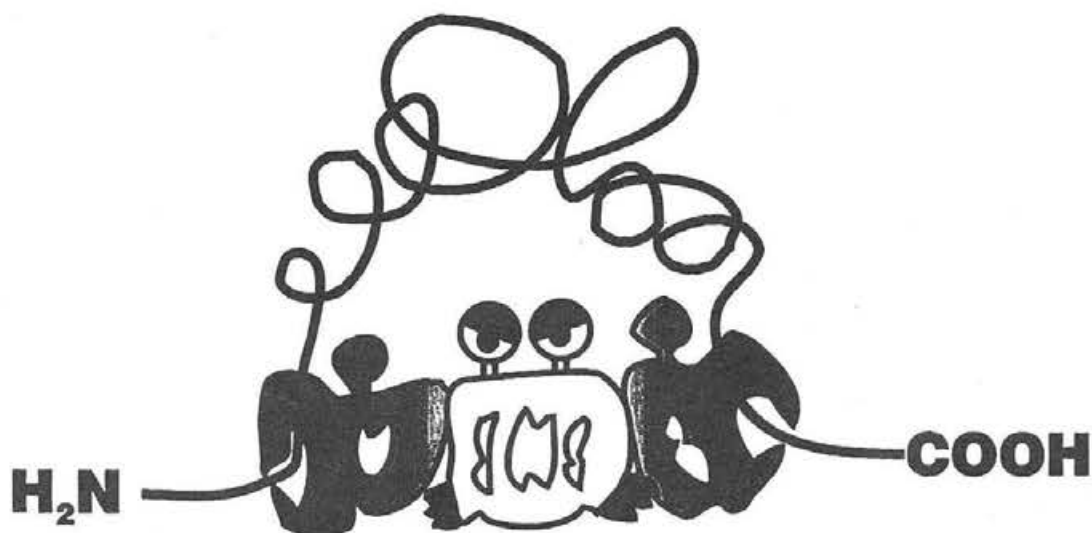


重点領域研究

「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5号（平成9年11月発行）

文部省科学研究費重点領域研究「細胞内蛋白分解」事務局

# 目次

- (1) 巻頭言
- (2) 平成9年度重点研究班会議日程
  - 1 第2回公開シンポジウム
  - 2 第2回班会議
  - 3 第2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“ぶろておりしす”発行
  - 3 出版案内
  - 4 学会・集会案内
  - 5 第二回「細胞内蛋白分解ワークショップ」開催報告
- (4) 学会・集会報告
  - 1 EMBO Workshop on Cellular Functions of AAA Proteins : 第2回会議
  - 2 FASEB Summer Research Conference “Ubiquitin and Protein Degradation” に参加して
  - 3 “病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター” 研究会
  - 4 “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)
- (5) ミニレビュー
  - 1 植物の液胞と細胞死
  - 2 がん遺伝子発現に伴うアポトーシスとユビキチン系
  - 3 Kex2型蛋白分解酵素 Furin と細胞高次機能
  - 4 脱ユビキチン化酵素：巨大な遺伝子ファミリーの謎
  - 5 In Vivoにおける細胞内プロテアーゼ活性の測定法
- (6) トピックス
  - 1 APC (大腸癌遺伝子) はユビキチンリガーゼか？
  - 2 Caspase-3はプレセニン蛋白の新切断酵素である
- (7) 海外留学中研究者からの最新情報
  - 1 K先生へ：細胞死のことなど
  - 2 小胞体品質管理機構に寄与するプロテアーゼ
- (8) 掲示板コーナー  
伝言板、その他インフォメーション
- (9) 編集後記
- (10) 発表論文の概要紹介：巻末添付

## (1) 巻頭言：重点領域研究の役割

平成10年度から、重点領域研究は特定領域研究と名称を変え、従来の大型のグループ研究を減らして、少人数のグループ研究を加えることになった。この二、三年、文部省と学術審議会は科学研究費補助金の中で基盤研究を重視する立場を打ち出している。これは、研究費について、研究者を対象にアンケートを行うと、科研費システムの一本化が常に上位にランクされることに応じているのであろう。

米国では、研究者のほとんどが、一つないし二つの3～5年継続のグラントで研究を行っている。これだと、通るかどうかわからない研究費を毎年いくつも応募したり、あれこれの班会議に参加する時間のロスを省くことができる。それでは、科研費を基盤研究（一般）に一本化すれば、問題は解決するかというと、けっしてそうではない。わが国には、審査システムが確立していないからである。

さて、既存のシステムの弊害を確実に減らすためには、新しいシステムを古いシステムに並べて走らせることが非常に有効であり、かつ現実的である。この方法は、既存のシステムを壊すのに巨大な労力が要求されるときに次善の策として特に有効である。文部省は大学の講座制を解体する代わりに、科研費によって研究費の不平等配分、つまり「優秀な」研究者により多くの研究費を配分する方法をとった。このやり方は、

ある程度の成果をあげた。しかし、科研費でも一般研究は講座制にそのまま対応する部・分科・細目内で審査されるという、新しいシステムとしての欠陥をもっている。この欠点を補うものとして、かつての特定研究があったし、今の重点領域研究があると考えられる。ここでも旧体制の一般研究に対し第二のシステムとして重点領域研究（特定研究）は非常に効果を発揮した。

基盤研究（一般）でも第二のシステムを平行させる方法がとられなかった訳ではない。複合領域の設定によって分子生物学や細胞生物学などという新しい分科細目をつくったことなどが、それに当たる。しかし、次善の策の限界として、旧来の部・分科・細目は温存した。私は、現在の部・分科・細目を完全に壊してしまわないかぎり、重点領域をなくして基盤研究一本にするのには反対である。基盤研究一本にするのであれば、現在の審査システムを、ピアレビュー方式（これにも欠点があることは、欧米では常に指摘されているが）に近いものに改変しなければならない。それができるまで、重点（特定）領域研究は次善の策としての役目をはたさねばならない。

平成9年10月

重点領域研究「細胞内蛋白分解」総括班メンバー  
矢原 一郎（財）東京都臨床医学総合研究所



## (2) 平成9年度重点研究班会議日程

### 1 第2回 公開シンポジウム：「プロテアーゼとアポトーシス」

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9年12月1日（月）午後1時～5時

会場：東京ガーデンパレス・雅（2階）

〒113東京都文京区湯島1-7-5 電話：03-3813-6211

JRお茶の水駅下車 徒歩5分

#### プログラム

1:00 領域代表者挨拶

1:05 三浦 正幸（阪大・医）「カスパーゼの活性化とプログラム細胞死」

1:35 杭田 慶介（都臨床研）「ノックアウトマウスを用いたcaspaseの機能解析」

2:05 鎌田 真司（阪大・医）「カスパーゼファミリープロテアーゼによるアポトーシスの制御」

2:35 川島 誠一（都臨床研）「プロテアソームの阻害＝細胞死 or 分化？」

3:05 中島 琢磨（東理大・基礎工）「タンパク質ユビキチン化機構によるアポトーシスの制御」

3:35 休憩20分

3:55 “特別講演” 長田 重一（阪大・医）「Fasを介したアポトーシス」

4:55 副領域代表者閉会の辞

5:00 終了予定

問い合わせ先：木南英紀（順天堂大・医）

### 2 第2回 班会議

日時：平成9年12月2日（火）～3日（水）

場所：東京ガーデンパレス

### 3 平成9年度：第2回 総括班会議

日時：平成9年12月1日（月）11：00～12：30

場所：東京ガーデンパレス

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

#### 総括班メンバー

- 鈴木 紘一 東京大学分子細胞生物学研究所教授：領域代表・第一班班長  
木南 英紀 順天堂大学医学部教授：領域副代表・第二班班長  
岩永 貞昭 九州大学名誉教授：研究評価, チェック・レビュー  
大島 泰郎 東京薬科大学生命科学部教授：研究評価, チェック・レビュー  
勝沼 信彦 徳島文理大学健康科学研究所教授：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) 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・トピックス等、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：研究代表者鈴木絃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.

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

"Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors" (eds by Katunuma, N., Kido, H., Fritz, H., and Travis, J.), IOS Press, (1997)

"Proteolysis in Cell Functions" (eds by V. K. Hopsu-Havu et al.) IOS Press, (1997)

"Ubiquitin and the Biology of the Cell" (eds. by J.-M. Peters et al.) Plenum Publishing, London, in press (11月発刊, 1997)

組織培養 特集号 “プロテアソーム” 1996年3月号（編集：田中啓二）

細胞工学 特集号 “ユビキチンとプロテアソーム” 1996年7月号（監修：田中啓二）

蛋白質核酸酵素 “プロテオリシス：蛋白質分解の分子機構とバイオロジー”

平成9年10月臨時増刊号（編集：鈴木紘一、木南英紀、田中啓二）  
実験医学 特集 “プロテアーゼと疾患” 1997年11月号（編集：  
鈴木紘一）

#### 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・平成9年12月16－19日：京都（田代啓）
- (2) 公開シンポジウム "AAAファミリー"ATPaseの多彩な細胞機能と共通分子基盤。平成10年2月23－24日：岡崎（小椋光, 他）

<http://sesame.nibb.ac.jp/~aaasympo/index.html>

##### 国際学会

- (1) "Vth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control", October 4-8, 1997, Ljubljana, Slovenia (V. Turk et al.)
- (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.).
- (4) "International Conference on Protease Inhibitors '97 (ICPI '97)", December 6, 1997, Kyoto (Y. Kiso)

#### 5 第二回「細胞内蛋白分解ワークショップ」開催報告

平成9年7月8日から10日、110名余りが参加して、浜名湖三ヶ日天然温泉「浜名湖レークサイド」にて、重点領域研究「蛋白分解のニューバイオロジー」の第二回「細胞内蛋白分解」ワークショップが開催されました。今回のワークショップは、班員によるミニシンポジウム「“構造—機能” 相関」（7月8日夜）及び

「選択的蛋白分解」（7月10日午前）、平成9年度新班員の紹介と研究計画（7月9日午前）、そして班員以外の講演者による特別講演「蛋白分解研究の活性化を目指して」（7月9日午後）、更には8日と9日の夜には自由討論という構成で開催されました。

8日夜のミニシンポジウム「“構造—機能” 相関」では、木曾良明先生（京都薬科大学）が「アスパラギン酸プロテアーゼの活性中心構造からデザインされた阻害剤の開発」という演題で講演されました。HIVのプロテアーゼは二量体を形成しており、その活性中心に結合する阻害剤を基質であるHIVのgag-pol融合蛋白のアミノ酸配列をもとにして開発していること、dipeptideで阻害は可能であるが細胞への移行も考慮して設計する必要があること等をお話してくださいました。続いて、芳本忠先生（長崎大学・薬学部）が「プロリン特異的ペプチダーゼの構造とプロリン特異性発現機構の解明」という演題でお話してくださいました。様々なプロリン特異的ペプチダーゼは、活性中心であるSer-His-Aspは保存されているものの、全体を見渡してのアミノ酸配列の相同性は低いこと、その中で先生の教室で行った結晶化の成功例を示していただきました。このミニシンポジウムの最後は、このワークショップの開催場所をお世話してくださいました牧正敏先生（名古屋大学・農学部）の「カルパスタチンの構造とカルパイン阻害機構」の御講演でした。カルパスタチンは4回の繰り返し構造を持ち、その中心部分の27アミノ酸残基だけでカルパイン阻害活性をもつこと、さらに、その中心部分がカルパインの活性中心と結合し、アミノ末端側がカルパイン大サブユニットのE-F handと、カルボキシル末端側がカルパイン小サブユニットのE-F handとCa依存的に結合することを話されました。

9日午前の平成9年度新班員の紹介と研究計画では、中島琢磨先生（東京理科大学・基礎工学部）の「アデノウイルスE1A導入アポトーシスにおけるトポイソメラーゼII $\alpha$ の特異的分解機構」の御講演で始まりました。アデノウイルスE1Aを単独で導入した細胞ではp53の不安定化後アポトーシスが誘導され、その際、トポイソメラーゼII $\alpha$ は選択的にUb-Proteasome系で分解されることのお話でした。鎌田真司先生

(大阪大学・医学部)は「蛋白分解による細胞死制御機構の解析」という演題で講演されました。酵母のtwo-hybrid systemを用いてCPP 32やICEに結合する細胞質蛋白質の検討を行っておられました。水野恵子先生(横浜市立大・医学部)は「PKCの蛋白質分解機構の解明とアポトーシスにおける機能解析」という演題でnPKCの限定分解ではアポトーシスがおこり、完全分解では細胞分化がおこるというお話をされました。山嶋哲盛先生(金沢大学・医学部)は「カルパインとカテプシンの動態より見た霊長類の虚血性神経細胞死の病態と解析」という演題で講演されました。日本猿を20分全脳虚血し5日後における神経細胞死においては、 $\mu$ -Calpainの活性化が起こり、 $\mu$ -Calpainのリソゾーム膜への作用によってCathepsin Bが遊離してくる事をお話されました。杭田慶介先生(東京都臨床医学総合研究所)は「Caspaseファミリープロテアーゼ遺伝子群のノックアウトマウスの作製と解析」という演題でCPP32のKOマウスでは神経細胞死の抑制がおこるが胸腺細胞では何も起こらないこと、CMH-1のKOマウスは致死であること、ICEのKOマウスではIL-1 $\beta$ だけではなくIL-1 $\alpha$ やIL-8も減少することをお話されました。千葉和義先生(お茶の水女子大・理学部)は「細胞内プロテアーゼ活性のin vivo, real time測定法」という演題で講演されました。ACMSを結合した合成基質を細胞内にマイクロインジェクションすることで、生細胞内でのプロテアゾーム活性を経時的に測定する事ができるという内容でした。稲葉一男先生(東京大学・理学部)は「精子運動開始におけるプロテアソームの生理機能」という演題でLeu-Leu-Val-Ile-MCAがATPで活性化した精子の鞭毛運動を抑制する事やプロテアソームが二量体微小管に結合しているというお話をなさいました。前田正知先生(大阪大学・薬学部)は「転写制御因子GATAのcAMPに応答する分解のメカニズム」という演題で講演されました。転写制御因子GATAは、二つのZn fingersの間にPKAおよびPKCによってリン酸化を受けることによりその分解が制御されており、cAMPによるPKA活性化後のGATAの分解はMG115によって阻害されることからプロテアソームの関与が考えられるとのお話でした。岩井一宏先生(京都大学・医学系研究科)は「酸化的修飾がシグナルとなるユビキチン依存性



蛋白分解の細胞機能制御における役割」という演題で、鉄反応領域結合蛋白-1および-2の鉄結合部位が酸化修飾によるカルボニル化を引き起こし、Ub-Proteasome系によって分解されるという御講演でした。田中弘文先生（東京薬科大学・生命科学部）は「哺乳類細胞におけるサイクリンB特異的ユビキチン化とその調節機構の解明」という演題で講演されました。哺乳類培養細胞においてサイクリンB特異的hE2-Cを分離し、その結合蛋白をtwo-hybrid systemで分離するとのお話でした。大坪素秋先生（久留米大学・分子生命科学研究所）は「サイクリンE-p21特異的ユビキチンリガーゼの解析」という演題でサイクリンE-p21特異的E3をtwo-hybrid systemを用いて分離し、このE3がサイクリンEの細胞周期特異的分解に関与しているかを検討するというお話をされました。大海忍先生（東京大学・医科学研究所）は「共有結合型阻害剤に特異的な抗体を用いたプロテアーゼの活性化機構と生理機能の解析」という演題でE-64- $\mu$ -Calpain複合体に対する抗体を用いてU937細胞のFasやTNF- $\alpha$ 経路による細胞死の際の $\mu$ -Calpainの活性化やカルパスタチンの分解について解析をおこなうというお話でした。黒木和之先生（金沢大学・がん研究所）は「新規ヒトカルボキシペプチダーゼgp180の構造と機能」という演題で講演されました。Gp180はカルボキシペプチダーゼドメインを3回繰り返す構造を持つ膜蛋白質で、HBVはその三番目のカルボキシペプチダーゼドメインに結合すること、すべての臓器で発現しているが、その機能は不明であるとのことでした。田之倉優先生（東京大学・生物生産工学研究センター）は「プロメラインインヒビターの三次元構造の解析とそれに基づく阻害剤の開発」という演題で大腸菌で発現させたプロメラインインヒビターVIの三次元構造解析からBowman-Birk型trypsin inhibitorに近い構造であることが明らかになり、今後は特定のプロテアーゼに特異的に結合する変異プロメラインインヒビターVIを作製するというお話をされました。

特別講演「蛋白分解研究の活性化を目指して」では、三原勝芳先生（九州大学・大学院医学研究科）が「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」という演題で講演してくださいました。リボゾーム上で合成された蛋白質は



細胞質に存在しているHSP70で巻戻され各々に固有の細胞内小器官のなかに移行していくのであるからそれぞれの小器官に固有の細胞質因子が存在しており、ミトコンドリアにはMSF(Mitochondrial Import Stimulation Factor)が存在していること、更に、ミトコンドリア蛋白質前駆体-MSF複合体がミトコンドリア外膜に存在する受容体に結合し、ミトコンドリア内に蛋白質が移行していく時には細胞質のATPを必要とすること等を詳しくお話してくださいました。梅園和彦先生(京都大学・ウイルス研究所)は「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」という演題でお話してくださいました。脂溶性低分子リガンドに結合する受容体は少なくとも50種類以上細胞内に存在しており、ステロイドホルモン受容体の様なホモダイマーを形成するものと、甲状腺ホルモンやビタミンDやAの様にヘテロダイマーを形成するものがあること、中でもRXRはレチノイン酸受容体と相同性のある分子としてクローニングされた受容体で、レチノイン酸受容体やビタミンD受容体とヘテロダイマーを形成するがその機能は不明であること、今後は、各々の受容体に結合するが活性を発現させないような薬剤を用いて、RXRの機能を解析していくということをお話してくださいました。柳田充弘先生(京都大学・大学院理学研究科)は「細胞周期アナフェーズを推進する蛋白質分解」という演題で講演されました。細胞周期はcdc2-cyclin複合体のcyclinが分解されcdc2 kinaseの活性が発現するために進行するが、この時、細胞内にはAPC(Anaphase Promoting Complex)が形成されていること、このAPCは10個以上のサブユニットで構成された20S以上の巨大分子であること、このサブユニットにはUb-ligase, cyclin, やCut2蛋白質が存在し、リン酸化や脱リン酸化による調節を受けていることなどを話してくださいました。矢原一郎先生(東京都臨床医学総合研究所)は「細胞と分子シャペロン: Hsp90のはたらきを中心にして」という演題でご講演してくださいました。Hsp70やGroEL等の分子シャペロンについて概説した後、Hsp90の転写因子、プロテインキナーゼや他の分子シャペロンとの相互作用について詳しくお話してくださいました。

7月10日午前のミニシンポジウム「選択的蛋白分解」では反町洋之先生(東

京大学・分子細胞生物学研究所)の「カルパイン研究の現状」という講演で始まりました。活性中心の相同性からいろんな生物のカルパイン分子を取り上げ概説してくださいました。沢田 均先生(北海道大学・薬学部)は「プロテアソーム研究の現状」という演題でプロテアソーム分子が結合する分子によってATP依存的に蛋白質を分解したり、ATP非依存的にペプチダーゼ活性を発揮するようになることや、調節因子内に少なくとも6種類以上のATPaseが存在していることから、基質や調節因子サブユニットのリン酸化がプロテアソーム活性に影響を与えているというお話をされました。村上安子先生(東京慈恵医科大学・医学部)は「オルニチン脱炭酸酵素の分解調節機構」という演題でオルニチン脱炭酸酵素がアンチザイムと複合体を形成した後、26Sプロテアソームでエネルギー依存的に分解されるというお話をされました。秋山芳展先生(京都大学・ウイルス研究所)は「膜結合型プロテアーゼ複合体とその多様な機能：大腸菌FtsH複合体の解析」という演題で講演されました。大腸菌のFtsH複合体はSecYやF1F0-ATPase subunit A等の膜蛋白質やCIIや $\sigma 32$ 等の細胞質蛋白質を分解するが、自身のATPase活性とその他の細胞質因子が必要であることを話されました。小出武比古先生(姫路工業大学・理学部)は「分泌蛋白質の品質管理機構としての小胞体内蛋白分解メカニズムの解析」という演題で、非会合性TCRや遺伝性の変異蛋白質、環境誘導による蛋白質、糖鎖修飾の異常蛋白質の小胞体内での分解について概説され、その分解に関与するプロテアーゼの解析を現在進行中である事をお話されました。

8日と9日の夜には自由討論「国際学会における最新研究動向」という特別な催しがあり、大家の先生の若かりし日のお話やこのワークショップで話題にならなかった分野での研究での興味などのお話をお伺いする機会を持つことが出来ました。私としましては、別の分野の諸先生方とお話をする機会にもなり大変勉強になったワークショップであったと思います。ただ、もう少し時間的に余裕のある会であればもっと気楽にしていられるのですが、私には体力的に少しきついワークショップでした。(石堂一巳・順天堂大学・医学部・生化学第一)

## (4) 学会・集会報告

### 1. EMBO Workshop on Cellular Functions of AAA Proteins

今回が2回目となるAAA会議「AAA蛋白質の細胞機能に関するEMBOワークショップ」が、5月18～20日にドイツのミュンヘン近郊Tutzingで開催された。会場となった場所は対岸の向こうにドイツアルプスを望む閑静な湖畔であった。参加者は80人弱と、前回とほぼ同程度であった。三日間の日程のうち、プロテアーゼ関連は、二日目のメタロプロテアーゼと、三日目のプロテアソームであった。印象に残ったいくつかの発表について感想をまじえて報告する。

小椋(熊本大)は、大腸菌のFtsHは主要な膜構成成分(リン脂質・リポ多糖)の生合成を制御し、この機能が細胞増殖に必須であることを報告した。FtsHのAAAモジュール内のSRH(Second Region of Homology)領域に変異を導入してATPase活性とプロテアーゼ活性を調べ、SRHはATPase活性とプロテアーゼ活性の両方に重要な領域であることを示した。伊藤(京大)は、FtsHのprotease活性の調節、HflKCの役割などを報告した。膜蛋白YccAは、FtsHの基質らしく、そのN末端細胞質領域の内部欠失変異によってFtsHのSecY, Fo subunit a に対する分解を阻害するが、CII分解には影響を与えない。逆にHflKCのミスセンスのあるものはその逆の性質を持つことなどから、HflKCによるFtsHの "transmembrane modulation" において、膜蛋白基質、可溶性基質の間の基質特異性が制御されている可能性について言及した。Bukau(フライブルク大)は、 $\sigma 32$ の内部のC領域と呼ばれる領域に相当するペプチドが、ATP依存的にFtsHにより分解されることを報告したほか、FtsHの良い基質となるペプチドの特徴が、一般的にDnaKが結合する配列の特徴に一致することを示した。これに関連して、Liberek(グダニスク大)は、 $\sigma 32$ のC末端がFtsHによる分解に重要であるというin vivo, invitroのデータを示した。FtsHによる基質認識は、重要な問題の一つであるが、 $\sigma 32$ の認識についてはこのように一見矛盾するデータがあり、なお検

討を要する。しかし、秋山（京大）によるSecYの分解では、FtsHによる特異的分解を起こさせる領域がSecY上には複数存在することが示されているので、FtsHは必ずしも一箇所の特異的な配列／構造を認識しているのではないのかも知れない。

松沢（東大）は、FtsHの膜結合領域を欠失した可溶性FtsH (FtsH\*) を精製して、ATPase活性、プロテアーゼ活性を調べた。その結果、FtsHは $\sigma 32$ をATP依存的に分解するのに対して、FtsH\*はATP非依存的なプロテアーゼ活性を示した。Walkerモチーフに変異を持つ可溶性FtsH\*41は、やはりATP非存在下で $\sigma 32$ を分解する活性を示し、驚いたことにATP存在下では活性を示さなかった。Bouloc（南パリ大）は、大腸菌のHflB(FtsH)が $\lambda$ のCIII蛋白をATP非依存的に分解することを示した。このように、FtsHによる基質分解について、ATPを要求する基質と要求しない基質があること、さらにFtsHの形状によってもATPの要求性が変わることなどを今後どう整理して行くかが大きな問題として残った。Boulocはまた、Hisタグを付けたHflBのAAA moduleを精製し、尿素で変性したクエン酸合成酵素の再生系でシャペロン活性を調べたところ、再生が観察されたが、意外にもその活性はATP非依存的であった。AAA蛋白のシャペロン活性という点では、Langer（ミュンヘン大）の酵母ミトコンドリアのAAAプロテアーゼのシャペロン活性についての発表があった。以前彼らは、Yta10p/Yta12pにはプロテアーゼ活性以外にF1Fo ATPaseのアセンブリーなどを助けるシャペロン活性があると報告していた。この点についてさらに検討し、Yta10p/Yta12pの両サブユニットのプロテアーゼ活性部位に変異を導入した場合には、予想に反して呼吸能を失うことから、Yta10p/Yta12pがシャペロンとして機能するという確かな証拠は無くなった。このように、シャペロン活性についてはそれを支持するデータと否定的なデータが示され、またATP依存性についても疑問な点が多く、なお今後の課題として残った。

それ以外のトピックスとしては、Shotland（ヘブライ大）が、FtsHのリング構造について報告したほか、Schumann（バイロイト大）とCutting（ロンドン大）は、枯草菌のftsHが孢子形成に関わると報告した。真核細胞の26Sプロテアソームについて

は、それに含まれるAAA ATPaseは6種類で、それぞれのプロテアソームに6種類の異なるATPaseが一個ずつ含まれることがほぼ確定した。Finley（ハーバード大）は、酵母の26Sプロテアソームの6種類のAAA ATPaseのWalkerモチーフAのLysをArgあるいはSerに置換して、細胞の生育、プロテアソームのアセンブリー、基質分解能などを調べた。その結果、それぞれのATPaseは機能的に等価ではないことが分かり、短いペプチドの分解能を失うものやアセンブリーに異常があるものなどがあつた。このことは、AAA ATPaseが単純に基質蛋白を巻き戻すだけではないことを示している。蛋白分解におけるAAA ATPaseのATP加水分解によるエネルギーは、基質の認識、巻き戻し、活性部位への提示などに必要であると考えられてきたが、この問題もそう単純ではなさそうな気配である。田村（千葉大）は、プロテアソームATPase Sug1のATPase活性を詳細に検討し、poly(C), poly(U) やC、Uの多いある種のmRNAにより活性化されることを報告し、いまだ未知の機能がこのファミリーのAAA領域内に含まれる可能性を示唆した。AAA ATPaseドメインにはヘリカーゼに共通に見られるいくつかのモチーフも保存されていることより、核酸との関連もさらに検討する必要がある。

今回の会議では、AAA ATPaseの共通構造を明かにし、そこから共通の機能を提唱するという方向を目指す研究がどの程度進んでいるかを期待したが、まだその共通機能について本格的に討議する段階には至っていなかったというのが正直な感想である。強いて挙げれば、Lupas（マックスプランク研）がAAA ATPaseドメインの1次構造をすでに3次元構造の明らかにされている他のNTPaseの1次構造と比較し、AAA ATPaseに特徴的なSRH配列の機能を推定し、それがATPaseの調節的機能を持つことを提唱したことと、小椋らとその領域に部位特異的変異を導入し、実際にATPase活性に重要であることを実験的に示したことであつた。AAA ATPaseの共通配列が明らかになってすでに数年が経過しているが、そのような観点からの解析は今回の会議でも他からの発表はなかつた。このほか、すでに上に述べたように、ATP依存性の問題、基質認識の問題、シャペロン活性の問題などが早急に解明すべき課



題として挙げられる。次回は、来年12月にアメリカのSan Diegoで開催されること  
が決まったので、それまでにどれだけの問題が解明され、またどのような新しい問  
題が出てくるか楽しみである。 (小椋 光：熊本大学・医)

## 2. FASEB Summer Research Conference “Ubiquitin and Protein Degradation” に参加して

「ユビキチンと蛋白分解」に関するFASEB Summer Research Conferenceは、2年  
に1度行われるクローズドな会議で、今回で5回目になる。今後のユビキチンとプ  
ロテアソーム研究の方向付けを行う上で非常に参考になる会議である。今まで毎回、  
米国Vermont州Saxtons RiverのVermont Academyという学校を借りて夏休み中に行われ  
ている。今回のChairperson はArthur Haas (Medical College of Wisconsin), Vice  
ChairpersonはCecile Pickart (Johns Hopkins Univ.)で、米国 (109名 (日本人2名を含む))  
、日本 (12名)、イスラエル (12名)、ドイツ (10名)、英国 (10名)、カナダ (4  
名)、フランス (3名)、オーストラリア (3名)、その他の国 (6名) から、合計  
169名の参加者 (参加者リスト掲載者のみ) があった。本来この会議はクローズド  
な会議で、その内容を発表したり引用することは禁止されている。従って、本見聞  
録でもあまり内容の詳細については触れられないが、出席できなかった班員のため  
に、筆者が理解できる範囲で発表内容について概説し、その総括を行いたい。今回  
の発表演題は、口頭発表が48題、ポスター発表が83題あった。口頭発表に関しては  
以下の通りである。なお、口頭発表は午前と夕食後の2つのセッションに分かれて  
行われ、昼食後は自由時間 (夕方からポスター討論) になっている。

6月29日 (日)

### Session 1: Functions of the Ubiquitin System (Chair: A. Haas)

A. Varshavsky: Recent studies of the N-end rule pathway.

A. L. Goldberg: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway in atrophying skeletal  
muscle: A role for the "N-end rule pathway"

- P. Kloetzel: The regulation of proteasomal MHC class I antigen processing activity.
- A. Hershko: Mechanisms and regulation of cyclin degradation.
- M. Kirshner: Proteolysis and the cell cycle.

本セッションではユビキチンシステムについての発表があった。まず、Varshavsky が酵母のジ（またはトリ）ペプチドの細胞内への輸送に、Ubr1 (E3a)が必須であり、実際に細胞内では、そのトランスポーター(Ptr2p)のレプレッサー(Cup9)がUbr1によってUb化されて分解されることを報告した。次いで、Goldberg が筋萎縮において、ユビキチン-プロテアソーム経路が活性化され、それがN末端則に従って分解されることを、ジペプチド (Lys-Ala とAla-Lys) の阻害効果の差を利用して示した。Kloetzelは、MECL1の20Sプロテアソームへの取り込みには、LMP2の発現が必須であることと、PA28 を常に過剰発現させると、抗原提示能が増強されることを示した。また、LMP2の活性中心のThrに部位特異的に変異を導入すると、逆に抗原提示が増強されることから、必ずしも全ての活性部位が抗原提示に関わっているわけではない、との報告がなされた。Hershkoは、サイクリンBのUb化にかかわるE3（サイクロソーム,APC）がcdc2によってリン酸化されるとp13suc1 に結合するようになることを示した。これは、MPFが活性化されるとp13suc1 を介して基質であるサイクリンB/cdc2複合体にサイクロソームが結合し、サイクリンのUb化と分解が起こりやすくなることを暗示している。Kirshnerは、ヒトとカエルのAPC（サイクロソーム）が8種類の蛋白質からなり、その内の6種類は酵母にそのホモログがあることを報告した。また、DNA複製阻害蛋白質p25（この蛋白質がG1期に分解されることが次のDNA複製に必要）もAPCの生理的基質の候補になりうることを示した。本セッションでの発表を聞いて、APCの構造と機能に関する蛋白質レベルでの解析と、各種E3に特異的な阻害剤の開発が今後の大きな課題であると感じた。

#### Session 2: Ubiquitin-Dependent Cellular regulation (Chair: C. Pickart)

- A. Weissman: Proteasome-dependent degradation of a T cell receptor subunit from the endoplasmic reticulum.
- A. Ciechanover: Inhibition of NF- $\kappa$ B cellular function via specific targeting of the I $\kappa$ B $\alpha$



ubiquitin ligase.

R. Haguenaer-Tsapis: Npi1/Rsp5 ubiquitin-ligase dependent endocytosis of the yeast uracil permease.

L. Hicke: Ubiquitin-dependent endocytosis of the G protein-coupled  $\alpha$ -factor receptor.

S. Mori: Identification of an ubiquitin-ligation for receptor tyrosine kinases: Herbimycin A induces *in vitro* ubiquitination of epidermal growth factor receptor in rabbit reticulocytes lysates.

セッション2では、レセプターやトランスポーターといった膜結合性蛋白質と転写因子のUb依存的な制御機構について発表が行われた。まず、Weissmanは、T細胞レセプターに組み込まれなかった過剰のT細胞レセプターサブユニットが、糖鎖のトリミング（Nグリコシド型糖鎖のマンノース残基の除去）の後にUb化され、プロテアソームによって分解されることを示した。次いで、CiechanoverはI $\kappa$ B $\alpha$ のSer32/Ser36のリン酸化ペプチドがUb化を阻害すること、またこのペプチドを細胞に注入すると、TNF $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bを介したE-selectinの発現が抑制されることを示した。一方、Haguenaer-Tsapisは、uracil permease（トランスポーター）のPEST配列内のSerのリン酸化がUb化のシグナルとなってエンドサイトーシスされること、また、このUb化はLys63を介したマルチユビキチン鎖がエンドサイトーシスのシグナルとなることを示した。それに対して、Hickeは、酵母のG蛋白共役型 $\alpha$ 因子（一種の性フェロモン）レセプターがモノユビキチン化され、それがインターナリゼーションのシグナルとなっていること、またそれはプロテアソームによる分解とは無関係であることをユビキチン変異体（Lys $\rightarrow$ Arg）とDoa4の変異体を使って示した。MoriはTyrキナーゼであるEGFレセプターをキナーゼ阻害剤Herbimycin Aで処理するとウサギ網状赤血球ライゼート中の酵素により*in vitro*でUb化されるようになることを示した。

本セッションでは、レセプターやトランスポーターのインターナリゼーションのシグナルとなるUb化がモノなのかマルチなのか、またそれがどのLysを介したマルチユビキチン鎖なのか焦点となった。しかし、実験結果を見る限りは個々の場合

によって異なっていて、例えば「インターナリゼーションのシグナルはすべてLys63を介したUb化がかかわる」といったような一般則はないようである。

6月30日(月)

Session 3: Enzymology of the Ubiquitin-Dependent Pathway (Chair: D. Finley)

- A. Haas: Protein-protein interactions within the pathways of ubiquitin ligation.
- C. Pickart: Structure and recognition of polyubiquitin chains.
- P. Howley: Identification of regulators and E6-independent substrates of the E6AP ubiquitin protein ligase.
- R. Vierstra: Characterization of recognition elements within the ubiquitin proteolytic pathway in *Arabidopsis*.
- S. Jentsch: Novel components of the ubiquitin pathway.

セッション3では、ユビキチン依存的経路の酵素学と題して、5人の演者が話題提供した。最初の演者であるHaasは、E2ファミリーのKm値がおよそ  $10^{-7} \sim 10^{-8}$  Mで、Ubc9以外のE2はUbとチオエステル結合を形成することを述べた。また、E214KC88A やE214KC88SはE1とE3の阻害剤となることを示した。さらに、E214KのC末端の10残基がE3 $\alpha$ との結合に関わることを示した。それぞれのE2を用いてアフィニティクロマトをすれば、特異的なE3を精製できることを示した。次に、話はE3の基質認識機構におよび、E3の阻害剤として用いられてきたジペプチド(N-end rule substrate vs. non-N-end rule substrate)のE3に対する阻害様式を調べたところ、それはKmに対する効果(つまり競合阻害)ではなく、Vmaxに対する効果(非競合阻害)であることを発表した。さらに、E3 $\alpha$ はN-end rule substrate と non-N-end rule substrateのいずれに対しても親和性は等しいという速度論的データを示した。Haasの発表は、従来の考え方に一つの問題提起をし、多くの議論を呼んだ。しかし、Hershkoらの今までの報告結果と矛盾する点もあるので、慎重に解釈する必要があると思われる。ただ、特定のE3を介したUb化の阻害方法として、E214KC88A やE214KC88Sを用いるという考えや、それをE3の精製に利用するという考えは、今後E3の精製や生理機能の解

析を試みようとしている読者にとって、参考になるのではないだろうか。Haasの発表に続いて、Pickartが26SプロテアソームS5aのマルチユビキチン鎖認識機構についてふれ、マルチユビキチン鎖内の疎水性残基に富むS5a結合部位を推定した。Howleyは、E6がないときに細胞内でE6APと相互作用する蛋白質を探索し、新しいE2(UbcH8)と標的基質HHR23A (RAD23のホモログで、極体のduplicationに関与する新規基質蛋白質)を同定した。Vierstraは、シロイヌナズナからHECTドメインを有する2種類のE3(AtUbl1, AtUbl2)を同定した。また、26Sプロテアソーム中のS5aサブユニット(Mcb1)は生育に必須ではないが、アミノ酸アナログに対する抵抗性発現には必要であり、Ub経路のあるセットの分解にMcb1が関わっていることを示した。さらに、欠失変異体を用いた解析から、C末端の半分には、Ub鎖認識部位があることがわかったが、その部分を欠損してもアミノ酸アナログに対する抵抗性を示すので、Ub鎖認識部位以外の機能ドメインの存在が考えられる。

Session 4: Ubiquitin Carboxyl Terminal Hydrolase and Isopeptidases (Chair: G. DeMartino)

- K. Wilkinson: Human UCH-L3: Specificity, substrate binding and crystal structure of a deubiquitinating enzyme.
- R. Cohen: Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of the 26S proteasome.
- M. Hochstrasser: Mechanism and regulation of MAT  $\alpha$  2 degradation by the ubiquitin-proteasome pathway.
- J. Fischer Vize: The ubiquitin pathway and *Drosophila* eye development.
- A. D'Andrea: The DUB family: A novel family of cytokine-inducible deubiquitinating enzymes.

セッション4では、ユビキチンC末端ヒドロラーゼとイソペプチダーゼに関する報告がなされた。Wilkinsonは、ヒトのUCH-L3の結晶構造を示した。触媒3つ組(Cys-95, His-169, Asp184)やオキシアニオンホール(Gln-89)の構造はパパイン様酵素(カテプシンB)と類似性があるが、鎖の連結様式等に相違があることが示された。Cohenは26Sプロテアソーム中にイソペプチダーゼ活性があることを示し、それがユビキチンコンジュゲートの分解にかかわること、Ub鎖が短いときはむしろ、

校正機能によって除去されること、末端のUbから順次切断すること、K6, K11を介するUb鎖も基質になることが示された。Hochstrasserは出芽酵母のMAT $\alpha$  2レプレッサーの分解に関わるDoa変異を単離し、その内のあるものは、20Sプロテアソームのサブユニット変異を持つものがわかり、26Sプロテアソームの構造と機能について考察された。Vizeはショウジョウバエのfat facet (faf)遺伝子によってコードされているUbpがユビキチン経路を介して個眼の光レセプターの数を8個に限定することに関与することを報告した。D'Andreaはサイトカインで誘導される脱ユビキチン化酵素DUB-1やDUB-2が未知の生長制御因子のユビキチン化状態や分解を制御し、サイトカイン特異的の生長応答をもたらす可能性を指摘した。また、DUBは誘導後にユビキチン化されてプロテアソームにより迅速に分解される、との報告もなされた。

ユビキチン特異的ヒドロラーゼや脱ユビキチン化酵素が多数明らかにされ、その重要性が指摘されつつある。ユビキチンプロテアソーム経路の“校正”的制御という観点から、この酵素の機能研究の展開が望まれる。

7月1日(火)

Session 5: Structures and Enzymology of the Proteasome (Chair: K. Wilkinson)

- C. Hill: Structure of the proteasome regulator REG  $\alpha$  (PA28  $\alpha$ )
- W. Baumeister: Structure of the 20S and 26S proteasomes.
- D. Finley: ATPases of the yeast 26S proteasome.
- G. DeMartino: Regulatory proteins of the 26S proteasome.
- K. Tanaka: Functional analysis of 26S proteasomal subunits.

本セッションでは、プロテアソームとその制御因子の構造と機能に関する発表がなされた。まず、Hill (Utah Univ.) はプロテアソームアクティベーターPA28の $\alpha$ サブユニットのリコンビナントを大量発現させ、結晶化して2.8Åの解像度でX線結晶構造解析を行った。PA28は実際には $\alpha$ と $\beta$ サブユニットからなるヘテロ6量体であると考えられているが、少なくとも $\alpha$ サブユニットのみを発現するとホモ7量体を形成する。この構造を見ると、当初20Sとの結合にかかわると考えられたKEKEモ

チーフは20Sとの接触面にはないことがわかる。しかし、20Sプロテアソームとの複合体として結晶化されていないために、20Sとの詳細な結合様式については今後の課題として残された。Baumeisterは電子顕微鏡解析を駆使した26Sプロテアソームの高次構造解析について発表した。やはり解析はかなり困難であるという印象を与えた。Finelyは酵母を用い、26Sプロテアソーム中の6種類のATPaseのATPの結合にかかわるLysをArgまたはSerに変換した変異体を作成し、その表現型を調べるとともに、その変異体から26Sプロテアソームを精製して酵素的性質を調べた。Arg変異体ではYta5(S4)変異体だけが致死で他は生育可能であるが、Ser変異体ではCim5(MSS1)とYta1以外は致死であった。Arg変異体のYta5Rは致死だが、その近接残基を変換したYta5RFでは生育可能で、そのプロテアソームを精製すると、ユビキチンコンジュゲート水解ばかりでなく、ペプチド水解活性も低下することが示された。従って、ATPaseは基質のunfoldingにかかわるという単純なモデルでは必ずしも説明できないことになる。大変興味深い研究で、今後の展開が期待される。DeMartinoはPA28のC末端側が20Sの活性化(20Sとの結合)にかかわること、活性発現には $\alpha$ サブユニットが重要だが、 $\beta$ サブユニットはその活性を制御することを発表した。田中(都臨床研)は、two-hybrid systemでSun1と相互作用するSoi 1(Sun one interacting protein 1)の変異株において細胞周期のG1/S期で分裂が停止し、ユビキチン化蛋白の蓄積が起こること、またSoi 1は26Sプロテアソームの構成因子である可能性があることを報告した。

Session 6: New Frontiers of Ubiquitin Research, Part 1 (Chair: J. F. Dice)

- K. Breitschopf: The ubiquitin-mediated proteolytic system and regulation of sodium channel activity: Degradation of the plasma membrane protein EN  $\alpha$  C.
- R. Verma: Phosphorylation of Sic 1p by G1 cyclin/Cdk triggers its destruction at the G1/S transition.
- P. Kaiser: Cyclin dependent kinase and Cks 1 interact with the proteasome in yeast.
- D. A. Loveys: E2A transcription factors contain a portable, phosphorylation-sensitive destruction box.
- A. Mathew: The ubiquitin-proteasome pathway regulates heat shock factor 2 and



expression of molecular chaperones.

L. E. Huang: HIF-1 mediated hypoxic response is controlled by oxygen-modulated degradation of HIF-1 alpha subunit through the ubiquitin-proteasome pathway.

K. Iwai: Oxidative modification is the signal of the iron-dependent degradation of iron regulatory protein 2 (IRP2) via ubiquitination-proteasome pathway.

本セッションは、ポスター発表の中から、すぐれた内容のものを選び、口頭発表に選ばれたものである（詳細は省略）。

7月2日（水）

Session 7: Protein degradation in Organelles (Chair: S. Gottesman)

D. Wolf: ER-degradation of a luminal protein requires retrograde transport and the ubiquitin-proteasome pathway.

J. F. Dice: A selective pathway for the degradation of cytosolic proteins in lysosomes.

S. Bar-Nun: Characterization and *in vitro* reconstitution of ER and post-ER degradation of IgM in B lymphocytes.

R. Kopito: Degradation of integral membrane proteins by the ubiquitin-proteasome pathway.

R. Hampton: Protein degradation and cholesterol regulation.

セッション7では、オルガネラにおける蛋白分解に焦点が当てられた。Wolfは酵母のカルボキシペプチダーゼY(CPY)の分解において、Sec 61, Sec 63 が関与して一度ER中の蛋白質が細胞質側に逆輸送され、次いでER膜結合性のUb化酵素(Ubc6, Ubc7)によりUb化された後に26Sプロテアソームによって分解されることを示した。Diceは、12残基の細胞質テールをもつリソゾームの96kDa糖蛋白質(lgp96)の分解にはATPのエネルギーが必要なこと、またその分解にはリソゾーム中のLy-hsc73が必要であることが示され、基質分子がhsc-73によって細胞質側に引きだされてからプロテアソームによって分解される可能性が示された。Hamptonは、HMG-CoA reductaseのうちHmg1pは安定だが、Hmg2pは不安定で、その分解にはUBC7によるUb化が関与することが、突然変異株を用いた解析から示された。

Session 8: New Frontiers in Ubiquitin Research, Part 2. (Chair: R. Viestra)

- H. P. Roest: Role of the ubiquitin-conjugating enzyme mHR6B in spermatogenesis and DNA repair.
- J. Huijbregtse: The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the RSP5 ubiquitin-protein ligase.
- H. Saitoh: p18Ubc9 associates specifically with p340RanBP2, p88RanGAP1 and a 17kDa ubiquitin-like protein, UBL1.
- M. Estelle: Function of a novel family of ubiquitin-activating enzyme (E1)-like proteins in cell cycle regulation and response to the plant hormone auxin
- D. F. Lindsey: A Deubiquitinating enzyme is required for development but not growth in *Dictyostelium*
- T. Sommer: A functional link between retrograde transport during ER degradation and the components of the ubiquitin/proteasome pathway on the cytosolic surface of the ER membrane.
- M. Rohrwild: Structure and mode of action of the ATP-dependent HSIUV protease, a proteasome-related particle in *E. coli*.

本セッションでは、ポスターの中から選抜された研究で、どれも興味深い内容であったが、特に注目を集めたのは、Saitohの発表ではないだろうか。サイクリンのユビキチン化にUbc9が関わる可能性に関してJentschらがかつて報告しているが、実はこのUbc9はいわゆるE2（ユビキチンコンジュゲイティング酵素）として機能するのではなく、ユビキチン様蛋白質(UBL1あるいはSUMO-1、ただし、K48はない)のRanGAP1(GTPase-activating protein for Ran)への結合に関与すること、また、その結合はRanGAP1のp340Ran2への結合に必要であることを報告した。Ubc9は細胞周期に関わることは確かであるにしても、機能的にはE2として機能するのではなく、また、核移行に関わることが示唆された。その一方で、ポスターセッションでは、サイクリンのユビキチン化に関わるE2CのX線結晶解析結果が報告された。細胞周期の停止やサイクリンの蓄積だけでサイクリンのユビキチン化を論じることの危険性をあらためて認識させられた。

Session 9: Protein Degradation in Prokaryotes (Chair: P. Kloetzel)

- S. Gottesman: Substrate specificity in bacterial protein degradation.
- J. Flanagan: The structure of ClpP, the proteolytic component of the Clp ATP-dependent



protease from *E. coli*.

M. Maurizi: Structural and functional relationships in *E. coli* ClpAP and ClpYQ proteases

T. Baker: Analysis of ClpX chaperone function and regulation.

最終セッションでは、大腸菌における蛋白分解の機構について議論された。まず、Gottesmanが大腸菌におけるエネルギー依存性プロテアーゼの構造と機能について総括し、それぞれの生理的基質が異なる事を示した。また、tail-specific proteaseの機能についてもふれた。次いで、Flanaganは解像度2.3 Å ClpPのX線結晶解析のデータを示した。MauriziはClpAP複合体は、蛋白分解とリホールディングの両方を行うことが示し、またBakerはClpAのシャペロンとしての機能と制御機構について報告した。

全体として、ユビキチン-プロテアソームシステムの基質探索がかなり広範囲に行われてきた。しかし、その一方で、各蛋白質に特異的なユビキチンリガーゼの同定は遅れている。ユビキチン-プロテアソームシステムに関わる酵素とその制御機構が今後ますます明らかにされると思われる。ユビキチン特異的ヒドロラーゼの機能解析も興味深い。また、ここ2年間の大きな進歩としては、X線結晶構造解析が進んだことも挙げられる。20Sプロテアソーム、PA28, UCH, E2C, ClpPなどの蛋白質高次構造の情報は、その機能を考える上で非常に有用である。26SプロテアソームやサイクロソームのX線結晶構造解析も時間の問題かもしれない。ユビキチン様蛋白質やE1様酵素など、本来のユビキチン化とは異なる別のシステムの研究も、今後の一つの課題となるであろう。2年後のFASEB Summer Research Conferenceが楽しみである。

(沢田 均：北海道大学薬学部)

### 3. 病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会

本研究会は、臨床と基礎、そして製薬業界のコミュニケーションを図る目的で昨年発足したばかりである。名古屋大学産婦人科学講座の友田豊教授が本年も代表世話人として準備され、暑さがぶり返した8月20日(午後)－21日(午前)の

2日間にわたって、名古屋国際会議場で行われた。昨年は、愛知県医師会館での1日だけの集会であったが、今年は、基調講演（1題）、ワークショップ（5題）、シンポジウム（4題）、一般講演（9題）、ポスター（40題）の発表があり、規模が大きくなって出席者の数も200人近かったと思われる。以下、口頭発表を中心に、おおざっぱな内容を紹介します。

開会の辞のあと、まず、東大医学部2内の豊岡照彦博士により、基調講演「循環器疾患とプロテアーゼ/インヒビター：その発症、進展から診断と治療まで」が行われた。その要旨は、（1）臨床現場で、ACE (Angiotensin Converting Enzyme) 阻害薬が代表的な降圧剤として用いられ、昇圧因子の生成を阻止するとともに、その薬理作用として、降圧因子ブラジキニンを失活させる加水分解酵素をも阻害し、複合的に降圧作用がみられること、（2）アンジオテンシンIIなど血管収縮因子のCキナーゼ活性化による血管内膜肥厚作用、MMP・TIMP系も関与した動脈硬化の進展、（3）狭心症から心筋梗塞への進展で、治療として線溶系亢進薬、血小板凝集抑制薬の使用、（4）心筋梗塞の定量診断と治療では、カルパインによる虚血部心筋タンパク質の分解と微量定量による予後推定の可能性、カルパイン阻害剤の治療への可能性、（5）心不全の進展と治療では、ACE阻害薬が心不全末期のTNF $\alpha$ 誘導によるアポトーシスを抑制し、心筋を保護する役割があることなど、プロテアーゼをターゲットとした治療法の新展開について幅広く講演された。

ワークショップのテーマは「アルツハイマーとプロテアーゼ」で、石浦章一博士（東大分生研）がオーバービューをされ、種々の細胞内外プロテアーゼがAPP ( $\beta$ アミロイド前駆体タンパク質)のプロセシング酵素 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の各secretase)として候補に挙げられているが、その実体が未だに解明されていない現状を述べられた。続いて5人の演者によってそれぞれ最新の知見が披露された。駒野宏人博士（国立長寿医療研究センター）は、家族性アルツハイマー病の主要原因遺伝子の一つであるpresenilin1のミスセンス変異が、変異遺伝子導入神経細胞株を樹立することにより、A $\beta$ 42およびA $\beta$ x-42産生を上昇させ、APP代謝に影響を及ぼすことを示された。西

道隆臣博士（都臨床研）は、種々の $\beta$ アミロイド代謝産物に特異的な抗体を調製し、 $\beta$ アミロイドの生成・代謝過程の定量的な解析結果について、浜崎秀明博士は（北里大学医学部）、 $A\beta$ はカテプシンDによって代謝除去され、その分解低下がアミロイド形成の原因である可能性を話された。丸山敬博士（国立生理研）は、各種変異APPを培養細胞で発現させ、APPの仮想的分泌プロセッシング酵素である $\alpha$ セクレターゼは、特定配列を認識するのではなく、膜貫通領域から一定の長さの所で切断する酵素であることを示された。宮崎香博士（横浜市立大学木原研）は、APP分子内にgelatinaseA阻害領域をもつこと、またその一方で、gelatinaseAは $\alpha$  secretase様活性をもち、 $A\beta$ 領域を分解するとともに、さらに $A\beta$ 領域のN末端側上流でも切断してAPP遊離作用をもつことを示された。このあと、ポスター発表が2会場に分かれて行われ、癌転移、MMPやaminopeptidaseに関する発表が目立った。動物実験や組織、病理標本解析が多いのもこの研究会の特徴と思われる。夜には、同会議場の中空フロアで夜景を眺めながら懇親会が開かれ、名古屋大学病院・医学部の和太鼓グループや軽音楽グループのアトラクションもあった。

2日目のシンポジウムでは、「癌転移とプロテアーゼ」がテーマに取り上げられ、小川道雄博士（熊本大医2外）が序論および、臨床医の立場から、血行性遠隔転移の現状と阻止策について講演された。加藤紘博士（山口大医産婦人）が、扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして発見されたSCC抗原の分子構造・遺伝子構造と、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼの両方を阻害することなどの生化学的特徴、アポトーシス抑制能について発表された。清木元治博士（東大医科研）は、膜型MMP（MT-MMP）のgelatinase活性化にはモル比1：1以下のTIMP2の介在が必要であり、プロテアーゼのヘモペキシンドメインも関与して、MT1-MMP/TIMP2/gelatinaseAの3分子が複合体を形成し、遊離のpro-gelatinaseAを細胞表面にリクルートすることにより基質濃縮を行っていること、そして、複合体を形成していない過剰のMT-MMPがpro領域の分解除去を行っていることをin vitroで証明された。また、変異体のトランスフェクション実験を行って、活性化には細胞内ドメインを

介したMT1-MMPのクラスター形成が重要であることを示された。中島元夫博士（ノバルティスファーマ）は、各製薬会社が競って開発したプロテアーゼインヒビターの臨床応用面、特に悪性腫瘍の治療に関して現状を話された。シンポジウム後は、一般講演が引き続き行われ、癌の増殖・転移抑制に関して臨床的立場からの研究成果、MMPの活性化・制御機構や新規プロテアーゼ阻害剤の癌細胞増殖・転移の抑制効果などが発表された。大幅な時間を延長しての熱心な質疑応答があり、終了したのは午後1時30分を過ぎ、血糖値がかなり低下した頃であった。

ポスターを含めた発表演題に、今もっとも話題となっているcaspaseやproteasomeが殆ど見当たらなかったのは意外ではあったが、今後、この研究会はもっと規模が大きくなり、より広い分野の研究者が集まると予想される。日頃、臨床系の研究成果の発表を聞く機会のなかった小生にとっては、本研究会への参加は、視野を広くするのには絶好のチャンスであり、有意義に残暑きびしい2日間を過ごせたと思う。なお、来年度は、微生物化学研究所の青柳高明先生が代表世話役となり、今年と同様、名古屋国際会議場で8月21（金）、22日（土）の2日間にわたって開かれる予定です。

（牧正敏：名古屋大学農学部）

#### 4. プロテアーゼと病態：病因解析から創薬治療を目指して

酵素はプロテアーゼの発見から始まり、その医学的応用も古くから行われていた。初期の医学的応用は、消化酵素剤として消化器疾患への適応であったが、医学のほぼ全領域にわたるさまざまな疾患でプロテアーゼが重要な働きを示していることが明らかにされるにつれ、プロテアーゼとそのインヒビターを標的とした病因解析の試みと、創薬、治療への応用が多くの研究者の興味をとらえ、今や爆発的ないきおいで発展しつつある。現在研究の進んでいる主な項目について、病気の疾患別分類を指標にプロテアーゼとの関係を表にまとめる。現代医学のかかえる、主要な疾患のほとんどがプロテアーゼに関係していることがわかる。このような研究の中

で、先駆的成功例にHIV-1プロテアーゼ阻害剤のAIDS患者への応用があげられる。この場合、Reverse Transcriptaseの阻害剤と併用することによりHIV患者でのプロテアーゼ阻害剤は劇的な治療効果を発揮し、驚くべき死亡率の低下と、病状の改善が報告されている。この成功に続く第2,第3の試みが医学、生物学者の多くの期待を集めている時期に、「プロテアーゼと病態」と題したシンポジウムが第70回日本生化学大会プログラム委員会で計画された。

シンポジストとしては、心臓血管系疾患の中で、動脈硬化や心筋肥大、高血圧の研究領域で注目を集めているChymaseにつき島根医科大学薬理学教室と大阪医科大学薬理学教室のグループから奥西秀樹先生が代表で発表を行った。Angiotensin IからIIへの変換が、ヒトではAngiotensin I Converting Enzymeによる変換が30-40%、残りがChymaseで行われ、ChymaseによるAngiotensin IIの産生が主要であることを明らかにした。また動脈硬化巣、冠動脈硬化のバルーンによる治療後の再狭窄部位、高血圧による心肥大における平滑筋の増殖にChymaseによるAngiotensin IIの形成が関与していることを具体的に示した。これまでChymaseの特異的阻害剤の報告はないが、奥西等は独自に開発したChymase阻害剤の構造を明かにして、今後の展望を述べた。

一方、多くのウイルス疾患の中でウイルス自身の持つプロテアーゼはウイルス蛋白の細胞内プロセッシングに必須であり、その阻害剤がいかに有効であるかは、HIV-1プロテアーゼで証明済みである。同じ手法に基づくC型肝炎ウイルスのNS3プロテアーゼ阻害剤の開発が世界の多くの研究者によって行われているが、このテーマに関しては他のシンポジウムで取り上げられているため、今回は取り上げられなかった。一方ウイルスが細胞に感染するさいの感染細胞性トロピズムを決定している因子の1つにプロテアーゼが挙げられる。この点からウイルスの感染機序の解明と、ウイルス感染を抑制するプロテアーゼインヒビターにつき徳島大学分子酵素学研究所の木戸博が発表した。主にインフルエンザ、センダイウイルスの感染細胞性トロピズムを決定しているtryptase Claraと、その阻害物質としてのhuman mucus



protease inhibitorと肺サーファクタントの有効性、ならびにHIV-1感染時にその外膜糖蛋白質gp120と結合した後にこれを切断するtrypsin TL2の報告があった。trypsin TL2はプロテアーゼ作用の他に、Nucleoside diphosphate kinase様の作用を持ち、同じく木戸等のグループによって最近報告されたHSP70の新しい機能としてのNucleoside diphosphate kinaseと、ほとんど同一の性質を持つことからシャペロン機能を持ったプロテアーゼとしてウイルス侵入機序での役割が提案された。このことは、最近成人型T細胞白血病のレセプターとしてのHSP70様蛋白が発見されたことと関連して今後この方面での研究の進展が期待される。

癌の治療は、今や癌そのものを標的とする化学治療法の開発の困難さから、転移をおさえ癌組織そのものを手術ないし、放射線治療法で取り除いたほうが現実的であるという最近の研究の流れから、癌転移を制御する因子の解析が進んでいる。すなわち、癌細胞の周囲の結合組織破壊、つづいて血管への侵入、そして転移臓器での組織への接着と浸潤という一連の過程の中で、プロテアーゼが注目されている。結合組織や血管基底膜を構成している各種コラーゲンの分解にはGelatinase Aが関与しており、この酵素を活性化する膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼの活性化が癌転移の初期過程の中で重要とされている。MT1-MMPの発見者でその活性化機序の研究をリードしている東大、医科研の清木元治先生が最近の成果を報告した。特にProgelatinase Aの活性化機構に、メタロプロテアーゼインヒビターのTIMP-2が逆説的に必要な理由を見事に証明した。すなわちプロセッシングカスケードにTIMP-2が必要なのはMT1-MMPとTIMP-2の結合によってさらにProgelatinase Aの結合も可能になり3者の複合体が形成される。このようにして膜に結合したprogelatinase AがTIMP-2の結合していないMT1-MMPによって切断され活性化のカスケードが始まるという説である。このようなマトリックスの分解をつかさどるプロテアーゼ群は血管新生にも深くかかわっており、血管新生のメカニズムにおけるMT1-MMPの役割についても、今後の問題としてふれられた。

米国アグロン社のKrzysztof博士は、X線結晶解析の第一人者である。博士は、こ

れまでに解析したMatrix Metalloprotease群のX線結晶解析データを基にデザインした、インヒビターAG3340のデザインから癌転移モデル動物実験までのデータを順を追って詳細に紹介し、標的プロテアーゼから創薬までの道筋を明確に示した。

都臨床研の西道隆臣博士は、脳虚血とアルツハイマー病に伴う神経変性に焦点を絞り、神経変性疾患へのプロテアーゼの関与と、プロテアーゼインヒビターによる治療の可能性を示した。その1つは、脳虚血性神経変性に伴うカルパインの活性化が、時間的空間的に異なる2つの相（初期相と後期相）から成り立っていることを見い出している。初期相でのカルパインの活性化による何らかのシグナルが周囲の組織に伝達され、細胞死とリンクした後期相を誘くとの仮説を立てた。後期相でのカルパインの活性化を阻害剤を投与することで抑制し、ひいては脳虚血による神経細胞死を抑制できると報告している。一方、アルツハイマー病の老人斑形成の主要な物質は $\beta$ アミロイドとされているが、このN末端構造がきわめて多様でしかも修飾されていることを明らかにして、アミロイド蛋白のアミノペプチダーゼによる分解の低下が $\beta$ アミロイドの蓄積の原因になるという仮説を提唱している。この仮説が正しいか否かは今後の検討をまたねばならないが、発病に至るまでの時間の長さから考えてアルツハイマー病の予防と治療を考える1つの標的を明確に提示した。

今回、Leif. R. Lund博士によるPlasminogenのノックアウトと創傷治癒に関する講演が予定されていたが、急性肺炎による入院というアクシデントがあり、博士の研究の最近の進展を聞くことが出来なかった点が心残りであった。Plasminogenは、線液系のプロテアーゼとして最初に報告されたが、細胞増殖、血管新生、組織修復で中心的役割を果たしていることが明かになってきている。博士のさらなる研究の進展は、またの機会に聞けるものと思う。シンポジウムの印象としては、全体として活発に討論され時間が大幅に延長してしまったが、幅広い領域から研究者が集まり、1つの疾患を中心に専門的知識や情報を交換できて有益な場であったと考える。このような研究の中から世界に先駆ける独創的研究が生まれることを期待してやまない。

（木戸博：徳島大学分子酵素学研究所）



# I: Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors

Disease	Protease	Inhibitor
<b>1. INFECTIOUS DISEASE</b>		
<b>Virus</b>		
Adeno virus	(Viral protease) Adeno 23K (Serine)	
Sindbis virus	Sindbis nsP2 (Serine)	
Yellow fever virus	Yellow fever NS3 (Serine)	
HCV	Hepatitis C NS3 (Serine)	(+)
Poliovirus	Polio 2A, 3C (Cysteine)	
Rhinovirus	Rhino 2A, 3C (Cysteine)	
HAV	HA 3C (Cysteine)	
EMC virus	EMCVL protein (Cysteine)	
FMD virus	FMDVL protein (Cysteine)	
HIV-1	HIV-1 PR (Aspartic)	HIV-1 PR inhibitors (+)
HIV-2	HIV-2 PR (Aspartic)	
HTLV-1	HTLV-1 PR (Aspartic)	
	(Cellular protease)	
Influenza virus and Sendai virus	Tryptase Clara, Factor Xa (?)	MPI, Pneumony Surfactant, Aprotinin (+)
HIV-1	Tryptase TL2 (?)	
<b>2. CARDIOVASCULAR SYSTEM and BLOOD COAGULATION</b>		
Hypertension	Renin, Angiotensin Converting Enzyme, Chymase	ACE inhibitor (Captopril) (+)
Atherosclerosis	Chymase (Angiotensin I, bigETs)	
Infarction and Apoptosis	Calpain, Cathepsin(s), Caspase, Proteasome	
Disorders of the Cardiovascular system and Collapse	Kallikrein, Plasmin, Plasminogen activator, Cathepsins, Encaphalinase	UTI, Aprotinin (+)
Coagulation and Fibrinolysis	Blood clotting factors Plasminogen activator, plasminogen, plasmin	
<b>3. NEOPLASMA and WOUND HEALING</b>		
Tumor invasion	Matrix metalloproteases (Gelatinase A, MTI-MMP etc.)	
	Urokinase, Plasmin, Cathepsin B	(+)
Angiogenesis and Wound healing	Plasminogen activator, Matrix metalloproteases	Angiostatin (+)
<b>4. INFLAMMATION</b>		
Allergy	Mast cell proteases (Chymase, tryptase)	(+)
Psoriasis	Tryptase	
Interstitial inflammation and fibrosis	Mast cell proteases and Granulocyte Proteases	
Nephritis, Myositis, Liver cirrhosis		
Pneumonia, Emphysema	Leukocyte elastase	(+)
Pancreatitis	Trypsin, Chymotrypsin	UTI, Trypsin inhibitors
<b>5. OTHERS</b>		
Osteoporosis	Cathepsin K	(+)
Antigen-presentation	Cathepsin B, Proteasome	

## (4) ミニレビュー

### 1. 植物の液胞と細胞死

#### 植物の細胞死

動物細胞の自殺型細胞死としてすっかり定着してしまったアポトーシスという言葉は、「植物の枯れ葉が落ちる」という意味のギリシャ語に由来している。植物の葉の枯死については、例えば、イネの葉が、実の生る時期に一齐に葉を枯らし、その分解成分を実の方へ転流するという事は良く知られている。しかし、こういった植物の葉の細胞死は古くからセネッセンスあるいは老化と呼ばれ、アポトーシスとは言わない。落葉は実質的には”アポトーシス”であるにも関わらず、アポトーシスという言葉は使うことができなくなってしまった。皮肉なことであるが、動物細胞のアポトーシスで決められた定義が植物細胞の死に当てはまらないことが多いからである。マクロファージもサイトカインも持たないのであるから死に方が異なるのも当然かもしれない。

動物細胞でも、アポトーシス以外にプログラムされた細胞死が報告されているように、植物細胞でも様々なプログラム細胞死が知られている。詳しくは、良い総説が出ているのでそちらをご覧ください<sup>1)</sup>。身近な所では、私たちが主食としているコメの胚乳は、発芽に伴って崩壊して、栄養分を胚へ転流する。花の雄しべの先についた葯は花粉が成熟するとそれを放出するために一部の細胞群が退化する。根から吸った水分の通り道である道管は、死んだ細胞からできている。また、病原体の感染に対しては、免疫系を持たない植物は、感染部周辺の細胞を死なせて（過敏反応死）、病原体の侵入を防ぐ。これらを含む植物の細胞死に関する分子レベルの解析は、今後の研究に待たねばならないが、いわゆる死の実行については、多くの場合、液胞内の分解系が主役を果たしていると考えられている。

## 細胞死に至る過程で誘導されるプロテアーゼと液胞プロセシング酵素

細胞死を予定されている植物組織に発現誘導されてくるプロテアーゼの多くは、システインプロテアーゼである。タバコの葯の一部の細胞<sup>2)</sup>、カーネーションの花<sup>3)</sup>、デイリリーの花<sup>4)</sup>、エンドウの胚珠 (tpp)<sup>5)</sup>、イネの胚乳 (oryzain)<sup>6)</sup>などの細胞死の前に誘導されてくる外、乾燥ストレスを受けたアラビドプシ (RD21)<sup>7)</sup>、や低温傷害を受けたトマト<sup>8)</sup>、で誘導されてくることが報告されている。これらのプロテアーゼは、奇しくも、線虫のCED3や哺乳動物のCaspase<sup>2)</sup>と同様にシステインを活性中心に持つが、アポトーシス関連のプロテアーゼの活性部位に当たるQACRG配列は持たない。面白いことは、これらのセネッセンスやストレスで誘導されるシステインプロテアーゼは互いに相同でパパイニンファミリーに属しているが、それらの前駆体はC末端側に10 kDa程のプロペプチドを持っていることである。このプロペプチドはパパイニン自身には存在しない。このタイプのプロテアーゼで最も良く研究されているのは、キーウィ果実のActinidin<sup>9)</sup>であるが、そのアナロジーから、これらのプロテアーゼは、1) 液胞に局在していること、2) C末端側のプロペプチドの除去によって活性型に変換すること、3) プロペプチドの除去がアスパラギン残基のカルボニル基側で起こっていることなどが分かってきた。

上記の3点から、液胞内で前駆体タンパク質のアスパラギン残基を認識してそのカルボニル基側のペプチド結合を切断する液胞プロセシング酵素 (Vacuolar Processing Enzyme; **VPE**) の関与が浮上してきた。VPEは、種子の液胞タンパク質の成熟化に関わる酵素として発見されたものであるが<sup>10)</sup>、花粉の放出のために急激に退化するCircular Cell Cluster (環状細胞塊) やセネッセンス前の葉の細胞などで発現する栄養器官型VPEが存在することが最近分かってきた<sup>11,12)</sup>。このVPEは、セネッセンス時に働くプロテアーゼの活性発現の制御を担っていると考えられる。VPEの組織特異的また時期特異的な発現を調べると、VPEがセネッセンスのみでなく先に述べた病原体の感染や傷害にも応答して誘導されてくることが分かってきた。この時のVPEのターゲットと考えられるのは、感染抵抗性タンパク質Chitinase<sup>13)</sup>や

傷害で誘導されるProteinase inhibitor<sup>14)</sup>などである。これらの液胞タンパク質もやはりアスパラギン残基のカルボニル基側でプロセスされ、活性を持つ分子に変換することが知られている。VPEは細胞が死に至るときあるいは分化転換しようとするときなど、非定常状態にある時の液胞で強く発現し、液胞の機能分化をコントロールしている。

#### 液胞内プロテアーゼ：液胞プロセシング酵素とCathepsin D様プロテアーゼ

VPEは、新規のシステインプロテイナーゼで、パパインなど既知のシステインプロテイナーゼとは相同性がなく、動物のホモログとしては住血吸虫のSM32と最近データベースに登録されたヒト由来のものが知られている。動物細胞のVPEホモログの局在性や機能についても解析が待たれるところである。

高等植物のもう一つのプロテアーゼとして、Cathepsin D様の酸性プロテアーゼ

(Aspartic Proteinase: AP)がある。植物のAPは、Cathepsin Dに比べ、13 kDa程の挿入領域を持ち、S-S結合で架橋された2本のポリペプチドからなる。種子に多量に発現していることは知られているが、生理学的な役割は不明である。基質特異性も広く、種子の液胞タンパク質の成熟化には直接関与せず、VPEの働きによって遊離してくるプロペプチドの消化に関わっていることが分かってきた<sup>15)</sup>。動物細胞でも、Cathepsin Dとプログラムされた細胞死との関連が報告されているが<sup>16)</sup>、植物細胞でもAPが細胞死と関わりがある可能性も生じてくるかもしれない。

以上、植物の細胞死と液胞の分解系との関係を駆け足で述べてきた。動物細胞の死におけるリソソームの分解系の関連がクローズアップされてきているが、今後のリソソームの研究にも期待を寄せている(本誌第2号, p.47)。

#### おわりに

高等植物の液胞は、動物細胞のリソソームと対比されてきた。以来、動物の培養細胞を用いた優れた研究は、植物の液胞タンパク質の生合成や小胞輸送の研究にとって多くの有益な知見を与えてくれた。しかしその一方で、動物の研究成果をそのまま植物の系に当てはめて考えることによって見逃してしまう現象がいかにも多い

かということも私達に教えてくれた。最近の植物の液胞に関する研究は、少しずつではあるが、そこから脱却しつつあるようで嬉しい（植物細胞生物屋として）。高等植物は、どんなに周りの環境が劣悪になってもそこから逃げ出すことができない。自分自身をその環境に合わせるように変えていく。この植物細胞のもつ転換能力を支えるように、液胞も大きく変身する能力を持っている<sup>18)</sup>。この機会に是非、「植物の液胞は細胞の大部分を占め、ひたすら膨圧の維持に努めているだけの構造体」というイメージを少しでも良くしていただければ幸いである。現在でも高校の生物の教科書では、植物の液胞は生命活動に直接関わらない後形質（原形質に対して）でありオルガネラではないとしている。この記述が書き換えられる日が近いことを願っている。

#### 文献

- (1) 福田裕穂 (1996) 化学と生物 **34**: 586-594
- (2) Goldberg, R. G., Beals, T. P., Sanders, P.M. (1993) *Plant Cell*, **5**: 1217-1229
- (3) Jones, M. L., Larsen, P. B., Woodson, W. R. (1995) *Plant Mol. Biol.*, **28**: 505-512
- (4) Valpuesta, V., Lange, N. E., Guerrero, C., Reid, M. S. (1995) *Plant Mol. Biol.*, **28**: 575-582
- (5) Granell, A., Harris, N., Pisabarro, A. G., Carbonell, J. (1992) *Plant J.*, **2**: 907-915
- (6) Watanabe, H., Abe, K., Emori, Y., Hosoyama, H., Arai, S. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**: 16897-16902
- (7) Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H., Shinozaki, K. (1993) *Gene*, **129**: 175-182
- (8) Schaffer, M. A., Fischer, R. L. (1988) *Plant Physiol.*, **87**: 431-436
- (9) Paul, W., Amiss, J., Try, R., Praekelt, U., Scott, R., Smith, H. (1995) *Plant Physiol.*, **108**, 261-268
- (10) Hara-Nishimura, I., Takeuchi, Y., Nishimura, M. (1993) *Plant Cell*, **5**: 1651-1659
- (11) Kinoshita, T., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (1995) *Plant Mol. Biol.*, **29**: 81-89
- (12) 西村いくこ (1997) 蛋白質 核酸 酵素, 臨時増刊号, プロテオリシス, 印刷中
- (13) Stiche, L., Hofsteenge, J., Neuhaus, J.-M., Boller, T., Meins, F. J. (1993) *Plant Physiol.*, **101**: 1239-1247
- (14) Graham, J. S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, H. L., Ryan, C. A. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**: 6555-6560
- (15) Hiraiwa, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (1997) *Eur. J. Biochem.*,

246: 133-141

- (16) Deiss, L. P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O., Kimchi, A. (1996) EMBO J., 15: 3861-3870
- (17) 西村いくこ (1995) 細胞工学, 7: 99-109

(西村いくこ：基礎生物学研究所・細胞機構)

## 2. がん遺伝子発現に伴うアポトーシスとユビキチン系

### なぜカスパーでないのか

アポトーシス制御にユビキチン系が関与していると考えている私たち小田研究室のメンバーは、現在の「アポトーシス」研究者たちの中では極少数派である。もちろん、カスパー (Caspase) の活性化カスケードの存在を否定しているわけではないし、それらがユビキチン系により活性化され、またはユビキチン系を活性化する可能性も否定していない。しかし、残念ながら(?)、私たちの実験系 (アデノウイルスE1Aがん遺伝子産物によるヒト上皮様がん細胞株のアポトーシス誘導) では、カスパーの関与がアポトーシス誘導に主要な役割を果たすというデータが得られていない。

先日コールドスプリングハーバー研究所 (CSHL) で行われた "Programmed Cell Death" のミーティングでは、Fas/TNF- $\alpha$  の系以外では、カスパーカスケードの活性化にミトコンドリアに存在する Apaf-1 (線虫の Ced4 のホモログ) とシトクロム C (Cyt-C) が関与するという考え方をする人が多かったように感じた。口頭発表では、この「セントラルドグマ」に「自分の系を当てはめる」ことを主眼にした研究も見られたが、Apaf-1 や Cyt-C の関与が明確に示されていても、「なにが」それらを活性化するのかよく分からないことが多いように感じた。多くの系におけるアポトーシス進行にカスパーの関与が認められるものの、現時点ではなにがそれらを活性化するかについては十分に解明されたわけではない。特にがん遺伝子発現に伴うアポトーシスに関しては、アデノウイルスE1Aのみならず、Myc に関しても未解明である。これらについては、ミトコンドリアの変性を発端とするカスパーカスケードの活



性化のみでアポトーシス誘導機構を説明することは困難であると感じる。実際、今回のCSHLミーティングでも、いくつかの発表でカススペースの活性化を認める一方、それらのアポトーシス進行への関与が認められないとするものがあった。また、p53依存的なアポトーシスに関して言えば、アポトーシス誘導に先立つp53の安定化には、正常な状態においてp53の分解に関わっているユビキチン系、またはカルパインの不活化が必要なはずである。この機構に関しては放射線と紫外線照射によるp53安定化に関してC. G. Makiらの報告が提出されているが、カススペースの関与云々は全く不明である。線虫という単純化された系におけるCed-3とCed-4の遺伝的解析に合致する結果として、そのホモログであるカススペースやApaf-1が高等動物のいくつかのアポトーシスに関与することが明確に示されたことは、アポトーシスの機構を解明する上で非常に重要なことである。しかし、それで高等動物におけるアポトーシスの機構が全て説明できる訳ではない。アポトーシスの機構には未だ大きなブラックボックスが残されている。

本稿では私達の研究の経緯と解析結果を記述し、なぜがん遺伝子によるアポトーシス誘導にユビキチン系が関与すると主張しているか、解説を試みたい。

### 研究の発端

1992年、L. RaoらがアデノウイルスE1A遺伝子の発現がアポトーシスを誘導し、E1B19k蛋白がそれを抑制することを報告した(1)。それは、アポトーシスの機構に興味を持っていた私が実際に研究を開始するに当たり、ボスである小田鈞一郎教授を説得するのにまたとないチャンスだった。

それまでは、形質転換に伴うフィブロネクチン (FN) 遺伝子の転写抑制機構を調べるため、E1Aをがん遺伝子のモデルとしてその発現に伴い活性化する因子の結合モチーフと役割をラットFNプロモーター領域で解析していた。E1Aは細胞内の種々の因子と結合することで転写を正または負に制御するが、同時にG1期からS期への移行を抑制している癌抑制因子Rbやp53の機能を解除し、または乗り越えるよう、細胞内の制御を修飾することで細胞周期の進行を促進する。E1Aによる形質転換の

成立には、rasやE1B遺伝子の発現が必要とされていた。がん遺伝子としてのE1Bの機能が十分理解できていなかった当時、DNA合成の促進のみではなく、プロテインキナーゼカスケードの活性化等も形質転換には必要で、このことが複数の遺伝子変異による多段階発がんの概念を支持する実験的根拠の一つと考えていた。多段階発がんの概念は揺るぎないが、まさかS期進行の促進がアポトーシスを惹起し、アポトーシスの抑制が形質転換の成立に必要なとは、考えもしなかった。しかし、実際のがん組織を取り出すと、特に悪性のがん組織内にピクノーシス (Pycnosis、核凝縮) を起こした細胞を多く見出すときがあるという。おそらく、がん化にともなう細胞周期の脱制御がアポトーシスを引き起こすのだろう。L. Raoらの論文は、それまで「現象としておもしろい」と思っていたアポトーシスの分子機構を、がん化や細胞周期の機構との関連から本格的に解析する糸口を与えてくれたのである。

さっそくボスの同意を得て実験系の構築を始めた。E. WhiteやT. SubramanianらのE1B19k遺伝子変異アデノウイルス株に関する論文(2, 3)を元に、E1Aにより最も効率よく死ぬと推定されたヒト上皮様癌細胞株KBに、ホルモン誘導性のプロモーター、マウス乳ガンウイルス(MMTV) LTRを負荷したE1A 12S cDNAを導入した。樹立した細胞株はホルモン(デキサメタゾン、dex)を投与しE1Aの発現を誘導すると、効率よくアポトーシスを起こして死滅した。親株のKBはdex投与により増殖速度がわずかに落ちる程度でほとんど影響を受けなかったから、E1Aの発現がアポトーシスを引き起こしたのは明白であった。E1Aを発現する細胞株の中からMA1と命名した細胞株を選び、構成的に強く発現するヒト $\beta$ -アクチンプロモーターを付加したE1B19k遺伝子やBcl-2遺伝子を導入した結果、それらは発現レベル依存的にアポトーシスを抑制するが、E1A蛋白の発現レベルや安定化して蓄積されるp53蛋白のレベルには全く影響しないことが分った。また、MA1細胞の細胞周期はp53蛋白のレベルが最大となった後、完全に停止しないもののG1期に蓄積するが、E1B19k蛋白やBcl-2蛋白の発現はこの変化にも全く影響しなかった(未発表データ)。これらのことから、E1B19k蛋白やBcl-2蛋白はアポトーシスにおける細胞変性の開始(execution)を

抑制していると推定した(4)。

樹立した細胞株を用いてアポトーシスの分子機構を解析するのに際して、共通の形態変化である細胞核の変性（クロマチンの凝縮やDNA断片化）に注目した。共通の形態変化がある以上、その変化を起こすのに必要な限られた数の標的分子、または機能の破壊が起こるはずである。様々なアポトーシス誘導シグナルは細胞内で変換された後、その標的を破壊する経路へ導かれると考えた。共通の標的を特定し、その破壊機構からアポトーシスの分子機構を探ろうと考えた。

#### トポイソメラーゼII $\alpha$ の分解とアポトーシス

クロマチンの構造異常惹起に関わる標的蛋白は、核マトリックスや核ラミナを構成する蛋白群、DNA合成や転写の時にDNAトポロジーの維持に関与するトポイソメラーゼ群やヘリカーゼ群が推定された。そこでまず哺乳動物細胞で報告されていた3種のトポイソメラーゼI、II $\alpha$ 、II $\beta$ のレベルの経時変化をdex投与後のMA1細胞、およびMA1細胞から樹立したE1B19kまたはBcl-2発現細胞株について調べた。その結果、トポイソメラーゼIとII $\beta$ のレベルは殆ど変化しないこと、トポイソメラーゼII $\alpha$ はdex投与36時間後には50%、48時間後には1%近くまでposttranscriptionalに減少（分解）することが分った(4)。またトポイソメラーゼII $\alpha$ 分解は、p53蛋白が最高レベルに蓄積されるdex投与24時間以後に起こること、DNA断片化や単離細胞核のDNaseI感受性増加がdex投与48時間以後に認められるのに対し12時間以上早く起こること、E1B19kやBcl-2の発現レベルに応じてアポトーシス同様に抑制されることがわかった(4)。その後、カスペーシスの基質と言われるラミンA/C、ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ（PARP）の分解も検証したが、dex投与後もラミンは全く変化せず、PARPはトポイソメラーゼII $\alpha$ 同様36時間以後一部分解したが、90%以上の細胞が死滅した72時間後になっても50%以上が未分解のままであった。これらのことは、トポイソメラーゼII $\alpha$ の分解がそれ以後に起こる細胞核変性過程に先行する重要なイベントであることを示している。PARPを基質とするカスペーシス3の関与については今後の解析で明らかにしたい。

ところで、アポトーシスにおけるクロマチンDNAの断片化は、核/染色体マトリックスへの結合領域 (MAR) での切断が契機となっておこる(5)。MARはトポイソメラーゼIIの結合部位で、DNAトポロジーの維持に必須の領域である。トポイソメラーゼIIの損失はMARを介するクロマチンDNAの構造維持機構の損失を意味し、クロマチン構造の変性を惹起すると推定される。トポイソメラーゼIIの2種のアイソザイムのうち、トポイソメラーゼII $\alpha$ は細胞周期による発現制御を受けており、S後期からM終期までもっとも高く発現して細胞核 (染色体) に局在し、染色分体の形成と分離を司る(6-9)。トポイソメラーゼII $\beta$ は細胞周期を通じて発現している(6)が、増殖中の細胞ではトポイソメラーゼII $\alpha$ に比べてその発現レベルは低く(9)、終末分化して増殖能を失った細胞で強く発現する(9)ため、その主機能は転写や複製に伴うDNAトポロジーの維持と推定される。MA1細胞ではトポイソメラーゼII $\alpha$ のレベルはトポイソメラーゼII $\beta$ に比べて10倍以上高く、その分解による急激な損失がクロマチンDNA断片化の引き金となる可能性は高い。

#### トポイソメラーゼII $\alpha$ 分解機構

トポイソメラーゼII $\alpha$ の減少機構を解析する上で、その細胞周期依存的な発現と消失のパターンは大変示唆的であった。サイクリンBのそれと、分解の時期が僅かに異なる以外、そっくりだったからである。サイクリンBはM中期/M後期移行期に、20Sサイクロソームによりユビキチン化された後、プロテアソームで分解される(10, 11)。サイクリンBのユビキチン化は、N末端側にある分解認識アミノ酸配列を介して起こる(12)が、トポイソメラーゼII $\alpha$ のN末端側にも類似の配列が存在した。また、核マトリックスに含まれるトポイソメラーゼII $\alpha$ 、および免疫沈降法で調製したトポイソメラーゼII $\alpha$ は、アポトーシス誘導後 (42 h) のMA1細胞S10抽出液 (S10-42、プロテアソームを含む粗抽出液) 中で、ATPとユビキチン依存的に強く分解された(13)。この分解活性はアポトーシスを誘導していないMA1細胞 (0 h) のS10抽出液 (S10-0) 中では弱いこと、アポトーシス抑制因子の発現レベルに応じて抑制されることが分った。一方、トポイソメラーゼII $\beta$ はこれらS10抽出液中で全く分解されな

かった。S10-42とS10-0からそれぞれプロテアソームを遠心分離によって除去したS100-42、S100-0を用いて調べた結果、S100-42ではトポイソメラーゼII $\alpha$ ユビキチン化活性が増加していた。このことから、E1A誘導アポトーシスの過程でトポイソメラーゼII $\alpha$ をユビキチン化する酵素が活性化し、トポイソメラーゼII $\alpha$ 分解が亢進することが示唆された(13)。トポイソメラーゼII $\alpha$ に対するユビキチン化活性をユビキチンセファロースカラム法とResource-Qカラムで分画した結果、トポイソメラーゼII $\alpha$ のユビキチン化にはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) が必要であること、E1A誘導アポトーシスでは、このうちE2 (分子量約20kDa) が増加することが分った(14)。遺伝子の転写を正、および負に制御するが、トポイソメラーゼII $\alpha$  特異的なE2の発現を活性化することでトポイソメラーゼII $\alpha$ の分解・損失を亢進させ、アポトーシスを誘導すると推定される。ユビキチン系の制御の修飾がアポトーシスに重要な役割を果たしている可能性が高いのである。

#### p53分解の抑制

MA1細胞では、dex投与によってE1Aが発現するとそのレベルの上昇を追うようにがん抑制因子p53のレベルが上昇し、24時間後には最高レベルに達する。この上昇は、N末端側のアポトーシス誘導領域を欠失したE1Aの変異体では起こらない。MA1細胞におけるE1A誘導アポトーシスにおいて、p53レベルの上昇が必要かどうかは重要な問題の一つであるが、それを論議しなくてもE1Aの発現に対する最も早い反応としてp53の分解抑制が起こることは事実である。p53はユビキチン系(15, 16)とカルパイン(17, 18)によって分解されるが、E1Aに応答して起こるp53レベルの上昇は、どちらの機構が抑制されて起こるのだろうか。この機構を調べるために、dex未投与のMA1細胞 (0) と、dex投与24時間後のMA1細胞 (24) からそれぞれS10抽出液 (S10-0、S10-24) とS100抽出液 (S100-0、S100-24) を調製した。S10-24とS100-24には高レベルのp53が含まれるが、S10-0とS100-0には含まれない。それぞれS10-24またはS100-24中のp53を基質とし、S10-0およびS100-0中のp53分解活性を解析した。



その結果、S10-0とS100-0に含まれるp53ユビキチン化活性が、S10-24とS100-24では認められないこと、カルパインの活性はどちらも変わらないことが分った。このことは、E1A誘導アポトーシスの極めて早い段階で、ユビキチン系の制御に修飾が起こっていることを示唆する。

#### おわりに

p53の安定化からトポイソメラーゼII $\alpha$ 分解までの間になにが起こっているのかは、今後の解析を待たねばならない。しかし、前述したようにE1Aは種々の細胞内因子との会合を介して様々な遺伝子の転写を制御し、細胞周期に影響を与える。転写制御や細胞周期に影響を与える点では、MycやFos、Jun、E2F等も同様である。細胞周期の制御にユビキチン系が深く関与していることは最近の研究により明らかである(10, 19-24)から、がん遺伝子による細胞周期の脱制御とそれに連関した転写制御の異常が起きれば、それに対する応答としてユビキチン系の制御に修飾が起こるだろうし、その結果トポイソメラーゼII $\alpha$ の分解によるアポトーシスが起こっても不思議ではない。

私達の研究結果をみて、「プロテアソーム阻害剤を投与して見ろ、君の系のアポトーシスは抑制できないだろう。だからトポイソメラーゼのユビキチン化亢進がアポトーシスを起こすなんて言うのは、ばかげた考えだ。」と意見する研究者がおられる。プロテアソームの機能をここで解説したら、墓穴を掘るので（もう十分に掘ってしまった？）、省略させていただく。が、ユビキチン系は、蛋白分解やプロセッシングのための基質特異的修飾機構である。従って例えば、トポイソメラーゼII $\alpha$ のユビキチン化のみを阻害できればE1A誘導アポトーシスにおけるクロマチンの変性を抑制できるかもしれない。今後の研究においては、プロテアソームとセットで考えるべきではないように思う。

#### 文献

1. Rao, L. et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 7742-7746
2. White, E. et al., (1984) J. Virol., 52, 410-419

3. Subramanian, T. et al., (1984) *J. Virol.*, 52, 336-343
4. Nakajima, T. et al., (1995) *Oncogene*, 10, 651-662
5. Lagarkova, M. A. et al., (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 20239-20241
6. Woessner, R. D. et al., (1991) *Cell Growth Differ.*, 2, 209-214
7. Goswami, P. C. et al., (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1500-1508
8. Adachi, N. et al., (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 230, 105-109
9. Turley, H. et al., (1997) *Br. J. Cancer*, 75, 1340-1346
10. King, R. W. et al., (1995) *Cell*, 81, 279-288
11. Sudakin, V. et al., (1995) *Mol. Biol. Cell.*, 6, 185-197
12. Glotzer, M. et al., (1991) *Nature*, 349, 132-138
13. Nakajima, T. et al., (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 24842-24849
14. Nakajima, T. et al., (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, revised
15. Maki, C. G. et al., (1996) *Cancer Res*, 56, 2649-2654
16. Maki, C. G. and Howley, P. M. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, 17, 355-363
17. Kubbutat, M. H. G. and Vousden, K. H. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, 17, 460-468
18. Pariat, M. et al., (1997) *Mol. Cell. Biol.*, 17, 2806-2815
19. Ciechanover, A. (1994) *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 375, 565-581
20. Tsurumi, C. et al., (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 15, 5682-5687
21. Aristarkhov, A (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93, 4294-4299
22. Hateboer, G. et al., (1996) *Genes. Dev.*, 10, 2960-2970
23. Hofmann, T. et al., (1996) *Genes Dev.*, 10, 2949-2959
24. Diehl, J. A. et al., (1997) *Genes Dev.*, 11, 957-972

(中島琢磨：東京理科大・基礎工学部・生物工学)

### 3. Kex2 型蛋白分解酵素 Furin と細胞高次機能

#### 1. Furin 研究の歴史的背景

1967年 D. Steiner はインスリンが前駆体プロインスリンとして生合成されることを報告し、インスリンはプロインスリンから酵素反応によって切断されると予測した(1)。その後カテプシンBがこの切断を行うと考えられた時代もあったが、Steiner らによって1990年に正しい酵素 PC2 (PC=Prohormone Convertase) が同定された(2)。しかし、PC2 と相同性をもつ切断酵素はすでに1984年に酵母からクローニングされていた(3)。この酵素は酵母が産生するキラ毒素や $\alpha$ 接合因子の前駆体を切断し、活性型に転換する。この遺伝子を欠損している酵母は前駆体

を切断できない変異株 Kex2 (killer expression 2) として同定されていた。

1989年 Fuller らは Kex2 遺伝子と相同性の高い *fur* 遺伝子を DNA データベースから検索した (4)。この遺伝子は、ヒトの *fes/fps protooncogene* の遺伝子構造を解析している際、その遺伝子上流に約 4.5 kb の mRNA をコードしている転写部分 (transcription unit) として同定され、*fur* (fes/fps upstream region) と名付けられ、その蛋白産物は *furin* と命名された (5)。この *furin* と Kex2 は約 50% の相同性を持ち、*furin* は高等動物のプロセシング酵素であろうと推測された (4)。事実 G. Thomas のグループは、*furin* 遺伝子と神経成長因子  $\beta$ -NGF 遺伝子をプロセシング能がない BSC-40 細胞に導入し、 $\beta$ -NGF 前駆体が生理活性型に転換されることを報告した (6)。

D. Steiner のグループは、先に述べたように Kex2 遺伝子の一部を DNA プローブとしてヒトのインスリノーマライブラリーから Kex2 と相同性の高い cDNA をクローニングし、PC2 と名付けた (2)。その後次々と相同性のある限定切断酵素 PC1/PC3, PC4, PACE4, PC5/PC6, PC7, PC8 がクローニングされている。これらの Kex2 ファミリー酵素はいずれも、N 端プロ領域の後に約 300 アミノ酸残基からなる触媒領域が続く。触媒領域はセリンプロテアーゼの酵素活性に必須のアスパラギン酸、ヒスチジン、セリンを含み、他の領域に比して相互の相同性が非常に高い。その後にホモB領域またはP領域と呼ばれる部分が続き、さらに Kex2 と *furin* は細胞膜貫通配列をもつ。*furin* はER から Golgi 膜に移行する際にN端プロ領域の切断が必要である (7)。Kex2 と *furin* は TGN に存在するが、最近 *furin* の細胞質領域約 60 残基中には *furin* が TGN と細胞膜をリサイクリングするシグナルが含まれていることが分かった (8, 9)。*furin* と PACE4 は  $-\text{Arg}^4\text{-X-X-Arg}^1$  (RXXR) を切断するが、*furin* の方が PACE4 より基質スペクトラムが広い。RXXR 切断配列は多くの成長因子、循環調節ペプチド、血清蛋白、ウィルス膜蛋白、受容体等に見られる (Table 1 参照)。これら RXXR 配列をもつ前駆体蛋白の中で、*furin* の切断によって活性型に転換されることが証明されたものは TGF $\beta$  (10), PTHrP (11), BNP

(12), ストロームライシン-3 (13), インスリン受容体 (14), HGF 受容体 (15) である。前駆体蛋白が furin によって切断されるかどうかを調べるには、furin 遺伝子を欠損しているヒト大腸癌由来 LoVo 細胞がしばしば用いられる。この細胞で発現させた RXXR をもつ前駆体蛋白が切断されずに分泌され、furin を導入した LoVo 細胞で切断されれば、furin が切断に関与していると考えるのである (15)。この LoVo 細胞は、furin を欠損しているが PACE4 はもっているため、RXXR をもつ前駆体蛋白は切断される可能性があるが、これ迄のところ PACE4 で特異的に切断をうける前駆体は報告されていない。

furin はほとんどの細胞のトランスゴルジネットワーク (TGN) に局在するとされているが、種々の細胞や組織で furin 発現を調べると、その発現は肝細胞では高く、膵β細胞ではきわめて低い。ところで、成長因子の中には PDGF, IGF1 のように増殖をおこすものと、TGFβ, アクチビンのように分化を誘導するものがある。また、血清蛋白にもアルブミンのように分化した肝細胞から分泌されるものや、補体, プラスミノゲンアクチベーターのように急性期の反応産物として産生されるものがある。循環調節因子のエンドセリンは増殖時の血管内皮で発現が高いが、CNP は分化状態の内皮細胞で高発現する。そうすると、furin は細胞が分化状態でも増殖状態でも発現しているのだろうか。これ迄に Kex2 ファミリー酵素の構造と酵素学的研究は大きく発展してきた (16)。しかしその生物学的、生理学的意義についての研究は最近始まったばかりであり、本稿では高次機能を有する膵β細胞, 心筋, 胃粘膜上皮細胞の 3 つの細胞系で furin の役割について考察する。

## 2. 細胞高次機能と furin 発現

i) 膵β細胞 インスリンは膵β細胞で前駆体プロインスリンとして産生され、プロインスリンは PC2 と PC3、カルボキシペプチダーゼによってインスリンに転換される。私の研究室で膵β細胞を用いて furin の研究を行うことになったきっかけは、分化度の高い (別の言葉で言えばインスリン含量が多く、増殖速度が遅い) 膵β細胞株 (MIN6, βHC9 など)、分化度の低い (インスリン含量が少なく、増殖が速い)

膵β細胞株 (RINm5F, HIT-T15 など)、その中間に位置する βTC3 で PC2, PC3, で furin の発現を比較したところ、分化度の低い細胞株では PC2 と PC3 発現はほとんど見られなかったが、furin 発現がきわめて高かったので、furin の生物学的役割に注目したことによる。

分化度の高い MIN6 は当然 PC2, PC3 を高発現しているが、furin をほとんど含んでいない。そこで MIN6 に furin を発現させると、インスリンの含量の低下、PC2 と PC3 の発現減少、グルコース刺激によるインスリン分泌能の減少が見られた (17)。これらはインスリン非依存型糖尿病のインスリン分泌障害の特徴である。更に、furin を発現させた MIN6-F 株は親株より速い増殖カーブを示した (18)。furin は正常膵島でも増殖期、即ちラットでは胎生期から新生児期にかけて強く免疫染色されるが、成長した膵島では若干の β細胞が弱い免疫染色を示すだけとなる (19)。即ち、furin は増殖が盛んな膵β細胞で高く発現し、分化度の高い β細胞で強発現させると膵β細胞の高次機能を減弱させるのである。

ii) 心筋 心筋は終末分化状態の細胞で、新生児期を過ぎると分裂して増殖することはない。私の研究室で心筋を用いて furin 発現と心肥大の関係を研究することになったきっかけは、ラット胎児期の心臓が高い furin 発現を示したことによる。我々はまずラット心臓の左冠動脈下行枝を結紮し、心筋梗塞を作成した。梗塞心は心房性利尿ペプチド ANP と脳型利尿ペプチド BNP を分泌することが知られており、BNP 前駆体は Table 1 に示すように furin 切断配列を含んでいる。梗塞後、血中 BNP は3日目と14日目で二峰性に上昇した。BNP 発現は心房で3日目、心室で14日目に高く、furin 発現も BNP 発現と非常によく一致したパターンを示した。furin と同族の PACE4 は梗塞心でも正常心と同様全く変化せず、一定の発現を示し続けた (20)。

心筋細胞をシリコン膜上で培養し、シリコン膜を伸展させると心筋細胞は肥大をおこす、肥大心筋細胞は BNP を高発現し、分泌するが、同時に furin 発現も上昇する。従って、梗塞心で見られた BNP と furin の共発現が肥大培養心筋でも観



察された。更に、*furin* が BNP 前駆体を小さな BNP-45 に転換していることを確認するため、2種類の *furin* 型酵素阻害剤（クロロメチルケトン付加ペプチドと阻害活性部位を Arg-X-X-Arg にした  $\alpha_1$ -アンチトリプシン）を培養液に加えると、BNP-45 の生成が抑制された。この際興味あることに、阻害剤存在下で心筋細胞を伸展させても、肥大が生じなかった(12)。このことは *furin* 切断部位をもつ成長因子前駆体が活性型に転換されないことを示唆し、*furin* 発現は心筋肥大に関与していると考えられる。我々は現在この成長因子前駆体の同定を行っている。

iii) 胃粘膜上皮細胞 胃体部粘膜は無数の胃腺の集合から成り、胃腺はムチン産生上皮細胞から成る胃小窩と、酸分泌壁細胞、ペプシノーゲン産生主細胞、ヒスタミン産生 ECL 細胞、ムチン産生副細胞などが混在する腺部に分けられる。このように機能分化した各細胞は、胃小窩と腺部の境界に位置する増殖帯の幹細胞から分化したものである。我々はラット胃粘膜で *furin* が増殖帯のやや上部の細胞群に強く発現していることを見出した。この細胞群は胃粘膜上皮に分化していく細胞なので、その培養細胞株 GSM (Gastric Surface Mucosa) 06 を用いて実験を行った。GSM06 は温度感受性 SV40 T 抗原でトランスフォームした細胞で、33℃では増殖するが39℃では増殖が止まり、分化した性状、即ち PAS 染色陽性となる。*furin* は33℃の増殖状態で発現し、39℃の分化状態で消失した。ところが、*furin* を強発現した細胞株では39℃でも PAS 陽性物質を産生せず、また、アンチセンス *Furin* を強発現させると33℃でも GSM 細胞は PAS 染色陽性となり、増殖が緩慢になった(21)。即ち、*furin* は胃粘膜上皮細胞が増殖する時に発現し、成長因子前駆体を活性型に転換していることを示唆している。

### 3. 今後の展開

前項で膵β細胞、心筋細胞、胃粘膜上皮細胞を例にとり、*furin* 発現がこれらの細胞の高次機能を減弱させることを述べた。しかし肝細胞の場合、*furin* 発現は TGFβ 発現と相関し、しかも TGFβ 刺激で誘導される。従って、*furin* は前項のように細胞増殖に伴って発現し、増殖因子を活性化する場合だけでなく、細胞分化に

伴って発現し、分化誘導因子を活性化する場合もあり（論文投稿中）、それは細胞型によって異なるらしい。また、それぞれの細胞型で furin がどのような前駆体基質を切断して活性型に転換しているかに関しては、心筋における BNP, 膵β細胞における PTHrP などを除くとまだ基質の同定が不十分である。今後はこの基質ハンティングが一つの研究方向になるであろう。更に、本稿では深く触れなかったが、furin はもう一つの機能、即ち TGN と細胞膜間をリサイクルする機能をもつ。我々は、furin が高発現するところのリサイクリングが盛んになり、成長因子等が大量に細胞外へ分泌されると考えているが、その確認は今後の研究にかかっている。また、furin 発現が高次分化機能を減弱させるなら、そのインヒビターを用いることにより各細胞系の機能維持をはかることが可能であり、私は furin インヒビターを用いた細胞の高次機能維持の研究が今後の重要課題の一つと考えている。

## 文献

1. Steiner DF, et al. Proc Natl Acad Sci USA 57: 473-480, 1967
2. Smeekens SP, et al. J Biol Chem 265: 2997-3000, 1990
3. Julius D, et al. Cell 37: 1075-1089, 1984
4. Fuller RS, et al. Science 246: 482-486, 1989
5. Roebroek AJM, et al. EMBO J 5: 2197-2202, 1986
6. Bresnahan PA, et al. J Cell Biol 111: 2851-2859, 1990
7. Vey M, et al. J Cell Biol 127: 1829-1842, 1994
8. Molloy SS, et al. EMBO J 13: 18-33, 1994
9. Bosshart H, et al. J Cell Biol 126: 1157-1172, 1994
10. Dubois CM, et al. J Biol Chem 270: 10618-10624, 1995
11. Liu B, et al. Am J Physiol 268: E832-E838, 1995
12. Sawada Y, et al. J Biol Chem 272: 20545-20554, 1997
13. Pei D, et al. Nature 375: 244-247, 1995
14. Bravo DA, et al. J Biol Chem 269: 25830-25837, 1994
15. Kodama M, et al. FEBS Lett 328: 25-29, 1993
16. Nakayama K, Biochem J in press, 1997
17. Kayo T, et al. J Biol Chem 271: 10731-10737, 1996
18. Kayo T, et al. Diabetes 46: 1296-1304, 1997
19. Kayo T, et al. Endocrinology 137: 5126-5134, 1996
20. Sawada Y, et al. FEBS Lett 400: 177-182, 1997

(竹内利行：群馬大学生体調節研・遺伝子調節部門)

Table 1

BNP とウィルスを除いて他はヒトのアミノ酸配列を記した。BNP はヒト、ブタ、ラットの配列を記した。-6 から -1 間の R と K は太字にしてある。Adrenomedullin と Big endothelin の C 端は当然 bioactive ではない。

Proteins	Propeptide	Bioactive peptide
Growth factors	-6 -4 -1 +1	
PDGF-A	-KRPLPIRRKR	SIE-
PDGF-B	-ELESARGRR	SLG-
$\beta$ -NGF	-PFNRTHRSKR	SSS-
HB-EGF	-LGGGRDRKVR	DLQ-
IGF-1	-APLKPAKSAR	SVR-
TGF $\beta$	-QHLQSSRHRR	ALD-
Activin A	-EDHPHRRRRR	GLE-
Inhibin	-PPSGGERARR	STA-
PTHrP	-VEGSLRRLKR	AVS-
Regulatory peptides		
Human BNP-32	-MVLTYTLRAPR	SPK-
Porcine BNP-32	-SIFQVLRGIR	SPK-
Porcine BNP-26	-RGI RSPKTMR	DSG-
Rat BNP-45	-TKELLKRVL R	SQD-
CNP-22	-ARKYKGANKK	GLS-
CNP-53	-LKGDRSRLLR	DLR-
Adrenomedullin (N-terminus)	-DAAARIRVKR	YRQ-
Adrenomedullin (C-terminus)	-PQGYGRRRRR	SLP-
Endothelin (N-terminus)	-PPWRLRRSKR	CSC-
Big endothelin (C-terminus)	-YGLGSPRSKR	ALE-
Plasma proteins		
Albumin	RGVFRR	DAH-
Factor VII	-AHGVLHRRRR	ANA-
Factor IX	-ANKILNRPKR	YNS-
Factor X	-GKQTLERRKR	SVA-
von Willebrand factor	-SSPLSHRSKR	SLS-
Tissue-type plasminogen activator	-IHARFRRGAR	SVQ-
Prothrombin	-ARSLLRQVRR	ANT-
Protein C	-MEKKRSHLKR	DTE-
Matrix metalloproteinases (MMP)		
Stromelysin-3	-GLSARNRQKR	FVL-
Membrane-type MMP-1	-EIKANVRRKR	YAI-
Virus envelope		
	Envelope 1	Envelope 2
HIV GP160	-KRRVVQREKR	AVG-
HTLV1	-VPTLFSRSRR	AVP-
Semliki forest virus	-TCRNGTRHRR	SVS-
Sindbis virus	-RCGSSCRSKR	SVI-
Adhesion molecules		
E-cadherin	-SSPGLRRQKR	DWV-
	-6 -4 -1 +1	
Integrin $\alpha$ 3 H-L chains	-RPSSPQ	RRRR QLD-
Integrin $\alpha$ 6 H-L chains	-TESHNS	RKKR EIT-
Complements		
C3 $\beta$ - $\alpha$ chains	-CPQPAA	RRRR SVQ-
C4 $\beta$ - $\alpha$ chains	-PKEKTT	RKKR NVN-
C4 $\alpha$ - $\gamma$ chains	-FEGRRN	RRRR EAP-
C5 $\beta$ - $\alpha$ chains	-PCKEIL	RPRR TLQ-
Pro-receptors		
Insulin receptor $\alpha$ - $\beta$ chains	-FVPRPS	RKKR SLG-
HGF receptor (c-Met) $\alpha$ - $\beta$ chains	-CILTEK	RKKR STK-

## 4. 脱ユビキチン化酵素：巨大な遺伝子ファミリーの謎

### はじめに

出芽酵母には、脱ユビキチン化酵素 (DUB : DeUbiquitinating enzyme) と推定されるプロテアーゼ遺伝子が17種存在しており、ヒトでも10種以上見つかっている。酵母においては、E2を上回る数で、ユビキチン代謝に関わる遺伝子としては最大のグループを形成している。なぜこれほど沢山の遺伝子が存在するのかは、ほとんどわかっていない。現在、DUBの機能として考えられるものには(1) ユビキチン前駆体からのユビキチン分子の切り離し、(2) 分解されてはいけない蛋白のユビキチン化解除によるproofreading、(3) 特異的基質のユビキチン化状態の調節、(4) プロテアソームによるユビキチン化蛋白分解時の脱ユビキチン化等が考えられている。幾つかのDUBについてはその役割が明らかになりつつあるが、大部分はまだ不明である。このミニレビューでは、DUBの分類と、幾つかのDUBの紹介、及び、DUBスクリーニング法の紹介をする。

### DUBの構造と分類

酵母の脱ユビキチン化酵素と推定されている17種は、いずれもシステインプロテアーゼであり、構造上ふたつのグループに分類できる(1, 2, 3)。ひとつは約25 kDaのUCH (Ubiquitin C-terminal Hydrolase) enzyme と呼ばれるもので、出芽酵母のYuh1、哺乳動物のUCH-L1、UCH-L3、Drosophilaのuch-D、アメフラシのAp-uch等が含まれ、互いに約40%のidentityと非常に良く似ている。最近UCH-L3の結晶構造解析がなされ、cathepsin Bと非常に良く似た構造をしていることが示された。これらの特徴としては、ユビキチンのC末に小さい分子が結合しているときには活性を示すが、人工基質であるubiquitin- $\beta$ -galactosidase fusion protein (Ub- $\beta$ -gal) の様な大きな分子が結合したものは切断しにくい傾向にある。また、多細胞生物で見いだされたもののほとんどが、特徴的な組織分布を示している。

もう一つのグループはUBP (UBiquitin specific Protease) enzyme と呼ばれるもので、

そのほとんどは100 kDaから150 kDaの間に含まれるが、なかには300 kDaに及ぶものもある(図1)。酵母ではYUH1以外の16種がここに含まれる。一次構造上の特徴として、すべてのUBPでcysteine box及びhistidine boxと呼ばれる高度に保存された領域が存在し、活性中心を形成しているとされる。これらのbox中で完全に保存されているCys残基とHis残基は、知られているすべての例で、プロテアーゼ活性に必須である。このふたつの領域の他にも多少保存されているところがあるが、全体的な共通性は非常に少ない。特にそれぞれのUBPにおいて、N末あるいはC末に長い独自の配列をもっているものが多く、各々の機能の特異性に関与していることが推測される。活性自体も蛋白ごとに異なり、ユビキチンのC末ならどんな蛋白がペプチド結合していようと切断できるようなものから、後述するisopeptidase Tの様に特徴のある脱ユビキチン化活性を持つものもある。

#### プロテアソームと深く関わるDUB

蛋白分解シグナルとしてのユビキチン化を考えると、分解促進的に働くDUBと分解抑制的に働くDUBが存在していることが想像できる。実際に、主に蛋白分解促進的に働くDUBとして、出芽酵母ではDoa4 (UBP4)とUbp14が知られている。DOA4は、Hochstrasserらによって、MAT $\alpha$ 2の分解に関与する遺伝子(Degradation Of Alpha)のひとつとして単離され、欠損及び変異株ではMAT $\alpha$ 2の他にもユビキチン-プロテアソーム経路で分解される様々な蛋白に対して分解が遅れること、slow growth及びDNA修復の欠損が起きることが見いだされた(4)。当時、E2やE3あるいは既知のプロテアソームの成分であればそれほど不思議ではなかったのであるが、推定蛋白の一次構造がUBPであったため、「脱ユビキチン化酵素が蛋白分解を促進する」という事実を示すおそらく最初の例と考えられたのである。実際彼らは、active siteを破壊した蛋白によるdominant negative効果、Doa4過剰発現によるMAT $\alpha$ 2類似蛋白やN末端側基質の分解促進等から、Doa4がユビキチン-プロテアソーム経路で分解される様々な蛋白に対して、分解促進的に働くDUBであることを証明した。doa4 mutantでは、ポリユビキチン化されたままの分解産物のペプチドと考えられる物質が蓄積するこ



とから（この結果は、プロテアソームによるユビキチン化蛋白の分解時にユビキチンがはずされるタイミングと仕組みを考える上でホットな議論の対象になっているようである）、Doa4はプロテアソームがユビキチン化標識された蛋白質を分解するときに協調的に働くと考えられており、実際Hochstrasserらは精製した26SプロテアソームにDoa4が含まれると言っている。

Doa4の発見と同じ頃、もう一つの蛋白分解促進的に働くと思われるDUBが報告された。哺乳動物ではisopeptidase Tと呼ばれる蛋白で、出芽酵母のUBP14のhomologと考えられる(5,6)。これまでの研究から、この酵素はユビキチン化蛋白からユビキチンをははずす活性は殆ど無いのに、unanchored ubiquitin chain（イソペプチド結合で繋がれたユビキチンだけのオリゴマー）に対して著しく強い活性を持ち、ubp14欠損酵母ではこれが蓄積することなどから、unanchored ubiquitin chainがポリユビキチン化されたプロテアソームの基質の分解を競合的に阻害するのを防ぐことによって、ユビキチン経路の蛋白分解を促進すると考えられている。Doa4とUBP14の特徴から、HochstrasserとWilkinsonらはユビキチン化蛋白分解におけるそれぞれのUBPの役割を図2のような簡単なモデルで説明している。ポリユビキチン化された蛋白はプロテアソームで分解される時、Doa4と未知のUbpXによってポリユビキチン鎖がはずされ（図2の下の経路）、はずされたunanchored ubiquitin chainはUbp14によって個々のユビキチンに分解されるというものである。ところが、最近、ウシの26Sプロテアソームの制御因子複合体に、ユビキチン化蛋白のユビキチンを基質の反対側からははずすことが出来る活性が存在し(7)（図2では“trimming” DUB）、この成分はDoa4ではないと思われるので、図2の上の経路も新たにつけ加えられている。ユビキチン化された蛋白は、まず、26Sプロテアソームのユビキチン鎖レセプターに結合し、“trimming” DUBによって基質の反対側からユビキチン鎖が短くされる。このとき、ユビキチンが完全にはずれた蛋白は分解を免れ、ユビキチンの残っているものがプロテアソームによる分解を受ける。残ったユビキチンは、“trimming” DUBとDoa4によってはずされると想像される。蛇足かもしれないが、最近アメフラ

シで神経細胞特異的に発現し、シナプスのlong-term facilitationに必須のUCH(Ap-uch)が、プロテアソームと結合し、更に蛋白分解を促進することが示されている(8)が、発現部位が特異的な為か、あるいは特異的な基質(PKAのR subunit等)の分解促進を想定しているためか、このモデルには、組み込まれていないようである。

### 種々のDUB

特異的な基質がユビキチン化されるのを防ぐことによって、その基質の分解をおさえるように働くことが示唆されているDUBも存在する。DrosophilaのFAF proteinがこの例ではないかと思われる(9)。faf mutantは目の細胞の分化とoogenesisに異常を示すが、他の異常は見られない。この産物は約300 kDaの巨大な蛋白で、Ub-β-gal切断活性を示すUBPである。酵母には存在しないが、ヒトにはhomologと思われるものが存在する。Drosophilaでの変異による目の異常は、プロテアソームのsubunitの発現を抑えることで強く抑圧されるため、目の分化において、FAF proteinは特異的蛋白の分解を抑制しているものと推測されている。

このほかにも、いろいろなDUBが存在している。proto-oncogeneであるヒトのTre-2やマウスのUnp、ヘルペスウイルスの溶菌化に関与すると思われるHAUSP、サイトカインで誘導されるマウスDub1、Dub2、サイレンシングの調節に関わる酵母のUbp3やDrosophilaのD-Ubp-64-Eといった様々なDUBが存在していることは、DUBが細胞内で多様な機能をになっていることを示唆している。しかし、これらのDUBが実際どの様にして機能しているのかは、ほとんどわかっていない。今後は、遺伝子しかわかっていない多くのDUBと共に、詳細な機能解析が行われていくものと思われる。

### DUBスクリーニング法

C.H.Chungらは、最近、非常にエレガントな方法で、ニワトリ骨格筋から新規の脱ユビキチン化酵素cDNAをクローニングしている(10)、その方法を紹介する。これは、大腸菌内で発現させることによりDUB活性を示す遺伝子をスクリーニングする方法であり、VarshavskyらがN末端則の証明にDUBを利用したことを応用

している。VarshavskyらがN末端則の証明に用いた基質は、 $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal)のN末端のメチオニンを20種のアミノ酸で置換したX- $\beta$ -galactosidase (X- $\beta$ -gal)であった。彼らは、ubiquitin-X- $\beta$ -galactosidase fusion protein (Ub-X- $\beta$ -gal)を真核細胞内で合成させると、翻訳直後にDUBの作用をうけて、ユビキチン分子と、ユビキチンと正確に切り離されたX- $\beta$ -galができることを利用し、 $\beta$ -galがN末端のアミノ酸の種類によって半減期を大きく変えることを証明したのである。さらに、大腸菌でもClpAに依存したN末端則が存在することが証明されたが、DUBが存在しない大腸菌でのN末端則の証明には、Ub-X- $\beta$ -galを切断するDUBを補う必要があった。これらの事実から考え出されたDUBのスクリーニング方法は、次のようなものである。N末のユビキチンがはずされるとN末端則により分解されるUb-R- $\beta$ -galを発現している大腸菌と、ユビキチンがはずれても分解されずに活性を失わないUb-M- $\beta$ -galを発現している大腸菌に、cDNA libraryを発現させてX-gal plate上でコロニーを形成させたときに、Ub-R- $\beta$ -gal大腸菌コロニーを白くし、Ub-M- $\beta$ -gal大腸菌コロニーを青くするものを「ユビキチンのC末で正確に切断できる酵素」すなわちDUBと判定するものである。Varshavskyらは、この方法で酵母遺伝子をスクリーニングし、酵母のUBP2、UBP3をクローニングした(11)。C.H.Chungらはニワトリ骨格筋のcDNA libraryから、UBP41をクローニングした。多くのUBPがUb- $\beta$ -gal切断活性を持つことを考えると、今後もこの方法で、未知のUBPが見つかる可能性は十分あると思われる。

## まとめ

ここでは蛋白分解シグナルの調節ということに主眼をおいて、脱ユビキチン化酵素について見てきた。しかし、ユビキチン化は、単に蛋白分解のシグナルとしてだけでなく、多様な機能を持つことが示されてきている。また、ユビキチン類似の蛋白や、ユビキチン類似のドメインを含む蛋白も存在している。これだけ多くのDUBが存在しているという事実は、DUBが蛋白分解シグナルとしてのユビキチン化以外の出来事にも関与している可能性をも想像させる。DUBが巨大な遺伝子ファミ

リーを形成している謎が解けるにつれて、今までと違った方向から、ユビキチンの役割が明らかになってくるのではないかと期待している。

## 文献

- (1) 「ぶろておりしす」第2号 p 49
- (2) Wilkinson, K.D. (1995) Annu. Rev. Nutr., 15, 161-189
- (3) Hochstrasser, M. (1996) Annu. Rev. Genet., 30, 405-439
- (4) Feroz, R. and Hochstrasser, M. (1993) Nature, 366, 313-319
- (5) Wilkinson, K.D. et al. (1995) Biochemistry, 34, 14535-14546
- (6) Amerik, A.U. et al. (1997) EMBO J., 16, 4826-4838
- (7) Lam, Y.A. et al. (1997) Nature, 385, 737-740
- (8) Hegde, A.N. et al. (1997) Cell, 89, 115-126
- (9) Huang, Y. et al. (1995) Science, 270, 1828-1831
- (10) Baek, S.H. et al. (1997) J. Biol. Chem., 272, 25560-25565
- (11) Baker, R.T. et al. (1992) J. Biol. Chem., 267, 23364-23375

(鈴木俊顕：浜松医大生化学第一)

図2：ユビキチン依存性蛋白分解におけるUbp14とDoa4の役割  
(図中のUbcXとUbrXは、それぞれE2、E3を表す：参考文献6より)

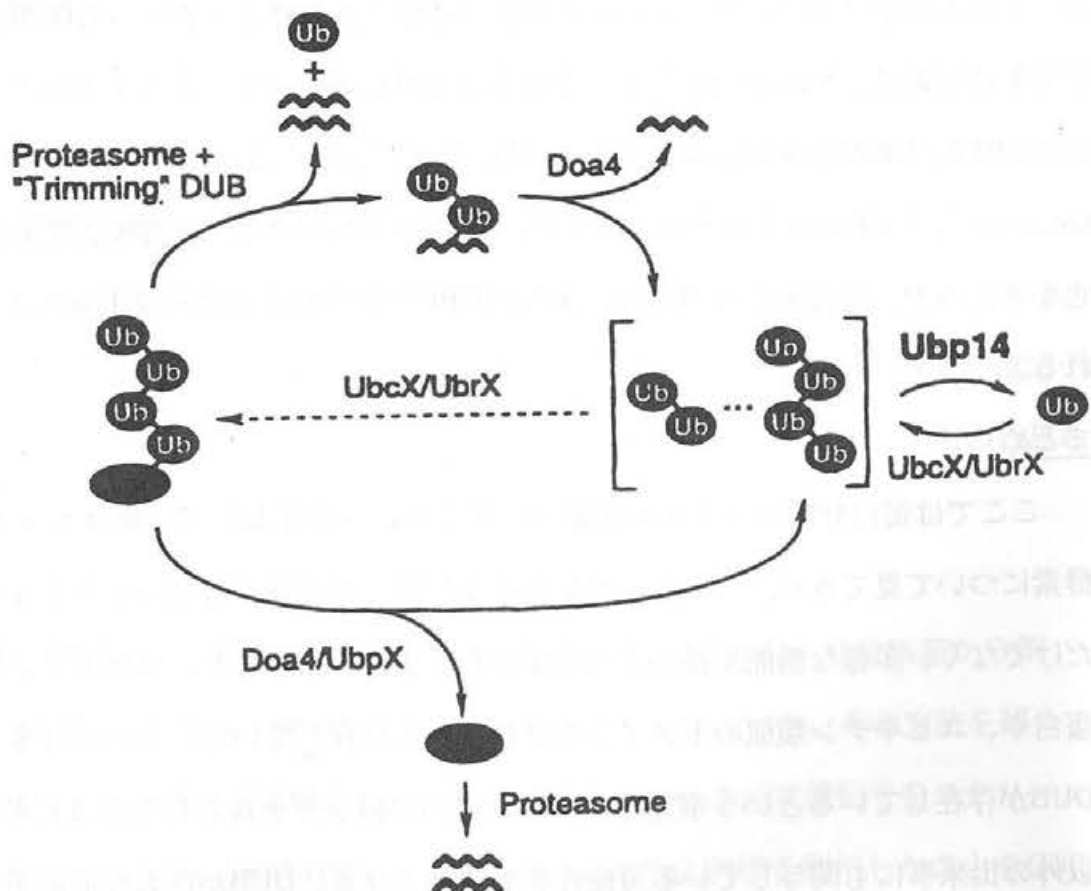
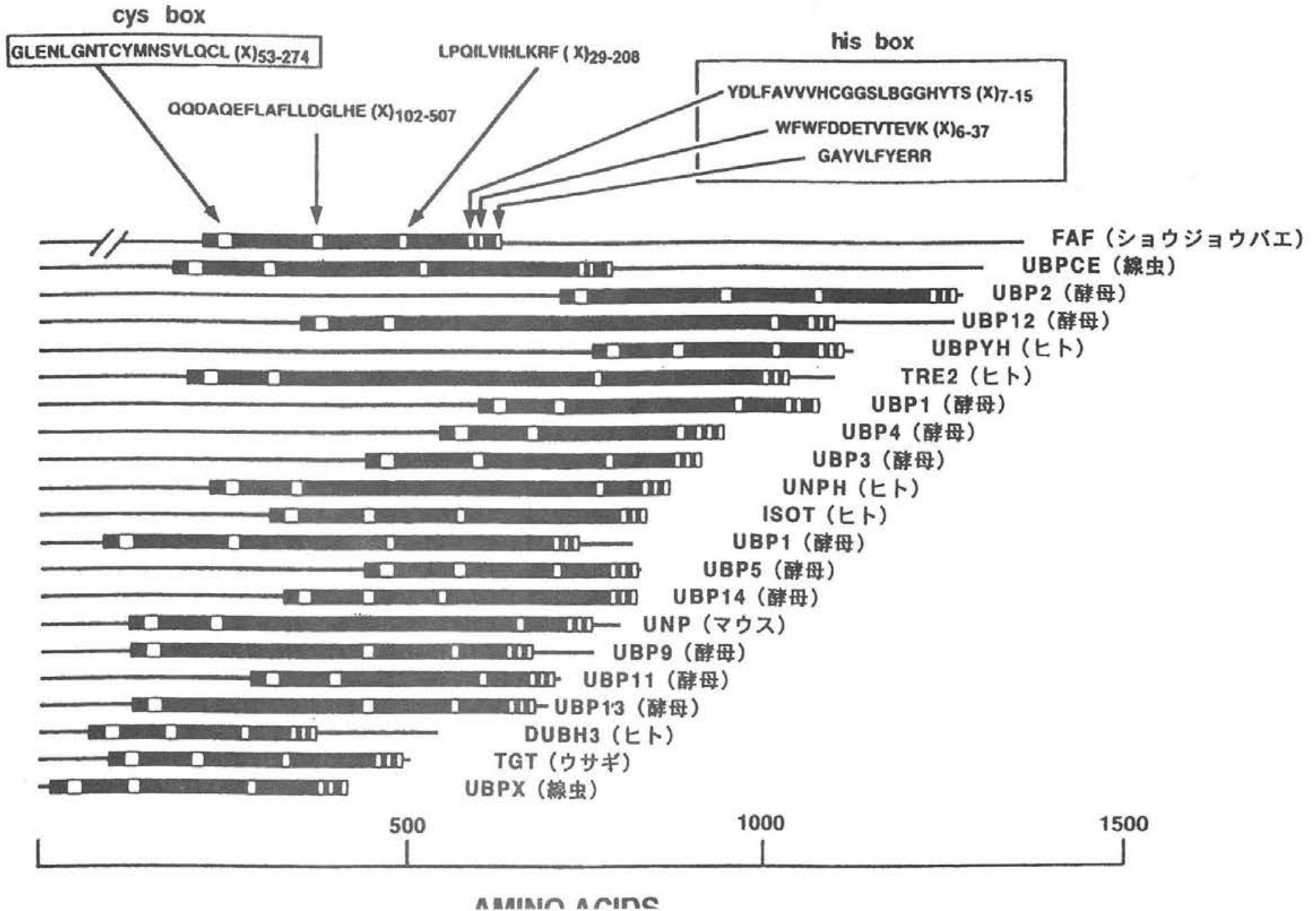


図1：種々のUBPの構造（参考文献5より一部改変）





## 5. *in vivo* における細胞内プロテアーゼ活性の測定法

我々は、細胞を生かしたまま、細胞内のプロテアーゼ活性を測定する手法を開発してきた。原理はいたって単純で、細胞にプロテアーゼ用の蛍光基質をマイクロインジェクションした後に、増加してくる蛍光量を定量すればよい。ただし、通常の生化学的手法で用いられている蛍光基質 (peptidyl-MCA基質) は、分解産物であるAMCの細胞膜透過性が高いために使用することができない。酵素活性の指標となる蛍光物質が細胞外に流出するために、分解速度の定量が困難なのだ。

蛍光物質、7-aminocoumarin-4-methanesulfonic acid (ACMS) は水に溶けやすく、7位のアミノ基にペプチドを結合することによって、プロテアーゼ基質が合成できる (peptidyl-CAMS基質) (1)。水に溶け易い物は油に溶け難いので、ACMSも油 (または細胞膜) に溶け難いことが期待できる。実際にACMSを細胞にマイクロインジェクションしたところ、細胞から漏れ出ないことが確認できた (2)。そこで、ヒトデ卵母細胞のプロテアソーム測定用にZ-Phe-Leu-Arg-CAMSを合成したのだが、これが期待に反して水に溶けず、研究は当初から座礁してしまった。DMSOにならよく溶けるのだが、これをマイクロインジェクションするとすぐに析出してダマになってしまうのだ。さらに100%のDMSOは、細胞の膜構造を破壊するなどの好ましくない効果を伴った。さて、peptidyl-MCA基質にも水に溶け難いものが多いので、通常は10mM程度になるようにDMSOに溶かしている。これを、アッセイ用の水溶液中に投入し、時を置かず激しく攪拌することで、なんとか水溶液にしている。しかし、相手が細胞であると、激しく振り回しても細胞が破壊されるだけで、細胞内には拡散しない。Z-Phe-Leu-Arg-CAMSも、最終濃度が十分薄ければ水溶液にできるが、これをマイクロインジェクションするとさらに薄まり、酵素活性の測定は困難だ。そこで保護基をスクシニル基に変えたSuc-Phe-Leu-Arg-CAMSを合成したところ、5mMの水溶液を作ることができた (10%のDMSOを含んでいるが、細胞毒性は無かった)。これをヒトデ卵母細胞にマイクロインジェクションすると、速やかに細胞内に拡散

し、蛍光量が増加していった。基質は水に溶けていなければならないという第一関門は突破できたわけだ。この基質は細胞内のサイトゾル（細胞膜より内側であり、リソゾーム、小胞体、さらにミトコンドリアの外側の領域）に存在するので、プロテアソーム活性を測定しているのではないかと期待できた。

本研究の目的は、生きた細胞の中で、酵素反応の速度論的なパラメータを求めることにある。そのためには、細胞内での基質初濃度が求められなくてはならない。本研究で用いた細胞は卵であり、球形なので体積は容易に求められる。また、マイクロインジェクションした基質体積も求められるので、この問題は解決された。しかし厳密には、オルガネラの体積を求めることができないので、サイトゾルのみの体積は未知である。よって本研究では、便宜上オルガネラの体積を0として $V_0$ 、 $V_{max}$ 、そして $K_m$ を求めた。なお $V_0$ は、蛍光顕微鏡に光電子増倍管を接続して、細胞一個あたりの蛍光の増加量を定量することで、求めることができた(2)。

さて、次の問題としては、求められた速度論的パラメーターが、真にプロテアソームのみによるものか否かを明らかにしなくてはならない。特に、本基質はカルパインによっても分解される可能性があるので、阻害剤を利用して検討した。すなわち、プロテアソームに対する特異的な阻害剤(Z-Leu-Leu-Leu-Hなど)で基質分解は阻害されたが、カルパイン阻害剤(E-64)では阻害されなかった。本研究ではさらにエキソペプチダーゼの存在も考慮して、プロテアソームの速度定数を求めることができた。大変興味深いことに、 $V_0$ は減数分裂を再開させるホルモン(1-メチルアデニン)処理によって上昇することが明らかになった。すなわち卵母細胞が減数分裂を再開すると同時に $V_0$ は上昇し始め、サイクリンがプロテアソームによって分解される時期(M期終了時)に最大となった。このことは、プロテアソーム活性の制御機構が、卵内に存在することを示している。またその時期の $V_{max}$ と $K_m$ は、ホルモン処理以前の卵よりも大きな値を示した。このことから、プロテアソームがなんらかの質的変化を起こしていることが示唆された。

プロテアーゼ活性について、*in vivo*で $V_0$ 、 $V_{max}$ または $K_m$ 値を求めた例は、本研

究以前には見あたらなかった。1993年にRosser等は7-amino-4-chloromethyl-coumarinを用いて、肝細胞のカルパイン活性を求めている(3)。しかし、この蛍光物質を用いた基質分解には、細胞内のグルタチオンを要求する反応が関与している。また彼等の手法では $V_0$ は求められない。本手法はこれらの技術的隘路を解決しており、あらゆる細胞に適用可能と考えられる。

今後は、班員の皆様にもご教授願ひ、より多くの細胞や現象に本手法を適用していきたい。また、細胞内の酵素活性の局在を明らかにする手法の開発にとりかかりたい。

#### 文献

- 1) Sato,E., Matsuhisa,A., Sakashita,M., and Kanaoka,Y. (1988) New water-soluble fluorogenic amine, 7-aminocoumarin-4-methanesulfonic acid (ACMS) and related substrates for proteinases. Chem. Pharm. Bull. 36, 3496-3502.
- 2) Chiba, K., Sato,E., and Hoshi, M. (1997) Detection of *in vivo* proteasome activity in a starfish oocyte using membrane-impermeant substrate. J. Biochem. 122, 286-293.
- 3) Rosser,B. G., Powers,S. P., and Gores,G. J. (1993) Calpain activity increases in hepatocytes following addition of ATP. Demonstration by a novel fluorescent approach. J. Biol. Chem. 268, 23593-23600.

(千葉和義：お茶の水女子大学・理学部・生物学教室)

## (6) トピックス

### 1. APC (大腸癌遺伝子) はユビキチンリガーゼか？

最近, APCの結合蛋白質である $\beta$ カテニンがユビキチン-プロテアソーム系で分解されるという報告があった(1). これまで $\beta$ カテニンの安定性がWingless/Wntシグナルによって制御されることは知られていたが, その分解にAPCおよびプロテアソームが関与することが初めて示された. APCというと細胞周期研究のフィールドではまさにユビキチンリガーゼである Anaphase Promoting Complexを指すが, 本稿では多発性大腸腺腫症(Adenomatous Polyposis Coli)の原因遺伝子である APCを指す. APCは常染色体優性遺伝する多発性大腸腺腫症の家系から単離された癌抑制遺伝子である(2). 優性遺伝するがAPC変異はハイポモルフであると考えられ, 個々の大腸腺腫においてはもう一方のアリルに somatic mutationがおこっていることから, 発症には両アリルの変異が必要であると考えられている. APC産物は触媒ドメインを有さず, その生化学的な機能は不明だが, 蛋白質と相互作用するドメイン構造を多く有し, これらのドメイン構造の欠失は各々の結合蛋白質との相互作用を阻害し癌化へ寄与すると考えられる. 現在, APCに結合する蛋白質として $\beta$ カテニン, DLG, EB1, tid56等が明らかになっている(3). これらの結合蛋白質との相互作用によって様々な生物現象に関わることが報告されているが, APCの機能は不明である. 本稿ではこれまでの知見を紹介し, APCがユビキチンリガーゼとして機能する可能性を考察したい.

APCは組織全般に発現するが, 脳で特に強く発現する. 細胞内では細胞膜直下に局在し, 上皮細胞の細胞接着装置近傍や神経細胞のシナプスにクラスターを形成する. また, 細胞が運動するときはその先端の細胞膜直下に発現する. ショウジョウバエの癌抑制遺伝子DLGのヒトホモログは, 大腸上皮細胞や神経シナプスでAPCと共存し, PDZドメインを介してAPCのC末端と結合する(4). DLGは, またバンド4.1蛋白質のN末30kDa領域とも結合することで, APCとスペクトリン等の細胞骨格

蛋白質を連結していると考えられる。また、APCは $\beta$ カテニンとも結合し、 $\beta$ カテニンが一方で $\alpha$ カテニンと結合することでアクチン系細胞骨格と間接的に結合する。更に微小管（チューブリン）とも直接結合できる。APCはDLG、 $\beta$ カテニン、微小管等と複合体を形成して、細胞骨格や細胞接着を制御し、細胞の増殖・運動に関与すると考えられる。中枢神経系のシナプスではDLGはNMDA-R-2やShaker型K-チャンネルと結合し(5)、更に最近DAP-1とも結合することが明らかとなった(6)。DAP-1はNMDA-R-DLG複合体だけでなくAPC- $\beta$ カテニン複合体とも結合するため、APCはNMDA-Rやイオンチャンネルのクラスター形成に阻害的または協調的に働くことが予想される。

APCはまた細胞周期を制御することが示唆されている(7)。APCを培養細胞に強制発現させるとG1期からS期への移行が阻害され、その阻害効果はサイクリンD/cdk4またはサイクリンE/cdk2を共発現させることにより解除される。このことはヒトtid56ホモログがAPCと結合することと考え合わせると興味深い。ショウジョウバエの癌抑制遺伝子であるtid56はDnaJファミリーと高い相同性をもち、出芽酵母のホモログであるyjd1はCln3に特異的なp34CDC28依存性のリン酸化および分解に必須である(8)。APC-tid56複合体の生理作用は明らかではないが、サイクリンの蛋白質分解に関与する可能性が推測される。

以上、APCは細胞接着から細胞周期の制御まで幅広い生物現象に関与するが、APCの果たす共通の機能は何であろうか。最近、APCが $\beta$ カテニンの分解を制御することが示唆され、蛋白質分解の制御因子である可能性がでてきた。 $\beta$ カテニンはAPCと $\alpha$ カテニンを間接的に結合させるだけでなく、初期発生の軸形成においてWingless/Wntのシグナル伝達分子として働く。WinglessがそのレセプターFrizzled2に結合するとアダプター蛋白質Disheveledのリン酸化、セリン/スレオニンキナーゼGSK3 $\beta$ の抑制を介して、細胞質中の $\beta$ カテニン量が上昇し、その結果、 $\beta$ カテニンが転写因子TCF/LEFと共に核移行し転写を活性化することが明らかとなっている(9)。この基本的なカスケードの一部はカエル受精卵を用いた実験系でも証明されており、



$\beta$ カテニンやドミナントネガティブGSK3 $\beta$ を大量発現させると Wntシグナルによる二次軸の誘導効果を代替することが明らかとなっている(10). Wingless / Wntシグナルによる $\beta$ カテニン量の上昇は蛋白質の安定化によって制御されており, N末を欠失した安定化変異体はWingless / Wntのシグナルを代替することができる. また, 培養細胞を形質転換する癌遺伝子のスクリーニングからも, N末を欠失した安定化変異体が単離されている. ごく最近,  $\beta$ カテニンがユビキチン化されること, そのユビキチン化にはN末に存在する GSK3 $\beta$ リン酸化部位(S33, S37)が必要であること, そして分解がラクタシスチンで阻害されることが明らかとなった(1). GSK3 $\beta$ リン酸化部位はIkBのN末(S32, S36)と相同であり, IkBではCHUKキナーゼによるリン酸化が分解の引き金となっているように,  $\beta$ カテニンでもGSK3 $\beta$ によるリン酸化がユビキチン化とプロテアソームによる分解の引き金になっていることが示唆された. 一方, APCもGSK3 $\beta$ の良い基質であり, 中央部にある 20アミノ酸の繰返し配列のリン酸化が $\beta$ カテニンとの結合に必須であることが明らかとなった(11). また, APC遺伝子を欠失した多くの大腸癌細胞株では $\beta$ カテニン量が上昇し, その細胞株に野性型APCを遺伝子導入すると $\beta$ カテニン量が減少することが報告された(12). この結果から,  $\beta$ カテニンはリン酸化APC - GSK3 $\beta$ 複合体に結合し, そのN末がリン酸化されるとユビキチン - プロテアソーム系で分解されるというカスケードが考えられた. 他方, APCのショウジョウバエミュータント(13)および一部の大腸癌細胞株では $\beta$ カテニンが上昇していないこと(12)も報告され, 少なくとも $\beta$ カテニンの分解は APC以外の経路でも制御されることが示唆された. まだ解明すべき点は多いが, やはり前述の事実から, APCが蛋白質分解の制御因子であること, すなわちユビキチンリガーゼ複合体の一員である可能性が考えられた.

それではAPCが蛋白質分解の制御因子であるなら, 他にどんな因子の分解を制御しうるだろうか. まず, APCは細胞周期を制御することから tid56とともにサイクリンの分解を制御している可能性がある. DLGについては, それが蛋白質の安定性によって制御されているという報告はない. しかし, DLGと同様に PDZドメインを

持ち、シナプスに存在する Tiam1 ファミリーはN末にGSK3 $\beta$ リン酸化部位のコンセンサス配列をもち、そのN末を欠失すると恒常的に活性化される事が知られている(14)。Tiam1ファミリーの機能が果たして安定性によって制御されているのか、そしてAPCと相互作用するのかは不明であるが、その局在と機能は共通点が多い。Tiam1ファミリーはラフリングメンブレンの直下やシナプスに存在し、RhoファミリーのGEF活性を有するため、細胞接着や細胞の運動を制御することが示唆されている。少し飛躍するが、もしAPCがユビキチンリガーゼであるなら、その基質としてGEFの安定性を制御するという仮説は魅惑的である。

APCの機能はアダプター蛋白質としての性質以外は不明であるが、今後ユビキチン-プロテアソーム経路との相互作用が明らかになることを期待したい。

#### 文献

- 1) Aberle, H. et al. (1997) EMBO J. 16, 3797 - 3804
- 2) Kinzler, K.W. et al. (1991) Science 253, 661- 664
- 3) Polakis, P. (1997) Biochim. Biophys. Acta 1332, F127 - F147
- 4) Matsumine, A. et al. (1996) Science 272, 1020 - 1023
- 5) Kornau, H.C. et al. (1996) Science 269, 1737- 1740
- 6) Satoh, K. et al. (1997) Gene Cells 2, 415 - 424
- 7) Baeg, G.H. et al. (1995) EMBO J. 14, 5618 - 5625
- 8) Yaglom, J.A. et al. (1996) Mol. Cell. Biol. 16, 3679 - 3684
- 9) Nusse, R (1997) Cell 89, 321 - 323
- 10) Miller, J.R. et al (1996) Gene Dev. 10, 2527 - 2539
- 11) Rubinfeld, B. et al. (1996) Science 272, 1023 - 1026
- 12) Munemitsu, S. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 3046 - 3050
- 13) Hayashi, S. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 242 - 247
- 14) Habets, G.G.M. et al. (1994) Cell 77, 537 - 549

(千葉智樹：東京都臨床医学総合研究所)

## 2. Caspase-3はプレセニリン蛋白の新切断酵素である

プレセニリンはアルツハイマー病原因遺伝子産物であり、よく似た2つの分子(プレセニリン1；PS1とプレセニリン2；PS2)が知られている。これら2

つの分子は共に病因分子として重要であり、各々ヒト第14染色体と第1染色体にコードされている。2つのプレセニリン分子のいずれの遺伝子に点突然変異が生じても早期発症型家族性アルツハイマー病になることがわかってきたが、その生理的意義については不明な点が多い。P S 2に関してはアポトーシスを促進する作用があると議論されている (Wolozin, B. et al., Science 274, 1710, 1996)。さらに、点突然変異の役割はこのアポトーシス亢進作用を増強すると考えている。これはこの遺伝変異が優性遺伝形式をとることから「gain of a function」という考えと合致する。一方P S 1については未だに未解決のまま残されているとあってよい。さてこのように、最近のアルツハイマー病研究の主流はアポトーシスの視点から病理をみることであり、これは1つの流れとして注目に値する。プロテアーゼの1つであるICEファミリーがこの細胞死に深く関与していることは本研究班の重要な課題の1つであることはいうまでもないが、最近Caspase-3がアルツハイマー病の病因に深く関与する事を示す報告がハーバード大学からサイエンスに発表された (Hartmann et al., J. Biol Chem., 272,14505-14508, 1997; Kim et al., Science 277: 373-376, 1997)。

アルツハイマー病の原因遺伝子産物であるプレセニリン蛋白は、生合成されたあと分子内分解を1カ所受ける。即ち、全長50kDaからなるプレセニリン1は分子量28kDaと18kDaの断片になる。この分解酵素についてはプロテアソームが疑われてきたが、未だに確実な証拠がない。上記の報告によれば、アポトーシス誘導によってこのプレセニリン分子の切断が別のところで生じ、従来切断される部位よりさらに50残基ほどカルボキシル末端側にずれたCaspase-3のコンセンサス配列AQRDS (アミノ酸343-346)の箇所分解されるらしい。その結果、分子量が36kDa (アミノ末端断片)と18kDa (カルボキシル末端断片)の新しいCaspase-3断片が生じることになる。両者の報告にはアポトーシスの要求性に関して若干の不一致があるが、P S 2の作用を考えた場合大きな問題ではない。むしろ、staurosporineおよびetoposideによって誘導されるアポトーシスに付随して見られるとする報告 (Kim et al.)は積極的に考慮すべき内容があると考えられる。なによ

り、重要なのはVolga-German家系（早期発症型家族性アルツハイマー病の1つ）の点突然変異P S 2のN 1 4 1 Iをもつ遺伝子を導入したneurogliomaのH 4細胞では、Caspase-3切断反応が亢進していることが見出されたことにある。さらに、プレセニリンのCaspase-3断片がアポトーシスをしめさない脳以外の組織でみられないことは、別の角度からの証拠として評価される（Hartmann et al.）。

Caspase-3反応はNGF添加したPC 1 2と初代培養系において観察されたことから、神経分化にも関係しているといえる。in vivoの脳においてもCaspase-3断片は神経発生に関連して出現する。従来のプレセニリン分解が生理的分解反応であるとするならば、今回見出されたCaspase-3経路はプレセニリンの病理反応として考えられるが、結論づけるにはまだ多くの問題を抱えているように思われる。しかしながら、プレセニリンの生理的分解の意味も依然として明らかではなく、これとは独立した病理的分解がアポトーシスに先立つ必須の経路なのか、アポトーシスに付随する単なる分解反応なのかを明らかにすることこそ、大切な問題であると考えられる。

本誌ぶろておりしすには、プロテアーゼとアルツハイマー病に関する解説（西道先生）とCaspaseに関する詳細な解説（杭田先生）がすでに発表されている。そちらも参照していただきたい。

（森 啓：都精神研・分子生物学、石浦章一：東大・分生研）

## (7) 海外留学中研究者からの最新情報

### 1. K先生へ：細胞死のことなど

暑中お見舞い申し上げます。ずいぶんご無沙汰してしまいました。日本は熱帯なんでしょうね。こちらは夏といっても、暑くて25度くらい、かわいいもんです。それでもみな暑い暑いといっております。エジンバラはヨーロッパの北のすみっこにありますから、気象条件次第では夏でも突然寒くなります。天気予報は明朝9度になると告げております。バイロン曰く、イギリスの冬は7月に終わり、8月に始まる。夏は日がなかなか暮れません。夏至の頃は11時頃まで明るく、時間を忘れて実験してしまいます（本当かな?）。当地の冬の天気のいやらしさといったらありません。雨と強風(Gail)の日が続きます。その代償として、こちらの春のすばらしいこと。さわやかな陽気で、街のあちこちで花が咲き乱れ、鳥が啼き、極楽のようです。実際、ここは東京より治安が良く、物騒な目にあったことはありません。ただ、自転車をアパートの階段下に置いてあったら、ついに夜中にかっぱらわれましたが。自転車は自室に持って帰るのが普通のようなのです。こちらのラボに来てまず驚いたのは、細胞培養の時にバーナーを使っていないことでした。冬は、とくに日本では絶対コンタミしたろうなと思うことをしても、絶対的な雑菌の密度が低いためか、全くコンタミしませんでした。雑菌といえば、こちらにはロンドンなんかにはうようよいる日本人が少なく、したがって日本料理店も3軒しかありません。こちらに着いて1週間で無性にウナギが食べたくなり、冬の雨風吹きすさぶ中を街のはずれにある高級日本料理店にかけこみ、5000円以上もしたけれど、思い切って注文したら、なんと、出てきたウナギのちんけなこと。怒りを乗り越して哀しくなりました。

さてこちらではどんなことをしているか、アポトーシス関係を中心に手短にご紹介しましょう。ボスのアーンショウ (W.C.Earnshaw) 教授はもともとセントロメア蛋白をはじめとする核蛋白の機能を細胞生物学的に解析してきたひとで、1年半前



にラボごとジョンスホプキンス大学から引っ越してきました。セントロメアの仕事の他にアポトーシスのin vitro系を使った研究を展開しているので、発生過程でのプログラム細胞死をやってきた私が飛び込んだのです。この研究の端緒は、細胞分裂時に核凝縮をおこす因子を研究してきたポストクが、この凝縮がアポトーシスなのではないかと気づいたことからです。実際、はじめにS期に同調させておいてからリリースして、つぎにM期でとめてやると、アポトーシスを起こす因子が出るということで(S/M extractと呼んでいます)、アポトーシスと細胞周期の関係をうかがわせるものなので、この論文を見たときに、アポトーシスの細胞周期依存性で学位をとった私としては我が意を得たりと感動すら覚えたものです。アポトーシスがマイトーシスの失敗作だという魅力的な仮説も考えられました。その後の展開は、みなさんよくご存知のICE様プロテアーゼがこのextractに含まれており、これがPARPや核ラミンをすばっと切るという知見につながっていきました。私にとって残念なことには、上記の仮説に否定的なデータが得られたために、その後この方向にはラボの研究が進んでいません。また、S/M extractは、ものどりの出発材料としては手間と金がかかりすぎ不向きかもしれません。事実、もっと簡単な系を使って米国のWangたちはアポトーシスを誘導する因子としてチトクロームcやDNA fragmentation factor (DFF と略す)を見つけました。後者はICEプロテアーゼの仲間のCPP32によって切断・活性化され、今度はそれが核内のDNaseを活性化しアポトーシスに特有のヌクレオソームラダーを生じさせるようです。アポトーシスにおいてプロテアーゼからクロマチンDNAの分解にどうつながるのかという謎にひとつの答えが出たわけです。Wangらの用いた100リッター規模の培養に比べて、いかにもこちらの培養は小規模です。私はというと、いくつかのプロジェクトを同時進行させています。そのひとつでアポトーシスを抑制する因子を捜す過程で、ある分画が強烈にアポトーシスを誘導することが分かりました。この中にはcaspase活性は含まれていませんでしたので、細胞内で切断をうけ既に活性化されたDFFかもしれません。この活性を単離した核にかけると凝縮し、ラダーができるのですが、面白いことに核ラミンはまっ

たくとっていいほど分解されていませんでした。caspaseによるラミンの切断なしにどうして核が断片化されるのでしょうか？ひょっとしたら、ラミンの分解はアポトーシスにおける核の形態変化に不必要なのかもしれません。あるいは、caspase以外のプロテアーゼが核内に存在し、これによってラミンがスメア的に切られているのかもしれませんが。研究室では、caspaseの基質ペプチドをビオチン化したものを使ってcaspaseをすべて標識してつかまえようという試みなど、さまざまなテクニックを総動員してcaspaseの全貌をつかもうとしています。ただ最近、caspase自身の解析以外に、ミトコンドリアからチトクロームcが放出されそのシグナルが核の変化をひきおこすことがわかったり、アポトーシス抑制因子が5つのラボで発見されたりと、世界のアポトーシス前線は日々に進歩しています。いつまでもcaspaseに固執しては暗礁に乗り上げないとも限りませんので、いくつかの野心的な方向も模索されています。研究室のメンバーは、米国人4人の他、欧州各国からポスドク・学生が来ており、にぎやかです。ラボのセミナーは夏休みも無く、英語のおぼつかない私はいつもあぶら汗たらたらです。来てすぐの頃に、配られてきたラボのセミナー表を見ますと、3回に1回くらいの割合でRound Robinという奴の名前がありました。きっとあの頭がピカピカで丸い奴のニックネームなんだろう、なんとがんばるハッスル男だろうと思っていましたら、あにはからんや、ボスが不在の時にやる出席者全員によるデータ紹介のことでした。さて帰国するまでには、あと何リットルあぶら汗を流すことでしょうか。スリムになってお目にかかりましょう。とりとめのないことを書きまして資源の無駄遣いでしたか？熱帯日本の夏、飲み過ぎないようにお願いいたします。

(刀祢重信：都臨床研・放射線医学、現在エジンバラ大学留学中)

## 2. ER分解：内か外か？

### “小胞体の品質管理機構によるタンパク分解の最先端”

#### (A) はじめに

新生タンパクのうち、遺伝的変異などの原因で折り畳みが不適切なもの（misfoldedタンパク）やオリゴマー形成されなかった余剰のサブユニットなどは、分泌経路から除外され速やかに分解されることが10年前頃から報告され始め、1990年にKlausnerとSitiaにより「小胞体(ER)の品質管理」という言葉が提唱された(1)。それ以降、ERの品質管理機構に関連する研究は、新生タンパク質の折り畳みの完成度をモニターする装置としての分子シャペロンと、不良品を分解する装置としての細胞内プロテアーゼの両面から目覚ましく発展していると言えよう。その概略は小出教授により本誌先号で解説していただいたが、当初ER内腔で起こると考えられたタンパク分解（ER-associated degradation、ERADとも略。ここではER分解と記す。）が、実はサイトゾルへ逆行輸送された後、プロテアソームにより分解されるという説が有力になりつつある。分子シャペロンについては、多くを記せないがカルネキシン/カルレティキュリンによるGlc1Man9GlcNAc2型糖鎖への結合など興味深い知見が出てきた（総説2、3に詳しい）。本稿では、できるだけ先号と重複しないよう、最新の話題を中心に小胞体の品質管理関連タンパク分解を紹介したい。

#### (B) 逆行輸送-プロテアソーム分解説の台頭

当初、ERの品質管理機構により分解されるタンパクは、brefeldin A添加によりERからGolgi体への輸送を遮断しても分解されること、その分解がALLN（Ac-leucyl-leucyl-norleucinal）により阻止されることから、ER内（正確にはpre-Golgi体）でcysteine proteaseにより分解されると考えられていた。通常、この分解は非常に強力で、標的タンパクは免疫沈降で検出できないペプチドレベルに分解される（後述する例外もある）ので、タンパク新生という場にこの様なdigestiveな分解は相応しくないのではと危惧する向きもあった。これに風穴を開けたのは、嚢胞性繊維

症の原因であるCFTR DF508変異体のER分解がラクタシスチンやMG-132などプロテアソーム阻害剤により阻止されるという1995年10月のCellの報告である(4, 5)。このうちKopitoら(Stanford大)は、ユビキチンのLys48をArgに変異させたUbK48Rの共発現によっても変異CFTRの分解が妨げられることから、CFTR変異体はユビキチン化された後、プロテアソームにより分解されると結論した(4)。その後、我々も含め、ALLNで分解阻止が見られたモデルタンパクは、「ラクタシスチン=プロテアソーム特異的阻害剤」を頼りにER内分解からプロテアソーム依存性分解へと修正された。Kopitoらは今年、T細胞レセプター $\alpha$ 鎖のER分解がプロテアソームによることを報告したが、これにはユビキチン化は不必要と結論しており(6)、分解に先立ちユビキチン化されるタンパクとされないものがあるようだ。

では、これらのmisfoldedタンパクはどの様にしてプロテアソームに具されるのであろうか？分泌タンパクは完全にER内腔に産み落とされサイトゾルのプロテアソームは直接アタックすることはできないだろうし、多くの細胞膜レセプターもER内腔側に大きなドメインを有する。昨年、これに一つの重要な答えを出したのがPleogh (MIT) のグループである。彼らはサイトメガロウイルスの遺伝子産物 (US2やUS11) 共発現下において、MHC class IのH鎖はSec61複合体からなるtransloconを介して細胞質側へ逆行輸送され、糖鎖を除去された後、プロテアソームにより分解されると報告し(7, 8)、ここにERからサイトゾルへの逆行輸送 (retrograde transport) 説が台頭した。これはウイルスタンパクという特殊な条件下での逆行輸送と見なすこともでき、果たして哺乳類細胞の通常の品質管理においても同様に逆送されるか疑問視する向きもあるが、少なくとも酵母を使った研究では逆行輸送説が正しいという報告が最近相次いで出されている。

### (C) 酵母では

遺伝子破壊の容易な酵母を使った系では、他家からもプロテアソーム変異株を使った $\alpha$ 1-antitrypsinのZ変異体のER分解の研究(9)や、Sec61pのER分解について報告されている(10)が、ここでは、Wolfら (Stuttgart大) の華々しい知見を紹介したい。

彼らはcarboxypeptidase yscY変異体 (CPY\*、Gly225のArgへの置換を持つ)をモデルに、そのER分解に関与する遺伝子(DER)の解析を行い、DER2がユビキチン結合酵素(UBC7)であるという知見を発端に、ユビキチン化に必要な酵母タンパク (Ubc7p、Ubc6p、Ubc4p) の遺伝子欠損株、UbK48Rの共発現、プロテアソームの変異体発現株においてCPY\*の分解遅くなることを見だし、CPY\*はユビキチン化後プロテアソームにより分解されると報告した(11)。ごく最近の続報において、酵母のタンパク合成は翻訳と協調した輸送 (co-translational transport) では、Sec61p、Sbh1p、Sss1pのヘテロ三量体からなるチャンネルを通ることが、一方post-translational transportではSec62p、Sec63p、Sec71p、Sec72pからなる複合体を介することが周知であるが、これらのうちSec61pとSec63pがCPY\*のサイトゾルへのexportに関与していること、また分子シャペロンのKar2p (哺乳類細胞のGRP78/BiPに相当) もこれに重要であることを示した(12)。さらに、彼らはER分解に関与する24.4 kDaの新規ER膜タンパク (DER1) を見だし、CPY\*の分解にさらなる因子が介在すると考えている(13)。しかし、糖鎖を除去したCPY\*は、むしろ細胞内で安定になること、カルネキシンの遺伝子破壊が全く影響ないことなど(14)、少なくともmisfolded タンパクの認識という点では哺乳類細胞と差違が見られる。

#### (D) プロテアソームの独壇場か？

今年最も多く研究されたER分解のモデルタンパクはapolipoprotein B100 (apoB)であると言っても過言でなく、9月までにJBCだけでも5報の関連報告がある。apoBはHMG-CoA reductase同様、血中脂質濃度に依存してER分解により量的調節を受けるタンパクである。面白いことにapoBはALLN-感受性プロテアーゼによるサイトゾルでの分解と、ALLN-非感受性かつDIT-感受性プロテアーゼによるER内腔での分解があると考えられ(15)、前者はユビキチン化を伴うプロテアソームによる分解で、サイトゾルの分子シャペロンであるHsp70により助長されることが分かった(16)。一方、後者については架橋実験からER60がGRP78/BiPらとともにER内のapoBに架橋されることから、ER60がapoBのER内腔での分解に関与する可能性が示唆されている



(17)。今年になって、ER60にはカルネキシン/カルレティキュリン同様、レクチン様分子シャペロンとしての機能も報告されており(18, 19)、より詳細な研究を待ちたい。apoB(540 kDa)の様に高分子量タンパクではER内タンパク分解も必要なのかもしれないという知見として、私の現在のPIであるArvanらが見いだしたチログロブリン(330 kDa)の先天性異常の例を挙げたい(20, 21)。この異常チログロブリンは分泌障害・ER内滞留を呈するが、その結果、正常では見られない45 kDaの断片を産生するとともにERp72、カルレティキュリン、ER60、GRP78/BiPなどの分子シャペロンが誘導される(18)。Sec61複合体のチャンネルの孔の直径は約20オングストロームといわれ、巨大分子を逆送するには小さ過ぎるため、ER内断片化も参画する可能性は否定できない。ER内プロテアーゼについては、小出研究室(姫路工大)でも鋭意研究中である。

#### (F) おわりに

CFTRのラクタシスチンによる分解阻止の報告以来、2年足らずで「ER内cysteine proteaseによる分解」から「逆行輸送後、プロテアソームによるER外での分解」へとERの品質管理機構の主説は変わってきたが、まだ何が出るか分からないというのが筆者の感想である。現に、今年4月のCold Spring Harborシンポジウムでは、プロテアソーム活性がmisfoldedタンパクをERから引きずり出すことに関連しているという説や、シグナルペプチダーゼがmisfoldedタンパクの断片化に関与しているという結果、プロテアソーム阻害剤存在下で新規プロテアーゼが誘導されるという報告も発表されたようである(22)。ここでは紹介できなかったが、品質管理に関与する分子シャペロンの面でも決着は未だついていないと考えている。世界にcatch upするためにはGoldbergとPloeghが新規プロテアソーム阻害剤を共同開発し、ER分解へも応用したように(23)、日本でもより活発な意見交換が必要と感じている。

#### 文献

1. Klausner, R.D. & Sitia, R. (1990) Cell 62, 611-614.
2. 和田郁夫(1997)細胞工学 16、1258-1267.
3. Kim, P.S., & Arvan, P. (1997) Endocrine Rev., in press.
4. Ward, C.L., Omura, S., & Kopito, R.R. (1995) Cell 83, 121-127.

5. Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D.B., Goldberg, A.L., & Rior dan, J.R. (1995) *Cell* 83, 129-135.
6. Yu, H., Kaung, G., Kobayashi, S., & Kopito, R.R. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 20800-20804.
7. Wiertz, E.J.H.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J., & Pleogh, H.L. (1996) *Cell* 84, 769-779.
8. Wiertz, E.J.H.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapaport, T.A., & Ploegh, H.L. (1996) *Nature* 384, 432-438.
9. Werner, E.D., Brodsky, J.L., & McCracken, A.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13797-13801.
10. Pilon, M., Schekman, R., & Romisch, K. (1997) *EMBO J.* 16, 4540-4548.
11. Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M., & Wolf, D.H. (1996) *Science* 273, 1725-1728.
12. Plemper, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., & Wolf, D.H. (1997) *Nature* 388, 891-895.
13. Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., & Wolf, D.H. (1996) *EMBO J.* 15, 753-763.
14. Knop, M., Hauser, N., & Wolf, D.H. (1996) *Yeast* 12, 1229-1238.
15. Wu, X., Sakata, N., Lele, K.M., Zhou, M., Jiang, H., & Ginsberg, H.N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 11575-11580
16. Fisher, E.A., Zhou, M., Mitchell, D.M., Wu, X., Omura, S., Wang, H., Goldberg, A.L., & Ginsberg, H.N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 20427-20434.
17. Adeli, K., Macri, J., Mohammadi, A., Kito, M., Urade, R., & Cavallo, D. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 22489-22494.
18. Oliver, J.D., van der Wal, F.J., Bulleid, N.J., & High, S. (1997) *Science* 275, 86-88.
19. Elliott, J.G., Oliver, J.D., & High, S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 13849-13855.
20. Kim, P.S., Kwon, O.Y., & Arvan, P. (1996) *J. Cell. Biol.* 133, 517-527.
21. Medeiros-Neto, G., Kim, P.S., Yoo, S.E., Vono, J., Targovnik, H.M., Camargo, R., Hossain, S.A., & Arvan, P. (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 2838-2844.
22. Jallepalli, P., & Bogyo, M. (1997) *Trends Cell Biol.* 7, 333-335.
23. Bogyo, M., McMaster, J.S., Gaczynska, M., Tortorella, D., Goldberg, A.L., & Pleogh, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6629-6634.

(徳永文稔：アルバート・アインシュタイン医科大学・内分泌学部門、姫路工業大学・理学部)

## (8) 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。

### “AAAスーパーファミリータンパク質”ホームページ開設のお知らせ”

「ぶろておりしす」でもたびたび紹介させていただいているAAAファミリータンパク質、AAAプロテアーゼのインターネットホームページを開設いたしましたので、お知らせします。AAAタンパク質については、ドイツ、チュービンゲン大学のFrohlichによって、国際版のAAAホームページが作られていますが、その内容はsequenceの比較と系統樹が主体であり、入門的な記述や特に機能に関する記事・図版が不十分であることなどをカバーするためと、特に日本におけるAAAスーパーファミリータンパク質の研究の発展を願って設置しました。アドレスは：  
<http://sesame.nibb.ac.jp/~aaasympo/aaainfo.html>です。本重点の班員の方々にも多少なりとも関連する情報が盛り込まれておりますので、ご覧いただき、御意見をいただきましたらと思います。ホームページの1ページ目にはAAAスーパーファミリータンパク質のイントロダクションがあり、これはMENUの「代表的AAAタンパク質とその機能」に続きます。「代表的AAAタンパク質とその機能」では、プロテアソーム、メタロプロテアーゼ、膜融合、ペルオキシソームなどに関わるAAAタンパク質について概説しています。MENUには、このほか、出芽酵母のAAAタンパク質、古細菌(Archaea)のAAAタンパク質、真正細菌のAAAタンパク質、総説、ミニレビュー、WWWサイト、シンポジウム・ワークショップなどの各ページへのリンクがあります。このうち、ミニレビューではAAAタンパク質に関する様々な話題について短くまとめたものを掲載していきますが、現在のところ、本誌「ぶろておりしす」に掲

載されたミニレビューの中からAAAタンパク質に関連するものを編集担当者の許可を得て転載しております。今後内容につきましては充実していきたいと思っております。また、シンポジウム・ワークショップでは、来年2月に岡崎で開催予定の公開シンポジウム（学会・集会案内を参照）のホームページへのリンクも紹介しています。

（小椋 光：熊本大学・医）

#### “特別販売”

Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors (eds. Katunuma, N., Kido, H., Fritz, H., and Travis, J.), IOS Press, (1997) 重点班メンバーからの申し込みの場合には特別割引価格4000円（送料込み）にて販売することであり、希望者は勝沼信彦先生（FAX: 0886-22-3217）に直接連絡して下さい。

#### Proteolysisの「訳語」再募集！

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。

（ぷろておりしす 事務局）

#### 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紘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紘一教授が1994年10月に東京で開催した第10回 International Conference on Intracellular Protein Catabolism 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)

"Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors" (eds. Katunuma, N., Kido, H., Fritz, H., and Travis, J.), 1997, IOS Press. 本書は昨年徳島で開催されたFAOBMB会議におけるシンポジウム : Biological Functions of Proteases (この会議の詳細については本誌第2号p.9の学会報告記を参照) の講演要旨を拡大して総説にまとめたものである。本書は"Physiological and Pathological Aspects of Proteases", " Physiological and Pathological Aspects of Protease Inhibitors", " Proteases and Immunology ", "Proteases and Cancers"の4章から構成されており、最新の研究成果が網羅されている。一読を勧めたい。

(ぶろておりしす 事務局)

"Proteolysis in Cell Functions" (eds by V. K. Hopsu-Havu et al.) IOS Press, (1997)  
本書は1996年9月にFinlandのTurkuで開催した第11回 International Conference on



Intracellular Protein Catabolism 国際会議 (ICOP) (会議の詳細については、本誌2号参照)での主要講演者の総説を成書に編集したものである。本重点研究班員の総説が比較的多く所収されている。プロテアーゼの基礎から病態に至る研究が幅広く網羅されているので、プロテオリシス研究者の素人・玄人を問わず参考になる記述が多いので参照されたい。

(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

“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。本誌はこれまでに第1号～第4号まで上梓し、今回、首尾良く第5号を出す運びとなりました。“ぶろておりしす”誌は年3回の発行を目指しているために、原稿の収集(?)が段々と困難になりつつあります。どうか、原稿執筆に積極的にご参加下さい。いつかの編集後記で、本書への執筆は「科研費採択の踏み絵」になるかも知れないと暗示して班員による執筆を半ば強制したのですが、とあるところで、「原稿を執筆したのに2年目に落とされた」との厳しい批判(?)が聞こえて参りました。編集局としては、「科研費採択」の決定権がありませんので「申し訳ありません」と丁重にお詫びするしか方策はありません。皆さん、いついかなる場合でも表現には十分に留意したいものです。しかし、本誌は「誤ちを改たむるに憚ることなかれ」という精神の逆説を地で行かんと、かつての失敗をも省みず独善的な編集に邁進してゆく覚悟です。幸い本誌事務局からの執筆依頼についてはほとんどの方々が、無条件でお引き受け頂いてくれており感謝しています。いづれにしても、上記のように空手形を切って失敗している塩梅ですが、どうかこれに懲りずに「無報酬の敏び」を甘受する程度の心のゆとりを持って頂きたいと願いたします。さて、本号では“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おう”という懸案の企画が成功し、二名より素晴らしい内容の原稿を頂いて無事掲載することができました。これで、企画倒れの汚名返上となりましたが、今後もこの企画を続行して行きたいと思っておりますので、有望な方をご存じの方はお知らせ下さい。日本語の原稿は細明朝体、英語の原稿はTimesで作成し、e-mail (tanakak@rinshoken.or.jp) かdiskでお送り下さい。「文字化け」防止のために、e-mailでなくdiskでお送り頂ければ幸いです。

(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。さて、今回この欄に班員以外の先生から掲載を依頼されました。本誌は本来、班員相互の情報交換と相互扶助(?)を計ることを基本的な目的に発行していますが、「日本の蛋白質分解研究」の裾野を開拓する主旨からも、班員以外の研究者達にも送付していますし、これまでも班員以外の多数の方々よりミニレビュー等の執筆にご協力頂きました。従って、この「発表論文の概要紹介」の欄についても、班員以外にも広く門戸を解放したいと思っています。この欄への投稿は自分の研究を国内津々浦々に宣伝する絶好の機会ですので、多くの「班員」および「蛋白分解研究者」からの掲載原稿の提出を強く希望します。

# Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage $\lambda$ : Transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA)

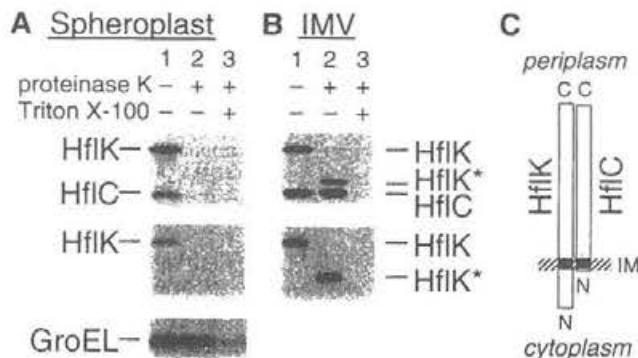
(proteolytic control/membrane protein/AAA ATPase)

AKIO KIHARA, YOSHINORI AKIYAMA, AND KOREAKI ITO<sup>†</sup>

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

Communicated by William T. Wickner, Dartmouth Medical School, Hanover, NH, March 26, 1997 (received for review November 25, 1996)

**ABSTRACT** The *cII* gene product of bacteriophage  $\lambda$  is unstable and required for the establishment of lysogenization. Its intracellular amount is important for the decision between lytic growth and lysogenization. Two genetic loci of *Escherichia coli* are crucial for these commitments of infecting  $\lambda$  genome. One of them, *hflA* encodes the HflKC membrane protein complex, which has been believed to be a protease degrading the cII protein. However, both its absence and overproduction stabilized cII *in vivo* and the proposed serine protease-like sequence motif in HflC was dispensable for the lysogenization control. Moreover, the HflKC protein was found to reside on the periplasmic side of the plasma membrane. In contrast, the other host gene, *ftsH* (*hflB*) encoding an integral membrane ATPase/protease, is positively required for degradation of cII, since loss of its function stabilized cII and its overexpression accelerated the cII degradation. *In vitro*, purified FtsH catalyzed ATP-dependent proteolysis of cII and HflKC antagonized the FtsH action. These results, together with our previous finding that FtsH and HflKC form a complex, suggest that FtsH is the cII degrading protease and HflKC is a modulator of the FtsH function. We propose that this transmembrane modulation differentiates the FtsH actions to different substrate proteins such as the membrane-bound SecY protein and the cytosolic cII protein. This study necessitates a revision of the prevailing view about the host control over  $\lambda$  lysogenic decision.



**FIG. 4.** HflK and HflC reside on the periplasmic side of the membrane. Spheroplasts (A) and inverted membrane vesicles (B) prepared from AD202 were incubated at 0°C for 2 hr in the absence (lane 1) or presence (lanes 2 and 3) of 1 mg/ml proteinase K. Lanes 3 received 1% Triton X-100 before digestion. Proteins were analyzed by SDS/PAGE and immunoblotting using antisera directed against the HflKC complex (Upper), the HflK subunit (A Middle) or (B Lower), and the GroEL protein (A Bottom). (C) Schematic representation of the topographical arrangements of HflK and HflC.

## 要旨

大腸菌の FtsH は ATP 依存性のメタロプロテアーゼであり、大腸菌の内膜に存在する。これまでに我々はタンパク質膜透過装置を構成する膜タンパク質 SecY が単独状態にある時、FtsH により分解されることを報告した<sup>1,2</sup>。

$\lambda$  ファージは大腸菌に感染すると染色体に組み込まれて溶原化するか、増殖して溶菌するかのいずれかの運命をたどる。 $\lambda$  ファージが溶原化するには cII タンパク質と呼ばれる転写調節因子が必要であり、その細胞内の量が多いと溶原化に、少ないと溶菌サイクルに入る。FtsH (HflB)、HflK、HflC の機能が失われると不安定な cII は安定化され、 $\lambda$  ファージの溶原化頻度が上昇することが知られている。HflK・HflC 複合体 (HflKC) は cII を分解するプロテアーゼであり、FtsH と HflKC は独立な経路で cII タンパク質の分解に関わると考えられていた。しかし、最近になって我々は FtsH と HflKC が複合体を形成していることを見だし<sup>3</sup>、従来の考えに疑問を感じた。今回、我々は精製 FtsH-His<sub>6</sub>-Myc と HflKC を用いて、FtsH-His<sub>6</sub>-Myc が *in vitro* で cII を ATP 依存的に分解することを示したが、以前の報告と異なり HflKC には cII 分解活性が見られなかった。我々は *in vivo* における cII の安定性の再検証、HflC のプロテアーゼ活性部位と推測された領域の欠変異などの解析を通じて HflKC が cII を分解するプロテアーゼではないと結論を出した。さらに我々は、HflK 及び HflC の大きな C 末端ドメインはペリプラズム側に配向していることを明らかにした。このことも HflKC が細胞質に存在する cII を分解できないことを強く支持している。我々は HflKC は膜を越えて細胞質側で働く FtsH の活性を調節していると考えている。

1. Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4532-4536.

2. Akiyama, Y., Kihara, A., Tokuda, H. and Ito, K. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31196-31201.

3. Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1996) *EMBO J.* **15**, 6122-6131.

# Intracellular degradation of secretion defect-type mutants of antithrombin is inhibited by proteasomal inhibitors

Fuminori Tokunaga<sup>a</sup>, Hiroko Shirotani<sup>a</sup>, Kazuya Hara<sup>a</sup>, Daisuke Kozuki<sup>a</sup>, Satoshi Omura<sup>b</sup>, Takehiko Koide<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Harima Science Park City, Hyogo 678-12, Japan

<sup>b</sup>Research Center for Biological Function, The Kitasato Institute, 9-1 Shirokane 5-Chome, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

Received 21 April 1997; revised version received 5 June 1997

**Abstract** To examine the cellular basis for secretion defect-type antithrombin deficiency, we expressed two mutants, P→stop (Pro<sup>429</sup> to stop codon) and ΔGlu (deletion of Glu<sup>313</sup>). Pulse-chase experiments using stably transfected BHK cells showed that little (<5%) of P→stop mutant as well as ΔGlu mutant was secreted and the total amount of radioactivity was significantly reduced, suggesting an intracellular degradation. The degradation was not inhibited by brefeldin A, indicating it occurring in a preGolgi apparatus. However, the degradation was strongly inhibited by proteasomal inhibitors, such as carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (LLL), carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-norvalinal (LLnV) and lactacystin. By endoglycosidase H digestion and immunofluorescence staining, these mutants were shown to localize in the endoplasmic reticulum (ER). These results suggest that the secretion defect-type mutants of antithrombin are degraded by proteasome through the ER-associated quality control mechanism in the cells.

© 1997 Federation of European Biochemical Societies.

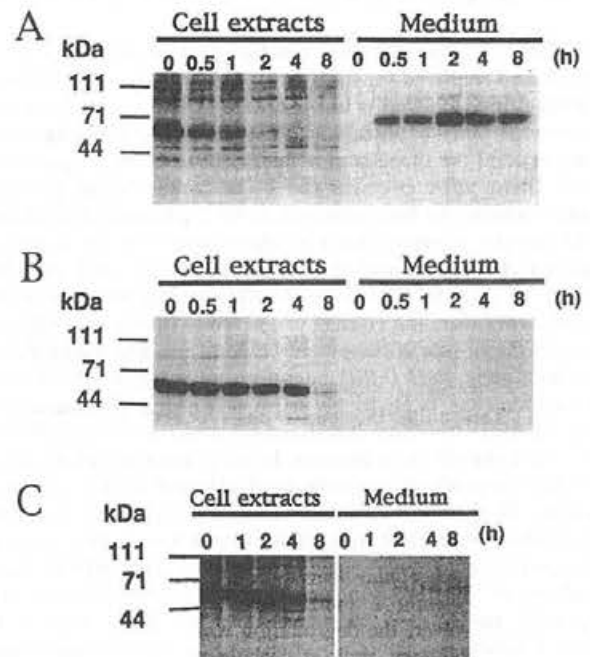
**Key words:** Antithrombin; Endoplasmic reticulum-associated degradation; Quality control; Lactacystin; Proteasome

[要約] タイプI型(分泌異常型)アンチトロンビン欠乏症の細胞内機構を解析する目的で、P→stop (Pro429の停止コドンへの変異)体とΔGlu (Glu313の欠失)体の2種の変異体をBHK細胞に発現させた。パルス-チェイス実験の結果、両変異体ともほぼ正常に合成されるものの、細胞外へはほとんど分泌されなかった(<5%)。それにも拘わらず、細胞内量は、野生型よりは遅いものの、次第に減少し、細胞内での分解が示唆された(Fig. 1)。

さらに、各種のプロテアーゼインヒビターの存在下で発現し、分解阻止効果を調べた結果、プロテアソームインヒビターであるLLL, LLnV, Lactacystinなどの阻止効果が大きく、これらの変異体がプロテアソームによって分解されていることが示唆された(Fig. 2)。

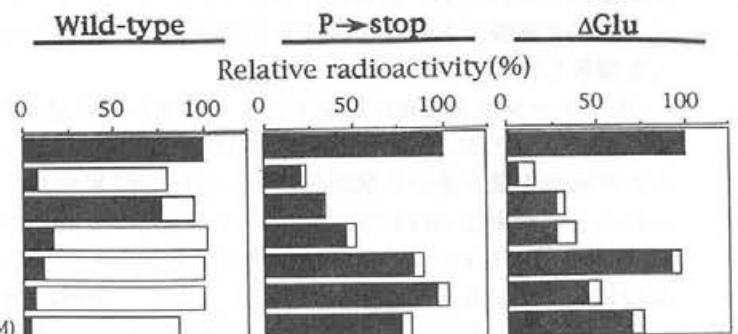
- 1 Pulse-label
- 2 No inhibitor
- 3 BFA(3μg/ml)
- 4 LLnL(50μM)
- 5 LLL(50μM)
- 6 LLnV(50μM)
- 7 Lactacystin(10μM)

**Fig. 2.** Effects of brefeldin A and proteasomal inhibitors on the secretion and degradation of wild-type antithrombin and P→stop and ΔGlu mutants. Stably transfected BHK cells were pulse-labeled for 1 h with 50 μCi/ml of EXPRE<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S and then chased for 8 h in the presence of various inhibitors. Antithrombin in the cell extracts and in the conditioned medium were immunoprecipitated, followed by SDS-PAGE analysis in the presence of 2-mercaptoethanol. Radioactivities of bands corresponding to antithrombin were quantitated by Bio-Imaging Analyzer. The relative radioactivities of antithrombin in cell extracts (closed bars) and medium (open bars) are shown.



**Fig. 1.** Pulse-chase analysis of Wt antithrombin and P→stop and ΔGlu mutants in stably transfected BHK cells. Stable BHK cells were pulse-labeled for 1 h with 100 μCi/ml EXPRE<sup>35</sup>S<sup>35</sup>S (a mixture of [<sup>35</sup>S]Met and [<sup>35</sup>S]Cys, NEN) and chased for 0, 0.5, 1, 2, 4, and 8 h. Labeled antithrombin from cell extracts and from the medium were immunoprecipitated and analyzed on 12.5% SDS-PAGE.

A, Wt antithrombin; B, P→Stop mutant; C, ΔGlu mutant.





## Identification of an ubiquitin-ligation system for the epidermal-growth-factor receptor Herbimycin A induces *in vitro* ubiquitination in rabbit-reticulocyte lysate

Seiji MORI<sup>1</sup>, Keiji TANAKA<sup>2</sup>, Harumi KANAKI<sup>1</sup>, Mitsuyoshi NAKAO<sup>3</sup>, Tadashi ANAN<sup>3</sup>, Koutaro YOKOTE<sup>1</sup>, Ken TAMURA<sup>1</sup>  
and Yasushi SAITO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Second Department of Internal Medicine, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan

<sup>2</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

<sup>3</sup> Department of Tumor Genetics and Biology, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan

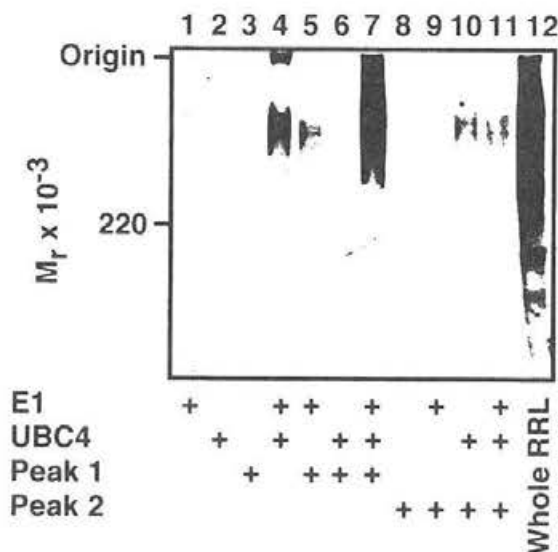
(Received 20 May 1997) – EJB 97 0712/1

Some receptor tyrosine kinases such as the receptors for epidermal-growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor undergo polyubiquitination as a consequence of ligand binding. The EGF receptor is also ubiquitinated by treatment with herbimycin A, an ansamycin antibiotic widely used as a tyrosine kinase inhibitor. To investigate the mechanism of the receptor ubiquitination, we have established an assay system in which herbimycin-A-induced ubiquitination processes can be analyzed *in vitro*. We now show that herbimycin A treatment of the purified EGF receptor induces polyubiquitination of the receptor in rabbit-reticulocyte lysate. Both DEAE unadsorbed material (fraction I) and high salt eluate (fraction II) of the reticulocyte lysate are involved cooperatively in the ubiquitination process, where the ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 can functionally substitute for fraction I. A ubiquitin-protein ligase-like activity, partially purified from fraction II by DEAE anion-exchange chromatography, also functions in concert with UBC4. The precise mechanism of herbimycin A-induced ubiquitination of the EGF receptor is not fully understood, however, our present findings suggest that direct interaction with herbimycin A results in some modification of the receptor which is recognized by the ubiquitin-conjugating system in rabbit-reticulocyte lysate.

**Keywords:** epidermal-growth-factor receptor; herbimycin A; ubiquitination; ubiquitin-conjugating enzyme; ubiquitin-protein ligase.

我々は既に、血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体をはじめとする多くの受容体チロシンキナーゼがリガンド刺激依存性にポリユビキチン化すること、ならびにポリユビキチン化された受容体は細胞内でプロテアソームにより速やかに分解されることを報告してきた。そしてこのリガンド依存性ポリユビキチン化とそれに引き続くプロテアソームによる分解という現象は、新しいタイプの受容体チロシンキナーゼのシグナル伝達抑制メカニズムの一つであることを提唱してきた。本研究は、この現象の分子メカニズムのより詳細な解明を目指して、受容体チロシンキナーゼのユビキチン化を触媒する酵素群の同定を試みたものである。

精製した上皮増殖因子 (EGF) 受容体をインビトロでハービマイシンとともにインキュベートすると、その受容体はウサギ網状赤血球溶解液 (RRL) 中で活発にポリユビキチン化されることを発見した。そこでこの系を用いて、RRLを酵素源としてEGF受容体のユビキチン化を触媒する酵素活性の解析を行なった。そして、1) ユビキチン化にはRRLのフラクション1と2の両者の存在が必要であること、2) フラクション1はリコンビナントUBC4でその機能を代替可能であること、3) フラクション2をDEAEカラムに吸着させた後、0–600 mMまでのKClのリニアードンシティーグラジエントで溶出した分画中にUBC4をE2パートナーとするE3活性が存在すること、以上を発見した。論文にはここまでの内容を掲載したが、現在このE3活性を示す蛋白のさらなる精製を行なっている。



(図) リコンビナントのE1とUBC4、ならびにDEAEカラムから溶出されたユビキチン化活性を示す分画(ピーク1)を用いたEGF受容体ユビキチン化のインビトロ再構成実験。ピーク1は、E1とUBC4の両者が共存した場合にのみユビキチン化活性を示すことから、E3としての性質を具備していることが明らかにされた(レーン7)。

# Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and $\gamma$ -interferon regulation

Nobuyuki Tanahashi<sup>1,9</sup>, Kin-ya Yokota<sup>1</sup>, Joon Young Ahn<sup>2</sup>, Chin Ha Chung<sup>2</sup>, Tsutomu Fujiwara<sup>3</sup>, Ei-ichi Takahashi<sup>3</sup>, George N. DeMartino<sup>4</sup>, Clive A. Slaughter<sup>5</sup>, Tetsushi Toyonaga<sup>6</sup>, Ken-ichi Yamamura<sup>6</sup>, Naoki Shimbara<sup>7,9</sup> and Keiji Tanaka<sup>8,9,\*</sup>

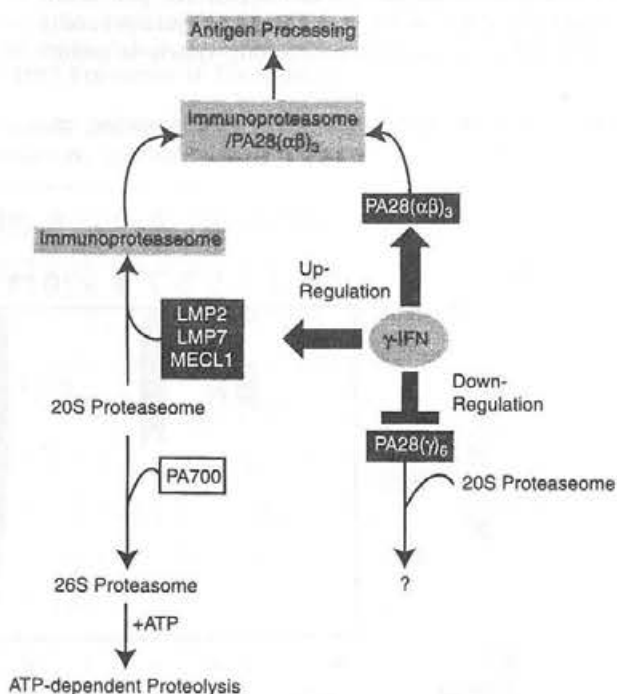
## Abstract

**Background:** Recent cDNA cloning of two homologous proteasome activators, PA28 $\alpha$  and PA28 $\beta$ , indicated the presence of a structurally related third protein, Ki antigen, but a functional relationship between Ki antigen and the two PA28 proteins is unknown. Accumulating evidence has implicated an important role for PA28 in the major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted antigen processing pathway. Recently, an immunomodulatory cytokine  $\gamma$ -interferon ( $\gamma$ -IFN) was found to increase greatly the messages for PA28 $\alpha$  and PA28 $\beta$ , but not Ki antigen, in human cells.

**Results:** Ki antigen was co-immunoprecipitated with the 20S proteasome by anti-proteasome antibody, and associated reversibly with the 20S proteasome, as observed for PA28 $\alpha$  and PA28 $\beta$ . Therefore, Ki antigen was renamed PA28 $\gamma$ . Anti-PA28 $\gamma$  antibody,

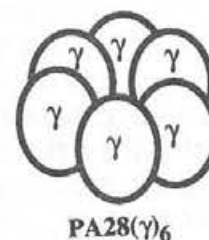
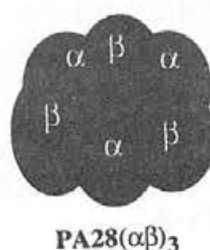
however, did not immunoprecipitate PA28 $\alpha$  and PA28 $\beta$ .  $\gamma$ -IFN caused an almost complete loss of the PA28 $\gamma$  protein in cells without affecting its mRNA level, whereas the levels of both mRNA and protein for PA28 $\alpha$  and PA28 $\beta$  were coordinately up-regulated by  $\gamma$ -IFN. Finally we showed that the human chromosomal genes of PA28 $\alpha$  and PA28 $\gamma$  were located on 14q11.2 and 17q21.32-21.33, respectively.

**Conclusion:** PA28 $\gamma$  (equivalent to Ki antigen) is a new member of the PA28 family proteins. It exists as a unique homopolymer under non-denaturing conditions.  $\gamma$ -IFN was found to induce the expression of PA28 $\alpha$  and PA28 $\beta$ , whereas it caused almost complete loss of the PA28 $\gamma$  protein in cells. The reciprocal expression of the PA28 family proteins may imply their involvement in distinct biological processes.



**Summary figure**  $\gamma$ -IFN induces not only the 20S immunoproteasomal subunits, LMP2, LMP7 and MECL1, but also two subunits of the proteasome activator, PA28 $\alpha$  and PA28 $\beta$ . Immunoproteasomes and  $\gamma$ -IFN-inducible PA28 $\alpha/\beta$  have been implicated to be involved coordinately in the antigen processing. The other proteasome activator, PA700, is associated ATP-dependently with the 20S proteasome to form the 26S proteasome, which catalyses an ATP-dependent proteolysis. Moreover,  $\gamma$ -IFN caused almost complete loss of PA28 $\gamma$  (equivalent to Ki antigen), but the physiological significance is unknown at present. PA28 $\gamma$  is presumably assembled to the homopolymer complex, PA28( $\gamma$ )<sub>6</sub>, differing from the heteropolymer complex, PA28( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>, consisting of PA28 $\alpha$  and PA28 $\beta$ .

プロテアソームは触媒ユニット（20Sプロテアソーム）に調節ユニットが会合して機能型酵素になる巨大な多成分複合体である。調節ユニットPA700が会合すると真核生物のATP依存性プロテアーゼである26Sプロテアソームになることはよく知られているが、最近もう一つの調節ユニットPA28が発見された。筆者らはPA28をコードするcDNAをクローニングすると、相同性の高い二種のタンパク質から構成されていることが判明したので、それらをPA28 $\alpha$ とPA28 $\beta$ と命名した。これらの一次構造を解明すると、驚いたことにPA28と高い機能不明のタンパク質Ki-antigen（自己免疫疾患患者血清中に存在する自己抗体の抗原として同定された）の存在することが分かった。本研究では、Ki-antigenが20Sプロテアソームに可逆的に会合することを証明し、この分子をPA28 $\gamma$ と再命名した。さらに、これらがPA28( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>とPA28( $\gamma$ )<sub>6</sub>の二種の複合体として存在すること（下記のモデル参照）を突き止めると共に、これらのインターフェロニン $\gamma$ に対する応答性が異なること等も見出した（左図のsummary figure参照）。これらの結果は、ごく最近PA28が内在性抗原のプロセッシングに必須な役割を演じていることの報告と一致する。



## Yeast Counterparts of Subunits S5a and p58 (S3) of the Human 26S Proteasome Are Encoded by Two Multicopy Suppressors of *nin1-1*\*

Kin-ichiro Kominami,<sup>††</sup> Naganari Okura,<sup>†</sup> Motohiro Kawamura,<sup>†</sup> George N. DeMartino,<sup>§</sup> Clive A. Slaughter,<sup>||</sup> Naoki Shimbara,<sup>¶</sup> Chin Ha Chung,<sup>#</sup> Masahiro Fujimuro,<sup>@</sup> Hideyoshi Yokosawa,<sup>@</sup> Yoshihisa Shimizu,<sup>\*\*</sup> Nobuyuki Tanahashi,<sup>\*\*</sup> Keiji Tanaka,<sup>\*\*</sup> and Akio Toh-e<sup>†††</sup>

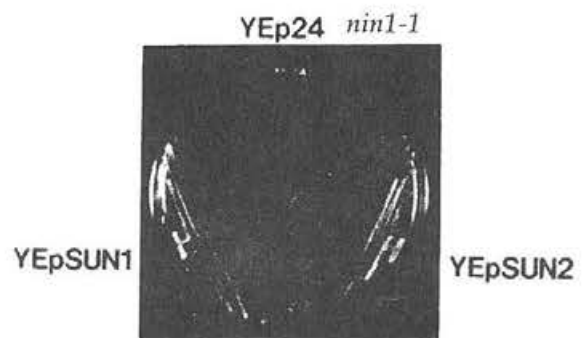
Nin1p, a component of the 26S proteasome of *Saccharomyces cerevisiae*, is required for activation of Cdc28p kinase at the G<sub>1</sub>-S-phase and G<sub>2</sub>-M boundaries. By exploiting the temperature-sensitive phenotype of the *nin1-1* mutant, we have screened for genes encoding proteins with related functions to Nin1p and have cloned and characterized two new multicopy suppressors, *SUN1* and *SUN2*, of the *nin1-1* mutation. *SUN1* can suppress a null *nin1* mutation, whereas *SUN2*, an essential gene, does not. Sun1p is a 268-amino acid protein which shows strong similarity to MBP1 of *Arabidopsis thaliana*, a homologue of the S5a subunit of the human 26S proteasome. Sun1p binds ubiquitin-lysozyme conjugates as do S5a and MBP1. Sun2p (523 amino acids) was found to be homologous to the p58 subunit of the human 26S proteasome. cDNA encoding the p58 component was cloned. Furthermore, expression of a derivative of p58 from which the N-terminal 150 amino acids had been removed restored the function of a null allele of *SUN2*. During glycerol density gradient centrifugation, both Sun1p and Sun2p comigrated with the known proteasome components. These results, as well as other structural and functional studies, indicate that both Sun1p and Sun2p are components of the regulatory module of the yeast 26S proteasome.

表 1 出芽酵母 26S プロテアソームの調節因子遺伝子とヒト遺伝子の対応

	遺伝子名	ヒトホモログ
ATPase	YTA5	S4
	CIM5/YTA3	S7/MSS1
	YTA1	TB1
	YTA2	S6/TBP7
	CIM3/SUG1	S8/TRIP1
	SUG2/CRL3	p43 <sup>a)</sup>
	non-ATPase	SEN3
	NAS1/HRD2	S2/TRAP2
	SUN2	S3
	NIN1	S14
	NAS2	S12/Mov-34
	SUN1	S5a <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> 機能的なホモログであるかどうかは不明。

<sup>b)</sup> アミノ酸配列の長さは異なる。



最近、細胞周期制御におけるプロテアソームの役割が注目されている。それは細胞周期因子や転写因子として分離された遺伝子群が26Sプロテアソームの制御因子であることが相次いで分かってきたからである（左表の *CIM5*, *MSS1*, *SUG1*, *SUG2*, *SEN3*, *NIN1* および *S4* の分裂酵母ホモログ *mts2* 等）。すでに我々は細胞周期の G<sub>1</sub>/S 転移と M 期の振興に必須な遺伝子 *NIN1* (nuclear integrity) がヒト p31 (=S14) のホモログであることを報告した (EMBO J. 14, 3105-3115, 1995)。今回、温度感受性変異株 *nin1-1* の 2 種の抑圧遺伝子 *SUN1* と *SUN2* (suppressor of *nin1-1*) を分離したところ両者とも 26S プロテアソームの調節ユニットを構成するサブユニットをコードしていることが判明した。とくに Sun1p はマルチ-ユビキチン鎖を補足する機能を有するユビキチン受容体であることが判明した。しかし、*SUN1* は必須遺伝子でなかったため、26S プロテアソームには第 2 のユビキチン受容体の存在する可能性が示唆された。

# Proteolysis of Erythrocyte-Type and Brain-Type Ankyrins in Rat Heart after Postischemic Reperfusion<sup>1</sup>

Ken-ichi Yoshida<sup>2</sup> and Kazuki Harada

Department of Legal Medicine, Yamaguchi University School of Medicine, Ube, Yamaguchi 755

Received for publication, January 23, 1997

Ankyrin links cytoskeleton and integral membrane proteins and is proteolyzed *in vitro* by calpain, a Ca<sup>2+</sup>-dependent protease. In the present study, we examined the localization of two ankyrin isoforms, erythrocyte (red blood cell)-type (ankyrin<sub>R</sub>) and brain-type (ankyrin<sub>B</sub>), and their proteolysis after ischemia-reperfusion in the subcellular fractions of perfused rat heart by immunoblotting and by immunohistochemistry using specific antibodies. Both isoforms were observed to be distributed chiefly in the myofibril-nucleus (1,000×g pellet: P1) fraction, while ankyrin<sub>R</sub> was located substantially in the membrane (100,000×g pellet: P2) fraction. Reperfusion after 10 min or more of global ischemia induced preferential proteolysis of ankyrin<sub>R</sub> in the P2 fraction and ankyrin<sub>B</sub> in the P1 fraction. The proteolysis of ankyrin<sub>R</sub>, but not ankyrin<sub>B</sub>, was effectively inhibited by the synthetic calpain inhibitor acethyl-leucyl-leucyl-norleucinal. The immunohistochemical examination showed that anti-ankyrin<sub>R</sub> delineated striations, sarcolemma and nuclei, and the staining was decreased after ischemia-reperfusion, while anti-ankyrin<sub>B</sub> showed diffuse staining. The proteolysis of ankyrin<sub>R</sub> may interfere with force conduction through disruption of the linkage between integral membrane proteins and the myofibril-cytoskeleton.

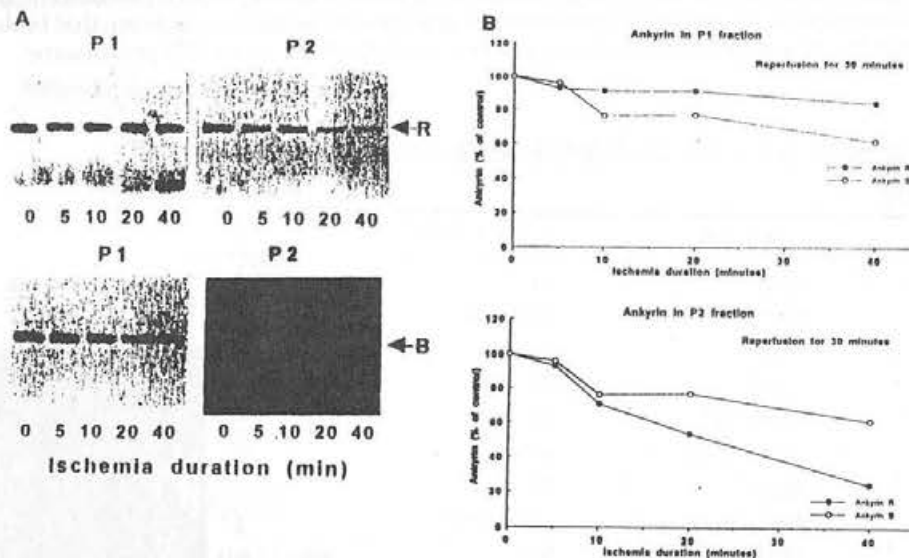


Fig. 2. Effect of ischemia duration on the proteolysis of ankyrin isoforms. Proteolysis of ankyrin<sub>R</sub> (R, closed circles) and ankyrin<sub>B</sub> (B, open circles) of the P1 and P2 fractions in the heart after various durations of ischemia followed by a fixed time (30 min) of

reperfusion is shown in representative immunoblots (panel A) and in the graph showing the quantification of the blots (panel B, mean of two experiments for each point, shown as % of no-ischemia value). For details, see the text.

【要約】 アンキリンは細胞骨格と膜内在蛋白 (Na/K-ATPase, Na channel, Na/Ca exchanger, Ca channel) を連結するカルパイン感受性蛋白質である。本研究では、赤血球型と脳型アンキリン (アンキリンR、B) のラット心筋内細胞局在と虚血再灌流時の蛋白分解を灌流ラット心臓モデルを用い、ウエスタンブロッティングと免疫組織化学により調べた。アンキリンR、Bとも筋原線維-核分画 (P1: 1000xg pellet) に大部分が存在したか、アンキリンRは膜分画 (P2: 100,000xg pellet) にも存在した。10分以上の虚血後、再灌流により膜分画のアンキリンRと筋原線維-核分画のアンキリンBが選択的に分解された。膜アンキリンRの分解はカルパイン阻害剤である (Acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal) により阻害された。免疫組織化学により、アンキリンRは横紋、サルコレンマ、核を染色し、虚血再灌流により減少することが示された。アンキリンRの分解は膜内在蛋白と筋原線維-細胞骨格との連結を切ることによって、収縮力の伝達を阻害するのかもしれない。



## Distribution of Ankyrin Isoforms and Their Proteolysis After Ischemia and Reperfusion in Rat Brain

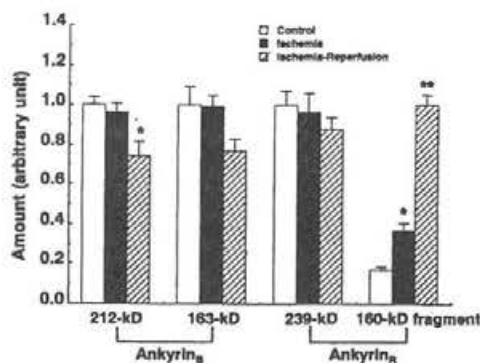
Kazuki Harada, \*Shiro Fukuda, †Manabu Kunimoto, and Ken-ichi Yoshida

Departments of Legal Medicine and \*Anesthesiology and Resuscitology, Yamaguchi University School of Medicine, Yamaguchi; and †Environmental Health Sciences Division, National Institute for Environmental Studies, Ibaraki, Japan

**Abstract:** The distribution of brain-type ankyrin (ankyrin<sub>B</sub>, 212 kDa) and erythrocyte-type ankyrin (ankyrin<sub>R</sub>, 239 kDa) was investigated in the subcellular fractions of rat forebrain (P1, 1,000 g pellet; P2, 15,000 g pellet; P3, 100,000 g pellet; S, 100,000 g supernatant) by immunoblotting using specific antibodies. The P2 fraction contained ~40% of the 212- and 163-kDa isoforms of ankyrin<sub>B</sub> and the 239-kDa isoform of ankyrin<sub>R</sub>. Further subfractionation of the P2 by Percoll gradient centrifugation followed by separation of myelin showed association of the three ankyrin isoforms with the synaptosome-rich fraction but not with the myelin-rich fraction. The plasma membrane-rich P3 fraction contained a concentration of ankyrin isoforms similar to that in the P2 fraction. In vitro proteolysis of ankyrin in the P2 fraction with calpain showed that the 212-kDa ankyrin<sub>B</sub> was more susceptible to calpain than was ankyrin<sub>R</sub>. In the two-vessel occlusion model, ischemia for 30 min generated the 160-kDa fragment of ankyrin<sub>R</sub>, and reperfusion for 60 min after 30 min of ischemia remarkably increased the 160-kDa fragment. The reperfusion also significantly decreased the 212-kDa isoform of ankyrin<sub>B</sub>. Both ischemia-reperfusion and in vitro proteolysis with calpain generated the 160-kDa fragment of ankyrin<sub>R</sub>, suggesting the involvement of calpain.

**Key Words:** Ankyrin<sub>B</sub> and ankyrin<sub>R</sub> isoforms—Ischemia-reperfusion—Calpain—Rat brain—Subcellular fractionation—Synaptosome.

*J. Neurochem.* 69, 371–376 (1997).



**FIG. 5.** Proteolysis of ankyrin isoforms in control, ischemia, and reperfusion groups as demonstrated by quantification of the immunoblots as presented in Fig. 4. Proteolysis of the 212-kDa isoform of ankyrin<sub>B</sub> was significant after ischemia (30 min)-reperfusion (60 min), and proteolysis of ankyrin<sub>R</sub>, as detected by the appearance of its 160-kDa fragment, was significant after ischemia (30 min) and became remarkable after ischemia-reperfusion. The 163-kDa isoform of ankyrin<sub>B</sub> was decreased after ischemia-reperfusion, although not significantly. Data are mean  $\pm$  SE values of the amount of ankyrin isoform (arbitrary unit) obtained from six rats for each group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , vs. control group.

[要約] 脳型アンキリン (アンキリンB) と赤血球型アンキリン (アンキリンR) の細胞内局在をラット前脳の細胞分画 (P1, 1000xg pellet; P2, 10,000xg pellet; P3, 100,000xg pellet; S, 100,000xg supernatant) のウエスタンブロッティングにより調べた。P2分画は約40%の212-kD、164-kDアンキリンBと239-kDアンキリンRを含んだ。P2を更に、Percoll gradientで分画し、これらがミエリンでなく、シナプトソームに存在することを確認した。形質膜に富むP3分画にもP2と同程度の濃度のアンキリンB、Rが含まれた。試験管内でP2分画をカルパインと反応させると、B型の方が感受性が高かった。ラット前脳の2血管閉塞モデルにおいて、30分虚血後、アンキリンRの160-kD断片が生成し、さらに60分再灌流すると160-kD断片は著明に増加した。再灌流後、アンキリンBの212-kD断片が有意に減少した。試験管内のカルパインによるアンキリンの分解パターンとの比較より、虚血再灌流時、カルパインがアンキリンRを分解するものと思われる。