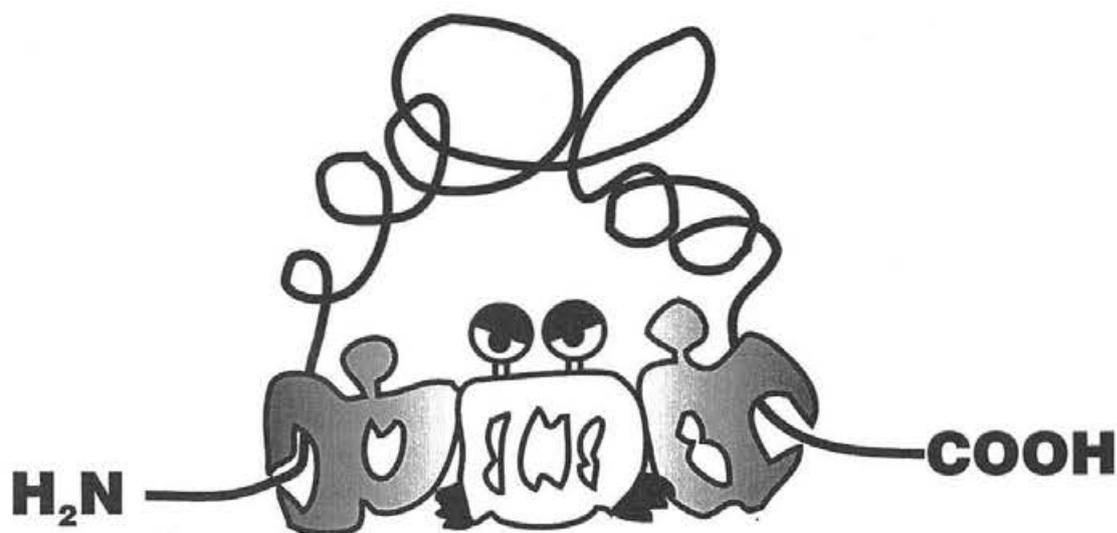


重点領域研究

「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4号（平成9年6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) 領域代表者挨拶（鈴木領域代表者）
- (2) 平成9年度重点研究班会議日程
 - 1 第2回 ワークショップ
 - 2 第3回 総括班会議
 - 3 第2回 公開シンポジウム
 - 4 第2回 班会議・第4回 総括班会議
- (3) 活動および関連事業
 - 1 班員名簿発行
 - 2 重点ニュース誌”ぷろておりしす”発行
 - 3 出版案内
 - 4 学会・集会案内
 - 5 第1回「若手の会」報告
- (4) 学会・集会報告
 - 1 "Proteasomes and Related Complexes" 2nd Workshop, March 19 - 21, 1997, Clenmont-Ferrand, France
 - 2 "Calpain Symposium", April 14 - 15, 1997, Oxford, England
 - 3 "Biology of Proteolysis", April 23 - 27, 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, CSH, USA
- (5) ミニレビュー
 - 1 ミクログリアにおけるカテプシンEの生合成、細胞内移行ならびに病的機能
 - 2 プロリルオリゴペプチダーゼ研究の最近の進展
 - 3 FtsHと分子シャペロン
 - 4 グランザイム：リンパ球のエフェクター機能に関与する顆粒内プロテアーゼ
 - 5 C末端プロセシングプロテアーゼ —光化学系II反応中心D1サブユニット前駆体のC-末端切断—
 - 6 サイクリン分解の最新状況：サイクリンのリン酸化は、サイクリン分解のシグナルである
 - 7 ER分解の新しい仕組み：細胞質への放出？
- (6) トピックス
 - 1 トリプレットリピート伸長とプロテオリシス
 - 2 バキュロシステムを使用したカルパインの大量発現
- (7) 掲示板コーナー
伝言板、その他インフォメーション
- (8) 編集後記
- (9) 発表論文の概要紹介：巻末添付

(1) はじめに

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」)は昨平成8年度から4年間の予定で始まり、本年は第二年度にあたります。現代生物学に残された最大の課題の一つである「細胞内蛋白分解の分子機構の解明とその意義」を明らかにすることを最終的な目標に研究を開始しました。初年度は総括班の他、計画班員14名と公募班員42名、合計56名の研究陣容でスタートしました。第1年度の研究成果については現在業績集をとりまとめているのですが、順調に研究が開始したと思っております。

本年度は公募班員が47名になり、その内、本年度から新しく本重点領域研究に参加された班員は14名です。本来なら少なくとも開始当初の二年間はスタート時の体制で進めたいと思っておりましたが、公募をする以上、当然、班員の入れ替えをすべきであるとの考えに従って、若干の班員の入れ替えをせざるを得ませんでした。

この重点領域研究は平成11年度までの4年間で、本年度は前半の研究の折り返し点に当たります。そのため、本年度までの実績をもとに、第三年度では更に厳しい評価・点検が予想され、それに伴って、計画班員についても大幅な見直し、組み替えをが求められています。どうかこの点をご理解のうえ、是非すばらしい成果を挙げて下さるようお願いいたします。

この小冊子「**ぶろておりひす**」は重点領域の班員間の連絡等を目指したものではありませんが、広く班員以外の方々にも配布し、「細胞内蛋白分解」の研究領域全体の宣伝と活性化に役立つことを期待しています。そのために、班員はもとより、班員以外の方にも興味を持っていただけるよう内容等には十分注意して編集するつもりです。班員以外の方々からの投稿も大歓迎です、ご意見、ご希望などのご注文も是非お寄せください。この雑誌が蛋白分解やプロテアーゼ関係の研究者を結ぶミニ情報誌になれば幸いです。

平成9年7月

文部省科学研究費重点領域「細胞内蛋白分解」
領域代表者 鈴木 紘一

(2) 平成9年度重点研究班会議日程

1 第2回「細胞内蛋白分解」ワークショップ

日時： 平成9年7月8日午後（火曜）～10日午前（木曜）

場所： 浜名湖三カ日天然温泉「浜名湖レークサイドプラザ」

8日： 午後 受け付け

8日： 夜 ミニシンポジウム：“構造-機能” 相関

9日： 午前 平成9年度新班員：紹介と研究計画

9日： 午後 特別講演：蛋白分解研究の活性化を目指して

1. 三原勝芳：蛋白質のミトコンドリアへのターゲティングと外膜透過の機構

2. 梅園和彦：脂溶性低分子ホルモン/ビタミンによるシグナル伝達の機構

3. 柳田充弘：細胞周期アナフェーズを推進する蛋白質分解

4. 矢原一郎：細胞と分子シャペロン：Hsp90のはたらきを中心にして

10日： 午前 ミニシンポジウム：選択的蛋白分解

10日： 午後 解散

2 平成9年度：第1回 総括班会議

日時： 平成9年7月10日：午前7時30分～8時45分

場所： 浜名湖レークサイドプラザ

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

総括班メンバー

- 鈴木 紘一 東京大学分子細胞生物学研究所教授：領域代表・第一班班長
木南 英紀 順天堂大学医学部教授：領域副代表・第二班班長
岩永 貞昭 九州大学名誉教授：研究評価, チェック・レビュー
大島 泰郎 東京薬科大学生命科学部教授：研究評価, チェック・レビュー
勝沼 信彦 徳島文理大学健康科学研究所教授：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 第2回公開シンポジウム

“プロテアーゼとアポトーシス” (仮題)

平成9年12月1日(午後)

特別講演予定: 長田重一(大阪大学・教授)

東京ガーデンパレス

4 平成9年度: 第2回 班会議

平成9年12月2~3日(期日未定)

東京ガーデンパレス

(3) 活動および関連事業

1 班員名簿（平成9年度）発行：平成9年6月作成

2 重点ニュース誌“ぶろておりしす”発行

第4号：平成9年6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、班員以外の定期配布を希望する研究者にも無料で送付しますので、送付先を事務局：研究代表者鈴木紘一研究室に連絡するようにお薦め下さい）

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

"Intracellular Protein Catabolism" (Eds 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）

Mol. Biol. Rep. Special issues: Proteasomes and Related Complexes (Guest editors: Schmid, H.-P. and Briand, Y.), 24, 1-138 (1997)

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）

Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors (eds. Katunuma, N., Kido,

H., Fritz, H., and Travis, J.), IOS Press, in press (1997)

4 学会・集会案内

国内学会

- (1) “プロテアーゼと病態：病因解析から創薬、治療を目指して” 第70回
日本生化学会大会シンポジウム・平成9年9月22-25日：金沢
- (2) “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・平成9年12月16-19日：京都（田代啓）

国際学会

- (1) "Ubiquitin and Protein Degradation", FASEB Summer Research Conference,
June 28 -July 3, 1997, Saxtons River, Vermont, USA (A.L. Haas).
- (2) " International Symposium on Dynamic Aspects of Lysosomal/Vacuolar System",
November 3-6, 1997, Conference Center of Okazaki National Research Institute,
Okazaki, Japan (Y. Ohsumi)
- (3) "The UK-Japan Cell Cycle Workshop", November 24-27, 1997, Kyoto
(M. Yanagida et al.).

5 第一回『プロテオリシス若手の会』：報告

1997年2月17日・18日に第一回『プロテオリシス若手の会』が福岡県福岡市の国民休暇村「志賀島」で行なわれました。九州地区には重点領域『細胞内蛋白分解のニューバイオロジー』に関東地区に次ぐ多くの班員の先生方がおられること、別の重点領域研究でいわゆる『若手の会』の様な集会を開催した経験があること、そして先の班会議のときに九州大学の牟田達史先生が協力して下さるとおっしゃって頂いたこともあり、また私自身がじっくりと岩永貞昭先生のご講演を拝聴してみたいという希望もあったため、福岡での開催となりました。年を越してからの急な呼掛けにもかかわらず16研究室から40名余りの方々に参加していただくことが出来ました。参加者の大部分は大学院生であり、このような若い人達を快く送り出してくださいました班員の先生方に厚く御礼申し上げます。また、参加された方々には本当に忙しい時期に貴重な時間を割いて参加していただき誠にありがと

うございました。さて、基調講演には私の強い希望で岩永貞昭先生に「生体反応におけるプロテアーゼ反応の意義」という題名でご講演をしていただきました。セリン性プロテアーゼ全般のお話から研究の中心テーマであった凝固系のお話までしていただいたのですが、時間が不足して、カプトガニの生体防御の話をしていただくことができなくなってしまいました。

続いて一般演題が行なわれました。トップバッターとして、熊本大学・医学部・遺伝発生医学研究所の龍田高志先生に「大腸菌FtsHプロテアーゼの機能解析」という演題で話していただきました。FtsHの欠損株では $\sigma 32$ の蛋白量が30倍以上に増大することから、 $\sigma 32$ の分解に関与しているというデータが示され、更に、ATPアーゼドメインの変異したFtsHでは蛋白分解活性が減少しているとのお話でした。このことに対して会場から、FtsHミュータント間でのATPアーゼの活性とプロテアーゼ活性は平行しているのか、またDnaKとの結合は相関しているのかという質問がなされました。徳島大学・酵素研の奥村祐司先生は「ヒト由来のプラスミンによる膜結合型1型マトリックスメタロプロテアーゼ前駆体の活性化」という題でガン細胞の細胞内ではなく細胞表面で膜結合型1型マトリックスメタロプロテアーゼ前駆体の活性化が引き起こされる際には、トロンビンではなく細胞表面の受容体を介して細胞表面に結合したプラスミンが重要である事を発表されました。岡山大学・理学部の山本由弥子先生は「光合成・光化学系II反応中心D1タンパク質前駆体のC末端プロセッシング」について話されました。葉緑体DNAにコードされたD1蛋白質のC末端のプロセッシングが核にコードされたセリンプロテアーゼであるCtpAでなされるが、このプロセッシングは既知のセリンプロテアーゼインヒビターでは阻害されないこと、現在このプロテアーゼの基質特異性をペプチドを用いた競合実験により検討中であるとのことでした。九州大学・理学部の下方国稔先生は「ミトコンドリアプロセッシングペプチダーゼの基質認識機構の解析ーリンゴ酸脱水素酵素前駆体を基質として」という演題で、リンゴ酸脱水素酵素のプレシークエンズに変異を導入したペプチドを用いた競合実験で、リンゴ酸脱水素酵素のプレシークエンズの

どのアミノ酸がミトコンドリアのプロセッシング酵素の基質認識に重要であることを示されました。徳島大学・工学部の森健二先生は「Kexin様プロテアーゼPACE4」という演題で、分泌蛋白質のプロセッシングプロテアーゼの中のPACE4には7つのアイソフォームがあり、遺伝子は1つで全長300kbp以上25エクソンからなり、それぞれのアイソフォームはスプライシングの違いから出来ることや、プロテアーゼ活性に違いのあることを話されました。東京工業大学・生命理工学部の加藤明先生は「プロモーター使い分けによるendopeptidase24.16の細胞内局在の制御」という題で話されました。endopeptidase24.16は初めAngiotension Binding Proteinとしてクローニングされた蛋白質ですが、プロモーター部位を含むエクソンの使い分けによって、細胞質に局在するものとミトコンドリアに局在するものの二種類の蛋白質が合成されることを話されました。九州大学・理学部の藤田英明先生は「リソゾームの形成機構：リソゾーム膜蛋白質の細胞内輸送機構およびその機能」という演題で、リソゾーム膜蛋白には種類によって異なったリソゾームへの局在化機構があることや、リソゾーム膜蛋白質の機能について現在解析中であるとのお話をいただきました。九州大学・歯学部の筑波隆幸先生は「カテプシンEの生合成と局在化機構」というお話をいただきました。カテプシンEは細胞の種類によって細胞質に存在したりリソゾームに存在したりすることや、プレフェルジンA、モネンシンやバフィロマイシンAによってその局在が変化したり影響を受けたりすることを示して頂きました。姫路工業大学・理学部の堀 洋先生は「所属講座の紹介と研究内容」というお話をいただきました。血液凝固異常と蛋白質の細胞内品質管理機構を中心に精力的に解析が進められている様子が良く解りました。長崎大学・薬学部の椛島力先生は「プロリン特異性酵素について」という演題でお話をいただきました。プロリンアミノペプチダーゼの美しい結晶が示されとても印象的でした。東京大学・薬学部の石野智子先生は「Prolyl endopeptidaseの機能について」という演題でセンチニクバエのプロリルエンドペプチダーゼが増殖期に核に移行することから、この酵素がセンチニクバエの増殖に必須であるというお話をいただきました。東京都

老人研・分子病理の高木秀幸先生は「イソ体アスパラギン酸メチル転移酵素ノックアウトマウスの生化学的解析」というお話をしていただきました。このノックアウトマウスでは痙攣重積発作による呼吸障害死が起こること、これは抗痙攣剤を投与してやることで2週間ぐらいの延命がなされること、脳のヘマトキシリンエオジン染色では異常が認められないが脳重量が15%ぐらい増加すること、学習効果が認められないことを話していただきました。

講演の後交流会に移り、自分の今いる研究室の話や「若手の会」の今後のやり方について自由な話合いをする事ができました。その後の非公式な交流会や後日参加者に対する電子メールでのアンケートによって、今後の「若手の会」の開催に関するご意見をお伺いいたしました。様々な意見が寄せられましたのでその一部を紹介させていただきます。

- ・若手の会の開催は学会に隣接して開催すると、学会で聞けなかったような事を直接聞く事ができるし旅費の面でも助かる。
- ・口頭発表は特定のテーマを決めて、一演題当たり30分程度で基調講演に関連したもののみとし、その他の発表はポスターにする。
- ・交流会の初めに自己紹介をやるほうが相手が誰であるのかが解ってよい。
- ・ホームページを作製し、その場を互いの意見や情報交換の場とする。
- ・敷居が低くて誰でも参加できるような会であって欲しい。

などが複数の方があげられたご意見でした。アンケートにご協力していただきました参加者の諸先生方にこの場をお借りして御礼申し上げます。

「プロテオリシス若手の会」は今回第一回を行なったばかりで今後の開催に関して班員の諸先生方やその教室に属しておられる若手の方のご協力により今後の方向や開催が大きく左右されると思います。今後とも宜しくご協力のほどをお願い申し上げます。

「プロテオリシス若手の会」幹事：石堂一巳，川原裕之，鈴木直子，反町洋之

(4) 学会・集会報告

1. "Proteasomes and Related Complexes" 2nd Workshop

平成9年3月19～21日にフランスの片田舎クレモンフェナン市（この地名はほとんどの方がご存知ないと思われるが、リヨンに近くまた中世においては有名な宗教会議が開催された由緒正しい街であるらしい。と同時に、有名な科学者パスカル生誕の地でもあり、事実、主催者の一人P. Schmid氏は当地パスカル大学の教授である）において“プロテアソームと関連複合体”に関する第2回の国際ワークショップが開催された。筆者にはクレモンフェナンには因縁浅からぬものがある。と言うのはフランスと言えぱパリしか知らない筆者が、この名も無き都市を訪れるのは3回目であるからである。最初は約5～6年くらい前に“筋蛋白とプロテアーゼ”の国際会議が催され、このときは鈴木領域代表者や木南副代表者らと一緒に参加した。そのときの開催場所は、郊外の山の頂で風光明媚な場所であったが、前回と今回の「プロテアソーム」会議はクレモンフェナン市の中心部で、会議場も滞在ホテルも同一であった。過去2回とも会議が終了して当地を去るときには、いつも「この辺境の街は二度と訪れたくないな」と言う感慨をもつのであるが、2～3年後に第3回ワークショップも開催予定であることを主催者に告げられると啞然となった。そう言えば、FASEBの“ユビキチンとプロテオリシス”の夏期ワークショップ（2年毎に開催）も米国ニューハンプシャーの片田舎で、本年6月末から第5回目が開催される。これは、ゴードン会議とほぼ同様な形式でおこなわれ、辺境の寄宿舍に約1週間缶詰となる。今回の「プロテアソーム」会議の規模は参加者が約130名であったが、日本人の参加者は筆者を含めて2～3人と低調であったので、次回にはもっと多くの参加者を望みたい。しかし、一つのテーマで徹底的に討議を重ねるとは確かに学ぶべき事柄が多く、日本におけるお祭り騒ぎの年次会議に比較すると時差の苦痛を割り引いても参加する価値はあるように思われた。

さて、会議の内容であるが、プロテアソームはユビキチンをパートナーとする

蛋白分解系でありながら、ユビキチンに関する講演は皆無（A. Ciechanoverの講演を除くと）であり、最初から最後まで「プロテアソーム」の話で統一されていた。この点では、ユビキチンとプロテアソームの話題が相半ばする（年によってその比率は変動するが、概ねユビキチンの話題が中心となる）上記FASEBの「ユビキチンとプロテオリシス」会議とは大きく異なる。この「プロテアソーム」に限定する会議の構成はユビキチンの話が聞けないだけに大きな弱点でもあるが、考えようによってはユビキチン研究に押されがちなプロテアソーム研究を徹底的に議論するには有効とも思われた。

講演（ポスター発表も含め）は、まさに玉石混交であった。中でも、愁眉は1988年度のノーベル賞受賞者R. Huberによる酵母20SプロテアソームのX線結晶構造解析の特別講演であった。その詳細はその2週間後のNature誌（386, 463-471, 1997）に発表されたので、ご存知の方も多と思われるので敢えて紹介しない。私が驚いたのは、1995年のScience誌の表紙を飾った“古細菌プロテアソームのX線結晶構造解析”（Science 268, 533-539, 1995）から僅か2年足らずの間に、酵母20Sプロテアソームの高次構造解析に成功したことであった。さらに吃驚したのは、昨年6月、CH Chung & AL Goldbergらが大腸菌HslVUが26Sプロテアソームのプロト型のATP依存性プロテアーゼであることを発表したが、実はプロテアーゼサブユニットであるHslVのX線結晶構造解析にもすでに成功していたからである（原稿もほぼ仕上がっており、またATPaseサブユニットであるHslUについての解析も鋭意進行中であるとのことである）。これらの巨大な分子複合体の結晶構造解析をいとも簡単にやっける技量は神業とも形容すべきものであり（多くの参加者が賛辞と羨望をもって彼の講演を拝聴していたのは、紛れもない事実であった）、他に追随を許さぬ正にノーベル賞科学者の面目躍如といったところであろうか。不思議なことは、真核生物や古細菌プロテアソームの β -ringが7個のサブユニットから構成されている（プロテアソームは α と β のリングが $\alpha\beta\alpha$ の順序で会合した円筒型粒子）のとは異なり、同じスレオニンプロテアーゼであるHslVが6個のサブユニットから構成されたリン

グとなっているたことである。しかし、高次構造は大変よく似ていて、構成サブユニットを一個引き抜いたものであろうと考察していたが、それでは複合体の意味は何であるのかと疑問に思った（詳細は論文が発表されてから考えることにしたい）。いずれにしても、近い将来にATPaseサブユニットHslUの構造解析が発表されれば、ATP依存性プロテアーゼの研究のみならず、そのATP結合ドメインを共通配列とするAAAファミリーATPaseにおける研究に対しても興味深い情報を提供することになるであろう。

Huber先生の講演については、大半の研究者が彼の成功を未確認情報として薄々知っていたが、内容については皆無であったので、衝撃的なインパクトを与えた。本講演を聞いていると、2年前の第1回「プロテアソーム」会議において、W. Baumeisterが古細菌プロテアソームの電子顕微鏡解析とX線結晶構造解析（Huberとの共同研究として）について講演したときの素晴らしい印象が鮮やかに蘇ってきた。今回、またしても「プロテアソームの高次構造解析」が最大の話題として注目を浴び会議を席卷した感があるが、それには二つの理由が考えられる。一つは、プロテアソームが巨大で複雑な分子複合体であることである。これは、X線結晶構造解析の技術的な観点からも興味深い対象であること（複雑な分子の構造解析の可能性への挑戦という意味あいもあるとの由である）と、なによりもプロテアソームの触媒反応機構の解明に大きく貢献したことによる。もう一つの理由は、やはり夥しい報告に示されるように、プロテアソームが放つ生理機能の重要性と多様性にあり、その分子的な理解のためには、プロテアソームの構造の理解が不可欠であることによると思われる。

さて、本研究に比較すると、その他の講演についての解説は気分的に色褪せるのであるが、いくつかのトピックスを解説する。B. Dahlmannはヒト20Sプロテアソームの分子構成について発表した。これは、KB. Hendilのモノクローナル抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察とcross-linking法を駆使して解明したものである。結果は、ほとんど酵母プロテアソームと同じであったが、一つのペアーサブユニットの分子内

位置が異なっていた（本研究の成果は最近PNAS 94, 2939-2944, 1997に発表された）。この相異について彼に尋ねたところ、高等動物と酵母の相異である可能性もあるが、解析ミスの可能性が高いと話していた。真偽は、ヒトプロテアソームのX線結晶構造が解析されるまで、不明である。DH. Wolfは酵母プロテアソームの遺伝学的解析を駆使して、プロテアソームの触媒サブユニットの同定をおこなった。プロテアソームのスレオニンプロテアーゼとしての反応機構が解明されたので、Pre2K108R, Pre3T20A, Pup1T30Aの変異プロテアソームを作製してプロテアーゼ作用を調べた（これらのサブユニットは筆者らがクローニングしたヒトプロテアソームのX, Y, Zに相当する）。興味深いことに、これらは各々、キモトリプシン型活性、PGPH分解活性、トリプシン型活性を選択的に（他の二種の活性に影響することなく）阻害した。実験結果は明快であったが、これらの三種のサブユニットは互いに相同性があるものの、アミノ酸配列においてこれと言った特徴がないにも関わらず、個々のサブユニットに依存して異なる特異性がなぜ発揮されるのかは不明である。

本会議の一つの話題は、プロテアソーム活性化因子PA28の研究が大いに進展したことである。簡単に述べると、まず筆者は、PA28が $\alpha\beta\gamma$ から構成された三種のファミリー蛋白質であり、インターフェロン γ によって巧妙に調節されていることを発表した。次いで、PM. KlotzelらはPA28が内在性抗原のプロセッシングに重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、S. WilkはPA28 α のCOOH-末端（これが活性化に重要であることはすでにGN. DeMartinoらが報告している）の構造を利用して、Z-GMIY(Ac)₂を合成し、これが20Sプロテアソームの強力な活性化剤として作用することを明らかにした。また、KB. Hendilは、26Sプロテアソームを免疫沈降することのできるp45（制御ユニットPA700を構成するATPaseサブユニットの一つ）に対するモノクローナル抗体を作製して、HeLa細胞Extractを免疫沈降した結果、この抗体がPA700のみならずPA28も沈殿させることを見出し、細胞内にPA700-20Sプロテアソーム-PA28のハイブリッド型プロテアソーム複合体の存在することを示唆した。そのほかにも、関連ポスターがあり（また、本会議では発表はなかったが、既に

PA28のノックアウトマウスが作製され、免疫応答に異常が発生するとの情報ももたらされた)、筆者はPA28がこのようにホットな話題になるとは予想していなかったもので少なからず驚いた。26Sプロテアソームの構造と機能に関する研究発表も多数みられたが、既存の概念を脅かすような発見はなかった。その他にも色々な発表があったが、全てを網羅して解説を加える余裕はないので、この会議の抄録、および講演者の総説(全てではないが)がMol. Biol. Rep. Special issues: Proteasomes and Related Complexes (Schmid, H.-P. & Briand, Y.), 24, 1-138 (1997)に印刷されたので、そちらを参照して頂きたい(必要な場合には筆者がお貸しします)。

プロテアソーム研究の過度に競合する今日の研究状況を省みてみると、もはや一人の研究者が「全勝」を目指すことは、ほとんど不可能に近く、さりとて「全敗」ではこの世界に身の置き所がなくなってしまうので、せめてとある領域(しかし後世において重要と認められる研究でなければならないが)での「勝ち越し」を狙いたいところである。このような進歩の激しい領域の国際会議に参加して思うことは、やはり多くの情報が得られることであり、頻繁に国際会議に出向くことの必要性を痛感する。逆に言えば、「蛋白分解」の世界における研究の進展が、極めて急であることを物語っており、それはそれとして喜ばしいことかも知れない(競争している場合には多少とも辛い場面にも遭遇することにもなるが)。しかし、名も無き若手研究者が非常に素晴らしい研究成果を発表すると、この世界に長く逗留していた己を省みて何故か虚しくなる。そう言えば、中原中也の詩に「おまえはなにをしてきたのだ?と吹き来る風が言う」というフレーズがあったが(随分昔の記憶なので、正確ではないが)、この詩の一節を思い出すと、誰かに叱責されているような感じで暗澹たる思いにとらわれ、ビールが不味くなってしまった。

(田中啓二: 東京都臨床医学総合研究所)

2. Calpain 97国際会議 (CALPAINS: Their Role in Pathology and New Therapeutic Opportunities)

日時: 1997年4月13日 (日) ~ 15日 (火)、場所: イギリス、オックスフォード、オックスフォード大学。カルパインに関する国際会議はCatherine Crawford博士 (Oxford Univ., U.K.)、Anna Turner博士(Oxford Univ., U.K.)、セファロン社のDonna Bozycko-Coyne博士(Cephalon, Inc., U.S.A.)、及び、Jackie Hunter博士(Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, U.K.)をオーガナイザーとして開催された。オックスフォードは、ロンドンから西へ100 km、電車で1時間ちょっとのところにある静かな学園都市、というよりも、どこまでがオックスフォード大学なのかわからないほど大学と町が渾然一体となった、とてもきれいな町であった。学会は二つの宿泊施設 (Lady Margaret HallとMagdalen College) の両方から歩いて15分くらいの所にある実験心理学の建物で行われた。参加者は全87名で、個人的な予想よりずっと多くてびっくりしたが、学会としては丁度良い規模のまとまったもので、まとまりすぎていて、いきなり会場全員で議論が始まったりもして、個人的にはとてもスリリングな会であった。日本からの参加者は4名と少なく、U.S.A. 29名、U.K. 22名がやはり多かった。実際の会議は丸2日間で、2日とも8:45に開始され口頭発表21題、ポスター演題32題が発表された。演題は、構造、病理学、阻害剤の3つが多数を占めており、カルパイン、カルパスタチンについての興味深い発表が続いた。

主なものを紹介すると、まず、東大分生研の石浦章一博士が、所長職多忙のため急遽参加できなくなった鈴木紘一教授のピンチヒッターという重責を見事に果たして、カルパイン研究を概説する素晴らしい講演を行い、満場の拍手喝采を受けた後、C. Crawford博士とD. Goll博士(Univ. of Arizona, U.S.A.)の座長により、S. Meyer博士(Cephalon Inc., U.S.A.)、J. Elce博士(Queens Univ., Canada)、及びE. Carafoli博士(Swiss Federal Inst. of Technology, Switzerland)が、 μ -、m-カルパインの大腸菌と昆虫細胞(Sf-9/バキュロウィルス)における発現とそれを用いた構造-機能相関解析につい

て最新の知見を発表した。論文にも既に発表されている（実は商品にもなっていた！：CALBIOCHEM社 Calpain II, Rat, Recombinant, High Purity, Cat No. 208718, 250 μ g 105ポンド）が、J. Elce博士はラットのm-calpain大小サブユニットを、大腸菌BL21(DE3)株を用いて20~30°Cで発現して、精製することに成功し、得られたrecombinant m-calpainは、nativeの酵素とほぼ変わらないスペックであることを報告した。しかしながら、彼らも μ -calpainは、うまくいかないと言っており、成否の鍵は微妙な所にあるのかもしれない。ちなみに我々も昔 μ -calpainを大腸菌で発現させ、活性を得ることに成功しており、Ca²⁺感受性も確認できたが、比活性が低くそれ以上大腸菌に固執するのは止め、昆虫細胞発現系に移行してしまった。やはり、大腸菌で発現できればそれにこしたことはないので、比活性ほぼ100%という彼のデータは驚異的である。一方、E. Carafoli博士のグループもバキュロウィルスと大腸菌の両方を使ってヒト μ -calpainを発現し、両方のパラメータを比較した。その結果興味深いことに、バキュロウィルスの方は、ほぼ完全にnativeの酵素を一致していたが、大腸菌の方は微妙に値がずれていた。例えば、Km(Ca²⁺)は、nativeでは60 μ M, 昆虫細胞では67 μ Mなのに対し、大腸菌では200 μ Mであった。比活性も彼らの場合は、昆虫細胞では90%以上なのに対し、大腸菌では約70%であった。これらの事実は、大腸菌で発現させたカルパインは、nativeなものに比べて微妙な高次構造の歪みがあるのかも知れないことを物語っている。また、S. Meyer博士は、昆虫細胞の発現系を用いてヒト μ -calpain大小サブユニットを発現し、大サブユニットのみでも活性を持つことを示した。ただし、比活性はnativeの約40%であった。カルパインの活性化機構については百家争鳴の状態であり、実際にin vivoでどのような活性化が起こっているのかを検討するための（複数の機構が組み合わさっている可能性の検討も含めて）、良い方法論が待たれるところである。その一つの可能性として、J. Anagli博士(Henry Ford Health Science Center, U.S.A.)やE. Carafoli博士らによって発表されていたのは、HIV proteaseなどで盛んに応用された、いわゆるInternally quenched fluorescent substrateというものである。原理は、十数個のペプチド（ここが基質となるので、各プロテ

アーゼに特異的かつよく切断される配列をデザインする)のN末端とC末端とにそれぞれ蛍光基と消光基を付けており、通常は蛍光基が励起されてももう一端にある消光基によって分子内でエネルギートランスファーが起きて、分子外に蛍光は出ない。しかしながら、ペプチドが切断され、分子内消光ができなくなると蛍光が発するため、プロテアーゼの特異的かつ定量的な基質となりうるわけである。彼らは、これをカルパインに応用するべく、カゼインやフォドリンの配列の幾つかを用いており、それなりに基質となりうることを示してはいたが、そもそもカルパインはペプチドの配列を認識するというのは苦手なので、今一つの感があった。しかし、これがうまく働けば、細胞内にこの基質を入れて、カルパインが活性化している所を簡単に捕まえることも可能になるかもしれない。

脳虚血とカルパインの関係については、特に製薬会社を中心にカルパインの低分子量阻害剤の開発競争と言う形で活発に研究されており、今回もうんざりするほど多くの脳の"スライス"を見せてもらった。ほとんどのグループが、東京都臨床医学総合研究所の西道博士が用いて成功されているフォドリンのカルパインによって切断を受けたフラグメントのN末端に対する抗体を作成して、このフォドリンの分解を指標にしていた。B. Siman博士(Cephalon Inc., U.S.A.)、K. Saatman博士(Univ. of Pennsylvania, U.S.A.)、B. Bahr博士(Cortex Pharmaceuticals Inc., U.S.A.)、K. Wang博士(Parke-Davis Pharmaceutical Research, Warner-Lambert Co., U.S.A.)、N. Banik博士(Med. Univ. of South Carolina, U.S.A.)、K. Lee博士(Univ. Virginia, U.S.A.)、J. Hunter博士などが脳虚血や脊髄損傷におけるカルパイン阻害剤の効果を示しており、どれも驚くほど(フォドリンの分解抑制には)よく効いていた。中でもK. Saatman博士は、背の高い美しい容姿にして淡々とラットの脳を叩き潰す方法を解説していたのが印象的であった。

合成インヒビターについては、James C. Powers教授(Georgia Inst. of Technology, U.S.A.)がReview講演を行い、彼の合成した数百のtransition-state inhibitorsのどれが、どのくらい μ -、m-calpainに効果があるかを概説した。中には両者に選択的に阻害効

果を持つものもあり、 μ -, m-calpainの機能分担研究への応用が期待された。他に、J. Mallamo博士(Cephalon Inc., U.S.A.)やK. Wang博士も、それぞれが開発した阻害剤分子について発表した。名古屋大学の牧正敏博士は、BIAcoreを使ったデータを交えながら、カルパスタチンとカルパインとの相互作用機序について講演した。カルパスタチン自体に関する研究は全体に少なく、口演では一題のみで、牧博士の発表は全員が興味深く静聴し、活発な議論が行われた。

筋肉生理学の権威である、G. Vrbová (Univ. College London, U.K.)は、自分の発表にはSouthernもNorthernもWesternもEasternも出てこないと宣言してから、筋肉のbiologyとカルパインの関係について、高齢にもかかわらず矍鑠とした口調で口演された。また、R. Nixon博士(Harvard Med. School, U.S.A.)は、アルツハイマー病とカルパイン-カルパスタチン系との関係について発表し、アルツハイマー病の患者の脳ではm-calpainの量がコントロールの9倍に増加していることなどを示した。N. Kosower博士(Tel-Aviv Univ., Israel)は、筋芽細胞の融合など一般的に細胞の膜融合にはカルパインが必須であり、カルパスタチンで抑えられることを発表した。

p94については、我々のグループの他に、N. Forsberg博士(Oregon State Univ., U.S.A.)がそのalternative splicing productが目のレンズに特異的に発現していることを発表し、I. Richard博士(Généthon, France)は肢帯型筋ジストロフィー症2A型の患者に見られるp94の変異を解析して発表していた。まだまだ、カルパインの中で市民権を完全に獲得していないなあという感じであった。筋細胞分化とp94との関係を発表するはずだったCottin博士(ISTAB-INRA, France)が急に参加できなくなったのも残念であった。

ポスターで個人的に目をひいたのは(演者が可愛いらしかったからという話もある)、Ms. S. Sokol (MRC, U.K.)による線虫のカルパインホモログ、Tra-3についてである。実際にはこれから実験を進めていくという感じではあったが、哺乳類のTra-3ホモログも同定されているので、今後大きな発展が期待できる分野であろう。また、K. Wang博士のグループは、ブタ μ -calpain大サブユニットの第IVドメインの構造を

結晶解析した結果を発表した。彼らが開発したPD150606というCa²⁺-結合ドメインに相互作用するという阻害分子と結合した形で、2.1Å解像度で解析し、その結果ドメインIVには潜在的に5つのE-Fハンド構造が存在することと、PD150606は第一と第二番目の構造に結合していることを明らかにしていた。

会議終了時に、是非このCalpain 97の第二回を開催しようと、全員で意志を確認したが、残念ながら具体的な日時を固めるには至らなかった。個人的にも是非Windows 97の次期バージョンが出る前に第二回が開催されたら素晴らしいなぁと思っている。製薬会社の強力なバックアップがあって初めて実現したmeetingであったようなので、当然といえば当然で、仕方の無いことなのだが、全体として、何となく口頭演題の「縁故」採用が多く、トピックが偏っていた様にも感じられた。次回はさらに幅広くトピックを募集できるとさらにカルパインの研究がstimulateされることになるのではと、勝手なことを考えた。 (反町 洋之：東大分生研)

3. "Biology of Proteolysis" Cold Spring Harbor Laboratory Meetingに参加して：細胞増殖、癌化から

4月23日から27日まで、New Yorkの郊外のCold Spring Harbor研究所において、第一回"Biology of Proteolysis" meetingが開かれた。筆者は幸いにも参加する機会が得られたので、筆者の守備範囲（主に細胞増殖、癌化）の発表のいくつかを独断で選んで報告したい。この趣旨のmeetingはCold Spring Harbor meetingとしては今回が初めてである。これはとりも直さず、近年の医学生物学全分野における蛋白分解の注目度の反映であろう。Meetingでは"Signal transduction", "Gene regulation and DNA replication", "Development", "Neoplasia and cell transformation", "Cell cycle", "Quality control", "Host-pathogen interaction and antigen presentation", "Cell death"の幅広いトピックについて、口頭発表、そしてポスター発表が行われた。トピックから推察されるように、Meetingは多様性に富み、また、各分野の第一線の研究者が集まったことか

ら、内容の深いものであった。また、26日の午後にはピアノとバイオリンの奏者を迎えての本格的なクラシックコンサート、それに続く、カクテルパーティー、ロブスターがメインディッシュのディナーパーティーによって、ほとんどピークに達していた疲れも癒された。参加者は総勢220人、うち内外から日本人は16人（2名口頭発表）であった。このmeetingは今後も継続するようであり（次は2年後）、今後の発展が期待される。

まず "signal transduction" では、NF- κ B, I κ Bについての3つの研究室から報告がなされた。この転写因子とそのインヒビターは炎症、免疫応答に深く関わるもので、精力的に解析が進んでいるが、そのプロセッシングにプロテアソームが関与しており、また、それが完全分解ではなく限定分解に関わるというユニークな点からも興味を集めている。NF- κ Bはp50とp65のヘテロダイマーとして働くが、p50は前駆体のp105からユビキチン/プロテアソーム系でプロセスされる。またNF- κ BはI κ Bの結合により細胞質に隔離されるが、外部からの刺激により、ユビキチン/プロテアソーム系を介したI κ Bの分解により活性化される。Maniatis（ハーバード大）は、I κ Bの分解に必要なI κ Bキナーゼを同定している。この700 kdの蛋白複合体はI κ Bの32と36番目のセリンをリン酸化し、21と22番目のリジンがユビキチン化され、それに伴いプロテアソームにより分解が促進される。興味深いことに、I κ Bキナーゼはユビキチン化とMAPK/ERKキナーゼ（MEKK）によりそれぞれ独立に活性化される。また、このユビキチン化によるI κ Bキナーゼの活性化にはプロテアソームは必要ない。彼等は酵母においてもp105からp50へのプロセッシングが起こることを見つけており、この分子機構の解明の武器になるのではないかと予想される。Coux（ハーバード大）はp105のp50へのプロセッシングを再現するHeLa細胞の抽出液のin vitro系について報告した。精製したE1, E2, E3のユビキチン経路の酵素と26Sプロテアソームのみでプロセッシングはいき、E2としてはE2-25K, UBCH5(UBC4)の二つが、E3としては未知の50 kdの蛋白が特定された。E3のサイズは以前にウサギreticulocyteで得られていた結果とは異なる。また、この系において

はp105よりカルボキシ末端を欠くp97のほうがよい基質となる。D'Andrea (ハーバード大) はサイトカインによって誘導される二種類の脱ユビキチン化酵素について報告した。DUB-1, DUB-2はそれぞれIL-3とIL-2によってG1期の前初期に誘導された後、それ自身がユビキチン/プロテアソーム系で速やかに分解される。また、DUB-1とDUB-2の他にもDUB遺伝子は存在し、それらはマウスの第7染色体の特定の領域に存在する。これらDUB遺伝子群は様々なサイトカイン応答に必須であると予想される。Hicke (ノースウエスタン大) は酵母の性的接合に必要なalphaファクター受容体のインターナリゼーションについて報告した、この過程には受容体のセリンのリン酸化とモノユビキチン化の二つのプロセスが必須で、ユビキチン化に必要な受容体のリジン残基はリン酸化に必要なセリン残基と隣接しており、リン酸化がユビキチン化のシグナルとなる可能性が高い。Hochstrasser研のJohnson (シカゴ大) は酵母の細胞型を決定するa1とalpha2について報告した。これら転写因子は一倍体のa, alpha細胞ではそれぞれ単独で存在し、不安定だが、2倍体のa/alpha細胞では安定性が増す。a/alpha細胞でa1とalpha2は結合することにより、お互いの分解シグナルをマスクした結果、安定化するらしい。

"Gene regulation and DNA replication"では、大腸菌のATP依存性プロテアーゼClpプロテアーゼについての報告が続いた。Flanaganはプロテアーゼ活性を持つClpPの結晶構造解析について、Baker (MIT) はClpXがファージMuのトランスポゼース-DNA複合体を壊し、DNA複製を開始させるメカニズムについて報告した。Gottesman (NIH) はClpXPの分解の基質であるRpoS (静止期特異的シグマ因子) の認識機構について述べた。増殖期におけるRpoSの速やかな分解にはRssBが必要で、RssBによるRpoSの修飾がその調節に関与しているらしい。

"Neoplasia and cell transformation"では、カテプシンB、マトリックスメタロプロテアーゼとそのインヒビター (TIMPs)、プラスミノゲンの癌化への寄与についての発表が続いた。Sloane (ウエインステート大) は癌化に伴うカテプシンBの局在の変化が細胞のマトリックスからの遊離を促進する可能性について、Matrisian (バン

ダービルト大)はマトリライシンの発現がMMTV-neuマウスの系において乳癌を促進すること、Martin(トロント大、カナダ)とCoussens(UCSF)により、それぞれSV40T抗原、パピローマウイルスHPV16トランスジェニックマウスを用いた発癌のモデル系でのマトリックスメタロプロテアーゼとTIMPの癌化のプロセスへの関与が報告された。E6APはパピローマウイルスのコードする発癌蛋白E6によるp53のユビキチン依存性の分解に必須のユビキチンリガーゼE3である。E6APの正常細胞での基質はわかっていなかったが、Howley研のKumar(ハーバード大)は酵母Two hybrid法を使って、E6に依存しない基質であるHHR23A(酵母のRAD23のヒトのホモログ)を初めて同定した。Jones(ハーバード大)とBagchi(イリノイ大)はパピローマウイルスHPV16の発癌蛋白E7が癌抑制遺伝子産物pRBの安定性を低下させるという報告を行った。その活性にはE7のカルボキシル末端のZincフィンガーモチーフが必要で、分解は26Sプロテアソームを介するようである。E7はアデノウイルスの発癌蛋白E1Aの様にpRBに結合してその働きを阻害するだけでなく、積極的にpRBの分解を促進することによっても癌化に寄与していることを示す。

"Cell cycle"のセッションでは、まずRuderman(ハーバード大)によって、細胞周期制御のレビューがなされ、その中で、ユビキチン/プロテアソーム系による分解の重要性が強調された。M期の制御においては、APCまたはサイクロソームと呼ばれるユビキチン経路のE3ユビキチンリガーゼが注目を集めている。これはG2/M期の制御に必要なサイクリンBの分解シグナルを介したM期特異的分解に必要な蛋白質複合体で、その分解の調節の鍵を握っていると思われる。G1/S期においてもG1サイクリンとそのインヒビターのユビキチン/プロテアソーム系による分解が重要であることが明らかになってきたが、その分解に必要なユビキチン経路の酵素はE1を除いてM期のものとは異なる。RudermanはサイクリンBの分解に関与するE2(E2-C/UbcH10)について報告し、Brandeis(ICRF, U.K)は動物細胞で、サイクリンBの分解の活性がM期の終了後のG0/G1期においても続くことを報告した。サイクリンBの分解はMPF(CDC2キナーゼ)により引き金が引かれるので、CDC2キナー

ぜが不活性なG0/G1期でサイクリンBの分解の活性がどのように維持されているのか興味もたれる。Juang (ハーバード大) はサイクリンとは異なるAPCの基質について報告した。これらAPCの基質の分解シグナルの認識機構と分解のタイミングがいかに決定されるのかが、今後の課題として残っている。酵母のG1サイクリンとそのインヒビターに関して、分解系の認識シグナルとしてのリン酸化が注目を集めつつある。WDドメインを持つ酵母のCDC4はリン酸化された基質の認識からユビキチン分解系への係に中心的な役割を果たすことがわかってきた。このトピックに関する報告が、Jallepalli (ジョンズホプキンス大), Correll (Cal Tech), Skowyra (ベイラー医大), Toda (ICRF, U.K) によりなされた。ユビキチン化シグナルとしてのリン酸化が高等動物のG1サイクリンとそのインヒビターでも保存されていることが、サイクリンEとp27Kip1を使ってClurman (フレッドハッチンソン癌研) によって示された。

"Development", "Quality control", "Host-pathogen interaction and antigen presentation", "Cell death" のセクションでも興味深い発表が続き、活発な討論がなされたが、筆者の不勉強のため割愛させていただきたい。また、紹介しなかったが、レベルは口頭発表以上かと思えるポスター発表も多数あったことを付け加えておく。このように"Proteolysis"全般の多岐に渡ったこのMeetingの内容は、筆者にとって消化不良を起こすほどであったが、あまりにも多様な生命現象において、現在その重要性が再認識されつつある"Proteolysis"を総合的に捉えるうえでは、このようなMeetingが必要不可欠とも思えたりもした。

(大坪素秋：久留米医大・分子生命科学研)

(4) ミニレビュー

1 ミクログリアにおけるカテプシンEの生合成、細胞内移行

ならびに病的機能

はじめに カテプシンEはカテプシンDとともに哺乳類における主要な細胞内アスパラギン酸プロテアーゼである。カテプシンDが典型的なリソソーム酵素としてほとんど全ての動物細胞に普遍的に比較的高濃度存在しているのに対して、カテプシンEは非リソソーム性酵素として基本的にはほとんど全ての動物細胞に存在しているものの組織あるいは細胞種における濃度差は顕著である(1, 2)。胃、脾臓あるいは胸腺ではカテプシンEの酵素量はカテプシンDを上まわっているが、酵素学的には不活性なプロ型として主に存在している。また樹立細胞株にカテプシンEcDNAを導入した場合でもプロ型分子のまま小胞体に留まるか、あるいはせいぜい高マンノース型糖鎖を保った中間型までにしかプロセッシングを受けないことが明らかにされている(1, 3, 4)。一方、胸腺ではデキサメサゾン等で刺激するとプロ型から成熟型酵素への変換が速やかに行われる(5)。これらの知見から、カテプシンEはほとんどの細胞においてはプロ型として小胞体あるいはゴルジ装置に蓄えられており、何らかの刺激に応じて細胞内酸性コンパートメントに転送され、自己触媒的に成熟型酵素に変換され機能するものと考えられる。ところが、脳神経組織ではカテプシンEは老化に伴って成熟型酵素とし著明に増大し、ニューロンにおいてカテプシンDと共存することが示されている(6, 7)。このことから、カテプシンEの脳神経組織における存在様式ならびに活性化機構は末梢組織におけるものとは異なっていると思われる。

本稿では、脳在住の単核貪食細胞系細胞であるミクログリアにおけるカテプシンEに関するこれまでの研究成果を通じて、本酵素の生合成、細胞内輸送、局在ならびに病的機能についての新たな展開について紹介したい。

1. グリア細胞ならびにニューロンにおける局在と分子型

ラットの脳神経組織においても、カテプシンDがほとんど全ての細胞に比較的高濃度存在するのに対して（約 540 μ g/mg タンパク質）、カテプシンEは一部のニューロンに存在が認められるだけであり、酵素量も非常に少ない（約 2ng/mg タンパク質）。ところが、脳神経系の障害に伴って損傷部位に集積する反応性ミクログリアにおいてカテプシンEの発現が著明に増大することが明らかにされた（6, 8-10）。この際、カテプシンEは静止型ミクログリアあるいは反応性アストロサイトにはほとんど認められない。しかも興味あることに、カテプシンEは反応性ミクログリアでは成熟型酵素として検出される。このことは、カテプシンEが反応性ミクログリアでは最終目的地である細胞内酸性コンパートメントに転送されていることを意味しており、反応性ミクログリアの機能においてカテプシンEが重要な役割を果たしていることを示している。

ラット脳より分離した初代培養ミクログリアは、貪食能ならびに細胞表面抗原の発現状態から判断すると、静止型よりもむしろ反応性ミクログリアに近い。このため、カテプシンEは初代培養ミクログリアにおいて還元条件下で分子量42kDaの単一バンドとして検出される。この42kDaの分子は、酸処理を行っても分子量の変化は認められず、さらにカテプシンEのプロ部分のペプチドより作成したプロ型分子のみを認識する抗体とは反応しないことから、成熟型酵素であることに疑いない。免疫電子顕微鏡による観察では、カテプシンEはミクログリアの粗面小胞体、ゴルジ装置ならびにエンドソームに検出される。また、カテプシンEは初代培養アストロサイトにはほとんど認められないが、初代培養ニューロンには成熟型酵素として比較的少量の存在が見られる。一方、カテプシンDはいずれの初代培養細胞においても成熟型酵素として比較的高濃度リソソームに存在する。このように、カテプシンEは中枢神経系においても細胞の種類により発現状態が非常に異なっており、特にミクログリアにおいて細胞の活性化に伴って成熟型酵素としてエンドソームに高濃度発現してくるものと思われる。

2. ミクログリアにおける生合成ならびに細胞内移行

初代培養ミクログリアを用いた ^{35}S -メチオニンでのパルスチェイス実験では、カテプシンEは還元条件下で分子量46kDaのプロ型酵素として合成され、時間経過とともにプロセッシングを受け、チェイス4時間後には大部分は最終的に分子量42kDaの成熟型酵素に変換し、一部はチェイス直後よりプロ型分子のまま培地中に分泌される。合成初期のカテプシンEは高マンノース型の糖鎖構造を有しており、チェイス4時間後にはその大部分は複合型あるいはハイブリッド型糖鎖に変換する。ところが、 H^+ -ATPase阻害剤であるバフィロマイシン A_1 で処理したミクログリアではカテプシンEの成熟型酵素へのプロセッシングは完全に阻害され、プロ型分子のまま培地中へ分泌される量が増大する。さらに、小胞体からゴルジ装置へのタンパク質輸送を阻害することが知られているプレフェルディンA処理でも成熟型酵素へのプロセッシングは完全に阻害され、この場合は培地中への分泌も認められない。これらの結果は、カテプシンEには、ミクログリアにおいて膜結合リボソームで合成された後、ゴルジ装置に輸送され高マンノース型から複合型あるいはハイブリッド型への糖鎖構造の修飾を経て最終的にエンドソームに輸送され自己触媒的に活性化されて成熟型酵素に変換する主要な経路と、プロ型分子のまま細胞外に分泌される経路の2種類存在することを示している。一方、カテプシンDは成熟型酵素になっても高マンノース型糖鎖を保っていることから、カテプシンEの糖鎖構造の複合型あるいはハイブリッド型への変換はリソソームからの選別に関与しているものと考えられる。

3. ミクログリアにおける病理的機能

3-1. アミロイド β 蛋白の分解

アミロイド β 蛋白はアミロイド前駆体蛋白質の生理的なプロセッシング産物であることから、正常な脳においてはアミロイド β 蛋白の産生と分解量の間にはバランスが取れているものと考えられる。ところが、アミロイド β 蛋白の産生量が異常に増大

したり、あるいは分解機能が低下するとアミロイド β 蛋白の蓄積を招くことになる。アミロイド β 蛋白の詳細な分解機構については明らかとなっていないが、最近興味ある報告がなされている。脳可溶性分画によるアミロイド β 蛋白の分解活性の至適pHは4.5で、この分解活性はアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるペプスタチンAにより完全に抑制されるが、システインプロテアーゼ阻害剤であるE64あるいはロイペプチンでは影響を受けない。さらに、ペプスタチンAを用いたアフィニティクロマトグラフィーによりこのプロテアーゼが精製され、カテプシンDであることが同定された(11, 12)。カテプシンEのアミロイド β 蛋白に対する分解活性は今後検討しなければならないが、カテプシンDとの類似性から考えてLeu34-Met35ならびにPhe19-Phe20の2つの部位で切断するものと推定される。さらに最近、ミクログリアが細胞表面に発現しているクラスAスカベンジャー受容体を介してアミロイド β 蛋白を結合し取り込むことが明らかにされ(13, 14)、さらに、取り込まれたアミロイド β 蛋白はエンドソーム/リソソーム系に蓄積することが報告されている。アミロイド β 蛋白が蓄積する老人斑のコア部分にはミクログリアが集積しており、ミクログリアがアミロイド β 蛋白の分解除去を担っていることは容易に想像される。さらに、この集積したミクログリアはカテプシンE陽性であることから(15)、アミロイド β 蛋白をエンドサイトーシスで取り込み分解する反応において、カテプシンEならびにDが重要な役割を果たすものと推察される。

3-2. 抗原ならびにインバリアント鎖のプロセッシング

カテプシンEはマウスリンパ球において外来性抗原のプロセッシングに関与することが本酵素の特異的阻害剤であるアスカリスインヒビターを用いた実験により示されている(16)。さらに、ペプスタチンAによりMHCクラスII結合インバリアント鎖のプロセッシングの初期段階が抑制されることから、インバリアント鎖のプロセッシングにアスパラギン酸プロテアーゼが関与することも報告されている(17)。カテプシンEならびにDによるインバリアント鎖の切断部位を調べた実験では、Leu174-Phe175はカテプシンEならびにDによりほぼ同じ速度で切断されるが、

Met99-Glu100はカテプシンEにより特異的に切断されることが明らかにされている(18)。これらの結果は、カテプシンEがインバリアント鎖の特に初期段階のプロセッシングにおいて必須であることを示している。ミクログリアは、活性化されるとMHCクラスIIを誘導し、抗原提示細胞として働くことが知られている。このことから、カテプシンEは外来性抗原ならびにMHCクラスII結合インバリアント鎖のプロセッシングを介して反応性ミクログリアの抗原提示機能に関与する可能性が考えられる。

3-3. 細胞接着能

マウス胚性腫瘍細胞のP19は培養皿への接着性が弱く、細胞同士の大きな凝集を生じる。P19は、このような凝集培養条件下でレチノイン酸を処理すると、ニューロンならびにグリア細胞に分化することが知られている。ところが、ラットカテプシンEcDNAをP19に導入したところ、接着性が強くなり何も被覆していない培養皿に付着するとともに細胞同士の凝集力が弱まる。この接着性の増大ならびに凝集力の低下はペプスタチンA存在下では認められない。これらの結果より、カテプシンEはP19において接着能の制御に関与するものと思われる。ミクログリアはニューロン障害因子として活性酸素ならびに一酸化窒素を産生放出することが知られているが、これらの寿命は極めて短い。このため、これらの因子がニューロン障害を発現するためには、ミクログリアがニューロンに接着することが重要である。初代培養ミクログリアも接着性が非常に強く、何も被覆していない培養皿に付着する性質を利用して他の細胞から分離できる。カテプシンEcDNAを導入したP19と初代培養ミクログリアの接着能の類似性より、カテプシンEがミクログリアの接着能ならび細胞障害活性を制御している可能性が推察される。実際、ペプスタチンAで前処理したミクログリアはニューロンへの接着が弱く、ニューロン障害活性も低下するという知見を得ている。

おわりに 図1に、反応性ミクログリアにおけるカテプシンEの役割の可能性について、模式的に示した。反応性ミクログリアの損傷部位における役割には修復あるいは

は組織障害という二面性があることが知られており、変性過程に陥っているニューロンの生死の判定者のような存在であるとも考えられる。カテプシンEが反応性ミクログリアのどちらの面の機能を担っているのか詳細に検討してゆかなければならないが、今後はノックアウトマウスの作成がカテプシンEの機能解明に向けた焦点になるものと思われる。

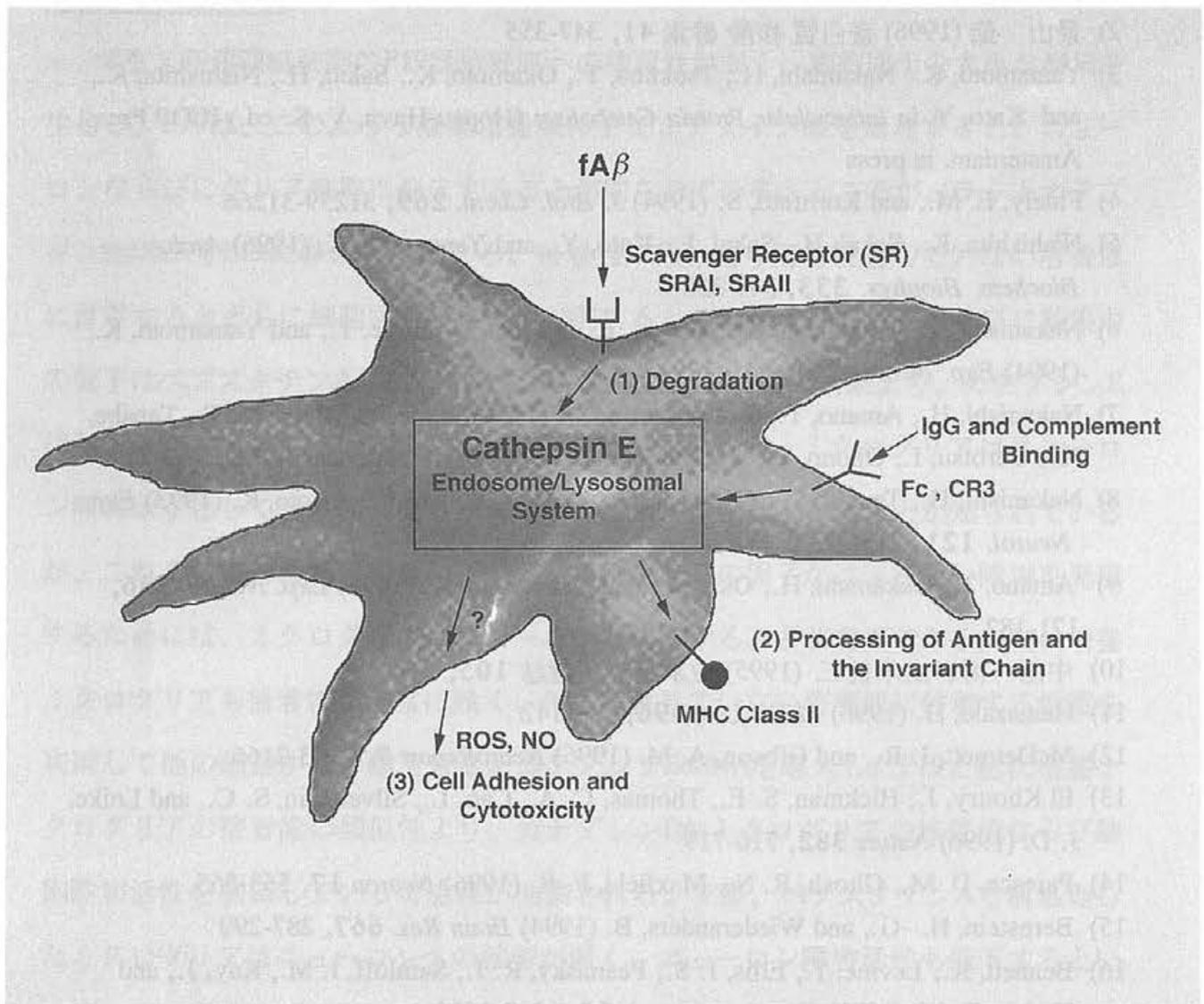
文献

- 1) 山本健二 (1993) 生化学 **65**, 458-461
- 2) 景山 節 (1996) 蛋白質 核酸 酵素 **41**, 347-355
- 3) Yamamoto, K., Nakanishi, H., Tsukuba, T., Okamoto, K., Sakai, H., Nishishita, K., and Kato, Y. in *Intracellular Protein Catabolism* (Hopsu-Havu, V. K. ed.) ICOP Press, Amsterdam, in press
- 4) Finely, E. M., and Kornfeld, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31259-31266
- 5) Nishishita, K., Sakai, H., Sakai, E., Kato, Y., and Yamamoto, K. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 349-358
- 6) Nakanishi, H., Tomonaga, K., Amano, T., Hirotsu, I., Inoue, T., and Yamamoto, K. (1994) *Exp. Neurol.* **126**, 119-128
- 7) Nakanishi, H., Amano, T., Sastradipura, D. F., Yoshimine, Y., Tsukuba, T., Tanabe, K., Hirotsu, I., Ohono, T., and Yamamoto, K. (1997) *J. Neurochem.* **68**, 739-749
- 8) Nakanishi, H., Tsukuba, T., Kondou, T., Tanaka, T., and Yamamoto, K. (1993) *Exp. Neurol.* **121**, 215-223
- 9) Amano, T., Nakanishi, H., Oka, M., and Yamamoto, K. (1995) *Exp. Neurol.* **136**, 171-182
- 10) 中西 博、山本健二 (1995) *日本薬理学雑誌* **105**, 1-9
- 11) Hamazaki, H. (1996) *FEBS Lett.* **396**, 139-142
- 12) McDermott, J. R., and Gibson, A. M. (1996) *NeuroReport* **7**, 2163-2166
- 13) El Khoury, J., Hickman, S. E., Thomas, C. A., Cao, L., Silverstein, S. C., and Loike, J. D. (1996) *Nature* **382**, 716-719
- 14) Paresce, D. M., Ghosh, R. N., Maxfield, F. R. (1996) *Neuron* **17**, 553-565
- 15) Bernstein, H. -G., and Wiederanders, B. (1994) *Brain Res.* **667**, 287-290
- 16) Bennett, K., Levine, T., Ellis, J. S., Peanasky, R. J., Samloff, I. M., Kay, J., and Chain, B. M. (1992) *Eur. J. Immunol.* **22**, 1519-1524
- 17) Maric, M. A., Taylor, M. D., and Blim, J. S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2171-2175
- 18) Kageyama, T., Yonezawa, S., Ichinose, M., Miki, K., and Moriyama, A. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 549-553

(中西 博：九州大学歯学部薬理学教室)

図の説明

Fig.1 Possible functions of cathepsin E in the activated microglia.



2 プロリルオリゴペプチダーゼ研究の最近の進展

プロリルオリゴペプチダーゼはプロリンに特異性を持つ唯一のエンドペプチダーゼであり、ポストプロリン切断酵素やプロリルエンドペプチダーゼと呼ばれて来た。しかし、低分子ペプチドによく作用し、変性タンパク質や高分子ペプチドには作用出来ないことから、最近プロリルオリゴペプチダーゼと改命名されている。酵素は微生物、植物および動物と広く分布し、動物では種を問わず各臓器で活性が見られ、脳、骨格筋や睪丸で活性が高い。これに対し、植物や微生物では高感度蛍光基質を用いても、ごく一部の種にしか活性が見られず、普遍的に存在するとは思えない。プロリルオリゴペプチダーゼの生理的役割は、プロテアーゼ分解産物としてのペプチドや生理活性ペプチドの代謝に関係すると推定されている。また、痴呆症患者の脳内、筋ジストロフィー患者の筋肉、骨粗鬆症患者の組織、うつ病患者の血中(1)など、病態と酵素活性との関係やインヒビターを用いた行動薬理実験などが行われてきた。それらは状況証拠として十分興味あるものであるが、直接酵素が関与している証拠はまだ弱い。最近よく用いられる酵素遺伝子をノックアウトした実験動物を作るのが今後の研究方向であろう。

ここ数年遺伝子レベルでの解析が進み、これまでヒト脳、ヒトT細胞、ウシ脳、ブタ脳、*Flavobacterium*、*Aerobacter* や *Sphingomonas* より酵素遺伝子がクローニングされた。その過程で、*Flavobacterium* 由来の酵素と大腸菌プロテアーゼIIが24.5% ホモロジーがあることが見いだされた(2)。次いで、ジペプチジルペプチダーゼIVおよびアシルアミノ酸遊離酵素がプロリルオリゴペプチダーゼとホモロジーを持つことが見出され、プロリルオリゴペプチダーゼ・ファミリーを形成することが明らかになった。なお、プロテアーゼIIはトリプシンと同様に塩基性アミノ酸のカルボキシル側を切断するセリンエンドペプチダーゼである。これらは共通して低分子基質には作用するが、高分子基質には作用できないオリゴペプチダーゼの性質を持つが、オリゴペプチダーゼ特有の構造を示すようなコンセンサス配列は得られていない。

更に、プロリルカルボキシペプチダーゼはプロリルオリゴペプチダーゼ・ファミリー酵素とホモロジーが見られるのみならず、小麦のカルボキシペプチダーゼIIや酵母のカルボキシペプチダーゼYなどセリンカルボキシペプチダーゼとホモロジーも見出された。一方、このセリンカルボキシペプチダーゼはアセチルコリンエステラーゼやリパーゼと立体構造からa/b ヒドロラーゼフォールド・スーパーファミリーに入ることが知られている。そのため、プロリルオリゴペプチダーゼ・ファミリーもa/b ヒドロラーゼフォールド・スーパーファミリーに含まれることが推定され、これまで知られているトリプシンやズブチリシン・ファミリーとは異なり、このファミリーは非常に大きなスーパーファミリーとなる。しかし、ファミリー全体を通してのアミノ酸の保存性はセリン、ヒスチジンとアスパラギン酸の触媒に関与する3残基周辺にようやく見出される程度である。

プロリルオリゴペプチダーゼのプロリンへの特異性は、サルコシン、N-メチルアラニンやアラニンを含む合成基質を用いた研究で、5員環部分が認識されていることが推定されている。実際に酵素の基質認識部位に5員環がはまり込む部位があるか？5員環を引きつける力は何か？はオリゴペプチダーゼの立体構造の解明しかない。これらを明らかにするため、我々は*Flavobacterium* と *Sphingomonas* のプロリルオリゴペプチダーゼを結晶化し解析中であるが、暫く時間が必要である。何か手掛かりを与えるものとして、プロリンとピログルタミン酸が同じ5員環を持つことに注目し、ピログルタミルペプチダーゼの構造の解析がプロリルオリゴペプチダーゼ研究に役立つと考えた。幸い我々はこのピログルタミルペプチダーゼ遺伝子のクローニングと酵素のX線結晶構造解析を終えており(3)、この構造からプロリンに対する特異性発現を推定した。ピログルタミン酸が入る空間があり、その近くにフェニルアラニン側鎖が3つ存在し、非常に疎水性の強いポケットを構成しており、ピログルタミン酸への基質特異性がこの空間との疎水力によってもたらされていると考えられた(図)。同様のことがプロリン特異性ペプチダーゼのプロリンへの基質特異性の発現機構と推定されるが、最終的にはX線結晶解析の結果を待たな

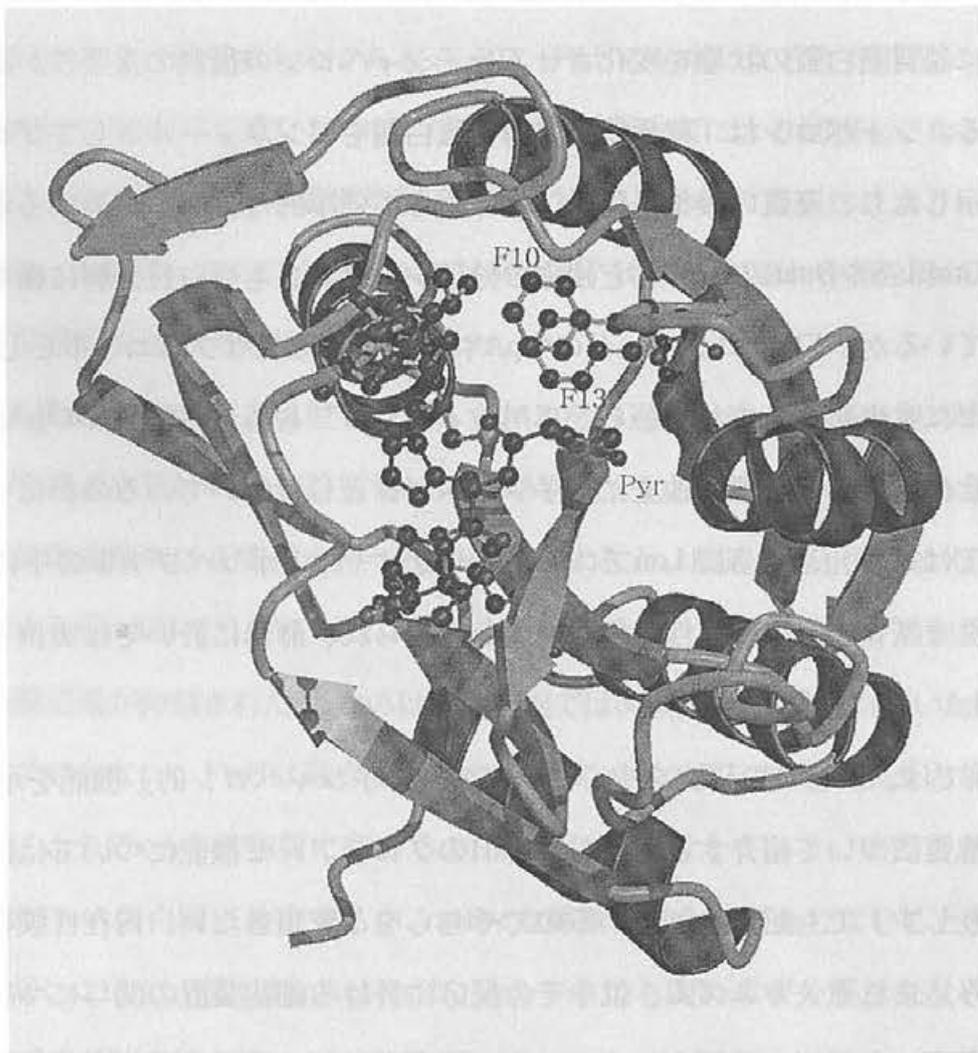
ければならない。

文献

- (1) Maes, M. et al. (1994) *Biol. Psychiatry* 35, 545-552
- (2) Yoshimoto, T. et al. (1991) *J. Biochem.* 110, 873-878
- (3) Odagaki, T. et al. (1997) *Structure* in press

(芳本 忠：長崎大学薬学部)

図1 ピログルタミルペプチダーゼとTRH (Pyr-His-ProNH₂)



3 FtsHと分子シャペロン

大腸菌では、これまでにClp (ClpAP、ClpXP)、Lon、HslUVおよびFtsHの4種類のATP依存性プロテアーゼが見出されている。FtsHはこれらATP依存性プロテアーゼの中で唯一の膜蛋白質であり、細胞増殖に必須であるという点で特徴的で、熱ショックシグマ因子(σ^{32})や λ ファージのcII蛋白質などの短寿命転写因子や正常にアセンブリー出来なかった膜蛋白質複合体の構成蛋白質 (SecYやFo subunit a)を分解することが最近の研究で明らかにされた(1-6)。一方、ftsH変異株は一見蛋白質分解との関係が明らかではない多様な表現型を示す。実際筆者らは、膜蛋白質 (SecY) 分解変異株としてftsHを分離したが、下記のようにこれとは全く異なるアプローチによってもftsH変異に行き当たった。細胞内蛋白質分解には加水分解を触媒するプロテアーゼと共に基質蛋白質の状態を変化させる分子シャペロンの役割の重要性が認識されつつある。シャペロンは「積極的」に基質蛋白質をアンフォールドしてプロテアーゼに提示したり、基質の凝集を防ぐことによって効率的な分解を促進すると考えられる。GroEL/SやDnaK/J/GrpEなど独立の分子シャペロンも蛋白質分解に働くことが知られているが、ClpプロテアーゼのClpAやClpXのようにサブユニットとしてプロテアーゼに本来組み込まれている”専用シャペロン”もあり (ClpXやClpAが細胞内でClpPと会合しない状態で独立に分子シャペロンとして働いているのかについては明らかではない)、さらに Lonプロテアーゼでは一つのポリペプチドの中にシャペロン活性とプロテアーゼ活性を併せ持つと考えられ、酵母に於いては実例も報告された(7)。

本稿では、筆者らの研究を中心にFtsHの「分子シャペロンの」機能を示唆する様々な性質について紹介する。なお、FtsHのプロテアーゼ機能については既に「ぶろておりしす」でも紹介されているのでそちらをご覧頂きたい。内在性膜蛋白質が膜に組み込まれるメカニズム、就中その反応に於ける細胞装置の関与については現在でも必ずしも明確に理解されていない。筆者らはこの過程に関与する細胞装置の

変異株を分離することを考え、内在性膜蛋白質SecYのC末端細胞質領域に局在性リポーターとしてPhoA（アルカリ性ホスファターゼのシグナル配列以外の配列）が融合した蛋白質を変異株スクリーニングに用いた。野生株中ではPhoAの融合したSecYのC末端領域は直前にあるSecYの膜貫通部位がいわゆる膜透過停止配列として働くため細胞質に留まるが、もし、膜透過停止が正常におこななければPhoA部分はペリプラズムに達する（Std表現型）。その様な変異株としてftsH変異が見出された(8)。ftsH変異株ではStd表現型だけでなく、幾つかの表層蛋白質の膜透過の遅延も観察された（Sec表現型）。これとは別に、元来コリンシンに対する抵抗性を示す変異株として分離されていたtolZ変異株もftsHに変異を持つことも明らかになった(9)。tolZ変異株では膜ポテンシャルの形成に欠陥がみられた。これらはFtsHが正常な膜機能の維持に関与することを示すものである。一方、FtsHの枯渇による生育阻害が分子シャペロンGroE（Hsp60/10）或いはHtpG（Hsp90）の過剰生産により回復し、ftsH変異によって起こるStd表現型、Sec表現型がそれぞれHtpG、GroEの過剰性により回復することが分かった(10)。このことから、FtsHがGroE、HtpGそれぞれと部分的にオーバーラップする機能を持つ可能性が示唆された。

FtsHの機能低下はStd表現型をもたらすが、その過剰生産はStdとは逆の効果を示す。内在性膜蛋白質MalFの細胞質領域にPhoAが融合したMalF-PhoAのPhoA部分の直前にある膜貫通配列に正電荷を持つ残基を導入すると、膜透過停止効率が低下して野生株中でもPhoAがペリプラズムに移行する。この時、野生型FtsHを過剰生産するとPhoAの膜透過が抑制された。PhoAは細胞質内ではS-S結合が形成されないためフォールディングできない。FtsHは融合蛋白質のアンフォールドしたPhoA部分と相互作用することによりPhoAを細胞質に留めるのではないかと考えている。実際、精製FtsHは変性したPhoA蛋白質に結合するが、nativeな酵素には全く結合しないことが分かった。興味深いことに、変性PhoAはFtsHに結合するにも関わらず分解されない。FtsHはポリペプチド結合能を持つが、実際に分解されるのは限られた基質のみであることを示唆する。また、FtsHがATP非存在下でSecYとも結合し（ATP存在下では分解

される) 高温 (42°C) で誘起される精製SecYの凝集を防ぐことを見出した。このような性質も分子シャペロンと類似するものである。

FtsHの相同体は真核生物 (酵母) のミトコンドリアにも存在する。酵母ミトコンドリアのFtsH相同体、Yta10p、Yta12p、Yme1pは何れもFtsH同様プロテアーゼ活性を持つと考えられている(11)。Yta10pとYta12pは複合体を作るが、これらの遺伝子の変異株中ではF1Fo ATPaseのFo セクターの構成膜蛋白質Subunit 9のアセンブリー (多量体化) が損なわれ、F1とFoとのアセンブリーも阻害される。また、やはり膜蛋白質複合体であるCytochrome c oxidaseの正常な複合体形成にもYTA10/YTA12が必要である(7, 12)。YTA10或いはYTA12欠損株におけるSubunit 9のアセンブリーはZn²⁺プロテアーゼアクティブサイトモチーフの変異体によっても相補される(12)。このようなin vivoでの結果から、Yta10/12は蛋白質分解と独立に働きうる分子シャペロン機能を持つと主張されている。精製蛋白質を用いた生化学的解析が待たれる。グラム陽性菌*B. subtilis*ではFtsHが孢子形成やストレス耐性等に関わることが示されており、それらもシャペロンの機能が関わるものかも知れない。

FtsHは、それ自身ホモ多量体を形成する(13)と共に、膜蛋白質HflK/HflCと複合体を作る(14)。変異株を用いたin vivo解析から、HflK/HflCはFtsHのプロテアーゼ基質特異性を制御するのではないかと考えている。例えば、hflKCの変異が膜蛋白質と細胞質蛋白質の分解に異なる影響を与えることが予備的に分かっている。HflK/HflCの作用機作は不明であるが、基質ポリペプチドの認識・結合に於いて働き、FtsHの分子シャペロン機能の制御にも関わるという興味ある可能性も考えられる。FtsHは細胞質側に大きなATPase・プロテアーゼドメインを持つが、HflK/HflCは逆に細胞質側ドメインは極めて小さく、その殆どがペリプラズム側に露出していることが最近明らかになった(15)。このようなトポロジーから、HflK/HflCが細胞質外から細胞質側に存在するFtsHの活性部位を制御していることが推測される。想像を逞しくすれば、細胞表層からの何らかのシグナルを認識して伝達するようなことも考えられる。プロテアーゼの制御機構の例として興味深い系ではなかろうか。

以上概説したようにFtsHの分子シャペロン機能を示唆する種々の結果や観察から我々は、FtsH（複合体）が膜蛋白質を、ある場合には分解へ、又ある場合は正しいアセンブリーへと導く、プロテアーゼ機能と分子シャペロン機能とを兼ね備えた膜のクオリティーコントロールマシンとして働くのではないかと考えている。一方では、上に挙げた「証拠」は全て状況証拠に過ぎず、FtsHが分子シャペロンの機能を持つことを直接示す証拠は得られていない。今後の重要な課題と考えている。

文献

1. Herman, C., Ogura, T., Tomoyasu, T., Hiraga, S., Akiyama, Y., Ito, K., Thomas, R., D'Ari, R., and Bouloc, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10861-10865.
2. Herman, C., Thevenet, D., D'Ari, R., and Bouloc, P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3516-3520.
3. Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A. J., Oppenheim, A. B., Yura, T., Yamanaka, K., Niki, H., Hiraga, S., and Ogura, T. (1995) *EMBO J.*, 14, 2551-2560.
4. Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4532-4536.
5. Akiyama, Y., Kihara, A., Tokuda, H., and Ito, K. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 31196-31201.
6. Akiyama, Y., Kihara, A., and Ito, K. (1996) *FEBS Lett.*, 399, 26-28.
7. Rep, M., van Dijl, J. M., Suda, K., Schatz, G., Grivell, L. A., and Suzuki, C. K. (1996) *Science*, 274, 103-106.
8. Akiyama, Y., Ogura, T., and Ito, K. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 5218-5224.
9. Qu, J.-N., Makino, S., Adachi, H., Koyama, Y., Akiyama, Y., Ito, K., Tomoyasu, T., Ogura, T., and Matsuzawa, H. (1996) *J. Bacteriol.*, 178, 3457-3461.
10. Shirai, Y., Akiyama, Y., and Ito, K. (1996) *J. Bacteriol.*, 178, 1141-1145.
11. Leonhard, K., Herrmann, J. M., Stuart, R. A. Mannhaupt, G., Neupert, W., and Langer, T. (1996) *EMBO J.*, 15, 4218-4229.
12. Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W., and Langer, T. (1996). *Cell*, 85, 875-885.
13. Akiyama, Y., Yoshihisa, T., and Ito, K. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 23485-23490.
14. Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1996) *EMBO J.*, 15, 6122-6131.
15. Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, in press

(秋山芳展：京都大学・ウイルス研究所)

4 グランザイム：リンパ球のエフェクター機能に関する

顆粒内プロテアーゼ

1. はじめに

現在、アポトーシスの分子機構については、様々な系での解析から得られた新たな知見が次々報告されている。「アポトーシス」という用語が「プログラム細胞死」と同義語として扱われる場合があるように、アポトーシスは細胞の生理的な死の場面で認められるものと一般に理解されている。しかし、細胞傷害性T細胞（CTL）やNK細胞など細胞傷害活性のあるリンパ球（キラー細胞）により引き起こされる細胞死は標的細胞にとっては「不慮の死」であるにも関わらず、標的細胞はアポトーシスに特徴的な変化を示して死滅することが知られていた（インターネット上のURL=<http://www.cellsalive.com/ctl.htm> でCTLが標的細胞のアポトーシスを誘導する様子をムービーで見ることができる）。

CTLによる抗原特異的な標的細胞破壊機構として、CTL顆粒中に貯蔵されている孔形成タンパク質 perforin (Pf) に依存した機構と標的細胞上の Fas (CD95) の発現に依存した機構の、ふたつの機構が働きうることが明らかとなっている(1)。Fasはアポトーシスを誘導する細胞表面タンパク質として同定され、その細胞死の機構は精力的に解析されつつある。一方、Fasを発現していない細胞でもPfによる経路でやはりアポトーシスに特徴的な細胞死を誘導するが、精製したPf自体は細胞融解活性はあるもののアポトーシスを誘導する活性は認められない。したがって、Pfと共に機能して標的細胞のアポトーシスを誘導する活性のあるエフェクター分子の存在が想定されていた。

約十年前、CTLが標的細胞を破壊する際に働いているエフェクター分子の検索の過程で、トリプシン型セリン・プロテアーゼの酵素活性の検出とcDNAの分離がほとんど同時になされた。その後、キラー細胞の顆粒からその他にも多くのセリン・プロテアーゼが分離され、顆粒内プロテアーゼという特徴からグランザイム

(granzyme) と呼ばれるようになった。これらは、CTLの抗原レセプターからの活性化シグナルにより顆粒から細胞外に放出されることや、CTLの活性化が認められる局所で Pf とともに発現が誘導されていることから、CTLによる標的細胞の破壊において何らかの役割を担っているものと想定されてきた。ここ数年、遺伝子導入実験や遺伝子破壊実験などによりグランザイムの生理的役割について検討が加えられ、グランザイム B (Gr.B) が標的細胞のアポトーシスに関わっていることを示す知見が集積しつつある。これらの経緯は以前書いた総説にも記したのでそちらを参照していただくとして(2)、本稿では最近の知見を織りまぜて、CTLによって引き起こされる標的細胞のアポトーシスとグランザイムの関わりを中心に概説する。

2. グランザイム分子の性状

グランザイムはそのアミノ酸配列の特徴から、活性中心に His、Asp、Ser からなる電荷リレー系をもつセリン・プロテアーゼ (エステラーゼ) であると考えられる。多くのものは分子量 28~30KDa のポリペプチド鎖に糖鎖が結合した構造をとるが、Gr.A だけは 76 位の Cys でジスルフィド結合したホモダイマー構造をとっていると考えられている(3)。

Gr.A の生理的な基質はいまだに明らかではないが、トリプシン型エステラーゼ (trypsinase) 活性を持つ。一方、Gr.B はセリン・プロテアーゼとしてはめずらしく Asp 残基に特異性を示し (Asp-ase)、Ala-Ala-Asp をもつ合成基質を加水分解し、chloromethyl ketone 誘導体で阻害される。この Gr.B の基質特異性はアポトーシスに関わることが示されている細胞内システイン・プロテアーゼである caspase に類似しており、後述するように CTL による標的細胞のアポトーシス誘導に実際に Gr.B が関与することが示されている。

3. リンパ球による細胞傷害へのグランザイムの関与

Henkart らは、標的細胞の DNA 断片化を引き起こすキラー細胞内の活性が Gr.A の活性と一致することや遺伝子導入実験により、Gr.A が有核の標的細胞の DNA 断片化を引き起こし効果的に傷害する活性を担うエフェクター分子であると結論した

(4)。ところが、ジーンターゲティングにより作製した Gr.A 欠損マウス由来の CTL では、DNA 断片化誘導活性ばかりか、他の細胞傷害活性にも異常が認められないことが報告された (5)。この結果は Gr.A 以外のプロテアーゼがその機能を代替している可能性を否定するものではないが、DNA 断片化誘導活性については、以下で紹介するように Gr.B のノックアウト実験では顕著に抑制されることから、Gr.A が主要なエフェクター分子として機能しているとは考えにくい。Gr.A には細胞外マトリックスを分解する活性、プラスミン活性化、B 細胞の増殖活性化などの活性が知られているが、Gr.A が血中のアンチトロンビン III によって速やかに失活することから (4)、Gr.A は放出された局所すなわち標的細胞の破壊の現場からあまり離れたところで作用するとは考えにくい。

最近、Gr.A 欠損マウスが *ectromelia* 感染後にウィルスを排除できないことが報告された (6)。当初は前述のように、Gr.A 欠損マウスではリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) に対する免疫応答などでも正常マウスとの差が認められないと報告されたが (5)、LCMV と異なり細胞傷害性ウイルスである *ectromelia* ではその排除に Gr.A が必須の役割を担っていることが明らかとなった。Gr.A によるこのウィルスの排除の機構は全くわからないが、ウィルス感染防御というプロテアーゼの新しい機能が明らかになる可能性があり興味深い。

Greenberg のグループは、ラット NK 細胞から DNA 断片化誘導活性のある因子を検索し、それがマウス Gr.B と高い相同性のあるプロテアーゼであったことから、Gr.B やそのファミリーのプロテアーゼが主要な DNA 断片化誘導因子である可能性を示した。実際、Gr.B のジーンターゲティングがなされ、Gr.B 欠損マウス由来の CTL の標的細胞融解活性は Gr.B の有無で差がないのに対し、DNA 断片化は Gr.B 欠損 CTL では著しい遅れが生じることが示された (7)。また、Gr.B 欠損 CTL により傷害された標的細胞ではクロマチン凝集などのアポトーシスの特徴である形態変化を伴っていなかった。これらの結果により Gr.B が CTL によって引き起こされる標的細胞のアポトーシスに必須の因子であろうと結論された (7)。

4. グランザイムによるアポトーシス誘導の分子機構

Gr.B が標的細胞内に送り込まれる機構は、Pf によって生じる細胞膜の孔を通しておこなわれるものと漠然と考えられてきた。しかし、実際には細胞を Gr.B 単独で処理すると自然に（おそらく受動輸送で）細胞質まで Gr.B が入り込むことが報告されている (8, 9)。細胞をさらに Pf で処理すると Gr.B は核にまで移行しアポトーシスが誘導される (8, 9)。また別の報告では、Gr.B は細胞膜上のレセプターに結合し、そこに Pf が共存すると細胞内に Gr.B が移行してアポトーシスに陥ることが示されている (10)。いずれの場合も、Pf は細胞融解を起こすよりも低い濃度で十分であることが注目される。また、後者の報告では、Pf の代わりにウィルス感染でも Gr.B の細胞内移行が起こることから、Pf によって Gr.B などのエフェクター分子が標的細胞内に送り込まれる機構とウィルス顆粒内容物が感染細胞の細胞質に放出される機構とが共通のものである可能性を主張しており興味を引く (10)。

Gr.B が基質として切断するものはアポトーシス関連プロテアーゼ caspase-3 (CPP32 / Yama / Apopain) であると以前報告されていた (11, 12)。しかしその後、他にも多くの caspase が見いだされ、現在、caspase-3 family の caspase-7 (Mch3, ICE-LAP3, CMH-1) が最も良い基質であると報告されている (10, 13, 14)。他にも caspase-10 (Mch4), caspase-8 (MACH, FLICE, Mch5) も Gr.B で限定分解されることが示されている (15)。特に caspase-8 は Fas (CD95) や TNF-receptor の細胞死シグナル伝達の引き金になるプロテアーゼとして知られており、Gr.B を介した細胞死が Fas や TNF による細胞死と共通の機構を持つ可能性が考えられる。

Gr.B が核に移行することがアポトーシス誘導の必要条件だとすれば、アポトーシスに関連した Gr.B の基質となるタンパク質は細胞質ではなく核に局在すると考えられるが、caspase のうちで核に局在し Gr.B の基質となるものがあるのかどうかは今後の検討を待たねばならない。

Gr.B は牛痘ウィルスの Serpin である CrmA により阻害されることが示されており (16)、CrmA を標的細胞に発現させると CTL による細胞死が阻害されることが報

告された(17)。しかし、CrmAはICEの活性を強く阻害しうることなどから、CTLによるアポトーシスのCrmAによる阻害効果は、Gr.Bを阻害した結果というよりもより下流のICE(caspase-1)などの活性を抑えた結果とも考えられる。

一方、Gr.Aはセリン・プロテアーゼでありながら、少なくとも*in vitro*でICE活性、すなわちIL1 β 前駆体から活性型IL1 β を切り出す活性があることが示されている(18)。しかし前述のように、この活性がキラー細胞による標的細胞のアポトーシスの誘導に必須とは考えにくい。

5. おわりに

グランザイムの中で、今のところGr.Bのみがキラー細胞による標的細胞のアポトーシス誘導に必須の因子であると考えられているが、他のグランザイムの生理機能についてはほとんど何もわかっていない。Gr.Aについては、その酵素活性が早くから同定されていたこともあり多くの研究がなされたが、どのような機構である種のウィルス感染を排除するのに関わっているのか不明である。今後の解析が待たれる。

文献

1. Takayama, H., et al. : Adv. Immunol. 60: 289-321, 1995.
2. 高山 大 : 「実験医学」vol.14, 2139-2143, 1996.
3. Jenne, D. E., & Tschopp, J. : Curr. Topic. Microbiol. Immunol. 140: 33-47, 1988.
4. Shiver, J. W., et al. : Cell 71: 315-322, 1992.
5. Ebnet, K., et al. : EMBO J. 14: 4230-4239, 1995.
6. Müllbacher, A., et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5783-5787, 1996.
7. Heusel, J. W., et al. : Cell 76: 977-987, 1994.
8. Jans, D. A., et al. : J. Biol. Chem. 271: 30781-30789, 1996.
9. Shi, L., et al. : J. Exp. Med. 185: 855-866, 1997.
10. Froelich, C. J., et al. : J. Biol. Chem. 271: 29073-29079, 1996.
11. Darmon, A. J., et al. : Nature 377: 446-448, 1995.
12. Martin, S. J., et al. : EMBO J. 15: 2407-2416, 1996.
13. Gu, Y., et al. : J. Biol. Chem. 271: 10816-10820, 1996.
14. Van de Craen, M., et al. : Eur. J. Immunol. 27: 1296-1299, 1997.
15. EMBO Workshop for Cell-Mediated Cytotoxicity, Kerkrade, the Netherlands, 1997.
16. Quan, L. T., et al. : J. Biol. Chem. 270: 10377-10379, 1995.

17. Tewari, M., et al. : J. Biol. Chem. 270: 22705-22708, 1995.

18. Irmiler, M., et al. : J. Exp. Med. 181: 1917-1922, 1995.

(高山 大 : 三菱化学生命科学研究所)

5 C末端プロセッシングプロテアーゼ—光化学系II反応中心

D1サブユニット前駆体のC-末端切断—

<まえおき>

光エネルギーを利用して強い酸化力を形成し、水の分解による酸素発生と電位勾配に逆らった電子伝達反応を駆動する光合成の光化学系II反応中心は、D1およびD2と呼ばれる分子質量約30kDaの、相同性の高い2種類の蛋白質のヘテロダイマーで構成されている(1)。意外な事実、反応中心の最も重要なサブユニットの1つであるD1蛋白質が、光照射・反応条件下で極めて不安定で、高速度の代謝回転を行うことである。この動的な過程には、諸種のプロテアーゼが関与しており、その1つがここに述べるD1蛋白質前駆体C-末端プロセッシングプロテアーゼである。このプロテアーゼの役割は、合成直後のD1蛋白質前駆体から8-16残基のアミノ酸よりなるC-末端延長部分を切断除去することであり、この切断過程は光合成において水分解（酸素発生）の機能を担うMn-クラスター（4原子のMnよりなる酸化還元センター）の構築に不可欠である。C-末端プロセッシングプロテアーゼの作用による水分解の機能発現の分子機構は未だ明らかではないが、酵素による切断で新たに現れるカルボキシル末端が機能上重要な役割を演ずることが考えられる。

最近の研究により、このC-末端プロセッシングを触媒するプロテアーゼが純化され(2)、その遺伝子の塩基配列も決定された(3, 4)。アミノ酸配列の比較から明らかにされた事実は、このプロテアーゼが大腸菌の“tail-specific protease (Tsp)”として知られる新しい型のセリン型プロテアーゼと相同性を持つことである(5-7)。一方、プロテアーゼ作用の基質となるD1蛋白質についても、その構造と機能の解析が進み、合成オリゴペプチドやin vivoあるいはin vitroで合成された基質を用いた解析から、

基質認識の機構について新しい知見がもたらされた(8)。

<基質と反応の場の特徴>

D1蛋白質は植物細胞の細胞内小器官（オルガネラ）の一種である葉緑体の持つDNA上の遺伝子（psbA）にコードされており、その情報はこのオルガネラ内で転写・翻訳される。D1蛋白質は、光合成において光エネルギー変換の場となるチラコイド膜（葉緑体の内膜）に存在する膜蛋白質で、ハイドロパシー分析や部位特異的抗体を用いる解析で示されるように、チラコイド膜を5回貫通し、そのN-端は葉緑体の礎質であるストロマの側に、C-端はチラコイド膜で囲われた内腔（ルーメン）に位置している（図1, 2）。プロセシングプロテアーゼによる切断部位は、膜貫通ヘリックスからルーメンに伸びる約60のアミノ酸残基よりなる突出部分のC-末端に位置し、除去されるアミノ酸残基の数は、生物種により、8ないし16である。プロセシングプロテアーゼによる切断部位はAla-344のカルボキシル側で、切断除去される部分の最初のアミノ酸（+1部位）は、多くの場合Ala、稀にSer（シアノバクテリアや緑藻の一部）である。切断部位上流のアミノ酸配列は、図3に示されるように、これまでにアミノ酸配列の決定（多くの場合psbA遺伝子の塩基配列からの推定）された約50種のD1蛋白質で、ほとんど例外なく保存されている。これとは対照的に、切断除去される延長部分では、+1部位を除いては、配列するアミノ酸ならびに鎖長の変化が大きい（図3）。D1蛋白質の合成は、チラコイド膜のストロマ側に結合したリボソーム上で進行し、ペプチド鎖は翻訳と共役する形で膜に挿入される。この膜内在性基質のC-末端の切断は、その部分がチラコイド膜を通過してルーメン側に輸送された後、その場に存在するプロテアーゼの作用により行われる（図6）。反応の場としてのチラコイド内腔の特徴の1つは、光合成の電子伝達反応と共役するプロトン濃度勾配の形成により酸性化され、そのpHは光照射・反応条件下で約5.5にも達することである（暗所では中性付近）。

<プロテアーゼ>

生化学的解析によると、このプロテアーゼは葉緑体チラコイド内腔に遊離状態

または膜の内表面にゆるく結合した状態で存在している。したがって、この酵素の抽出は、チラコイド膜を低濃度のTriton X-100で処理するか、あるいは比較的穏和な条件下で超音波処理することにより行われる(2)。抽出された酵素の純化には、硫酸沈殿、QAEアニオン交換クロマト、ヒドロキシルアパタイトクロマト、Sephadexを用いるゲル濾過クロマト、金属アフィニティークロマト等、通常の蛋白精製に用いられる方法の適用が可能である。実際には、酵素の存在量が少ないため精製は必ずしも容易ではないが、とにかく、これらの方法を組み合わせることにより純化が達成できる(2)。

純化された酵素のN-末端アミノ酸配列を手がかりに同定されたcDNAクローンの塩基配列の決定により明らかにされた本酵素の全アミノ酸配列と、純化された酵素のN-末端の比較から(2, 3), 389のアミノ酸で構成される本酵素(ホウレンソウの場合)は、N-末端に150残基のアミノ酸よりなる前配列を持つことが示される。この前配列部分は、酸性アミノ酸をほとんど含まず、ヒドロキシル基を持つアミノ酸と正の電荷を持つアミノ酸の繰り返し配列を特徴とする葉緑体包膜透過シグナルと、大きな疎水性領域の存在を特徴とするチラコイド膜通過シグナルに対応する2つのドメインで構成されている(図6参照)。この事実は、生化学的解析の結果とも一致しており、本酵素が核DNAにコードされ、細胞質で合成された後、2重膜である葉緑体包膜と1重膜であるチラコイド膜を通過してチラコイド内腔に送られることを示している。したがって、このプロテアーゼの作用は、核ゲノムによるオルガネラの機能制御の一例で、この酵素がD1蛋白質の前駆体を認識し、そのC-末端の特定の部位を選択的に切断するという、極めて高い特異性を保持している点が注目される。ところで、葉緑体の起源と考えられる原核生物のシアノバクテリア(ラン藻)は、植物と同様に水分解の機能を持つ光化学系IIを備えており、このプロセッシングプロテアーゼを持っている。実際、この酵素の遺伝子(ctpA)は、シアノバクテリアの光化学系IIの機能を欠く変異体の相補性テストで同定された(4)。興味ある最近の知見は、全ゲノム構造の解明されたシアノバクテリアの一種、*Synechocystis* sp. PCC

6803株には、このプロテアーゼの遺伝子の他に、これと相同性の高い2つの遺伝子が存在することが明らかにされたことである（現在のところ、これら2つの遺伝子にコードされる蛋白質の機能は不明である）。

D1蛋白質前駆体C-末端プロセシングプロテアーゼの活性は、セリン型、システイン型、アスパラギン酸型、金属型等に分類される既知のプロテアーゼに対する特異的な阻害剤の影響を一切受けない。したがって、この酵素は新しい型のプロテアーゼと考えられていた。しかし、意外な展開は、このプロセシングプロテアーゼが、大腸菌において“tail-specific protease (Tsp)”と命名され、蛋白質のC-末端を認識してこれを分解する酵素として報告されているプロテアーゼ(5)と、アミノ酸配列において部分的な相同性を持つことが明らかになったことである(3, 4)。両者におけるアミノ酸の一致は決して高いものではないが、重要なことは、その相同性がTspにおいて活性中心を含むと考えられている領域で特に著しい点である(図4)。Tspは新しい型のセリン型プロテアーゼと考えられており、同じくDFPやPMSF等の典型的なセリン型プロテアーゼ阻害剤の影響を受けず、輸送シグナルの除去に関与する“leader peptidase”や、SOSレギュロンのリプレッサーとして働く“LexA”と同様に、通常のプロテアーゼにおけるHis-Serの組み合わせではなく、Lysの ϵ -アミノ基とSerのヒドロキシル基で形成される“二組触媒基 (catalytic dyads)”を活性中心として持っているものと想像されている(7)。現在、これらのプロテアーゼは、原核生物またはそれを起源とするオルガネラに特徴的な新しい型の蛋白質分解系を構成するものと考えられている(7)。本酵素においても、活性中心を担うLysとSer残基に相当すると思われるSer-314とLys-369が上述の相同性の高い領域に存在し、予備的な解析では、これらがC-末プロセシングプロテアーゼの活性発現に不可欠であることが示されている。したがって、本酵素はTspと同じグループに属する新しい型のセリン型プロテアーゼであると考えるのが妥当のようである。

<基質認識>

前項で述べたような、本酵素とTspの活性中心の予想される類似性にもかかわら

ず、両者の基質認識機構には幾分差異が認められるように思われる。すなわち、Tspの場合には、蛋白質のC-末端が認識され、翻訳段階で誤って合成された蛋白質や、機能の終了した不要な蛋白質が、そのN-側の広範囲の領域で非特異的に切断されるように見える(5, 6)のに対し、ここで述べるD1蛋白質前駆体C-末端プロセシングプロテアーゼの場合には、図5Aに示されるように、切断を受けない前駆体蛋白質のC-末端近傍が認識に重要であることは事実であるが、認識上特に重要なアミノ酸残基は、切除されるC-末端側よりはむしろ成熟体蛋白質に残る部分にあり、また一方で、切断される部位は非常に厳密にAla-344のカルボキシル側に限られている(8)。D1蛋白質前駆体のC-末端に相当するオリゴペプチド（およびその置換体）の、基質としての有効性ならびにin vitroで転写・翻訳された全長のD1蛋白質前駆体を基質として用いるプロセシング反応へのこれら合成オリゴペプチドの拮抗阻害（拮抗基質）の実験によると、例えば、-2の位置のLeu-343をAlaに置換した置換体では、酵素への親和性が著しく低下していることが示される（図5B）。しかし、一方、切断除去される+1の位置のアミノ酸置換も反応速度に大きな影響を与え、切断の速度は、Ala, Ser, Phe, Cys > Gly > Val >> Proの順で、Proでは切断は行われぬ。このことに一致して、拮抗阻害実験の結果は、Proへの置換体では酵素への親和性がほとんど失われていることを示している。反応速度へのこの影響の機構は、in vivoでも保持されているものと考えられ、緑藻Chlamydomonasの生細胞を用いた解析では、D1蛋白質前駆体のこの部位（+1）でのアミノ酸置換が上述の順で藻体の生存能力に影響を与えることが明らかにされている。

<まとめ>

D1蛋白質前駆体C-末端プロセシングプロテアーゼの活性発現に関連して興味ある事実は、合成オリゴペプチドおよびin vitroで転写・翻訳した全長のD1蛋白質前駆体を基質とした場合の酵素活性の至適pHが7.7と高く、一方、この酵素の反応の場であるチラコイド内腔のpH 5.5ではほとんどその活性を示さないことである。この点は、反応の場の微環境を反映しているか、あるいは、何らかの活性制御機構の存

在を示唆しており、大変興味深い。In vitroでの解析における比較的高いKm値や、低い回転数 (TN) 等にも関連して、今後この原因の解明が待たれる。

大腸菌には本酵素と相同なTspが存在するにもかかわらず、本酵素を大腸菌中で活性を持った状態で大量に発現させることが現在可能である。この系を利用して大量に純化した標品を用いた結晶構造の解明や、シアノバクテリアの部位特異的突然変異体を利用する酵素の活性中心の同定も、すでに可能な段階に達している。この型のプロテアーゼについての特異的な阻害剤の探索も重要な仕事である。これらの研究を通して、原核生物系にユニークなこの新しい型のセリン型プロテアーゼの構造と機能ならびにその起源が解明されることを期待したい。

文献

1. Nanba, O. and Satoh, K.: Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 109-112, 1987
2. Fujita, S., Inagaki, N., Yamamoto, Y., Taguchi, F., Matsumoto, A. and Satoh, K.: Identification of the carboxyl-terminal processing protease for the D1 precursor protein of photosystem II reaction center of spinach. *Plant Cell Physiol.*, 36, 1169-1177, 1995
3. Inagaki, N., Yamamoto, Y., Mori, H. and Satoh, K.: Carboxyl-terminal processing protease for the D1 precursor protein: cloning and sequencing of the spinach cDNA. *Plant Mol. Biol.*, 30, 39-50, 1996
4. Anbudurai, P.R., Mor, T.S., Ohad, I., Shestakov, S.V. and Pakrasi, H.B.: The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8082-8086, 1994
5. Silber, K.R., Keiler, K.C. and Sauer, R.T.: Tsp: a tail-specific protease that selectively degrades proteins with nonpolar C termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 295-299, 1992
6. Keiler, K.C. Waller, P.R.H. and Sauer, R.T.: Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*, 271, 990-993, 1996
7. Paetzel, M. and Dalbey, R.E.: Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases. *TIBS*, 22, 28-31, 1997
8. Taguchi, F., Yamamoto, Y. and Satoh, K.: Recognition of the structure around cleavage site by the carboxyl-terminal processing protease for D1 precursor protein of photosystem II reaction center. *J. Biol. Chem.*, 270, 10711-10716, 1995

(山本由弥子・佐藤公行：岡山大学 理学部 生物学教室)

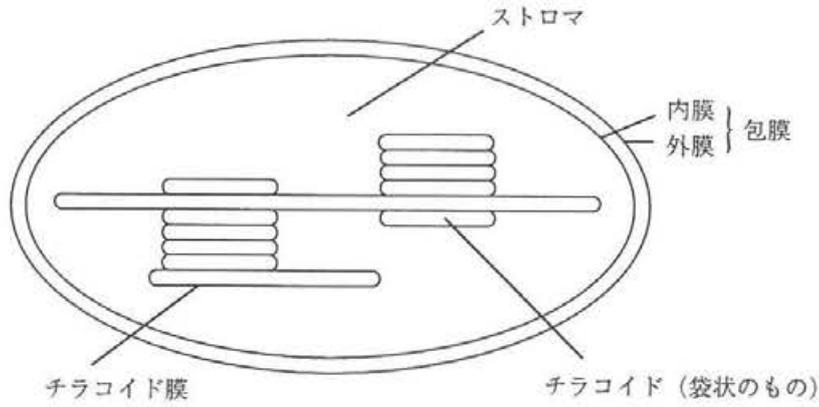


図1 高等植物の葉緑体の概念図

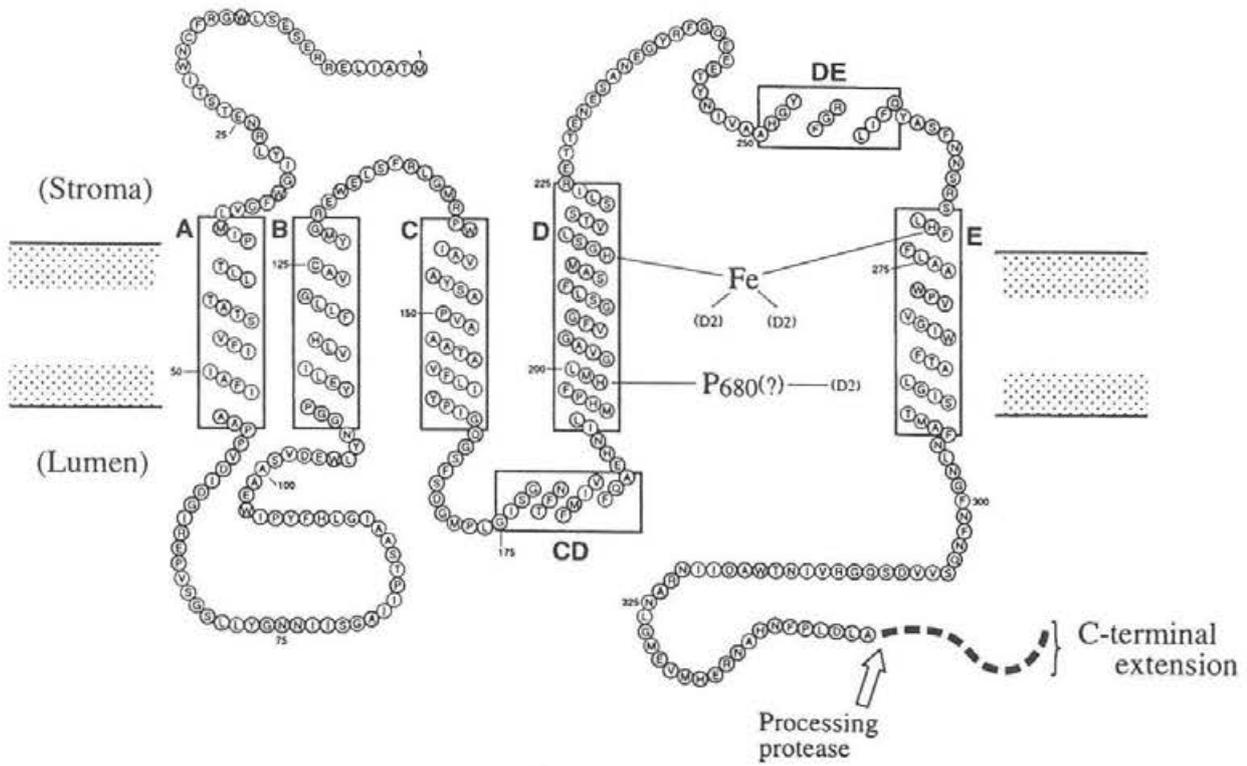


図2 D1蛋白質前駆体のチラコイド膜上における配置モデル

	350	360
	AIEAPSTNG AGDVAPVALTAPPING AGEVAPVAISAPAING AGEATPVALTAPSIHG AGEATPVALTAPAING AVEAPSING AFEAPSINA STNSSNN SVEAPSIA AIEAPATNG SEVSLPVALNKVEING SGEVMPVALTAPSINA SNEILPVAISAPSVVG	
	AGEVAPVALTAPAING AIDAPSING AIEAPSTNG AVEVPAING AVEAPAVNG AVEAPSING ALEVPSLNG AVESISIGG AVESISIGG AIEAPSTNG AVESISIGG AVEAPSING AVKAPSIIG AVKAPSIIG AVEVPSING AVESPSING SGDAQMVALNAPAIEG SGEQAPVALTAPAVNG AIEAPSTNG AVEAPSTIG SAESAPVAMIAPSING SGEQAPVALTAPAING AIEAPSTNG AVDAPSIIG	
330	340	
..... EVMHERNAHNFPLDLA		

図3 D1蛋白質前駆体のC-末端アミノ酸配列の比較
(黒丸は保存されたアミノ酸)

山本直希子・佐藤

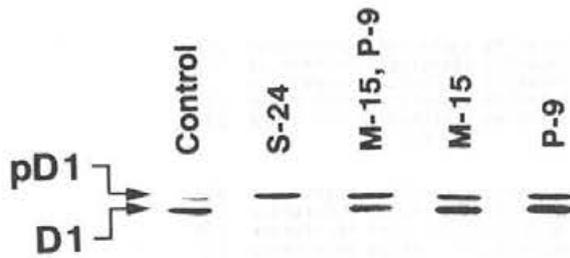
A) <i>Spinacia</i>	151	LSEENRIFLE	AWRTIDRAYV	DKTFNGQSWF	RYRENALRNE	PMNSREETYT	200
B) <i>Synechocystis</i>	32	FTEEQKLLQ	SWRLYNQSYL	DETFNHQNW	LLREK-YVXR	PLRNREETYT	80
C) <i>Synechococcus</i>	30	FTDEQDILLQ	AWRYVSYQAYV	DETFNHQNW	LIRQK-FLKR	PLKTRDEAYE	78
D) <i>Bartonella</i>	14	LSASLIYMAQ	SITTNNEQNT	YKQLARFGDI	FERYRTQYVT	IPDDQKLIEN	63
E) <i>Eschericia</i>	164	ALWDSKVKFD	ELSLKLTGXT	DKEIRETLTR	RYKPAIRRLA	QTNSEDVFSL	213
A)	201	AIRKMYATLN	DPFTRFLEPE	KLKSLRSGTQ	SSLTGVGISI	GPTAVDQSS	250
B)	81	AIEEMLATLD	EPFTRLLRPE	QYGNLQVTTT	GELSGVGLQI	---NINPETN	127
C)	79	AVGEMLALLD	DPYTRLLRPE	QYRSLKYSTS	GELSGVGLQI	---NVPPEVD	125
D)	64	AINGMLLSL-	DPHSSYMDAE	KAKDWRDSTK	GEFGGLGIEV	-----TMENN	107
E)	214	AMTAFAREI-	DPHTNYLSPR	NTEQFNTEWS	LSLEGIGAVL	-----QOMDD	257
		A	P		G	G	
A)	251	GLVVISATPG	APASRAG-IL	PGDVILAIDD	-----ASTDK	WGIYEAANIL	294
B)	128	QLEIMAPLAG	SPAEEAG-LQ	PHDQILAIDG	-----VDTQT	LSLDEAAARM	171
C)	126	YLEVILPLPG	SPAEEAG-IE	AKDQILAIDG	-----IDTRN	IGLEEAARM	169
D)	108	LKVVSPIDD	TPAAKAG-VL	AGDFISKIDG	-----KQISG	QTLNEAVDQM	151
E)	258	YTVINSMVAG	GPAAKSKAIS	YGDKIVGVGQ	TGKPMVDVIG	WRLDDVVALI	307
			PA	D	I		
A)	295	QGPDGSSVDL	TICSRDEI-K	HVYVKRERIT	LSPVKSRLCE	MPSAKDAPP	343
B)	172	RGPKNTKVSL	EILSAGTE-V	PQEFTLTRQL	LSLSPVAAQL	---DDSRPGQ	217
C)	170	RGKKGSTVSL	TVKSPKTD-T	VRYVKVTRDT	IALNPVYDKL	---DEKNGE	216
D)	152	RGPAGTPIITL	TINRFGVD-K	PLDIKIYRDI	IKYKAVKYRY	-----EG	192
E)	308	KGPKGSKYRQ	EILPAGKGTK	TRTYTLTRER	IRLEDRAVKM	--SVKTYGKE	355
		G		R			
A)	344	KYGYIKLTSF	TENASDAYKE	AIETLRS---	---NNVNAFVLD	LRDNSGGGLP	389
B)	218	SYGYIRLSQF	SANAYKEVAH	ALHQLLEE---	---QGADGVILD	LRNPPGGLLQ	263
C)	217	KYGYIRLNQF	SANAKTEIIK	SLNQLQK---	---QGADRYVLD	LRNPPGGLLQ	260
D)	193	DIGYLRILQF	TEKTFSDLQA	AIKDIQSKIP	TDKLGKGVLD	LRNPPGGLLQ	242
E)	356	KYVGLDIPGF	---YVGLTDD	VKVQLQKLEK	---QNVSSV[IID	LRNPPGGLLQ	401
		G	F			D	LR N GG
A)	390	EGIEIAKIWL	NKGVIVYICD	SRGVYDIYDV	EGSSAVAGSE	PLVVLVYKXG	438
B)	264	AGIDIARLWL	PESTIVYTVN	RQGTQESFTA	NG--EAATDR	PLVVLVYKXG	310
C)	261	AGIEIARLWL	DQETIVYTVN	RQGFESYSYA	VG--QPLTDA	PLVVLVYKXG	307
D)	243	QAISYIDAFI	NKGEIVSTRG	RKQNDVMRFD	AKL-GDLTDE	KPIIVLINGG	291
E)	402	EAVSLSGLFI	PAGPIYQVR-	-DNNKGVRED	SQTDGQVFFK	PLVVLVYDRF	449
			IV			P	VL
A)	439	TASASEILAG	ALXDNKRAVY	FGEPTYGKXG	IQSVFEL---	-----S	476
B)	311	TASASEILAG	ALQDNQRATL	VGEXTFGKGL	IQSLFEL---	-----S	348
C)	308	TASASEILAG	ALQDNQRAWL	VGEXTFGKGL	IQSLFEL---	-----P	345
D)	292	SASASEIYAG	ALQDHRRTAI	IGTQSFQKGS	VQTIIPL---	-----G	329
E)	450	SASASEIFA	AMQDYGRALV	YGEPTFGKCT	VQYRSLNRI	YDQMLRPEWP	499
		ASASEI	A A D RA	G GKG Q	L		
A)	477	DGSGLAIVYA	RYETPAHTDI	DKYGIKPDHP	LPA-SFPKDE	NDFCTCVQDS	526
B)	349	DGAGIAYTYA	KYETPQHDI	HXLGIMPDEV	VEQPLISFAE	ITSPADVYQY	398
C)	346	DGAGMAYTYA	KYETPLHDI	NXLGIMPDEV	VPQEPICYAM	MGSETDLQYQ	395
D)	330	ENGALRLTTA	LYYTPSGTSI	QGIGITPDIV	VEQPLPEYKX	GYDVTLGESE	379
E)	500	ALGSVQYTIQ	KFYRYNGGST	QRKGYTPDII	MPTGNEETET	GKGFEDNALP	549
		T		G	PD		
A)	527	SSTCYLNGVQ	LFSSR* 539				
B)	399	AALDLLTGGV	AIAAHKSSSI	PAMATAHKPN	* 427		
C)	396	AALDLLTQDQ	RSPPKFPKLP	XPLNRPKLC	HLLW * 428		
D)	380	LRGHIXGQE	SDKXGSGSAA	FVPRDPKDDV	QLNEAYKLLR	GEITHAAPP	429
E)	550	WWDSDAATY	VKSGDLTAFE	PELLKHNAR	IAKDPFQNI	MKDIARFNAW	599

図4 CtpA と Tsp のアミノ酸配列の比較

AとBで示す領域は、特に相同性が高い。すべての生物で完全に保存されているアミノ酸は、最下段に一文字表記で示されている。

(A), CtpA (ホウレンソウ) ; (B), CtpA (*Synechocystis* sp. PCC 6803) ; (C), CtpA に相当すると思われる ORF (*Synechococcus* sp. PCC 7002) ; (D), CtpA に相当すると思われる ORF (*Bartonella bacilliformis*) ; (E), Tsp (*E. coli*)

A



B (1)



B (2)

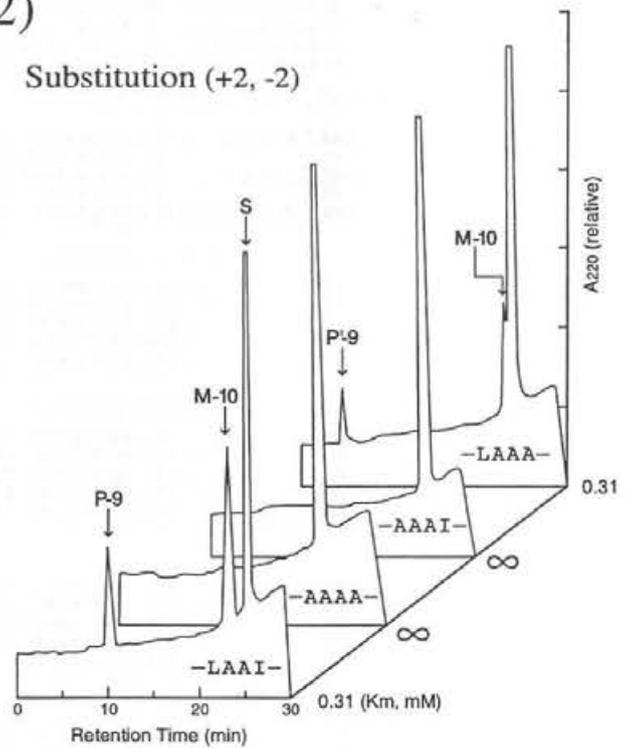


図5 合成ペプチドを用いる解析

A D1蛋白質前駆体のC-末端部分に対応する合成オリゴペプチド添加によるプロセシング反応の阻害 (基質は, *in vitro*で合成した全長のD1蛋白質前駆体)

pD1はD1蛋白質前駆体を, D1はD1蛋白質成熟体を示す。

Control, 無添加; S-24, D1蛋白質前駆体のC-末24残基のペプチド; M-15, D1蛋白質成熟体のC-末15残基のペプチド; P-9, C-末延長部分に相当する9残基のペプチド; M-15, P-9, M-15とP-9の同時添加

B(1), 合成ペプチドの置換体

(2), (1)に述べた合成ペプチド置換体の部分純化したプロテアーゼによる切断 (HPLCによる分析)

S, 基質; M-10, D1蛋白質成熟体のC-末に相当する反応産物; P-9(P-9), C-末延長部分に相当する反応産物

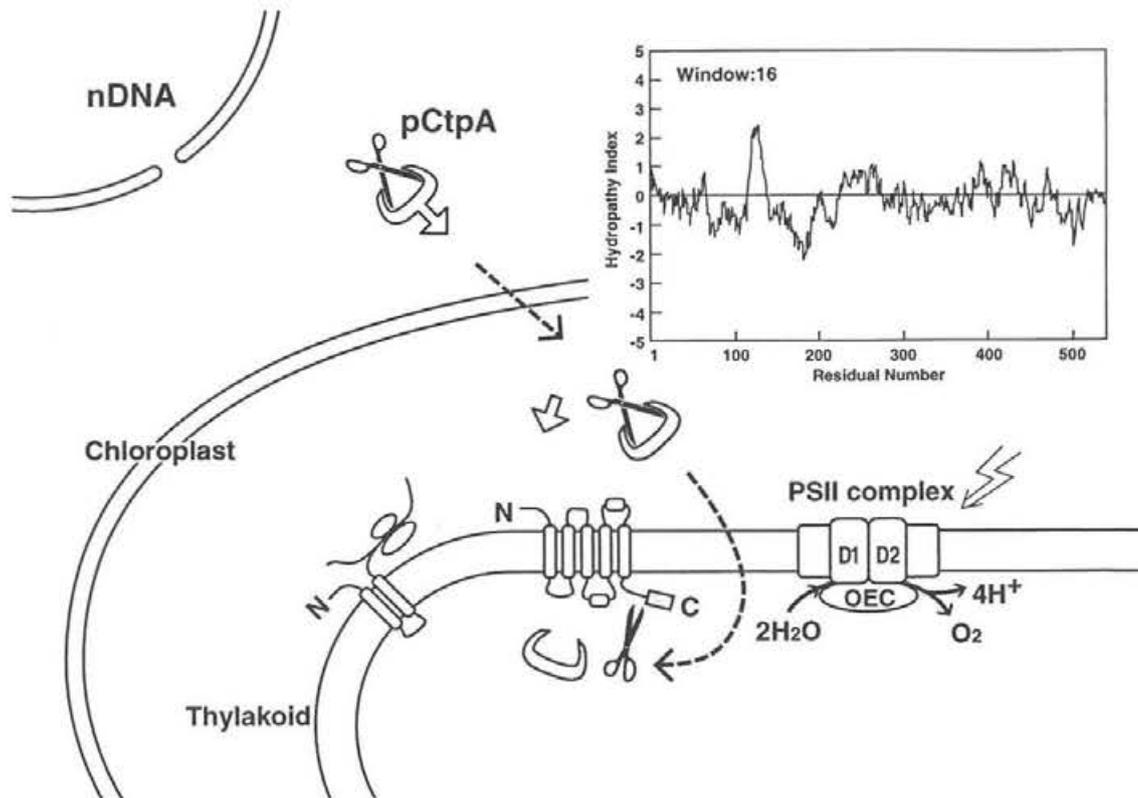


図6 D1蛋白質前駆体C-末端プロセシングプロテアーゼの輸送とその作用による光合成機能の発現を示す模式図

6 サイクリン分解の最新状況：サイクリンのリン酸化は、 サイクリン分解のシグナルである

サイクリンがCdc2キナーゼによりリン酸化を受けることは、MPFがサイクリンB-cdc2複合体であることが証明された10年前当時からわかっていた実験事実である。しかし、サイクリンのリン酸化の役割については明確な答えがなく、ミーティングやジャーナルでも話題性は乏しかった。

サイクリンはユビキチン-プロテアソーム系により分解される。サイクリンのリジン残基にユビキチンが結合すると、プロテアソームがユビキチン化されたサイクリンを認識して、細胞周期に依存したサイクリンの選択的分解がおこる。M期サイクリンにはプロテアソームの認識に必要なアミノ酸配列（destruction box）があって、このdestruction boxに変異がはいると分解はおこらないし、逆に、destruction box

を含むサイクリン断片を過剰に存在させてもプロテアソームの活性が抑えられてサイクリンは分解されない。destruction box—ユビキチン—プロテアソーム系は、言うならばサイクリン分解の最終段階を担う蛋白質分解システムである。しかしながら、卵抽出液でサイクリン分解（特にM期サイクリンA, B）のキネティクスを調べると、分解活性があってもサイクリンはしばらくは分解されずに安定で（たとえばカエル卵抽出液で20—30分）、その後急激に分解される。この分解カーブは、サイクリンを分解経路に向かわせる何らかのシグナルがサイクリン分子にあることを示唆している。そして、サイクリン分解は細胞周期の特定の時期（cdc2キナーゼ活性化後）におこることから、「さあ、サイクリンを分解してよいぞ」という分解のトリIGGERとなる情報が、cdc2キナーゼ活性化とリンクしてサイクリン分子に存在していなくてはならない。さて、サイクリン分解の引き金となる分子シグナルは何か？

このミニレビューではかなりの自由度を認めるとの編集部からのお許しも得ているので、我々のネガティブデータの紹介から始めさせていただく。サイクリン—CDK複合体は活性化の後、複合体のサイクリンのみが分解されてキナーゼ活性を失う。サイクリンの選択的分解の引き金となるシグナルは何か？ 単純な仮説としては、活性化したCDKがサイクリン—CDK複合体のサイクリンを自己リン酸化して、このリン酸化が分解の引き金シグナルとなってサイクリンが分解される、そう考えると大変'reasonable'である。そこで我々は「サイクリンのリン酸化はサイクリン分解のシグナルである」ことを検証するため、サイクリンAの配列上から予想されるリン酸化部位にin vitroで変異を入れて、リン酸化が起こらない（あるいは、大幅にリン酸化の程度が下がる）こととcdc2と結合することを確認した後、リン酸化されない変異サイクリンの分解の有無を調べた。結果は、ある程度の分解の遅延は観察されたものの、変異サイクリンは安定化せず、明快な解答は得られなかった(1)。この仮説は、cdc2キナーゼ活性化のタイミングとサイクリン分解のトリIGGERを説明しうる”美しい”仮説であると信じていたので、ambiguousなデータに悔

しい思いをした。

しかし、分解トリガーのリン酸化説はサイクリンEでの解析により、見事に”復活”した(2)。Won and Reed は、サイクリン分解を *in vivo* で検出する方法を用いることにより、「サイクリンの自己リン酸化は、サイクリン分解のシグナルである」ことを示した。出芽酵母細胞内で野生型サイクリンEを発現させると、その程度を少し下げるとの酵母は生育してコロニーを形成する。しかし、サイクリンEが分解されないと生育阻害されてコロニーができない。そこで、サイクリンのリン酸化の役割を調べるために、サイクリンEに任意に変異を導入し、出芽酵母に対するサイクリンの生育阻害効果を利用して、サイクリンEの分解がおこらないリン酸化変異をスクリーニングした。その結果、サイクリンEのC末端領域にあるスレオニンに変異 (T380A)が入ると、サイクリンEはリン酸化されず、且つ分解されない、という結果を得た。このリン酸化部位の変異によりサイクリンEのユビキチン化が妨げられ、*in vitro*の実験系では *c d k 2* 活性を阻害するとサイクリンEが安定化することも観察された。従って、サイクリンEのC末端領域にCDKキナーゼにより自己リン酸化されるリン酸化部位があり、このリン酸化が分解シグナルとなってサイクリンEが分解されると結論づけた。サイクリンがリン酸化されると、サイクリン分子の高次構造が変化し、分解シグナルとして識別されるのであろう。

サイクリンが *c d c 2* と複合体を形成することがサイクリン分解に必要である(1)。複合体形成後、サイクリンが自己リン酸化されないと、ユビキチン化が起こらないことから考えると、サイクリンのリン酸化によりサイクリン-CDK複合体の高次構造が変化して、覆いかくされていたサイクリン分子の分解ドメインが露出し、ユビキチン修飾が起こると考えると実験事実を説明しやすい。Yaglom等によると、サイクリンのリン酸化には分子シャペロンが関与することを示すデータが、出芽酵母のG1サイクリン *C l n 3* の解析から得られている(3)。出芽酵母の *y d j 1* 変異株では *C l n 3* はリン酸化されず、また、分解されない。分子シャペロン *Y d j 1* が *C l n 3* と結合することで *C l n 3* がリン酸化され、*C l n 3* の分解が起こる。

このYdj1の機能はCln3のリン酸化に特異的で、他のG1サイクリンCln2のリン酸化には関与しない。従って、Ydj1はむしろ、普遍的なシャペロンとしてよりも、分解に必要な因子としてサイクリンに会合して働いていると考えられる。

これらG1サイクリンから得られた実験データを考慮して、サイクリンがユビキチン-プロテアソーム経路に組み込まれるに至る過程、即ち、サイクリンの分解シグナルについて、やや独断をまじえて図示すれば、以下のモデルとなる(図1)。

- (1) サイクリンとCDK複合体の形成
- (2) 分子シャペロンを介したサイクリン分子のコンフォーメーションの変化
- (3) サイクリンの自己リン酸化
- (4) ユビキチン-プロテアソーム系によるサイクリン分解

文献

- (1) Stewart, E., Kobayashi, H., Harrison, D. and Hunt, T. (1994). Destruction of Xenopus cyclin A and B2, but not B1, requires binding to p34 *cdc2*. EMBO J., 13: 584-594.
- (2) Won, K-I. and Reed, S.I. (1996). Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. EMBO J., 15: 4182-4193.
- (3) Yaglom, J.A., Goldberg, A.L., Finley, D. and Sherman, M.Y. (1996). The molecular shaperone Ydj1 is required for the p34 *CDC28*-dependnet phosphorylation of the cyclin Cln3 that signals its degradation. Mol. Cell. Biol. 16: 3679-3684.

(小林英紀：九州大学大学院医学系研究科)

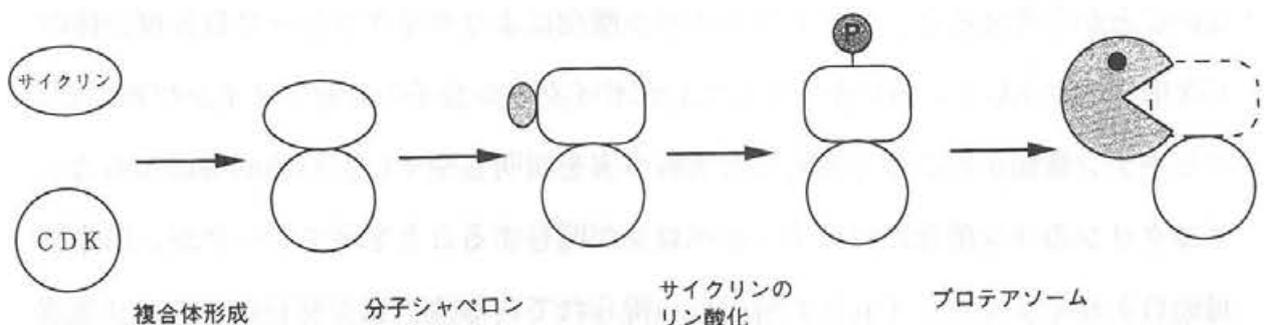


図1 サイクリンの分解シグナル

7 ER分解の新しい仕組み：細胞質への放出？

(A) はじめに

細胞内の蛋白分解部位としては、従来から、リソソームと細胞質が知られており、細胞内のプロテアーゼとしては、リソソームプロテアーゼ (cathepsin類) と細胞質に存在する巨大分子proteasomeとカルシウム依存性の中性プロテアーゼcalpainがよく知られているが、分泌タンパク質の分泌経路の最初であり、種々の翻訳後修飾が行われる場として理解されてきた小胞体(ER)において、新生蛋白質が分解されるという新たな機能が見つかり、ERにおける新生蛋白質の「品質管理(Quality Control)」と呼ばれるようになったのは、1990年頃のことである(1)。ERの品質管理とは、新規に合成された蛋白質が、①異常分子のため本来の高次構造が形成されなかったり、②サブユニットの会合がうまく行かずに、余剰のサブユニットが蓄積された場合などに、分泌されずにER内で選択的に分解されるというものである。ER分解としては、これ以外にも、③発生、病態など特定の条件下においては、正常な蛋白質であっても同様に分解される例も幾つかの蛋白質について知られている。

(B) ER分解とERプロテアーゼ

細胞内でのタンパク質分解に関与するプロテアーゼに関する研究は、通常各種のインヒビターによる分解阻止効果によって行われている。また、プロテアーゼの種類に関係なく、小胞体での分解であることを特定するためには、分泌タンパク質のゴルジ体への移行を阻止するbrefeldin A (BFA) がもっぱら用いられている。brefeldin Aは0.05mg/ml～1mg/ml濃度でゴルジ体を消失させ、小胞体に吸収させてしまうことにより、プレゴルジ以降のタンパク質移行を阻止する作用を示す(2)。したがって、brefeldin A存在下で分解が影響を受けず、細胞内蓄積が無ければ、分解はプレゴルジ以前で起こっていると考えられる。

ER分解は、先ずT-cell antigen receptor (3) や α 1-proteinase inhibitor (α 1-PI、 α 1-antitrypsinとも呼ばれる) 欠乏症の典型的な表現型であるZ-mutant (α 1-PIZ) (4), およ

び asialoglycoprotein receptor (5) などで報告された。さらに、HMG-CoA reductase (6) では、LLM (Ac-leucyl-leucyl-methioninal, ALLMとも記す)や LLnL (Ac-leucyl-leucyl-norleucinal, ALLNとも記す)で分解が阻止されることから、cysteine proteaseによって分解されることが示唆された。その後、apolipoprotein B (7) やIgM (8) においても、ER分解はLLMやLLnLで抑制されることから、cysteine proteaseの関与が示唆され、筆者らも薬物 (Warfarin) 投与下に合成されたPIVKA-protein C (Gla形成が阻止されたprotein C) のER分解が同様の根拠からcysteine proteaseによるものであることを報告した(9)。このように1995年までのER分解に関与するプロテアーゼは、IgM-L鎖の分解にserine proteaseの関与を示唆する例(10)などがわずかにあるだけで、ほとんどはLLnLおよびLLMによって阻害されるcysteine proteaseによるものであったことから「ER分解はcysteine proteaseによるもの」で決着との感があった。

ここで問題となるのは、このようなER分解に関与するERプロテアーゼが何であるかということである。ERプロテアーゼとしてはシグナルペプチダーゼがよく知られているが、それ以外にも、ER-60 protease (またはER60)とER-72 protease (またはER72)が本重点領域研究班員の鬼頭先生らによって単離されている(11,12)。これらのプロテアーゼはいずれも、ウシ血清albumin、PDI、calreticulinなどを分解するが、casein分解活性がない。また、一般的なシステインプロテアーゼ阻害剤であるLLnL, LLM, E-64, ロイペプシンなどによって阻害されることからシステインプロテアーゼに属すると考えられているが、構造的にはPDIファミリーに属する。マウスL細胞を用いた実験で、このER-60 proteaseがヒトlysozyme mutantに特異的に結合すること、さらに、in vitro で、変性lysozyme mutantがER-60 proteaseによって特異的に分解されることなどが示された(13)。しかし、上述のcysteine proteaseが、はたしてこのER-60 proteaseとER-72 proteaseであるかどうかは不明であるし、少なくとも、筆者らが検討したPIVKA-protein Cの分解には関与していないようである(9)。また、筆者らは、現在ERプロテアーゼの精製を進めているが、色々のペプチド基質に対する色々の活性ピークが得られており、ER内にはかなりの種類のプロテアーゼが存在するものと考え

えている。

(C) 事態は急転して.....

ところが、1995年の暮れ頃(実際に論文を読んだのは1996年に入って)から事態は異なる方向へと急展開し出した。まず、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) およびその DF508 mutantのER分解が、LLnLだけでなく、proteasomeに特異的な阻害剤とされているラクタシスチンによっても抑制されることから、ubiquitin-proteasome系によるものであることが示された(14,15)。MHCクラスIの misfolded H鎖の分解もLLnLやラクタシスチンで阻止されることから、ubiquitin-proteasomeによる新たな分解経路が提唱された(16)。また、 α 1-PIZでも同じくラクタシスチンで分解が阻止されることから、proteasomeによる分解であることが示唆され、さらに、ERのlumenに存在する α 1-PIZがproteasomeによって分解されることについては、 α 1-PIZが分子シャペロンであるcalnexinと相互作用することによって、膜貫通蛋白質であるcalnexinのcytosol領域が特異的にubiquitin化され、cytosolに存在するproteasomeはまずcalnexinを攻撃するという説明がなされた(17)。このように1995年以降、堰を切ったように、どれもこれもがラクタシスチンによる分解の抑制を根拠に一斉にproteasomeがER分解に関与するプロテアーゼであるという報告に変わり、proteasomeはER分解においても立役者の座を得た感がある。我々のところでも、先に「システインプロテアーゼによる分解」(9)と報告したPIVKA-protein C (投稿準備中)やantithrombin Utahmutant (投稿中)などの分解がいずれもLLL (Cbz-leucyl-leucyl-leucinal)やラクタシスチンによつて強く阻止され、proteasomeによる分解を示唆する結果が得られているのをはじめ、分泌異常型のantithrombin mutantであるDGlu (Glu313欠失体)やP→Stop (Pro429のStop codonへの変異でC末4残基が欠失)などでもproteasomeによる分解を示唆する結果が得られている(FEBS LETT., 印刷中)。

(D) 何故ER分解に細胞質のproteasomeが関与できるのか？

ところで、細胞質や核にしか存在しないとされるproteasomeが、ERに局在する基質蛋白質をはたしてどのようにして分解するのかという事になる。この疑問に対

して出された答えは、「基質蛋白質がERからcytosolに逆移行される」ということである。酵母のcarboxypeptidase yscY mutantでは、新生蛋白質が一旦ERに入り、糖付加されたのち、cytosol側に逆移行され、ここでubiquitin結合酵素Ubc7pによってubiquitin化されたのちにproteasomeによって分解されるという(18)。さらに、ERの膜蛋白質でtransloconの構成成分であるSec61p subunitのmutantもUbc7pによってubiquitin化されたのちにproteasomeによって分解されると報告されている(19)。

HCMV(ヒトcytomegalovirus)感染細胞では、MHCクラスIのH鎖が細胞表面に移行されることなく、ER内において極めて速やかに分解されることが知られているが(20)、この分解がLLnL, LLLおよびラクタシスチンによって阻止されることから、proteasomeによるものであり、その分解機構について、HCMVのUS11遺伝子をtransfectした細胞では、その遺伝子産物であるUS11(ER内に局在する膜貫通糖蛋白質)がMHCクラスIのH鎖をERからcytosolへ転移(dislocate)させる役割を果たすことが示された(21)。さらに、その転移は、本来新生蛋白質がER膜を通過してそのlumenに達する際に通過するtransloconを逆行して行われるという説が出された(22)。これによると、新生MHCクラスIのnascent H鎖がSec61 complexに結合し、ER膜を通過して、lumen側に移行するとHCMVのもう1つの遺伝子産物US2(ER内に局在する膜貫通糖蛋白質)がそれに結合し、両蛋白質がcomplexの状態、cytosol側に転移すると、直ちにN-glycanaseによって両蛋白質の糖鎖が除かれたのち、Sec61 complexから離れて、cytosolに遊離されてproteasomeの攻撃を受けるというのである。この論文では、一般のmisfolded異常蛋白質や非会合サブユニットの場合には、ERの分子シャペロンがUS2の役割を担うのであろうと述べている。この説は、ERに存在する蛋白質基質が何故proteasomeによって分解を受けられるかを見事に説明しているように思える。しかし、この分解機構は、宿主細胞に感染した各種のウイルスが、その宿主細胞の免疫機構から逃れるための、ウイルス側からの抗原提示阻止機構であり、果たして細胞自身によるいわゆる「品質管理機構」としての異常蛋白質や非会合サブユニットの分解にまで普遍化出来るかどうかはまだ分からない。

(E) 果たしてproteasomeはER分解を一手に引き受けているのか？

腫瘍抑制蛋白質p53では、ubiquitin-proteasome系による分解と同時にcalpainによっても分解されること、さらに、この両方の系によって分解される蛋白質としては、他にもN-myc, C-Fos, C-Junなどの転写調節因子が含まれるという報告がある(23)。MHCクラスIの分解でも、proteasomeが作用した後に第2のメタロプロテアーゼが仕上げをするという説も出されている(Fred Goldberg、今年3月のKeystone meeting)。また、apolipoprotein Bでも、主要な分解部位はpost-ERであり、cysteine proteaseの関与が示唆されている(24)。

筆者らも、分泌異常を示す血液凝固XII因子mutant(Factor XII Tenri)の細胞内分解がproteasomeよりもむしろcalpainによって行われていると解釈されるような結果を得ている(投稿準備中)。このようなことから、現状では「ER分解」酵素=proteasome説が有利ではあるが、ただ、それだけではなく、最終的な結論が出るまでには、まだまだ紆余曲折が有りそうである。

文献

- 1) Klausner, R.D. & Sitia, R. Cell 62, 611-614 (1990).
- 2) Klausner, R.D., Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J. J Cell Biol 116, 1071-1080 (1992).
- 3) Lippincott-Schwartz, J., Bonifacino, J.S., Yuan, L.C., & Klausner, R.D. Cell 54, 209-220 (1988).
- 4) McCracken, A.A., Kruse, K.B., & Brown, J.L. Mol. Cell. Biol. 9, 1406-1414 (1989).
- 5) Amara, J.F., Lederkremer, G., & Lodish, H.F. J. Cell Biol. 109, 3315-3324 (1989).
- 6) Inoue, S., Bar-Nun, S., Roitelman, J. & Simoni, R.D. J. Biol. Chem. 266, 13311-13317 (1991).
- 7) Sakata, N., Wu, X., Dixon, J.L. & Ginsberg, H.N. J. Biol. Chem. 268, 22967-22970 (1993).
- 8) Amitay, R., Shachar, I., Rabinovich, E., Haimovich, J. & Bar-Nun, S. J. Biol. Chem. 267, 20694-20700 (1992).
- 9) Tokunaga, F., Wakabayashi, S. & Koide, T. Biochemistry 34, 1163-1170 (1995).
- 10) Gardner, A.M., Aviel, S. & Argon, Y. J Biol Chem 268, 25940-25947 (1993).
- 11) Urade, R., Nasu, M., Moriyama, T., Wada, K. & Kito, M. J Biol Chem 267, 15152-15159 (1992).
- 12) Urade, R., Takenaka, Y. & Kito, M. J Biol Chem 268, 22004-22009 (1993).

- 13) Otsu, M., Urade, R. Kito, M., Omura, F. & Kikuchi, M. J Biol Chem 270, 14958-14961 (1995)
- 14) Ward, C.L., Omura, S. & Kopito, R.R. Cell 83, 121-127 (1995).
- 15) Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams D.B., Goldberg, A.L. & Riordan, J.R. Cell 83, 129-135 (1995).
- 16) Hughes, E.A., Hammond, C. & Cresswell, P. Proc Natl Acad Sci USA 94, 1896-1901 (1997).
- 17) Qu, D., Teckman, J.H., Omura, S. & Perlmutter, D.H. J. Biol. Chem. 271, 22791-22795 (1996).
- 18) Hiller, M.M., Finger, A., Schweigher, M. & Wolf, D.H. Science 273, 1725-1728 (1996).
- 19) Biederer, T., Volkwein, C. & Sommer, T. EMBO J 15, 2069-2076 (1996).
- 20) Yamashita, Y., Shimokata, K., Saga, S., Mizuno, S., Tsurumi, T. & Nishiyama, Y. J. Virol. 68, 7933-7943 (1994).
- 21) Wiertz, E.J.H.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J. & Ploegh, H.L. Cell 84, 769-779 (1996).
- 22) Wiertz, E.J.H.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. & Ploegh, H.L. Nature 384, 432-438 (1996).
- 23) Gonen, H., Shkedy, D., Barnoy, S., Kosower, N.S. & Ciechanover, A. FEBS LETT. 406, 17-22 (1997).
- 24) Wang, C.-N., Hobman, T.C. & Brindley, D.N. J Biol Chem 270, 24924-24931 (1995).

(小出武比古：姫路工業大学・理学部)

(6) トピックス

1: トリプレットリピート伸長とプロテオリシス

皆さんは、最近の脳科学の話題の1つ、トリプレットリピート病についてはご存知のことだろう(1,2)。この病気は、遺伝病であるにも関わらず親子で症状が違っており、一般的に親よりも子供、子供より孫の方が症状がひどくなるのが特徴である。この現象を、表現促進現象と呼び、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、筋緊張性ジストロフィー、脆弱X症候群などの病気が有名である。

これらの原因は、遺伝子中に存在する(CAG) n 、(CGG) n 、(CTG) n などのトリプレットリピートが発生初期に伸長するためであることが明らかになっている。ここで問題は、CAGリピートが翻訳領域に入った場合には、翻訳されたポリグルタミン鎖が伸びていき、結果的にタンパク質が変性して寿命が短くなると考えられるが、CGGやCTGリピートのように非翻訳領域に挿入されそれが伸長した場合には、翻訳産物は同じなのになぜ病気になるか、という点である(3)。後者については、まだ解答が得られていないが、前者で面白い現象が見つかった。話は新しくないのだが、興味あることなので紹介することにしよう(4)。

問題の病気の名前は、ハンチントン病という。日本では数百人しか患者のいないこの病気は、まれにみる悲惨な症状を呈する。通常は40歳前後に発病し、不随運動は顔や手のみならず全身に及び、最後には15年くらいの経過をたどって痴呆となり死亡する。止まることなく体が動くため、米国ではシェーカーと呼ばれている。ハンチントン病の発症初期には、突然凶暴になったり、理解できない言動や行動をとるようになり、狂気の発作を伴うことがある。この原因遺伝子ハンチンチンの発見にまつわる驚異的な幸運については、皆さんも耳にしたこともあるだろう。たった3つ目のプローブと12回目のサザンブロットで金的を射止めたのである。

ハンチンチン遺伝子の(CAG) n は普通は30個以下であるが、これが37を越えて50

近くになると発病する。この病気は優性遺伝病であるから、リピートが伸びた遺伝子産物（すなわち、長いポリグルタミンの挿入があるもの）が正常の350kDa遺伝子産物の持つ機能を越えた、新しい機能を獲得して発病するらしいのである。ハンチンチンは細胞質に存在するタンパク質で、通常は神経細胞をアポトーシスから守っているらしいのだが、変異ハンチンチンはアポトーシスを誘導し線条体の棘状ニューロンの細胞死を引き起こすのである。

この過程で仮説が提唱された。1つは、アポトーシス関連酵素であるCPP32/アポパインがハンチンチンを切断し、それもポリグルタミンの長いものほど切りやすいという事実から、リピート伸長という指令がアポトーシスの引き金をひき、誘導されたプロテアーゼがハンチンチンの寿命を短くして、アポトーシス全体の流れを変化させる、というものである。しかし、この仮説では説明できない現象がいろいろある。もう1つの仮説は、プロテオリシスによって生じたポリグルタミン自身がアポトーシスを引き起こすという説で、本邦の垣塚によって提唱されているが、残念ながらプロテアーゼがポリグルタミンを切り出した証拠がない。CPP32/アポパインによるハンチンチンの限定分解でも、切断箇所はポリグルタミンとは無関係のところなのである。

一方、N末端付近に存在するポリグルタミンを伸ばした、ハンチンチン遺伝子全長のたった3%の部分をつらねても、マウスで症状が現れたことは、ポリグルタミンを含む部分が新規の機能を獲得した、という証拠になる。もちろん長く伸びた遺伝子部分が新しい機能を持ったという可能性は否定できないが、ポリグルタミンの方が面白いので以上のような仮説が提唱されたわけである。問題になっているポリグルタミンの細胞毒性については、現在のところはっきりした結果が出ていない。皆さんはプロテアーゼの専門家であるが、グルタミンのC末端を切るヒトの酵素はご存知だろうか。X-Gln-MCAなんて基質を好き好んで作るのは私くらいのものであろう。私は知っているが、ポリグルタミン依存性アポトーシスをやっている人たちには、自分でやらしてもらおうと思っている。

話が横にそれてしまった。トリプレットリピート病での問題点は、伸長したリピートがアポトーシスを誘導するのか、アポトーシスで誘導されたプロテアーゼがリピート伸長酵素をたまたま基質にするのかが、明らかではないことなのである。そもそも、30merのポリグルタミンと50merのポリグルタミンが異なる生理作用をもつと主張されていることが怪しい。トリプレットリピート病の原因は全くわからない以上、新しい説は大歓迎なのだが、理論に実験が追いつかないのが現状である。

文献

- (1) 石浦章一 (1996) 現代化学 301, 38-43
- (2) 石浦章一 (1996) 「遺伝子が病気をつくる」 (三田出版)
- (3) Sasagawa, N., et al. (1996) Biochim.Biophys.Acta 1315, 112-116
- (4) Goldberg, Y.P. et al. (1996) Nature Genetics 13, 442-449

(石浦章一、東大分生研)

2 : バキュロウイルスを使用したカルパインの大量発現

カルパインを大量発現しようとする試みは最近になってようやく報告されるようになってきた (1-3)。その中でも Sf-9 細胞などの昆虫細胞とバキュロウイルスを使用した大量発現系は、大腸菌や酵母などを使用した発現系と、哺乳類培養細胞での発現系の、それぞれの利点を合わせ持つ系として優れており、カルパインのみならず多くの高分子量蛋白質を天然に近い形で大量に発現するのに大変有用である。大腸菌における系と比較してみると、バキュロウイルスの系は、時間がかかる

(Sf-9細胞は世代時間が18-24時間)、血清培地を使用する場合その費用がかなりかかる、培養細胞としての無菌操作の手間がかかるという欠点がある反面、効率よく発現する (うまくいくと ~20mg/l カルチャー)、活性のある蛋白質が発現する可能性が高いなどの利点がある。なお、他の動物培養細胞と比べると、浮遊培養が可能である、血清を使用しないでも増殖可能である、CO₂インキュベータも必要ない、ウイルス感染を用いるので、transfectionの効率がよい等の特徴を持っている。

哺乳類の組織普遍的カルパインは、 μ -、及びm-カルパインが現在までに同定さ

れており、天然の組織からはどちらも、活性を担う大サブユニットと制御機能を持つと考えられている小サブユニットからなるヘテロダイマーとして精製されてくる。そこで、カルパインヘテロダイマーを大量発現する試みとしては、1)大サブユニットをコードするウイルスと小サブユニットをコードするウイルスを細胞に共感染させる方法、2)大小両サブユニットをタンデムにつないだウイルスを細胞に感染させる方法、の2つが考えられる。どちらの場合も活性のあるカルパインを発現したことが、既に報告されており(3)、我々も同様な結果を得ている。このバキュロウイルスによる発現系を用いると、天然のカルパインではできなかった実験がいろいろ可能となる。即ち、1)片方のサブユニットだけを発現して解析することができる、2)さまざまなカルパイン変異体を調製し、その構造と機能の相関を解析することができる。

しかし、成功した実験しか論文にならないのはこの系もしかりで、バキュロウイルスの大量発現系のうたい文句とは裏腹に、うまく行かないときが多いのも事実である。実際に我々も組織普遍的なカルパインを共感染によって発現させた場合、活性のない酵素が発現する場合も少なくない。その多くの場合は次のような特徴がある。1)大量発現するのだがそのほとんどが不溶性の画分に存在する。2)たとえわずかに上清に存在してもゲル濾過ではボイドに溶出されてしまう(即ち、激しくアグリゲーションを起こしている)。よって、これらの場合は大腸菌発現系での封入体の巻き戻しと同様に可溶化再構成の必要がある。具体的な例としては、m-calpainはうまくいっても μ -calpainはうまくいかない、ヒトではうまくいってもニワトリではだめといったケースがあり、Ca²⁺感受性and/or構造の微妙な違いがSf-9細胞内での発現の成否と関係しているようであり、残念ながら一般則として「これをこうしたらうまくいく」というようなノウハウは、少なくとも我々は未だ見つけ得ないでいる。

我々はまだ使用していないが、発現ベクターを大腸菌内でバキュロウイルスと組み換えて、組み換えウイルスを大腸菌で産生させる系が市販され、さらに使い易

い系となった。今後しばらくはSf-9/バキュロウイルス発現系がタンパク質の構造機能解析において無くてはならない手法の一つであり続けることは確かである。願わくば全てのタンパク質でうまくいくようになるとういのだが。

「実験上の細かいティップスに関しては、直接東大分生研の益本まで聞いていただければ、わかる範囲でお答えいたします」

文献

1. Elce, J. S. et al. (1995) Protein Engineering 8, 843-848.
2. Graham-Siegenthaler, K. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 30457-30460.
3. Meyer, S.L. et al. (1996) Biochem. J. 314, 511-519.

(益本創：東大分生研)

(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。

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。

Proteolysisの訳語として、すでにどなたかの案にあったかも知れませんが、「タンパク質切新」を提案します。「分解」というバラバラにして使いものにならなくするというマイナスイメージをなくして、新しい機能を生み出すという意味を含めるというのが、大方の一致した意見だと思います。「新」をつけるのはありふれ過ぎるのかも知れませんが、「新」幹線も30数年も経ってみると、「新」の字は全く気にならなく、shinkansenとして世界に通用する言葉になっていると言えましょう。

「切新」という漢字を分解してみると、「切」は八より一つ少ない七でバラバライメージが低く、「新」は木を斧で切るという意味があるようで、切ったあとに新し

い芽生えがあるのは、まさにproteolysisの意識にかなうのではないかと考えた次第です。
(名古屋大学農学部 牧正敏)

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(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)

“叙勲”

本重点班の班員・総括班メンバーである勝沼信彦教授（徳島文理大学）が勲二等端宝賞を授与されました（平成9年4月29日発表）。

“学士院賞”

総括班メンバーである下記の先生が学士院賞を授与されました。

村上和男教授（筑波大学応用生化学系・先端学際領域研究センター長）が稲上正教授（バンダービルト大学医学部）との共同研究として「レニン・アンジオテンシン系に関する生化学ならびに分子生物学的研究」で96年度学士院賞を授与されました（平成8年4月13日発表）。

中西重忠（京都大学医学部教授）が「神経伝達の分子メカニズムに関する研究」で97年度の恩賜賞・学士院賞を授与されました（平成9年3月13日発表）。

(8) 編集後記

“ぶろておりしす”は重点領域研究「細胞内蛋白分解」ニュース誌です。本重点領域研究班・初年度には“ぶろておりしす”誌を第1号～第3号まで出しました（新班員で入手ご希望の方は申し出て下さい：増刷しましたので、在庫があります：私の部屋を占拠して邪魔になるので積極的に申し出て下されば幸いです：前号で品切れと宣伝していた割には情けない話で、どうも原稿の種切れが間近いのかも知れないと危惧しています）。さて、研究班・二年度を迎え、装いも新たに（文字通り雑誌の色を換えました）第4号をお届けします。新班員の方々には、今後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（すでに数名にはこれまでに、あるいは本号に登場してもらっていますが）。再度のお願いですが、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。第3号の編集後記において第4号からの新しい企画として、“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”と宣伝しましたが、企画倒れに終わってしまいました。これは単に編集部が無責任に帰すべき問題であると承知していますが、「申し出」の原稿がなかったことも一因と責任逃れを策謀しています。次号には是非とも汚名返上とゆきたいので、有望な方をご存じの方はお知らせ下さい。前号でも書きましたが、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。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。

Deletion of an Endosomal/Lysosomal Targeting Signal Promotes the Secretion of Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein (APP)¹

Yasuko Ono, Tadatoshi Kinouchi, Hiroyuki Sorimachi, Shoichi Ishiura,² and Koichi Suzuki

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113

Received for publication, October 31, 1996

Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP) generates a β -amyloid protein ($A\beta$) that is a main component of the senile plaques found in the brains of Alzheimer's disease patients. APP is thought to undergo proteolysis *via* two different pathways, the amyloidogenic pathway which produces $A\beta$, and the non-amyloidogenic pathway which releases a large N-terminal fragment into the medium. The proteases that mediate these processes remain unidentified. The physiological function of APP is not clear yet. Therefore, the cytoplasmic region of APP has attracted much interest, because this region is highly conserved among species, and members of the amyloid precursor-like protein (APLP) family. Several potentially functional sequences exist in the region, including signal sequences for protein sorting and a G_o-protein binding sequence. We constructed two mutants, 695 Δ NPTY and 695 Δ GYEN. They lack potential endosome/lysosome targeting signals, NPTY and GY, in the cytoplasmic domain of APP695, respectively. The mutant APPs had longer half-lives and were secreted more easily into the medium than the wild type, suggesting that these sequences are important for the secretion and metabolism of APP.

Key words: Alzheimer's disease, amyloid precursor protein, endosomal/lysosomal pathway, targeting sequence.

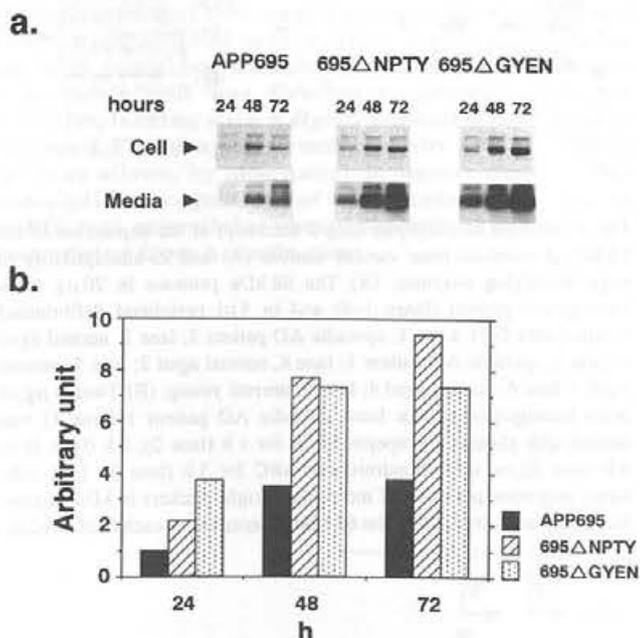


Fig. 2. APP mutants expressed in COS7-cells. (a) COS7-cells were transfected with wild-type and mutant APP695 cDNAs. At the indicated times after transfection, cells and media were collected, and the cells were solubilized in RIPA buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis (a). The upper bands represent the endogenous APP770 expressed in COS7-cells. APPs in cell lysates and media were detected with anti-AC and anti-22C11, respectively, and quantified (b). The ratios of sAPP to intracellular full-length APP were calculated. Data were normalized as to the value of wild-type APP695 after 24 h.

要約

アミロイド前駆体のプロセッシング異常がアルツハイマー病発病の鍵を握ることが分かってきたが、プロセッシング酵素並びにプロセッシング部位については種々の問題が指摘されている。私たちは、アミロイド前駆体分子中に存在するソーティングシグナル NPTY と GYEN を欠いたコンストラクトを COS 細胞に発現させ、プロセッシング速度の変化を検討した。その結果、エンドソーム・リソソーム移行シグナルを欠く変異体は、対照よりもプロセスされる速度が大きくなり、細胞内の半減期も延長した。

この結果により、アミロイド前駆体中に存在するシグナルが細胞内移行とプロセッシングに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

Human brain β -secretase contains heparan sulfate glycoconjugates

Akira Matsumoto^{a,*}, Reiko Matsumoto^b, Taira Enomoto^a, Hisamitsu Baba^c

^aDepartment of Radiation Biophysics and Genetics, Kobe University School of Medicine, Kusunoki-cho 7-5-1, Chuo-ku, Kobe 650, Japan

^bFirst Department of Internal Medicine, Osaka Teishin Hospital, Osaka 543, Japan

^cThird Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine, Kobe 650, Japan

Received 30 April 1996; revised version received 15 May 1996; accepted 16 May 1996

Abstract

A polyclonal antibody against the 68 kDa β -secretase was established, which recognizes a single 68 kDa band in brain homogenate of Alzheimer's disease patients and normal aged. Western analysis revealed that the protease is an acidic glycoprotein with negative charge on its glycoconjugate(s). Sensitiveness to heparitinase and glycopeptidase A indicates that the protease contains asparagine-linked oligosaccharide with heparan sulfate moieties. Specific detection of the 68 kDa band in the analysis using anti-heparan sulfate antibody, and its time-course-dependent degradation, also confirm the above results. It seems that, like human blood coagulation factors IXa and XIa, the glycoconjugate(s) attached to the protease interfere with substrate specificity, stability and topological restriction of proteolysis in brain extracellular matrix, where diffuse plaque formation is taking place.

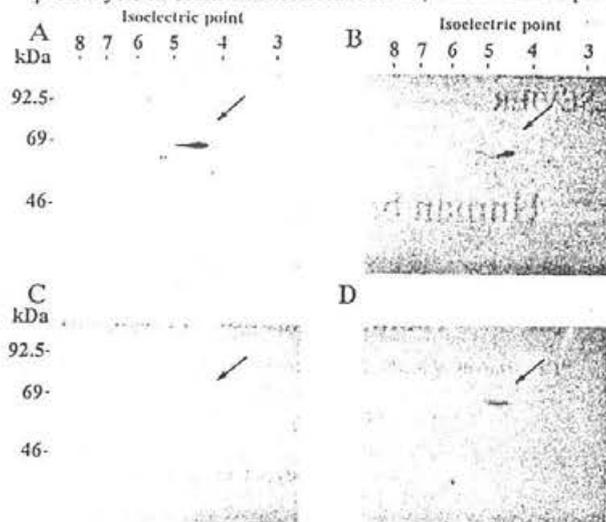


Fig. 1. Western blot analysis of two-dimensional gel electrophoresis of human brain homogenate by using anti-68 kDa protease antibody (adp-2) (A-C), or NaIO_4 -assisted staining of glycoconjugates (D). (A) Twenty μg protein from sporadic AD patient 1; (B) 20 μg of protein from sporadic AD patient 2; (C) 20 μg protein from normal aged 1; (D) same as (A) except that the blot filter was treated with NaIO_4 reaction. Left ordinates, migration positions of molecular weight markers in kDa; abscissa, approximate isoelectric points of the first dimension gel. Arrow indicates the protein spot of the 68 kDa protease.

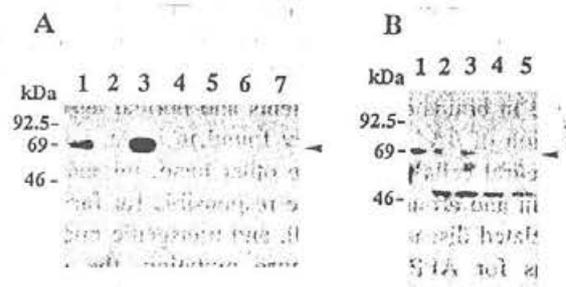


Fig. 2. Western blot analysis (adp-2 antibody) of the expression of the 68 kDa β -secretase from various sources (A) and its susceptibility to sugar-modifying enzymes. (A) The 68 kDa protease in 20 μg brain homogenate protein (lanes 1-4) and in 5 μl peripheral defibrinated serum (lanes 5-7). Lane 1, sporadic AD patient 2; lane 2, normal aged 1; lane 3, sporadic AD patient 1; lane 4, normal aged 2; lane 5, normal aged 3; lane 6, normal aged 4; lane 7, normal young. (B) Twenty μg of brain homogenate protein from sporadic AD patient 1 (lane 1) was treated with almond glycopeptidase A for 1 h (lane 2), 2 h (lane 4) or 3 h (lane 5), or with chondroitinase ABC for 3 h (lane 3). Left ordinates, migration positions of molecular weight markers in kDa. Arrowhead, migration position of the 68 kDa β -secretase in each SDS-PAGE.

ヒト脳における68kDaプロテアーゼを生化学的に解析した。本酵素は家族性アルツハイマー病由来リンパ球系細胞から筆者らにより精製されたセリンプロテアーゼでAPPと結合し、APP合成基質をその β アミロイドN端において切断することから β -secretase様活性をもつ。本酵素に対するポリクロナル抗体を用いた2次元Western解析からアルツハイマー病患者および正常老人脳において単一スポット(68kDa、pI 4.7)を検出した。さらに本蛋白は糖染色に濃染すること、heparitinase, glycopeptidaseに対する感受性解析から、ヘパラン硫酸糖質を含むN型糖鎖をその分子内にもつものと思われる。血液凝固系プロテアーゼからの類推からこの特殊な糖質をもつプロテアーゼの細胞外間質やprotease inhibitorsとの関連にも興味もたれる。

Targeting of Endopeptidase 24.16 to Different Subcellular Compartments by Alternative Promoter Usage*

(Received for publication, February 28, 1997)

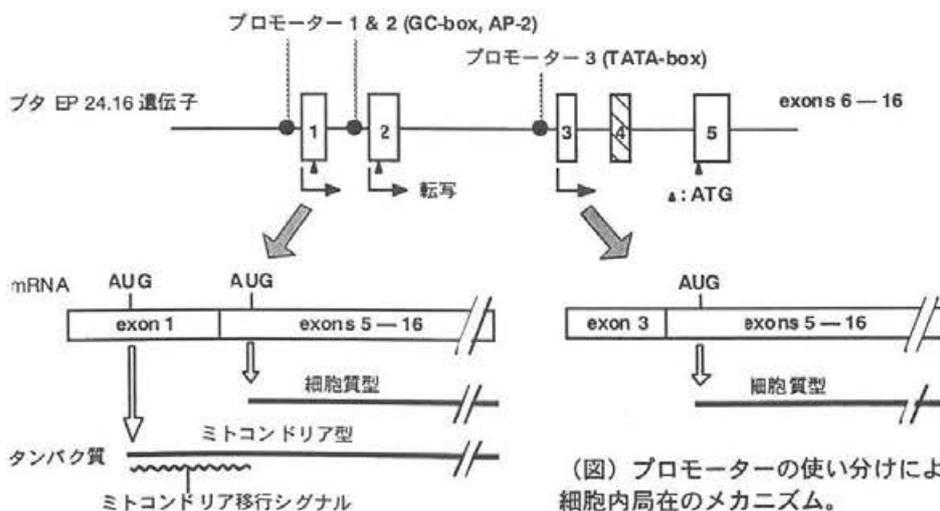
Akira Kato[‡], Naoaki Sugiura[§], Yohko Saruta, Takehiko Hosoiri, Hiroshi Yasue[¶], and Shigehisa Hirose^{||}

From the Department of Biological Sciences, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226, Japan, the [§]Department of Biochemistry I, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama 359, Japan, and the [¶]Animal Genome Research Group, National Institute of Animal Industry, Inashiki-gun, Ibaraki 305, Japan

Endopeptidase 24.16 or mitochondrial oligopeptidase, abbreviated here as EP 24.16 (MOP), is a thiol- and metal-dependent oligopeptidase that is found in multiple intracellular compartments in mammalian cells. From an analysis of the corresponding gene, we found that the distribution of the enzyme to appropriate subcellular locations is achieved by the use of alternative sites for the initiation of transcription. The pig EP 24.16 (MOP) gene spans over 100 kilobases and is organized into 16 exons. The core protein sequence is encoded by exons 5-16 which match perfectly with exons 2-13 of the gene for endopeptidase 24.15, another member of the thimet oligopeptidase family. These two sets of 11 exons share the same splice sites, suggesting a common ancestor. Multiple species of mRNA for EP 24.16 (MOP) were detected by the 5'-rapid amplification of cDNA ends and they were shown to have been generated from a single gene by alternative choices of sites for the initiation of transcription and splicing. Two types of transcript were prepared, corresponding to transcription from distal and proximal sites. Their expression *in vitro* in COS-1 cells indicated that they encoded two isoforms (long and short) which differed only at their amino termini: the long form contained a cleavable mitochondrial targeting sequence and was directed to mitochondria; the short form, lacking such a signal sequence, remained in the cytosol. The complex structure of the EP 24.16 (MOP) gene thus allows, by alternative promoter usage, a fine transcriptional regulation of coordinate expression, in the different subcellular compartments, of the two isoforms arising from a single gene.

Endopeptidase 24.16 (EP 24.16) は、哺乳動物の細胞内に存在する可溶性の中性メタロペプチダーゼである。EP 24.16 は *in vitro* で 6~18 アミノ酸のペプチドを良く切断するが、タンパク質の分解活性はなく、その活性や一次構造は、endopeptidase 24.15 (EP 24.15, thimet oligopeptidase¹, TOP) に極めて類似している。この2種類の細胞内ペプチダーゼは主に細胞質に存在するが、EP 24.16 に限ってミトコンドリアにも局在することが知られている。しかし、どのようなメカニズムで EP 24.16 の細胞質型とミトコンドリア型が産生されるかは謎であった。本研究で私達は、局在のユニークな EP 24.16 に着目して遺伝子の解析を行い、EP 24.16 の細胞内局在が複数のプロモーターの使い分けで制御されることを見出した。私達はまず、ブタ肝臓 cDNA を鋳型とした 5' RACE を行い、EP 24.16 の mRNA に 5' 末のアイソフォームが存在することを見出した。次に、遺伝子をクローニングして構造を決定し、単一の遺伝子が、3つのプロモーターの使い分けと(エクソン1~3)、エクソン4のオルタナティブスプライシングにより mRNA のアイソフォームを生じていることを見出した(図)。興味深いことに、ミトコンドリア移行シグナルはエクソン1だけにコードされており、エクソン1から転写されたものはミトコンドリアにそのタンパク質が移行し、エクソン2, 3から転写されたものは細胞質にとどまることが明らかとなった。このように、EP 24.16 の細胞内局在は転写レベルでの調節が可能で、このような細胞内局在化の制御は、プロテアーゼやペプチダーゼの例では初めてである(*ICOP Newsletter* 1996年11月号に関連記事有り)。

¹Thimet: thiol- and metal-dependent の略。2価イオンのキレート剤とチオール試薬で共に酵素活性が阻害される。



(図) プロモーターの使い分けによる EP 24.16 の細胞内局在のメカニズム。

Enhanced aggregation of β -amyloid-containing peptides by extracellular matrix and their degradation by the 68 kDa serine protease prepared from human brain

Akira Matsumoto^{a,*}, Taira Enomoto^a, Yoshisada Fujiwara^a, Hisamitsu Baba^b, Reiko Matsumoto^c

^aDepartment of Radiation Biophysics and Genetics, Kobe University School of Medicine, Kusunoki-cho 7-5-1, Chuo-ku Kobe 650, Japan

^bThird Division, Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine, Kobe 650, Japan

^cFirst Division, Department of Internal Medicine, Osaka Teishin Hospital, Osaka 543, Japan

Received 14 October 1996; revised version received 30 October 1996; accepted 11 November 1996

Abstract

To explore whether extracellular matrix components in human brain affect the deposition and aggregation of β -amyloid containing peptides, human brain samples from patients with sporadic Alzheimer's disease and normal aged were analyzed by Western blot analysis. All major β -amyloid-containing peptides contained epitope(s) which is recognized by anti heparan sulfate antibody. Incubation of brain β -amyloid-containing peptides with human collagen type IV in neutral pH efficiently generated a high molecular weight aggregated band, approximately 5-fold that of the control sample. We have previously found a serine protease which is capable of cleaving an oligopeptide at the N-terminus of β -amyloid. In this study, the protease, which also contains heparan sulfate glycoconjugates, degraded the above brain peptides as natural substrates, although with different efficiency. These findings suggest that extracellular matrix components affect the processing and aggregation of β -amyloid-containing peptides in human brain. © 1996 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved



Fig. 2. Enhanced expression of aggregated $A\beta$ -harboring peptides by extracellular matrix components. Western blot analysis of low molecular weight $A\beta$ -harboring peptides using anti $A\beta$ 1–14 antibody (A) or anti $A\beta$ 8–17 antibody (B) after 24 h incubation with following components. Lane 1, No addition; lane 2, 10 μ g human collagen type IV; lane 3, 10 μ g human fibronectin; lane 4, 10 μ g human laminin; lane 5, 10 μ g human heparan sulfate proteoglycan. Left ordinate, migration positions of molecular mass markers in kDa.

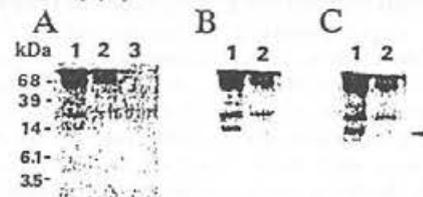


Fig. 3. Degradation of $A\beta$ -harboring peptides by human brain 68 kDa serine protease. Western blot analysis of immunoprecipitates of brain homogenate from sporadic AD sample 1 using anti $A\beta$ 1–14 antibody (A), anti $A\beta$ 8–17 antibody (B) or anti heparan sulfate oligosaccharide antibody (C). Lane 1, Immunoprecipitated peptides incubated for 24 h in reaction buffer; lane 2, immunoprecipitated peptides incubated with 0.1 pmol protease for 24 h in reaction buffer; lane 3, 0.1 pmol protease incubated for 24 h in reaction buffer. Left ordinate indicates migration positions of molecular mass markers in kDa, and arrowhead indicates migration position of the 16 kDa $A\beta$ -harboring peptide.

Table 1

Substrate	Efficiency of removal (%) ^a		
	$A\beta$ 1–14 epitope	$A\beta$ 8–17 epitope	Heparan sulfate epitope
Full-length APP	26	15	50
69 kDa fragment	1	14	39
35 kDa fragment	100	100	100
27 kDa fragment	33	65	62
16 kDa fragment	100	100	90

^aPercentage of reduction in intensities of densitometry tracings shown in Fig. 4 during the proteolytic degradation.

ヒト脳由来 β アミロイド含有ペプチド群の*in vitro*凝集におよぼすヒト細胞外間質の影響をTris-tricine電気泳動-Western法で解析した。特にヒトコラーゲン(type-4)は中性pHでC端側ペプチド群(1-2kDa)を凝集し高分子凝集体(90kDa以上)を最も高率に形成した。また高分子APPペプチドを基質とした68kDaプロテアーゼの活性解析では各 $A\beta$ ペプチド分子のヘパラン硫酸糖質の有無によりその分解効率が異なることを明らかにした。*in vivo*脳における細胞外間質、糖修飾された $A\beta$ 基質、糖修飾されたプロテアーゼおよびそのインヒビターの $A\beta$ 形成・凝集におよぼす機作の重要性が示唆される。

The 68 kDa β -secretase with heparan sulfate is expressed in serum and lymphocyte cytosol of normal aged and Alzheimer's disease patients

Akira Matsumoto,^{1,CA} Taira Enomoto,¹ Yoshisada, Fujiwara,¹ Hisamitsu Baba² and Reiko Matsumoto³

¹Department of Radiation Biophysics and Genetics, and ²Third Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine, Kusunoki-cho 7-5-1, Chuo-Ku, Kobe 650, Japan; ³First Department of Internal Medicine, Osaka Teishin Hospital, Osaka 543, Japan

^{CA}Corresponding Author

Peripheral serum and cytosol of peripheral lymphocytes of normal volunteers and Alzheimer's disease patients were analyzed for the 68 kDa β -secretase, which cleaves β -amyloid-harboring peptides at the β -amyloid-N-terminus. By two-dimensional gel electrophoresis and following western analysis using an antibody raised against this protease, a 68 kDa protein spot with microheterogeneity was detected in samples from almost all aged donors (> 60 y) and Alzheimer's disease patients. Donors younger than 50 y, however, do not exhibit this protein spot in either serum or cytosol of lymphocytes. Moreover, treatment of both serum and cytosol samples with particular sugar-modifying enzymes, such as heparitinase and glycopeptidase A, effectively degraded the 68 kDa band which is detected by western blot using anti heparan sulfate monoclonal antibody. This finding indicates that the protease contains asparagine-linked glycoconjugate(s) with heparan sulfate moieties. These results suggest that the 68 kDa β -secretase could be a serum marker protein for aging and Alzheimer's disease, and the presence of the unique glycoconjugate on the 68 kDa β -secretase may modulate proteolysis of its substrate and thereby β -amyloid accumulation and amyloidogenesis.

Table 1. Profile of Sample Donors

Donor	Age	Sex	Medication	Spot Type No.
H01	15	f	-	1
H02	22	f	-	1
H03	41	f	a	1
H04	66	m	-	2
H05	73	f	b	3
H06	88	m	b	3
H07	77	m	-	2
H08	58	f	-	2
H09	44	m	-	1
H10	11	m	-	1
H11	24	f	-	1
H12	29	m	-	1
H13	19	m	-	1
H14	34	f	-	1
H15	58	m	a	3
H16	31	f	-	1
JH01	21	m	-	1
JH02	48	m	-	1
JH03	41	m	-	1
JH04	58	f	c	3
JH05	66	m	-	3
JH06	30	f	-	1
JH07	24	f	-	1
JH08	29	m	-	1
JH09	64	f	c	2
JH10	80	m	-	3
JH11	23	m	-	1
JH12	78	m	-	3
JH13	41	f	-	1
JH14	39	f	-	1

female m: male
 medicated with anti-hypertensive
 medicated with anti-coagulant
 medicated with thyroid hormone

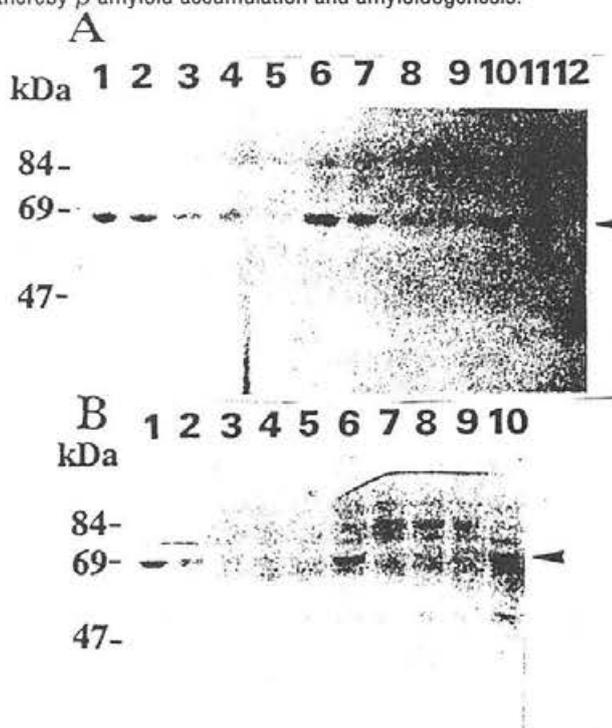


FIG 3.

Western blot analysis of serum (A) and cytosol of peripheral lymphocytes (B) by anti heparan sulfate antibody. Lanes 1 through 5, anti adp-2 immunoprecipitate of 4 μ l serum (A) or 30 μ g cytosol protein (B) of OTH07 (77 y) was not treated (lanes 1) or treated with heparitinase for 30 m (lanes 2), 1 h (lanes 3), 2 h (lanes 3) or 3 h (lanes 4); lanes 6 through 9, samples from OTH04 (66 y) as above were not treated (lanes 6) or treated with heparitinase for 30 m (lanes 7), 1 h (lanes 8) or 2 h (lanes 9); lanes 10 and 11, samples from KUH12 (78 y) as above were not treated (lanes 10) or treated with heparitinase for 30 m (lane 11) or 1 h (lane 12). Left ordinates, migration positions of molecular weight markers in kilodaltons.

ヒト68kDaセリンプロテアーゼの末梢血液中での発現を明らかにした。家族性アルツハイマー病患者リンパ球から精製した同酵素に対する抗体を用いたイムノアッセイおよび2次元Western法により30例の正常人脱フィブリン末梢血を検索した結果、68kDaスポット(弱酸性等電点、糖鎖のmicroheterogeneityを認める)を11例に検出した。その75%は65歳以上の老人由来の検体であった。また糖修飾酵素を用いた解析から、末梢血液中の本プロテアーゼは脳に発現している本酵素と同様分子内にヘパラン硫酸残基をもつ。