーゼによってリン酸化される(2, 3)。リン酸化されないように変異を導入したCLN2 と CLN3 は *in vivo* で安定化されるので(3, 23)、リン酸化は蛋白質分解に不可欠であると推定されている。したがって、G1 サイクリンが構成的に分解を受けるのは、結合相手のサブユニット CDC28 キナーゼによってリン酸化される結果と考えられる。

SIC1 の安定性も同じようにリン酸化によって制御されている。 *in vitro* において SIC1 にマルチユビキチン鎖が結合する際には、G1 サイクリン - CDK 活性の存在が必要とされる。また、SIC1 中にあるCDKによって認識されるコンセンサスなリン

酸化部位に変異を導入すると、*in vitro* では SIC1 のユビキチン化が低下するし、*in vivo* においては SIC1 の安定化がおこる (8)。SIC1 のリン酸化が細胞周期における本蛋白質の動態を決定する引き金であり、また CDK 活性に依存した制御を受ける唯一のステップであるらしい。というのは、精製したリン酸化 SIC1 は G1 サイクリン - CDK を添加しなくても CDC34 経路によってユビキチン化を受けるからである (24)。このように、SIC1 を欠失すれば G1 サイクリンは必須ではなくなるので (25)、G1 サイクリンの最も重要な機能は、CDC34 依存的なユビキチン化を受けるように SIC1 をリン酸化することであると推定される (図 1 のモデル参照)。したがって、SIC1 の安定性が細胞周期依存性を示す理由は、G1 サイクリン - CDK 活性に強く依存していることによる。

リン酸化によって基質蛋白質は CDC34 経路で分解されるようになるが、そのメカニズムについてはほとんどわかっていない。基質のリン酸化領域がユビキチンシステムによる識別部位を形成し、CDC53 を構成成分とする仮想的な E3 複合体 (15) との結合が促進されるのかもしれない。これは丁度、チロシンのリン酸化によって Src ホモロジー 2 (SH2) ドメインを介した蛋白質間の相互作用が増強されるのと良く似ている。あるいは、リン酸化によってもとの基質の立体構造が乱されて、それまで隠れていたユビキチン化のシグナルペプチドが露出することが原因なのかもしれない。PEST 配列 (プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニンに富む配列で短寿命蛋白質の分解シグナルと推定されているモチーフ) (26) は CDC34 経路での基質の分解との係わりが示唆されているが (3, 27)、蛋白質中にこの配列があれば必ず分解経路へターゲティングされると予言できるほどにはその領域が十分に限定されているわけではない。というのも、出芽酵母の全ゲノム中にある翻訳領域の約三分の一には PEST 領域が含まれているからである (28)。

CDC34 経路の進化的保存性 脊椎動物細胞には CDC34 (29)、CDC53 (30, 31)、SKP1 (11, 32) の構造上あるいは機能上のホモログが発現している。ヒト細胞においては CDK 阻害蛋白質である p27 の一部分は CDC34 経路で分解を受けるし (33)、

アフリカツメガエル卵での CDK に依存した DNA 複製には CDC34 のホモログが不可欠である (34)。出芽酵母での知見から類推すると、後生動物においても CDC34 経路によって CDK 阻害蛋白質の分解が DNA 複製の引き金となることが推定される。出芽酵母では分裂に際して CDC53 の機能発現が必須であるのに対して、線虫における CDC53 のホモログである *cul-1* は胚発生において細胞分裂の回数を限定するために不可欠であることが判明している (31)。したがって、*CDC53* 様の遺伝子群 (*cullins*) は細胞分裂を正方向に調節している蛋白質、例えば G1 サイクリンの分解にも関わっている可能性がある (16)。

文献

1. M. G. Goebel *et al.*, *Science* **241**, 1331 (1988).
2. R. J. Deshaies *et al.*, *EMBO J.* **14**, 303 (1995).
3. J. Yaglom *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **15**, 731 (1995).
4. D. Kornitzer *et al.*, *EMBO J.* **13**, 6021 (1994).
5. E. Schwob *et al.*, *Cell* **79**, 233 (1994).
6. M. D. Mendenhall, *Science* **259**, 216 (1993).
7. T. T. Nugroho and M. D. Mendenhall, *Mol. Cell. Biol.* **14** 3320 (1994).
8. M. Mendenhall, personal communication; E. Schwob, personal communication; R. Verma and R. J. Deshaies, unpublished data.
9. L. M. Herford and L. H. Hartwell, *J. Mol. Biol.* **84**, 445 (1974).
10. N. Mathias *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6634 (1996).
11. Bai *et al.*, *Cell* **86**, 263 (1996).
12. E. J. Neer *et al.*, *Nature* **371**, 297 (1994).
13. J. Sondek *et al.*, *ibid.* **379**, 369 (1996).
14. R. Feldman *et al.*, unpublished data.
15. A. R. Willems *et al.*, *Cell* **86**, 453 (1996).
16. J. M. Huijbrechtse *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 2563 (1995).
17. B. Bartel *et al.*, *EMBO J.* **9** (1990) 3179
18. Y. Barral *et al.*, *Genes Dev.* **9**, 399 (1995).
19. C. Connelly and P. Hieter, *Cell* **86**, 275 (1996); O. Stemman and J. Lechner, *EMBO J.* **15**, 3611 (1996).
20. M. Tyers *et al.*, *EMBO J.* **11**, 1773 (1992).
21. B. E. Clurman *et al.*, *Genes Dev.* **10**, 1979 (1996); K. A. Won and S. I. Reed, *EMBO J.* **15**, 4182 (1996).

21. B. E. Clurman *et al.*, *Genes Dev.* **10**, 1979 (1996); K. A. Won and S. I. Reed, *EMBO J.* **15**, 4182 (1996).
22. J. D. Donovan *et al.*, *Genes Dev.* **8**, 1640 (1994).
23. S. Lanker *et al.*, *Science* **271**, 1597 (1996).
24. R. Verma and R. J. Deshaies, unpublished data.
25. B. L. Schneider *et al.*, *Science* **272**, 560 (1996); M. Tyers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 772 (1996).
26. M. Rechsteiner and S. W. Rogers, *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267 (1996).
27. S. R. Salama *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7953 (1994).
28. D. Mathog, personal communication.
29. S. E. Plon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10484 (1993).
30. S. Lyapina and R. J. Deshaies, unpublished data.
31. E. T. Kipreos *et al.*, *Cell* **85**, 829 (1996).
32. H. Zhang *et al.*, *ibid.* **82**, 915 (1995).
33. M. Pagano *et al.*, *Science* **269**, 682 (1995).
34. R. Yew and M. W. Kirshner, unpublished data.

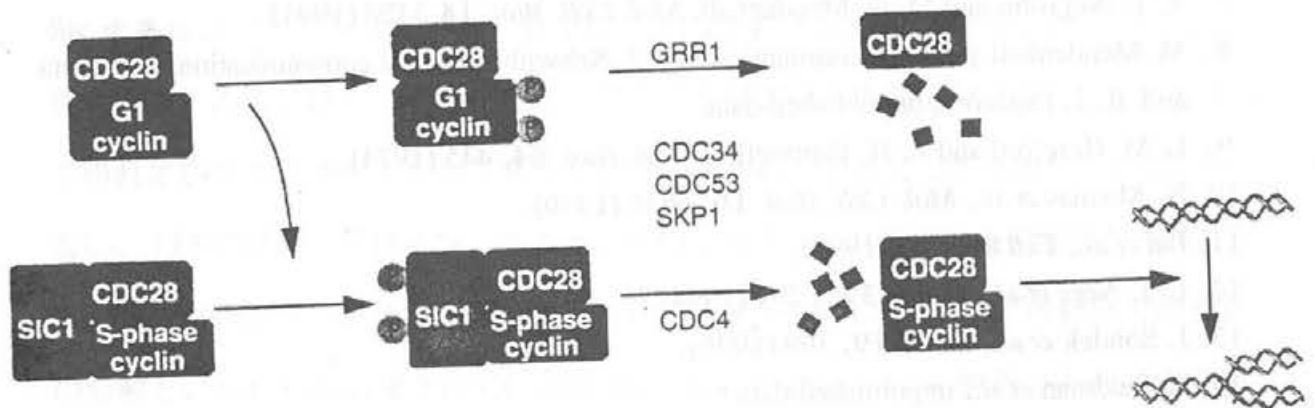


図1 出芽酵母における細胞周期の G1-S 移行モデル。本モデルでは、ユビキチンシステム (CDC34 経路) による G1 サイクリンと CDK 阻害蛋白質 SIC1 の選択的分解が G1-S 移行に必須であることを特に強調している。G1 サイクリンは CDC28 に結合すると活性型の G1 - CDK 複合体を生成する。G1 サイクリンは CDC28 によ

れる。G1 サイクリンは見掛け上、自己リン酸化されるため（訳者註：実際にはパートナーである CDC28 キナーゼによってリン酸化を受けるわけであるが、CDC28キナーゼ自身も別の酵素によってリン酸化と脱リン酸化によって活性が制御されている）構成的に不安定である。一方、G1 サイクリンの場合とは対照的に、CDK 阻害蛋白質である SIC1 の分解は細胞周期依存的である。SIC1 は G1 前期では安定であり、S 期 CDK が先行して活性化されるのを防いでいる。ところが、G1 後期に入ると会合した G1 - CDC28 キナーゼが SIC1 をリン酸化し、SIC1 の CDC34 経路によるユビキチン化を誘導するようになる。SIC1 が消失して活性型となった S 期 CDK は、未同定の標的基質をリン酸化することによって DNA 複製を開始させるようになると考えられる。CDC34、CDC53、SKP1 は G1 サイクリンの分解にも SIC1 の分解にも不可欠なユビキチンリガーゼ（E3）を構成すると推定されており、GRR1 および CDC4 はそれぞれの基質である G1 サイクリンと SIC1 の識別にかかわる役割を担っていると考えられているが、リガーゼ活性を持つ分子の本態は不明である。

（岡林 謙：都臨床研・化学療法）

(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て対処したい。また新しい有用な情報があれば、班員に知らせたい。

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! 知恵を絞って下さい。

(ぶろておりしす 事務局)

この募集に対して、前号でも紹介しましたが、再度以下の応募がありました。

私は「タンパク裁断」と言うのが良いと思います。又は少し長いですが、「タンパク制限分解」はいかがでしょうか。以上の2つは、どちらも”決められた場所を決められた方法/カスケード/シグナルで切断する”という意味で、布を裁断するように寸分のまちがいもなく切ることです。また切ったものをはり合わせてICE familyのように新しい活性を生み出すという意味も含ませたいと思います。しかし、裁断という言葉には服を作るという家内作業的なイメージも一方であり、保守的な男の人にはいやがられる傾向にはあろうかと思えます(はっはっは)。

(佐藤かおり: 都臨床研・遺伝情報)

「蛋白創世」あるいは「蛋白創出」

分解する、あるいは限定分解を受ける、生分解を受ける、いずれにしても分解されて新しく生まれ変わる、と言う意味で「万物創世」にあやかって、「蛋白創世」あるいは「蛋白創出」。なんてどうでしょう??

(森本幸生：姫路工業大学・理学部・生命学科)

「ぶろておりしす」は大変ためになり、愛読させてもらっております。さて、私は班員ではないのですが、Proteolysis の訳語について、コメントさせていただいてもよろしいでしょうか? あまり突飛ではなく「蛋白分解」のイメージとは少し違うものとして、全く変わり映えはしませんが、「蛋白水解」くらいはいかがでしょうか? 「分解」よりは多少奥深い響きも感じられ(?)、何の違和感もなく受け入れられると思われるので、この辺ではいかがなものかと、僭越ながら思った次第です。degradation, cleavage の両方に使える言葉が適当と思いますが、なかなか難しいですね。Hydrolysis という化学反応のみを表すことによって、多様なイメージに対応できるのではないかと思います。

(伊藤維昭：京都大学ウイルス研究所)

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紘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(昨年は第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。(ぶろておりしす事務局)

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 on Intracellular Protein Catabolism 国際会議 (ICOP) 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3号をお届けします。“ぶろておりしす”第1号・第2号とも予想外に好評で品切れとなってしまいました。ご要望に応え再刷しました（重点ニュースを増刷するなど前代未聞？）ので、必要な方は事務局に申し込んで下さい。次回の本ニュース誌第4号は、本重点領域研究班が2年目を迎えますので、装いも新たに（文字通り雑誌の色を換えると言う意味です！？）出版したいと思っています。今後とも原稿執筆をお願い致しますので、ご協力を宜しくお願いいたします。また、巷に“面白い話が転がっている”のを見聞した方は、班員であるか否かに関わらず執筆者をご紹介下さい（但し、原稿料はお出しできませんので、日本の“ぶろておりしす”研究の推進に尽力して下さる厚志家に限りませんが）。また、第4号からは海外に留学中の若手研究者に「研究室だより」あるいは「プロテアーゼ研究の最新状況」などを執筆してもらい、欧米の“ぶろておりしす”研究の息吹を伝えてもらう欄を設けたいと企画しています（似たような欄がどこかの商業誌にも散見しますが）。有望な方をご存じの方は、お知らせ下さい。この欄への執筆は、帰国したいが職がないオーバードクターには自分を売り込むチャンスであると脅迫(?)してもらっても結構です（実際、案外いい助手や講師を探している若手教授がいるかも知れません！いるわけない?）。日本語の原稿は細明朝体、英語の原稿はTimesで作成し、e-mail (tanakak@rinshoken.or.jp) 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

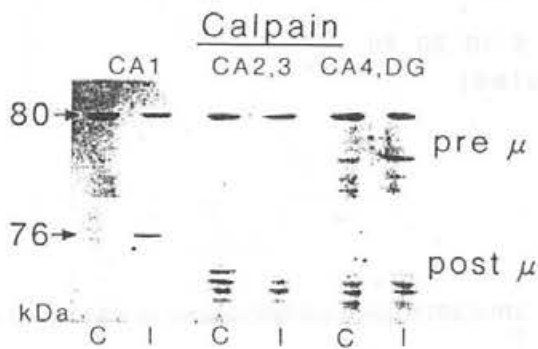
班員各位の研究進捗状況を把握する目的で随時発行（巻末添付）。いずれもオフセット印刷しますので、1ページ一杯に巧く記載して下さい。但し、図書・総説は除き原著論文に限定します。班員の自信作を数多く集めたいと考えていますので、“ぶろておりしす事務局”に送って下さい。研究成果を班員相互に素早く伝達する必要性からゲラ刷りの段階でも結構ですので、迅速に作成して頂きたいと考えています。

Transient Brain Ischaemia Provokes Ca^{2+} , PIP_2 and Calpain Responses Prior to Delayed Neuronal Death in Monkeys

Tetsumori Yamashima¹, Takaomi C. Saido², Masatoshi Takita³, Atsuo Miyazawa⁴, Jun Yamano¹, Atsuo Miyakawa⁵, Hisashi Nishijyo⁶, Junkoh Yamashita¹, Seiichi Kawashima², Taketoshi Ono⁶ and Tohru Yoshioka⁴

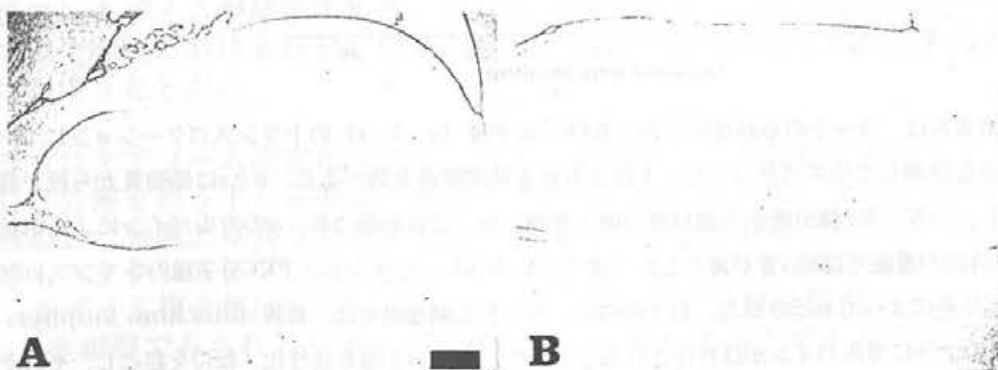
Abstract

To clarify the mechanism of postischaemic delayed cornu Ammonis (CA)-1 neuronal death, we studied correlations among calpain activation and its subcellular localization, the immunoreactivity of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) and Ca^{2+} mobilization in the monkey hippocampus by two independent experimental approaches: *in vivo* transient brain ischaemia and *in vitro* hypoxia-hypoglycaemia of hippocampal acute slices. The CA-1 sector undergoing 20 min of ischaemia *in vivo* showed microscopically a small number of neuronal deaths on day 1 and almost global neuronal loss on day 5 after ischaemia. Immediately after ischaemia, CA-1 neurons ultrastructurally showed vacuolation and/or disruption of the lysosomes. Western blotting using antibodies against inactivated or activated μ -calpain demonstrated μ -calpain activation specifically in the CA-1 sector immediately after ischaemia. This finding was confirmed in the perikarya of CA-1 neurons by immunohistochemistry. CA-1 neurons on day 1 showed sustained activation of μ -calpain, and increased immunostaining for inactivated and activated forms of μ - and m-calpains and for PIP_2 . Activated μ -calpain and PIP_2 were found to be localized at the vacuolated lysosomal membrane or endoplasmic reticulum and mitochondrial membrane respectively, by immunoelectron microscopy. Calcium imaging data using hippocampal acute slices showed that hypoxia-hypoglycaemia *in vitro* provoked intense Ca^{2+} mobilization with increased PIP_2 immunostaining specifically in CA-1 neurons. These data suggest that transient brain ischaemia increases intracellular Ca^{2+} and PIP_2 breakdown, which will activate calpain proteolytic activity. Therefore, we suggest that activated calpain at the lysosomal membrane, with the possible release of biodegrading enzyme, will cause postischaemic CA-1 neuronal death.



【要約】本論文で著者らは、ヒトに近い哺乳動物である日本ザルを用いて脳虚血実験を行い、海馬CA1領域での遅延性神経細胞死におけるカルパイン・ PIP_2 ・ Ca^{2+} 動員の関与を検討した。虚血直後には、 μ -カルパインの活性化がCA1領域で特異的に起こっていた（左図ウエスタンブロット下段の76kDaバンド、および下図免疫組織染色のB; Aはコントロール）。免疫電顕で観察すると、活性化型 μ -カルパインは液胞化リソソーム膜あるいは小胞体膜に局在

した。一方、 PIP_2 はミトコンドリア膜に局在した。海馬スライスで Ca^{2+} の動態を調べたところ、低酸素-低血糖（虚血のモデル）でCA1領域特異的に Ca^{2+} 動員が起こり、抗 PIP_2 抗体での染色が増加した。以上のことから、一過性脳虚血では細胞内 Ca^{2+} の上昇と PIP_2 の増加が先ず起こり、これらにより活性化されたカルパインがリソソーム膜に作用してリソソーム内分解酵素の遊離を促し、CA1領域での神経細胞死に至ると考えた。

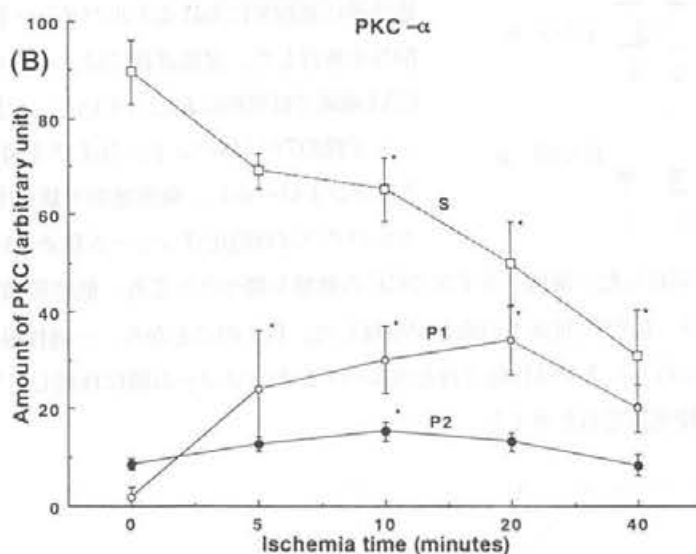
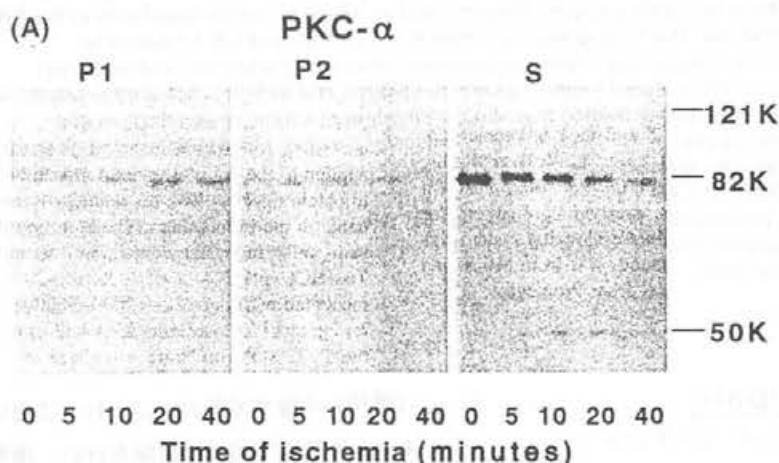


Translocation of protein kinase C- α , δ and ϵ isoforms in ischemic rat heart

Ken-ichi Yoshida ^{a,*}, Takao Hirata ^a, Yoshiko Akita ^d, Yoichi Mizukami ^a, Kazuhito Yamaguchi ^c, Yoshihide Sorimachi ^a, Tokuhiro Ishihara ^b, Sei-ichi Kawashima ^d

Abstract

To explore the spatial and temporal localization of PKC isoforms during ischemia, we quantified PKC isoforms in the subcellular fractions in perfused rat heart by immunoblotting using specific antibodies against PKC isoforms. PKCs- α and ϵ translocated from the 100 000 $\times g$ supernatant (S, cytosolic) fraction to the 1000 $\times g$ pellet (P1, nucleus-myofibril) and the 1000-100 000 $\times g$ pellet (P2, membrane) fractions during 5-40 min of ischemia. PKC- δ redistributed from the P2 to the S fraction. A 50-kDa fragment of PKC- α appeared during ischemia possibly through calpain action. Immunohistochemical observations showed the different localizations of PKC- α , δ , and ϵ in the myocytes. The PKC assay displayed high basal levels of Ca²⁺-independent PKC, the activation of Ca²⁺-dependent PKC in the P1 and P2 fractions, and the activation of Ca²⁺-independent PKC in the P1 fraction after 20 min of ischemia. These observations show that ischemia induces different patterns of translocation of the three PKC isoforms, suggesting differences in their roles.



【要約】 本論文で筆者らは、ラットの心筋虚血におけるPKC分子種 ($\alpha \cdot \delta \cdot \epsilon$) のトランスロケーションについて検討した。生化学的に細胞成分を分画してウエスタンブロットにより虚血時間経過を調べると、 α と ϵ は細胞質から核/筋原線維分画および膜分画へ転位し、一方、 δ は膜分画から細胞質分画へ遊離した。これらのうち、 α のカルパインによる切断産物と思われるPKMが生じ、長時間の虚血では総 α 量が減少した(ダウンレギュレーション)。PKC分子種のトランスロケーションは、組織切片の免疫組織染色によっても示された。以上の様に、ラット心筋虚血では、前報 (Biochim. Biophys. Acta, 1182, 215-220, 1993) のようにカルパインが活性化されるとともに、PKC分子種も活性化/転位を起こし、それぞれの細胞内部で固有の役割を果たしていると考えられる。

Proteasome pathway operates for the degradation of ornithine decarboxylase in intact cells

Yasuko MURAKAMI*§, Nobuyuki TANAHASHI†, Keiji TANAKA†, Satoshi ÔMURA‡ and Shin-ichi HAYASHI*

*Department of Biochemistry 2, The Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105, Japan, †Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan, and ‡The Kitasato Institute, 9-1 Shirokane 5-chome, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

Ornithine decarboxylase (ODC) is degraded in an ATP-dependent manner *in vitro* by the 26 S proteasome in the presence of antizyme, an ODC destabilizing protein induced by polyamines. In the present study we examined whether the proteasome catalyses ODC degradation in living mammalian cells. Lactacystin, the most selective proteasome inhibitor, strongly inhibited the degradation of ODC that had been induced in hepatoma tissue-culture (HTC) cells by refeeding with fresh medium. Furthermore the inhibitor inhibited the rapid degradation of ODC that had been induced by hypotonic shock. Interestingly,

hypertonic shock was found to increase the proportion of ODC present as a complex with antizyme (the ratio of ODC–antizyme complex to total ODC). Cycloheximide, which partly inhibits rapid ODC degradation caused by hypertonic shock, also partly inhibited the increase in the ratio of ODC–antizyme complex to total ODC. These results suggest that a common ODC degradation pathway, namely the antizyme-dependent and 26 S proteasome-catalysed ODC degradation pathway, is also operating in intact cells for osmoregulated ODC degradation.

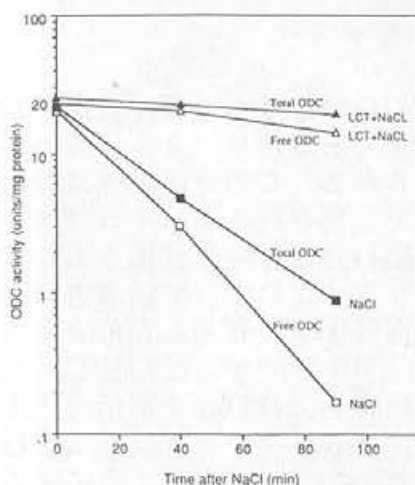


Figure 2 Effect of lactacystin on osmoregulated degradation of ODC in HTC cells

HTC cells were incubated in hypotonic medium with or without 5 μ M lactacystin for 4 h, and subjected to hypertonic shock by the addition of NaCl to a final osmolarity of 450 m-osm/l. Cells were harvested at the indicated times after the additions. Free and total ODC were determined as described in the Experimental section. LCT, lactacystin.

Table 1 ODC destabilization and increase of the ratio of ODC–antizyme complex to total ODC caused by the increase in osmolarity

HTC cells were incubated in fresh hypotonic medium for 4 h, and then cycloheximide (50 μ g/ml) and/or NaCl was added. Cells were harvested at 0 and 60 min after the addition. Free, total ODC and the amount of ODC–antizyme complex were determined as described in the Experimental section. Values are expressed as the means \pm S.D. for three dishes. A dash indicates that ODC–antizyme complex was below the level of sensitivity of the assay.

Addition	Change in osmolarity (m-osm/l)	Time after additions (min)	Total ODC activity (units/mg of protein)	Ratio of antizyme–ODC complex to total ODC (%)
None	150 to 150	0	24.2 \pm 1.9	–
None	150 to 150	60	32.2 \pm 3.5	–
Cycloheximide	150 to 150	60	21.2 \pm 3.4	–
NaCl	150 to 300	60	2.74 \pm 0.40	82.2 \pm 3.3
NaCl + cycloheximide	150 to 300	60	7.39 \pm 0.39	10.0 \pm 5.2
NaCl	150 to 450	60	1.00 \pm 0.12	78.4 \pm 5.6
NaCl + cycloheximide	150 to 450	60	2.81 \pm 0.07	21.6 \pm 9.5

緒言

オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) は、反応生成物であるポリアミンによって誘導される阻害蛋白質アンチザイムが結合すると、26 Sプロテアソームによって速やかに分解される。本研究では生細胞におけるODC分解もプロテアソームによって触媒されるのかどうかを明らかにしようとした。

結果

特異的なプロテアソーム阻害剤ラクタシスチンを用いて、生細胞においてもプロテアソームがODC分解を担う主たる酵素であることが明らかになった。また、従来、アンチザイム依存性ODC分解とは異なる機構で分解される可能性が示唆されていた浸透圧調節性ODC分解もラクタシスチンで強く抑制された (Fig. 2)。さらに、高浸透圧ショックはODC–アンチザイム複合体/全ODC比を上昇させてODC分解を促進することが示され (Table 1)、生細胞でみられる浸透圧調節性ODC分解もアンチザイム依存的にプロテアソームで触媒されることが明らかになった。



Control of Ornithine Decarboxylase Activity by Polyamines and Absence of Antizyme in *Tetrahymena*

K. Koguchi, Y. Murakami and S. Hayashi

DEPARTMENT OF NUTRITION, THE JIKEI UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE,
3-25-8 NISHI-SHINBASHI, MINATO-KU, TOKYO 105, JAPAN

ABSTRACT. 1. In cells of *Tetrahymena pyriformis* and *thermophila*, ODC activity was significantly suppressed but ODC decay was not stimulated by putrescine. 2. Free antizyme and ODC-antizyme complex were both not detected in extracts of cells of *T. pyriformis* treated with putrescine. 3. It was concluded that in *Tetrahymena*, unlike vertebrate cells, ODC is not subject to polyamine-induced destabilization mediated by antizyme. COMP BIOCHEM PHYSIOL 113B, 157-162, 1996.

KEY WORDS. Ornithine decarboxylase, antizyme, polyamines, *tetrahymena*, feedback regulation

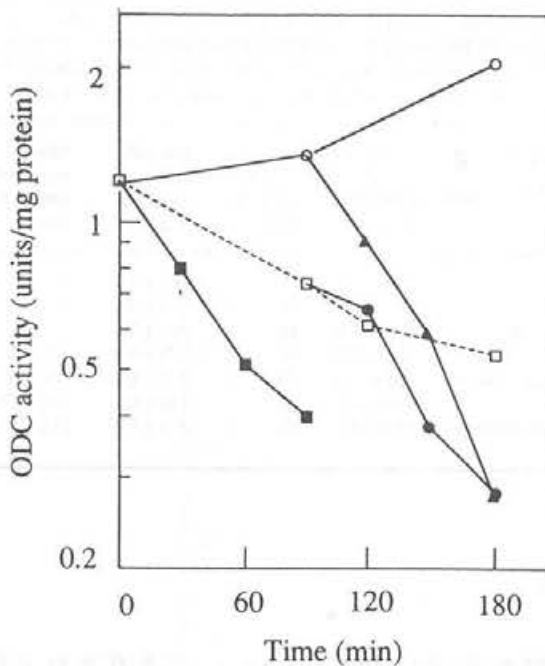


FIG. 4. Suppression of ODC activity by putrescine, without destabilization, in cells of *T. pyriformis*. Cells harvested at the end of log phase were resuspended in fresh medium. The suspension was divided into five equal portions, and then incubated for 5 hr (after 5 hr was defined as 0 time). (○), control; (▲), 10 µg/ml cycloheximide was added after 90 min; (□), 10 mM putrescine was added at 0 time; (●), 10 mM putrescine was added at 0 time and 10 µg/ml cycloheximide was added after 90 min; (■), 10 mM putrescine and 10 µg/ml cycloheximide were added at 0 time. Each point is a single experiment.

緒言

哺乳動物のODCは半減期が短いが、反応生成物であるポリアミンによってさらに短縮される。この分解加速は蛋白合成阻害剤で阻害されるが、それはポリアミンが直接ODC分解を促進するのではなく、ポリアミンによって誘導される短寿命の蛋白質アンチザイムが仲介するためである。アンチザイムはODCに高い親和性で結合し、ODCを不活性化すると同時に、26SプロテアソームがODCを基質として認識できるようにする。これはポリアミンの過剰な蓄積を防ぐためのフィードバック機構である。この論文ではこのフィードバック機構が原虫のテトラヒメナにも存在するのかどうかをしらべた。

結果

テトラヒメナにおいて、ポリアミンはODC活性を抑制したが、ODC活性の半減期は短縮しなかった。ポリアミン投与後のテトラヒメナの細胞抽出液には遊離のアンチザイムもODCと結合したアンチザイムも検出されなかった。従って、テトラヒメナではアンチザイムを介するポリアミンによるODCの分解制御機構は存在しないと結論された。

Assignment of the Human Antizyme Gene (OAZ) to Chromosome 19p13.3 by Fluorescence *in Situ* Hybridization

Senya Matsufuji,*†¹ Johji Inazawa,‡
Takaaki Hayashi,* Youichi Miyazaki,*
Tamotsu Ichiba,* Akihiro Furusaka,*
Tamiko Matsufuji,†§ John F. Atkins,§
Raymond F. Gesteland,†§ Yasuko Murakami,*
and Shin-ichi Hayashi*

*Department of Biochemistry II, the Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105, Japan; †Department of Hygiene, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan; and §Department of Human Genetics and †Howard Hughes Medical Institute, University of Utah, Salt Lake City, Utah 80112

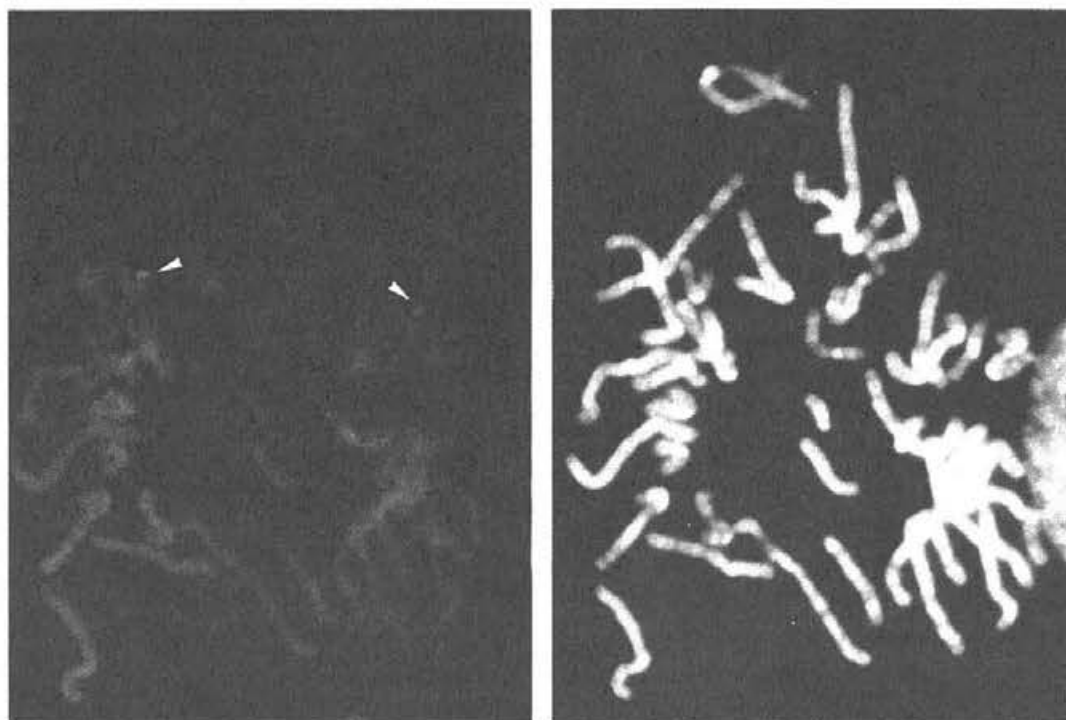


FIG. 1. Assignment of the human antizyme gene to chromosome 19 at p13.3. (Left) The arrowheads indicate the twin spot signals specific for the P1 phage clone, HuAZG1, carrying the human antizyme genomic fragment. (Right) The G-band pattern of the same metaphase chromosomes is visualized through a UV filter. The specific hybridization signals are localized on band 19p13.3. An identical result was obtained with the HuAZG2 probe.

緒言

ODCの過剰発現は癌化を引き起こすのに対して、アンチザイムの過剰発現は細胞内のポリアミンを減少させて細胞増殖を阻害する。従って、アンチザイムの発現異常は癌化の成因になりうると考えられる。この論文ではヒトアンチザイム遺伝子をクローン化し、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いてその染色体上の局在を明らかにした。

結果

アンチザイム遺伝子は第19番染色体短腕バンド13.3に局在することが明らかになった。

ちなみに、染色体のこの領域の欠失がある種の癌でがかなりの頻度で見られることが報告されているが、該当する癌抑制遺伝子は同定されていない。

Chromosomal localization of the proteasome Z subunit gene reveals an ancient chromosomal duplication involving the major histocompatibility complex

(evolution/synten)

MASANORI KASAHARA*†, MASARU HAYASHI*, KEIJI TANAKA‡, HIDETOSHI INOKO§, KIMIHICO SUGAYA¶, TOSHIMICHI IKEMURA¶, AND TERUO ISHIBASHI*

*Department of Biochemistry, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060, Japan; †Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima 770, Japan; ‡Division of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Isehara 259-11, Japan; and §Department of Evolutionary Genetics, National Institute of Genetics, and The Graduate University for Advanced Studies, Mishima 411, Japan

Communicated by D. Bernard Amos, Duke University Medical Center, Durham, NC, May 22, 1996 (received for review March 20, 1996)

ABSTRACT Proteasomes are the multi-subunit protease thought to play a key role in the generation of peptides presented by major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. When cells are stimulated with interferon γ , two MHC-encoded subunits, low molecular mass polypeptide (LMP) 2 and LMP7, and the MECL1 subunit encoded outside the MHC are incorporated into the proteasomal complex, presumably by displacing the housekeeping subunits designated Y, X, and Z, respectively. These changes in the subunit composition appear to facilitate class I-mediated antigen presentation, presumably by altering the cleavage specificities of the proteasome. Here we show that the mouse gene encoding the Z subunit (*Psmb7*) maps to the paracentromeric region of chromosome 2. Inspection of the mouse loci adjacent to the *Psmb7* locus provides evidence that the paracentromeric region of chromosome 2 and the MHC region on chromosome 17 most likely arose as a result of a duplication that took place at an early stage of vertebrate evolution. The traces of this duplication are also evident in the homologous human chromosome regions (6p21.3 and 9q33-q34). These observations have implications in understanding the genomic organization of the present-day MHC and offer insights into the origin of the MHC.

抗原特異的な免疫応答は、自己と非自己を識別して非自己を選択的に破壊する生体防御機構であり、この免疫識別の分子機構は、多様なT細胞レセプターを発現しているリンパ球が主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)と非自己抗原ペプチドを識別して活性化することである。生物が如何にしてこのMHCを進化的に獲得したのかは深い謎であり、長い論争の渦中であった。我々はガンマ型インターフェロンが内在性抗原のプロセッシング酵素であるプロテアソームの三種のペアーサブユニットの分子内置換して免疫プロテアソームを造成し、速やかな免疫応答に対処させることを提案してきた。ごく最近、これらの遺伝子座の決定から、驚くべき事実を発見し、上記の謎の解明についての新しい仮説を提唱するに至った。それは、MHC, TAP, LMP2/7, HSP70など抗原提示担当遺伝子群をコードするMHC遺伝子領域が、太古の染色体重複によって創造されたとの仮説(図参照)である。この詳細について興味のある方は本誌「ぶろておしす」第2号59ページ「MHCはクラスI抗原提示装置か?」及び生化学ミニレビュー「主要組織適合性遺伝子複合体領域をまきこんだ太古の染色体重複」(第68巻1717, 1996年)を参照されたい。



MHCがどのような過程を経てアセンブリーされたのかを説明するモデル

ABCはATP binding cassette 遺伝子を、C345は補体の第3, 第4, 第5成分の祖先遺伝子を意味する。
 この図の最下段に描かれている染色体地図は、マウスの第2および第17染色体の地図であり、重要な遺伝子座のみを示したものである。