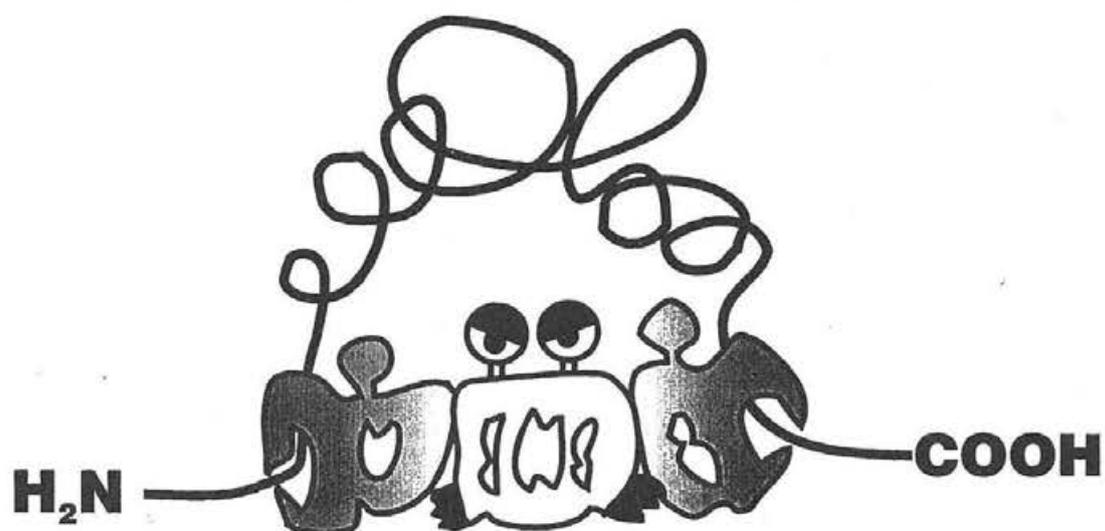


重点領域研究

「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6号（平成10年2月発行）

文部省科学研究費重点領域研究「細胞内蛋白分解」事務局

目次

- (1) 巻頭言
- (2) 平成10年度重点研究班会議日程
- (3) 活動および関連事業
 - 1 班員名簿発行
 - 2 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2回公開シンポジウム：「プロテアーゼとアポトーシス」報告
- (4) 学会・集会報告
 - 1 Vth International Symposium on Proteinsase Inhibitors and Biological Control
 - 2 International Symposium on Dynamic Aspects of Lysosomal/Vacuolar System
 - 3 International Conference on Protease Inhibitors '97 (ICPI '97)
 - 4 The 3rd UK-Japan Cell Cycle Workshop
 - 5 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)
- (5) ミニレビュー
 - 1 ミトコンドリアプロセシングペプチダーゼ：分子進化と機能分化
 - 2 転写制御因子の分解機構
 - 3 プロテアソームによる精子鞭毛運動の制御
- (6) トピックス
 - 1 Protein Kinase CとApoptosis
 - 2 生体内ユビキチンの定量：イムノアッセイの問題点
- (7) 海外留学中研究者からの最新情報
 - 1 ロンドン通信
- (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

— 研究におけるバックアップシステムの確立 —

昨年、ワシントン大（シアトル）での半年間の客員を終えて、つくづく思った事がある。それ、は我が国における研究のバックアップシステムの貧困さであろうか。もとより、こうした支援システムが欧米の足元にも及ばないのは周知のことで、留学された方々はすべて身をもって経験したであろう。云うまでもなく、欧米と日本の文化や考え方には著しい違いがあるので、何事も短絡的に比べるのは控えるべきであるが、客観性のあるサイエンスの中では許されるであろう。

さて、欧米の普通の研究室では、教授、準教授、助教授（docent も含む）など、いわゆるスタッフに加えて、秘書のほか技術員、研究補助員、civil engineer の幾人かが、ルーチン化された仕事や機器の管理、操作に当たっている。また、スタッフ専任のテクニシャンもいる。こうした研究を支えるシステムが、我が国の平和的研究室にあるだろうか。最近の集中豪雨的な予算配分の傘下にある研究室は別として、通常の実験室では、予算的にも、厳しく規制された雇用の面からも、とても無理であろう。

如何にそうしたシステムが貧困であるかを反映する身近な例として、我が国における Protein sequencer と DNA sequencer の購入状況を、欧米のそれらと比較してみたい。表は、これらの機器の販売ではトップの

Perkin Elmer Applied Biosystems 社が、欧米と我が国の研究機関に入れた sequencers の数を示している。驚いたことに、我が国の購入数は Protein と DNA sequencers とともにヨーロッパを越えているし、DNA sequencer は US よりも多い。勿論、1 社のみでの比較なので正確さに欠けるが、後発メーカーからの台数を加えても、Japan/US/Europe の比は変わらないであろう。云いたいことは、もし研究室に欧米並みの確立した支援システムがあって、研究補助員がそうした機器を日常的に動かしていれば、例え protein や DNA の構造情報が分子レベルでの研究に必須とされる今日でも、欧米を越える程の数は必要なかろう。こうした高価な機器は、幾つかのグループで共用するのが欧米では当たり前である。

ここで問題なのは、機器の導入によってそれなりの成果を挙げてるのであればまだしも、多くは一時期使用したあと、埃を被って放置されたままになることである。私の経験でも、例え sequencer が設置されていても、日常稼働してないためにスムーズに動かず、当方にサンプルを依頼される場合が多くあった。従って、これは税金の無駄使いとも云えるし、またそれ以上に厳しいのは、研究補助員が採れないために、補助員で充分できる仕事を研究者が肩代わりせざるを得ない現状であろう。何も sequencer に限ったことではないが、これほど研究者の能力を無駄使いしてる例は余りない。研究者側から見て、こうした状況を生む原因には、①共用することへの認識の貧しさ、②一人占めへのひとりよがり、③新しい機器を導入することへの満足感、④流行を追う焦り、⑤日本人の器用貧乏、などが挙げられようが、これらは反省するとしても、やは

りバックアップシステムの貧困さが大きく影響してるように思えてならない。支援システムの制度化は緊急かつ重要課題であろう。

ところで、官僚機構によるある種の統制が、研究の自由、創造性、自治を犯してる点無しとしないが、昨今の大型予算の配分の偏りやその運用を見るにつけ、かつてのサイエンスに対する公平な Support and no control の精神が次第に失われつつあるのが、大変気になるところである。帰するところ、今日の科学行政のあり方に問題があるのであろうが、それにしても上意下達の先取り競争に落ち込んだ感の強い現状を、“ぶろておりしす”の皆さんはどうみるのであろうか。

		表				(台数)
	モデル	日本	米 国	ヨーロッパ	他	総 数
Protein Sequencer	47X/49X	512	750	300	100	1,662
DNA Sequencer	310*	706	446	648		1,800

*モデル 373 と 377 の購入数を加えると、我が国の保有数は1,811台という。

平成10年2月上旬

重点領域研究「細胞内蛋白分解」総括班メンバー

岩永貞昭 九州大学名誉教授

(2) 平成10年度重点研究班会議日程

1 第3回 公開シンポジウム

日時：平成10年12月7日（月）

場所：東京ガーデンパレス

テーマ：未定

2 平成10年度：第1回班会議

日時：平成10年12月8日（火）～9日（水）

場所：東京ガーデンパレス

3 平成10年度：夏期ワークショップ

日時：平成10年7月8～10日（水～金）

場所：六甲山ホテル

4 平成10年度：第1回 総括班会議

日時：未定

場所：六甲山ホテル

- 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 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系教授：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

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

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

"Intracellular Protein Catabolism" (Eds by Suzuki, K. and Bond, J.S.), Adv.Exp. Med. Biol. vol. 389, Plenum Press, New York, 306pp (1996)

"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. Katunuma, N., Kido, H., Fritz, H., and Travis, J.), IOS Press, 205pp (1997)

"Proteolysis in Cell Function" (Eds, Hepsu-Havu, V.K., Jarvinen, M., and Kirschke, H.), IOS Press, 576pp (1997)

"Ubiquitin and the Biology of the Cell" Plenum Publishing, London, in press

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：鈴木絃一、木南英紀、田中啓二）
実験医学 特集 “プロテアーゼと疾患” 1997年11月号（編集：
鈴木絃一）

4 学会・集会案内

国内学会

- (1) 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>
- (2) 蛋白研セミナー「蛋白質社会の不可逆的リモデリング」
平成10年6月29-30日：大阪大学蛋白質研究所・講堂（横沢英良, 他）。掲示板コーナーに詳細情報。
- (3) 第3回「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」
平成10年8月21-22日：名古屋国際会議場（代表世話人：青柳高明）。
- (5) 第71回日本生化学会大会シンポジウム：「プロテオリシス研究の最前線 - 細胞機能と生体機能の制御 -」平成10年10月14-17日：名古屋国際会議場（小椋光、小出武比古）。
掲示板コーナーに詳細情報。

国際学会

- (1) The International Conference on "Dynamics and Regulation of the Stress Response". March 9-12, 1998. Kyoto International Conference Hall (K. Nagata and T. Yura)
- (2) Godron Research Conference on "Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors". July-12-17, 1998. New Hampshire (C. Craik)

(3) The 13th Rinshoken International Conference on "Ubiquitin and Proteasome: A New World of Proteolysis". November 25-27, 1998. Tokyo (K. Tanaka et al.)

掲示板コーナーに詳細情報。

5 第2回公開シンポジウム：「プロテアーゼとアポトーシス」報告

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・高千穂（2階）

昨年の12月1日（月）に文部省科学研究費重点領域研究「蛋白分解のニューバイオロジー」の第2回公開シンポジウムが東京ガーデンパレスで開催された。今回のシンポジウムの主題は「プロテアーゼとアポトーシス」ということで（このタイトルでは、あくまでも主役はプロテアーゼであるという主催者の強い意志が含まれている）、特別シンポジウムも含めアポトーシスの研究で最先端のお仕事をされている6名の先生方に貴重な講演をしていただいた。

三浦正幸先生：カスパーゼの活性化とプログラム細胞死

大阪大学医学部神経機能解剖学研究部の三浦先生は、これまでに線虫を用いた分子遺伝学的方法でアポトーシスを解析し、線虫のCED-3遺伝子が細胞死実行に不可欠な遺伝子であることを明らかにしてきた。現在、このCED-3遺伝子の哺乳類ホモログICEとそのファミリー（caspaseファミリー）が哺乳類においても細胞死実行の共通のメディエーターとして機能していることはすでに衆知の通りである。caspaseは発生での細胞死、疾患での細胞死及び炎症反応と様々な局面において機能していると考えられている。三浦先生は、それぞれのモデル系についてcaspaseの活性を阻害することによりその役割を示した。

発生でのcaspaseの役割については、腎臓の器官培養系を用いた実験を通して解説した。胎仔の後腎を取り出しin vitroで培養をすると、間葉系の細胞が尿間芽との

相互作用によって誘導を受け上皮様の腎胞が形成されるが、そこにcaspaseの一般的な阻害剤であるZ-Asp-DCBを投与すると、細胞死が阻害され、上皮様の腎胞の形成が阻害された。また、疾患での細胞死では多発性硬化症をモデルとして用いた。多発性硬化症は中枢神経系のオリゴデンドロサイトが腫瘍壊死因子であるTNFにより特異的に脱落する自己免疫疾患であるが、TNFによるオリゴデンドロサイトの細胞死はcaspaseの阻害剤であるZ-Asp-DCBやAc-YVAD-alにより抑制されることを示した。更に、炎症反応との関わりについては、炎症作用を持つLPSをオリゴデンドロサイトに投与するとcaspase-1及び-3の他にcaspase-11 (ICH-3)が発現することから、caspase-11遺伝子のノックアウトマウスを作製した。その結果、caspase-11のノックアウトマウスはTNFに対して低感受性を示し、LPS投与後の血中のIL-1濃度を測定したところ野生型に比べ著しく減少していたことから、caspase-11は生体でcaspase-1の活性を上流で調節する因子であることを報告した。

以上の知見は、caspaseが生体内における細胞死に関しても重要な役割を果たしていることを示しており、今後、治療薬等の開発に大いに期待のもてる結果である。

杭田慶介先生：ノックアウトマウスを用いたcaspaseの機能解析

東京都臨床医学総合研究所の杭田先生は、caspase遺伝子のノックアウトマウスを作製し、これらのマウスの表現型からcaspaseの機能を検討した。杭田先生は、これまでに、caspase-1 (ICE) 及び-3 (CPP32, apopain) 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その結果をNature誌に発表している。現在、杭田先生は、その他のcaspaseファミリー遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その機能解析を行っているが、今回の講演ではcaspase-6及び-7遺伝子のノックアウトマウスについての機能解析の結果を報告した。caspaseファミリーはcaspase-1 (-/-)やcaspase-3 (-/-)に代表されるように、ひとつの遺伝子を欠損させただけでは、ある特別の場所を除いて、個体のアポトーシス誘発機構を著しく損なわせることは不可能なことから、これらの機能はファミリー間で相補的に行われていることが推測されている。caspase-6及び-7は、caspase-3遺伝子のノックアウトマウスでは、最も顕著に変化の表れる脳におい

て発現が確認されることから、この2つのプロテアーゼはcaspase-3の働きを補足せず、独自の機能を持っていることが予想される。そこで、それぞれの遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その表現型から機能を検討した。その結果、caspase-7はMEKKカスケードの上流に存在し、最終的に他のcaspaseを活性化していることを報告された。更に杭田先生は、ccd-4のmammalian homologueであるapaf-1と密接な関係にあるcaspase-9(apaf-3)遺伝子のノックアウトマウスを作製し、現在詳しい解析を行っていることも報告された。これらのデータは、今後caspaseファミリーの研究に大いに役立つものと期待される。

鎌田真司先生：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

大阪大学医学部の鎌田真司先生は、Fasにおけるアポトーシスの系におけるcaspaseファミリーの関与を報告した。これまでもFas誘導性アポトーシスについては、caspase-1及び-3, -8 (MACH/FLICE/Mch5)の関与が報告されている。鎌田先生は、Fas誘導性アポトーシスの系においてcaspaseに対する特異抗体の細胞内への微量注入や変異型caspaseの高発現により、caspase-8の活性化後、caspase-4 (TX/ICH-2/ICERelII)の活性化によりcaspase-1及び-3が作用してアポトーシスが誘導されることを報告した。更に、caspaseカスケードの最下流で機能していると考えられているcaspase-3の基質蛋白質を、yeast two-hybrid system法によりスクリーニングを行い、いくつかの蛋白質についてクローニングを行った。その中のひとつがアクチン結合蛋白質であり、またこれまでもcaspaseの基質の一つであることが報告されているgelsolinであることを報告した。鎌田先生はこの他にも、この方法によりいくつかの蛋白質が存在することを確認しており、今後の報告が待たれる。

川島誠一先生：プロテアソームの阻害＝細胞死 or 分化？

東京都臨床医学総合研究所の川島先生は、ペプチド型のプロテアーゼインヒビターであるZ-Leu-Leu-leucinal(ZLLLal)を用いてアポトーシスに対するプロテアーゼの関与を検討した。その結果、マウス、ヒトのリンパ球由来の培養細胞にZLLLalを単独処理することによりアポトーシスが誘発されることを示した。ZLLLalはカルシウ

ム依存性のプロテアーゼであるカルパインと、多触媒機能を有する巨大プロテアーゼ複合体であるプロテアソームを低濃度で阻害する。そこで、カルパインに対してはZLLalと同様な阻害効果を示すが、プロテアソームに対して低感受性であるZLLalを用いて同様な検討を行ったところ、ZLLalではアポトーシスが誘発されなかったことから、リンパ球由来の培養細胞のプロテアソームを阻害するとアポトーシスが誘発されることを報告した。また、ZLLalをマウスの神経芽細胞に投与しプロテアソームを阻害すると、細胞は神経の突起伸長を示し、その後、細胞死に至ることからアポトーシスと分化の関係に共通の因子が存在する可能性があることを推測した。プロテアソームとアポトーシスの関係についてはインヒビターにより誘導と抑制という全く反対の報告があることから、今後の研究によりこれらの謎が明確になることが期待される。

中島琢磨先生：蛋白質ユビキチン化機構によるアポトーシスの制御

東京理科大学基礎工学部の中島先生は、ガン蛋白質であるE1A蛋白質により誘導されるアポトーシスの機構について報告した。ヒトアデノウイルスE1A蛋白質は通常、細胞の増殖を誘導するガン蛋白質として働くが、中島先生はガン抑制遺伝子である野生型p53遺伝子を発現している細胞では、p53蛋白質を安定化することによりアポトーシスが誘導されることを示し、このp53蛋白質の蓄積の系には、カルパインとユビキチン-プロテアソーム分解系が別々に関与していることを報告した。更に、E1A蛋白質により誘導されるアポトーシスにおいて、アポトーシス誘発時に特徴的に観察されるDNAの断片化に先行して、トポイソメラーゼII α （以下topoII α ）がユビキチン-プロテアソームシステムにより分解されていることを見出した。このtopoII α のユビキチン化にはユビキチン結合酵素（topoII α -E2）が関与しており、詳しい解析の結果このユビキチン結合酵素はUbcH7である可能性が強いことを報告した。p53蛋白質やtopoII α は以前からアポトーシスにおける関与が示唆されているが、その詳しい機構については未解明な部分が多いことから今後の研究の発展が期待される報告であった。

長田重一先生：Fasを介したアポトーシス

今回のシンポジウムの最後に、特別講演として大阪大学医学部の長田先生の講演があった。長田先生は生体内のdeath factorとして、TNFと相同性を持つFasリガンドを同定し、その後もFas誘導性アポトーシスにおけるcaspaseの関与等、数々のめざましい業績を挙げ、今日まで世界のアポトーシス研究の先導役としてご活躍されている。本シンポジウムでは、これまでに長田先生が明らかにしてきたアポトーシスにおけるFas蛋白質の役割の話を中心に、Fasとcaspaseの関係について丁寧に解説をしていただいた。また、最近の知見として可溶性Fasリガンドについての研究結果を報告していただいた。可溶性Fasリガンドは、これまで存在は確認されていたが、機能等の生体内での詳しい役割については未解明であった。長田先生は、Fasリガンドを可溶化しているのがメタロプロテアーゼであることを見出し、そのインヒビターや切断部位を欠損した変異体を用いた実験により、このメタロプロテアーゼが膜結合型Fasリガンドを可溶化することによってFasリガンドのdown regulationを行い、余剰な細胞死を回避していることを解明した。実際、劇症肝炎はFasLを発現した細胞傷害性T細胞の暴走によって起こることが知られているが、この肝炎の患者の血清中には可溶化されたFasLが通常より多く検出される。また、この他にもcell-free systemを用いた実験により、アポトーシス誘導時に観察されるDNA切断を直接誘導する因子(DNase)が存在することを示唆した。アポトーシスに関係したDNaseについてはこれまでにいくつかの候補があげられていたが、いずれも決め手に欠けていた。この因子について長田先生はあまり詳しく報告されなかったので、今後の報告に期待する事とする。

以上、今回のシンポジウムで講演していただいた内容を簡潔にまとめてみた。caspaseを始めとしたプロテアーゼは、アポトーシスにおいて非常に重要な役割を果たしていることはこれまでの数多くの(やや多すぎる様な気もするが)論文からも既に明らかであるが、その詳細な機構についてはこれまであまり明確に示されてはいなかった。しかし、今回のシンポジウムを聞いて、講演をされた諸先生方の地道

な研究データの蓄積により、アポトーシスにおけるプロテアーゼの明確な役割が徐々に明らかにされつつあることが実感でき、大変充実したシンポジウムであった。

(富岡正典：東京都臨床医学総合研究所)

(4) 学会・集会報告

1. Vth International Symposium on PROTEINASE INHIBITORS AND BIOLOGICAL CONTROL

1. はじめに：私がここにいる理由

1997年10月4日から8日までの5日間、スロベニア国の首都Ljubljana近郊Brdoにおいて、Vth International Symposium on PROTEINASE INHIBITORS AND BIOLOGICAL CONTROL、いわゆるBrdo Conference（でいいのでしょうか？）がVito Turk先生(Slovenia)、Bonnie Sloane先生(Detroit)、Hans Fritz先生(Munchen)方のオーガナイズによって開催されました。私にはスロベニアといっても旧ユーゴスラビアであることくらいの知識しかなく、あの忌まわしい過去の歴史をNHK特集『映像の20世紀』で予習したに過ぎませんでした。また、我が街のJリーグ名古屋グランパスエイトのストイコビッチ選手はユーゴ出身ですが、彼の新ユーゴはいわゆるセルビアに相当するためスロベニアとはキナ臭い関係にある（あった）ので、ピクシーネタはタブーであるとのコンセンサスは重々得ておりました。

今回私は、幸運にも佐々木教授（名古屋）のスライド製作係兼鞆持ち兼ツアーコンダクターとして、生き馬の目を抜くと言われるあのGordon Conferenceの欧州版であるこの学会に初めて参加させていただく機会を得ました。しかし、連日早朝から深夜までの英語漬けと教授との同居という極限状態の果てに、緊張の糸が見事にキレて、いつもの習慣で生き馬の目どころか息を抜いてしまい、その結果、いつの間にかタクシードライバーに変身しマニュアルの（わ）ナンバーのフォルクスワーゲン・ベントのステアリングを握っていました。そしてそんなある日、少し遅めの昼食の間隙を縫って、戦火を逃れチャビンデワントル作戦でBrdo要塞脱出を試みようとした所、カモフラージュにと乗せた4人のお客さんのひとりであるK先生（和光市）に正体を見破られ「尾崎さんとはTurkuでもお城でしか会えなかったよね。皆に

内緒にしてあげるから、原稿書いてちょうだいね、ヌファファファファー（この世界的に有名な笑い方で誰か解ったでしょ？）」ってな感じで、半ば脅しまがいにこの原稿を引き受け（させられ）たのでした。大変光栄です。

「僕は、学会は代返なしで完璧に聴講しますし、ポスターも全部拝見させていただきますが、いかんせん、能力の限界というものがかなり低いレベルに設定されており、ゆえに、誰々が何々をどのように発表され、それに対して誰々がどう反抗し、その時誰と誰が寝ていたか、などというような学問的な報告はできませんよ」と逃げ腰の私に対して、「そんなこといいから（はじめから期待してないから）、運転手さんブレッド湖まで急ぎでお願いね。時間が余ったら、逆方向だけどポストイナ鍾乳洞もね。ヌファ、、、」というのが、僭越ながら私が今ここで書いている理由です。つきましては、学会の詳細に関する情報を御希望の方は、学会抄録が <http://bio.ijs.si/conf/brdo97.htm>（'98年1月現在もなおアクセス可能を確認済みです）を御参照下さい。ちなみに、これはここだけの話ですが、Karlsson先生(Sweden)とKosower夫妻(Israel)は長い道中大変窮屈そうな御様子でした。

2. 遥かなるBrdoへの道

我々名古屋市大組は、ミュンヘンからアドリアエアーのプロペラ機アルプス越え遊覧飛行約1時間で、リブリャーナ空港に降り立ちました。佐々木教授は、あの伝説の'91年（スロベニア独立の年）をオーソドックスに回想されながら、「昔はここには何々があっただけ」とか言って、その著しい施設の近代化に驚きを隠し切れない様子でゲートを進みました。驚いた事に、おそらくTurk先生の御配慮でしょうが、我々が日本人であると解るとほとんどノーチェックでいとも簡単に入国でき、私はミュンヘンでEU人から受けたトラウマをその段階で解き放つ事ができたのでした。しかし、同乗のKorant先生(DuPont Merck)は、その巨大な体格と所持品ゆえに厳密なチェックを余儀なくされてしまいました。更に、その検査時間のあまりの長さにしびれを切らした佐々木先生が、なんと大胆にも税関を逆行し救出に向かうという行動に打って出て、話が益々ややこしくなったのではないかと思います。

しかし更に驚いた事は、そこで佐々木先生が目撃した検査を受けていた所持品は、なんとKorant先生がTurk先生のお土産にと、はるばるアトランティッククロッシングして持参された日本人形だったということでした。Korant先生は、学会中のサプライジングパーティーで行われたTurk先生のお誕生日会のスピーチの「Turk氏が愛される10の理由（わけ）」の中で、その上位に「Turk氏はアメリカを愛しているから」という事をのうのうとランキングさせ、結構ウケけておられていましたが、それは大嘘で「Turk氏はちゃきちゃきの日本大好き人間でーい」という事を、参加者同様しっかり熟知されていたようです。その日本人形が、学会終了後に訪ねたTurk邸のジャパングルームにさん然と展示されていたのは言うまでもありません。また「冗談じゃないぜ。あの時は市内観光でリブリーナ城を徒歩で登らされた時ぐらい汗（！）ったぜ」とKorant先生が言われたとか、はスペキュレーションの域を出ませんが。で、とにかく何とか無事に足並み揃ったところで、学会に用意していただいたシャトルマイカーに分乗し、会場であるThe Hotel Kokra Brdoに向かったのです。会場到着後は、前日に早々と到着後、その段階で会場周辺を既に全面クリアされてみえた斉藤先生（新潟）のオリエンテーションを受けた後、「私はスイスエアーで12万だった」「僕なんかBAで20ですよ」などとディスカウント自慢をしたり、続々と到着する諸先生を部屋から見下ろしたりしながら（それくらいしかやることがなかった）、レジストレーションを待ったのでした。

3. 学会（キャンプ）にて

学会は、オープニングセレモニーの後、Robert Huber 先生(Max Planck)のHelmut Holzer Memorial Lectureとしてのオープニングレクチャーで、幕を開けました。'95年度のノーベル賞受賞者でありますHuber先生の力を抜いた淡々とした大人っぽい講演は、私のような稚拙な若造にも、「プロテアーゼとインヒビター」のバイブル的かつ総説的存在として、非常に簡潔にまとめられた有意義なものであったように思います。

実際、カルパインを若干かじった程度の若葉マークの私は、その後の講演にお

ける学問の嵐の中で、セリンやらシステインやらメタロプロテアーゼやら、そのインヒビター達にボコボコにやられて沈んでしまうわけですから、もっとしっかり聴いておけば良かったというか、もう一度聴いてみたい講演であったと、今でも感じております。翌日から本格的に始まった口頭発表では、一部に日本語のスライドが豪快に飛び交う中（一瞬錯覚かと思いましたが、久々の日本語は海外生活5日目位に食べる美味い中華料理のような安心感もありました。今思うと他国籍人に対するサブプリミナルだったのかも知れませんか）、激しい意見のパンチの応酬が行われていました。しかし、この業界に入ってまだ日の浅い私は、「おっ、Judith Bond先生(Penn State Univ.)だ。ちょっと衣装が派手だぞ」とか、「Bode先生(Max Planck)も表現力でも負けてないなあ」とか、「Jennifer先生(Bristol Univ.)には20年前に会いたかったなあ。でも、今でもプロウだけで相当イケるぞ」とか、まさにテニスのボールボーイ状態で右往左往し、日頃ペーパーでしかお会いすることのできななかった大御所達の貫録に圧倒されるばかりでした。

また「このタッグがターク兄弟(Slovenia)か。絶妙な親孝行コンビネーションだ」とか、「やっぱり木戸先生(徳島)の美声はワールドクラスだな。徳島でのFAOBMBのバンケットではプロの司会者かと思ったもんな」とか。さらに「石堂先生(順天堂)かと思ったらIsidoro先生(Trino)だった」というオチは、私のみならずほとんどの日本人、特に木南先生(同上司)にとっても大驚きで、土産話としてはユビキタスだったのではないのでしょうか。私個人的には、Guy Salvesen先生(California)のCaspaseの活性化に関する発表を楽しみにしておりました。しかし、注目のアポトーシスとの関係をひも解きながら展開された充実したその期待以上の内容に自分なりに興奮し酔いしれていたところ、隣席されたJarvinen先生(Finland)に「あんちゃん、俺があのスライドを見るのは何回目か知っているかい」とニヤっとした苦み走った意味深な微笑とともに唐突に突っ込まれ、演者のみならず負けずとも劣らず成熟した聴衆陣に、この世界の厳しさと深さと恐さを垣間見た次第でした。また、ビールが底をつく程に深夜まで延々と活発な討議が行われたポスターセッション

ンは、今回、特にそのレベルがまれに見る高さだったと、巷の噂しきりでした。これでもかと言わんばかりの構造関係の1畳敷きポスターの息をのむ美しさには、惚れ惚れとするばかりで、佐々木教授をして「わしの部屋に1枚欲しいわい」と言わしめた程でした。また、未練がましく中途半端に臨床家の血が流れる私としては、KRKA社との出会いも何かを予感させる貴重なものでした。ヨセフステファン研究所との基礎的共同研究に裏打ちされた臨床データは、非常に興味深いものでした。特に、（私のヒアリング能力に重大な欠陥がなければ）日本の病院で実際に術前や悪性腫瘍の化学療法中の腎機能評価に最も一般的に使用されているクレアチニンクリアランスが、既に欧州においてはシスタチンにその王座を明け渡しているという事実は「これでしばらくは医局でネタ的にも食って行けるかも知れない」と、即メモらずにはいられませんでした。

御丁寧にも、帰国後にKRKA社から連絡を受けた日本の代理店から資料をいただき、仁義的に重要な先生方を御紹介させていただきました。彼らが既に鳴門海峡を渡ったという情報を得ましたので、この件につきまして御迷惑をおかけしたかも知れません。お許し下さい。

4. おわりに：再訪の誓い

そろそろこの原稿を書かないといけないと思っていたところに、年末にスロベニアから懐かしい学会の写真が送られて来ました。発表を直前にして部屋で最終チェック中でありました佐々木教授もしっかりベストポジションに収まっているのを見る度、あの時にダッシュで呼びに行かなかったら今ごろどうなっていたことかと、ホッとしております。「これでも見て思い出して頑張ってください。」というMarko先生(Slovenia)のメッセージが込められているような美しいカードも同封されていました。今でも、首を少し傾けながら足早に歩く瘦身の彼の姿を思い出すことができます。Marko先生には、私のお粗末な英語力のせいで、日本からのメール交換の段階から御迷惑をお掛けしました。そして学会では、佐々木教授のアブストラクトが抄録集から漏れていたことに対するクレームに、臨機応変なコピー配布という形で応えて

いただいた事に感謝しております。また彼には、研究所を見学させて頂いた際にも大変お世話になりました。ハイライトである結晶構造解析の器械を初めて見せて頂いた時には、そのステージ（とは言わないんだろうけれど、検体をセットする部分）のデリケートさに驚かされました。共焦点レーザー顕微鏡の派手なやつみたいな物だろうと侮っていた私には、「やっぱ、結晶の精製がポイントなんだなあ」と、勝沼先生（NIPPON）の秘蔵っ子、Tsuge先生（徳島）の「純度です」という自信たっぷりの力強い発言が、今も尚、眩しくてたまりません。

さて、次回のBrdoは'99年だということです。でも実は、「BrdoよりもPortorozがいいなあ」という噂も耳にしております。また'99年にはICOPもBostonで開催されると聞いております。いよいよ忙しい世紀末になりそうです。

私は、その時も国際免許と教授の鞆を持ってぜひ参加したいと思っておりますので、今後ともお手柔らかに御指導お願いいたします。また皆様にお会い出来る事を楽しみにしております。最後に（もしこんなふざけた文章が本当に掲載されたら場合）不穏当な表現がありましたら、あらかじめお詫び申し上げます。また、学会中お世話になりました先生方に、この場をお借りしまして厚くお礼申し上げます。

尾崎 康彦（名古屋市立大・医・生化学）

「付記」：本「学会報告記」を依頼したK先生の読後における独白：“面白い内容であったが、この報告記から科学的に導くことが可能な唯一の結論は、著者が会議にはほとんど出席せず（会議の内容に関する報告が皆無であることから判断して）、学会場の周辺を徘徊して個人的な経験の収集にのみ腐心していたことである”と。しかし、若い研究者が異国を旅して得ることのできる重要な特権は、少しばかりの新しい情報や知識の獲得のみでなく、外国の風土や食文化を堪能して、そこに孤高の島国日本とは異なる何かを感じることであり、この経験が将来の大きな糧になるかも知れないとも考えられる。なるほど、見方を変えれば、これも一つの見識かも知れない。この著者は、しかし、遊興のみに全精力を費やしていたかに見える。これが、科学者としての妥当な態度であったか否は、読者の判断にまかせたい。

2. International Symposium on Dynamic Aspects of Lysosomal/ Vacuolar System"

COE国際シンポジウム「リソゾーム/液胞系のダイナミックス」

11月3日から6日にかけて、平成7年度COE国際シンポジウム「リソゾーム/液胞系のダイナミックス」が岡崎ニューグランドホテルおよび岡崎コンファレンスセンターで、大隅良典岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所教授を開催責任者として、日本細胞生物学会・日本生化学会・日本農芸化学会の協賛で開催されました。参加者は日本人134名・外国人18名、口頭発表31演題（オープニングレクチャーを含む）・ポスター発表47演題と盛大なシンポジウムとなりました。

11月3日のオープニングレクチャーは、細胞内蛋白分解研究の巨人Glenn E. Mortimore教授（ペンシルバニア大学）による「Introduction and Variation on an Autophagic Theme」。1970年代より独自に確立した「モルチモアの肝細胞還流システム」による自食胞形成のアミノ酸による制御について話されました。Alaをcoregulatorとして、LcuやLcu8-MAPによる自食胞の形成が細胞表面の受容体を介して細胞内情報伝達システムへとつながっていく今後の研究の方向性を指し示すようなお話でした。

11月4日午前は、大隅教授のいう「Yeast People」による講演が5演題続きました。いずれも、自食胞形成の現象論から更に踏み込んでその情報伝達機構の解明に近づきつつある様子が、ひしひしと伝わってきました。単細胞系であること、変異株の分離が動物細胞に比べて容易であること、遺伝学的手法がしっかりしていることなどが、酵母の系をより有効なものとしているようです。酵母では、Aminopeptidase Iのような細胞質から液胞に直接輸送されるタンパク質の存在がはっきりしており、自食胞の形成はこの経路を使用していることが明らかにされつつあります。今後は、普段起こっているAminopeptidase Iの輸送系が、細胞の飢餓シグナルによってその他のタンパク質を取り込むようになる情報伝達機構の解明が「Yeast

People」によってなされることを予感させる充実した講演が続きました。

1月4日午後は、リソゾームへの細胞質タンパク質の直接取り込みに関する演題が2題続きました。RNase S peptideのリソゾームへの直接取り込みは、リソゾーム膜タンパク質であるLGP96を受容体としてHsc73とATPに依存しており、GAPDHにより阻害されること、取り込むリソゾームにはHsc73が存在していること、取り込まないリソゾームはHsc73は取り込まれた後で分解されてしまうことが講演されました。このリソゾームへの直接取り込みは、大変魅力的な仮説ではありますが、現在の所、RNaseAやGAPDHでのみ認められること、血清除去によりリソゾームに取り込まれることになっているが、生体内ではそのような状態は存在しないこと、などが問題点で、今後、その他の取り込まれるタンパク質の同定およびこの機構を誘導するような特定のアミノ酸とそれに関与している細胞内情報伝達系の検討が必要であると筆者は考えます。

引続き、自食胞形成に関する情報伝達に関する講演が3演題行なわれました。PI-3-kinaseの中でも、酵母のVps34p様のPhosphatidyl inositol specific-PtdIns-3-kinaseは自食胞形成を促進し、Phosphatidyl inositol-4-phosphateやPhosphatidyl inositol-4,5-bisphosphateを基質とするp110/p85型PI-3-kinaseは逆に抑制すること、細胞膜上のアミノ酸に対する受容体からのシグナルはGタンパク質を介して伝達されていること、更にGDP-G α i3がリソゾーム膜タンパク質のLAMP-1と共存しており、GDP-G α i3のリソゾーム膜への移行にはG α i3のC末側半分が重要であることが示されました。続いてポスターセッションが行なわれました。ここでもやはり「Yeast People」の活躍が目立っていました。偶数番号と奇数番号にわかれて説明をする時間が設けられていましたが、その間にBuffet Partyがあったおかげで、筆者の記憶が消滅してしまいました。

5日は、朝から自食胞に関する形態学的研究が3演題続いた後、生化学的研究が2演題講演されました。生化学的手法を用いた解析ではすりつぶす為には刺激に対する初期の細胞の反応を解明することが困難であるのに対して、形態学的手法では

ごく初期の反応を捕らえる事が可能である反面、ごく一部の反応のみを捕らえている可能性があり、この二つの研究手法はお互いに補完し合うべきなのですが、なかなか連続して演題が続くということが無かったので、今回のシンポジウムではその対比がいっそう明確なものになりました。

午後からは、エンドサイトシスやファゴサイトシスの講演が6演題続きました。このエンドサイトシスやファゴサイトシスの系では最近その情報伝達経路が解明されつつあり、Ras-PI3K-PKB(AKT)-?-Rab 5という経路についての詳細な講演が続いた後で、動物細胞で後期エンドソームからリソゾームへの移行が起こらない変異CHO細胞を分離したという講演がなされました。これまでに、動物細胞でこのような細胞株が分離されたことは温度感受性株も含めて無かっただけに、今後の詳細な解析に大いに期待が寄せられると筆者は感じました。続いて、後期エンドソームに特異的な膜脂質としてLyisobisphosphatidic Acid (LBPA) に対する抗体を用いた解析やエンドソーム間の輸送小胞の分離に関する講演がありました。また、このセッションでは特別に、大阪大学の高井義美教授がエキソサイトシスの情報伝達について講演されました。この系においても、やはりRabを中心に研究が展開され、それに結合する情報伝達タンパク質などについてお話しくださいました。

夕方からはファゴソームのプロテアーゼ獲得に関する演題とプロテアーゼの輸送機構に関する演題の後、エンドソームからリソゾームへの輸送に関わるアダプタータンパクに関する講演が2演題続きました。これまで、リソゾームへの輸送に関与していると関係者では想定されていたAP-3が、BIAcoreを使用した *in vitro* の系ではっきりとリソゾームの膜タンパクであるLimp IIの細胞質ドメインに結合すること、その結合にはリソゾームへの膜タンパクの輸送に関与していることが知られていたLIモチーフの前のアミノ酸配列が重要であること、メラノソームへのチロシナーゼの輸送にも同様にAP-3が関与していることが示されました。この日最後の演題は、植物の液胞に存在するVPE (Vesicular Processing Enzyme)の自己活性化と機能に関するお話でした。恥ずかしながら、筆者は植物の液胞には貯蔵型液胞と分解型液胞の2種類

が存在していることを初めて知りました。

6日は、朝から疾患関連の講演が4演題続きました。破骨細胞に特異的に発現しているカテプシンKは、I型コラーゲンを酸性環境下で完全に分解する活性があり、その阻害剤は骨粗しょう症に有効であろうとの講演の後、カテプシンEは細胞によってプロセッシングの様式が異なり、脳のマイクログリアでは初期応答に深く関与していることや、老化によるリポフスチン顆粒のなかに大量に存在していることなどが話されました。さらに、Lysosomal Protective Proteinが、中性でエステラーゼやデアミナーゼの、酸性ではカルボキシペプチダーゼの活性を持つこと、更に細胞内でエンドセリン-1の分解を行っており、実際にLysosomal Protective Proteinの欠損症であるガラクトシアリドーシス患者では、血液中のエンドセリン量の増大が認められるというお話でした。シンポジウムの最後を飾ったのはアポトーシスに関する講演で、脳の一過性虚血後に起こるアポトーシスではDNA断片化の前にオートファジック小体が発現すること、更には、通常のカスパーゼの活性化カスケード以外にカテプシンDにより活性化されカテプシンBによって抑制されるという別のアポトーシスを引き起こす経路があることを講演されました。

今回のシンポジウムには、研究対象としては植物・酵母・動物、方法論としては形態学的手法・生化学的手法・分子生物学的手法・遺伝学的手法と大変幅広い研究者が多数参加しており、お互いに見聞を広げるという意味で大変意義深いシンポジウムでした。SDS-PAGEやアミノ酸配列を見ると目にシャッターが降りるという参加者もいましたが、このシンポジウムをきっかけに、違う研究対象や方法論を取っている研究者間で共同研究が生まれ、育っていくことが大いに期待されます。筆者は、このシンポジウムに参加することができたことに大変感謝しており、今後も、「リソゾーム/液胞系のダイナミクス」を取り扱ったシンポジウムが開催されることを心から期待しております。最後に今回のシンポジウムのお世話をしてくださりました大隅良典教授・吉森保助教授他、大隅研究室の諸先生方に心から感謝しつつ、筆を置かせていただきます。(順天堂大学・医学部・石堂一巳)

3. International Conference on Protease Inhibitors '97

(国際プロテアーゼインヒビター会議'97)

1997年12月6日京都市・都ホテルにおいて国際プロテアーゼインヒビター会議組織委員会(筆者が委員長をつとめた)の主催で、日本薬学会、日本化学会、日本農芸化学会の協賛を得て、International Conference on Protease Inhibitors '97が開催された。

血圧調節、ウイルス性疾患やがんなどにおいてプロテアーゼが重要な役割を果たすことが近年わかってきており、プロテアーゼ阻害剤は治療薬開発の格好のターゲットとなってきた。このような機運の中で、プロテアーゼインヒビターに関するサイエンスベースの集会開催を待ち望む声が世界中のあちこちで聞かれた。このような時にタイムリーに、本当の意味での国際的で、サイエンティフィックな会議が日本で行われたことは、大きな反響を呼んだ。幸いにも、北米、ヨーロッパ、アジア(中東を含む)、オセアニアの世界中のプロテアーゼ阻害剤研究のビッグネームが集まり、リラックスした雰囲気の中で、基調講演2題、口頭発表23題、ポスター22題について、活発で有意義な討論が行われた。

準備期間の短い集会でもあり、参加者は最初100人程度を予想していたが、日本、韓国、シンガポール、米国、カナダ、ヨーロッパ全土、オーストラリア、イスラエルの15カ国から、予想をはるかに上回る、会場一杯の200名を超える盛況であった。組織委員長の歓迎の挨拶の後、米国Wisconsin大のProf. Dan RichがOpening Remarksで、簡単にプロテアーゼインヒビターデザインの歴史を振り返り、引き続いて基調講演としてメペプチドミメチックインヒビターのデザインと合成と題して、インヒビターをタイプI~IIIに分類し、解説した。続いて、韓国の浦項工科大学Prof. Kimの、Active site topologyに基づくプロテアーゼインヒビターデザインについての講演を初めとして、口頭発表が行われた。

プログラムについては簡単に下記に記したが、ゴードンカンファレンスと似た雰囲気非常に白熱した討論が続いた。午後からは、もう一つの基調講演として、

米国国立がん研究所のDr. EricksonがHIVプロテアーゼインヒビターの構造生化学について解説し、分子認識に基づいた薬剤耐性克服戦略の自説を披露した。さらに、口頭発表、ポスター発表が行われた。ポスター発表の時間には、ポテトチップやソフトドリンクをとりながら、なごやかで実りの多いディスカッションがあちこちで見られた。マスメディアの取材も行われており、外国人への取材は通訳が要るほどであった。会議終了後に行われたバンケットでは、ユーモアたっぷりのスピーチを楽しみながら日本の吟醸酒等を賞味し、会話がはずんだ。外国人招待者のグループは、このあとの京都の夜をカラオケで楽しみ、盛り上がった。

この国際会議では、各国の研究者がそれぞれの国に独自の考え方で研究を進めている、いわゆるお国柄があることがあらためて認識された。プログラムの素晴らしさ、発表された研究のレベルの高さ、フルーツフルなディスカッションは参加者に大きなインパクトを与え、1999年に第二回会議が、Dan Rich教授の世話で米国ウイコンシン州で行われることが決まった。

また、米国と日本の学術誌でプロテアーゼインヒビターの特集号が生まれ、筆者がゲスト編集者としてその企画を依頼されており、2000年に開催されるPACIFICHEMでもプロテアーゼインヒビターのシンポジウムが計画されているなど波紋が広がり、この会議が、プロテアーゼインヒビターの重要度の認識に大きな役割を果たしたといえる。

International Conference on Protease Inhibitors '97 December 6, 1997 -- The Miyako Hotel,
Kyoto Japan

SCIENTIFIC PROGRAM

Keynote Lectures

The design and synthesis of type-3 peptidomimetic inhibitors. (Daniel H. Rich - University of Wisconsin-Madison, USA)

The not-so-great escape: Structural and biochemical mechanisms of drug resistance to HIV-1 protease inhibitors. (John Erickson - NCI-FCRDC, USA)

Oral Presentations

Protease inhibitor design on the basis of the active site topology. (Dong H. Kim - Pohang

University of Science and Technology, Korea)

Design of serine protease inhibitors with conformation restricted by amino acid side chain-side chain CH/ π interaction. (Yasuyuki Shimohigashi - Kyushu University, Japan)

What converts a proteinase inhibitor into a substrate or vice versa? -Mechanistic implications from the study of cyclic forms of BPTI and eglin c prepared by total chemical synthesis. (Wuyuan Lu - Gryphon Sciences, and Genentech, USA)

The fluorescence quenched "one bead two compounds" solid phase inhibitor assay for direct visualization of protease inhibitors from very large inhibitor libraries. (Morten Meldal - Carlsberg Laboratory, Denmark)

Nonpolar interactions in designing thrombin inhibitors. (Yasuo Konishi - Biotechnology Research Institute, Canada)

Thrombin inhibitors: A novel specificity site recognition mode. (Vincenzo Pavone - University of Naples, Italy)

Novel, orally bioavailable thrombin inhibitors. (Roger M. Freidinger - Merck Research Laboratories, USA)

Application of synthetic plasma kallikrein selective inhibitor to affinity chromatography. (Yoshio Okada - Kobe Gakuin University, Japan)

Design of non-active site inhibitors for urokinase. (Horst Kessler - Technische Universitat Munchen, Germany)

Molecular recognition of cyclic HIV protease inhibitors: Highly orally-bioavailable DMP851 and a new paradigm for designing low drug-resistant profile inhibitors. (Patrick Y.S. Lam - The DuPont Merck Pharmaceutical Co., USA)

HIV protease inhibitors: Dihydropyrone clinical candidate. (Suwit Thaisrivongs - Pharmacia & Upjohn, USA)

Small-sized HIV protease inhibitors containing hydroxymethylcarbonyl isostere as an ideal transition state mimic. (Adnan Bekhit - Kyoto Pharmaceutical University Japan)

Inhibitory mechanism of HIV protease inhibitors as studied by NMR spectroscopy. (Toshimasa Yamazaki - National Institute of Agrobiological Resources, Japan)

Three-part harmony: Insights into drug resistance derived from analysis of the crystal structures of a single inhibitor bound to three different retro viral proteinases, HIV-1 PR, FIV PR, and EIAV PR. (Ben M. Dunn - University of Florida, USA)

Human mucus protease inhibitor and its mutants prevent infection by influenza A and Sendai viruses. (Hiroshi Kido - The University. of Tokushima, Japan)

Streptomyces metalloproteinase inhibitor (SMPI): Reactive site, inhibition mechanism, and inhibition spectrum. (S. S. Seeram - Kyoto Institute of Technology, Japan)

Structural characterisation of different forms of plasminogen activator inhibitor 1 using Fourier transform infrared spectroscopy. (P. I. Haris - De Montfort University, UK)

Inhibition of cysteine proteases by peptides containing aziridine-2,3-dicarboxylic acid building blocks. (Tanja Schirmeister - University of Freiburg, Germany)

Different substrate specificity between cathepsin B and papain, based on the crystal structures of the complexes with inhibitor. (Toshimasa Ishida - Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Japan)

Crystallographic studies of papain complexed with irreversible peptidic inhibitors. (M. Jaskolski - A. Mickiewicz University, Poland)

Novel inhibitors of cysteine proteases specific for cathepsin K. (Daniel F. Veber - SmithKline Beecham Pharmaceuticals, USA)

Peptidyl β -homo-aspartals (3-amino-4-carboxy-butyraldehydes): new specific inhibitors of caspases. (Sandor Bajusz - Institute for Drug Research, Hungary)

Structure-based design of inhibitors of interleukin-1 β converting enzyme (ICE; caspase-1). (Sheryl Hays - Warner-Lambert Company, USA, BASF AG, Germany and BASF Bioresearch Co., USA)

Posters

A simple linker for the attachment of aldehydes to the solid phase. Application to solid phase synthesis by the multipin method.

Synthesis of fluorescent serine protease inhibitors.

Design of bivalent plasmin inhibitors.

Novel serine carboxypeptidase inhibitors, belactins and piperastatins: Structure determinations and biological activities.

Molecular cloning and characterization of a novel serine proteinase inhibitor from bovine brain.

Proteinaceous inhibitors for Kex2 proteinase and their derivatives with enhanced inhibitory activity.

Structure-activity relationships of HIV-1 PR inhibitors containing AHPBA.

Modification of P2 site.

Structure based design and synthesis of macrocyclic inhibitors of human cathepsin D.

Structure-activity relationship of hydroxamate matrix metalloproteinase inhibitors on membrane-bound Fas ligand and TNF- α processing.

Structure-activity relationship of synthetic peptides as inhibitors against recombinant-matrix metalloproteinases.

Zn-S bond hydrolysis and peptide ligand hydrolysis triggered by Im NH---O=C hydrogen bond formation: Implication in the activation mechanism of matrix metalloproteinases.

Bis-peptidyl-derivatives of trans-epoxysuccinic acid as inhibitors of cathepsins.

Anti-cataract effect of potent calpain inhibitor, SJA6017.

Structure-function relationship of bromelain inhibitors from pineapple stem.

Malignant transformation alters intracellular trafficking of lysosomal cathepsins in human breast epithelial cells.

Effects of protease inhibitors on the antinociception produced by intrathecal dynorphin A

in mice.

The effect of perioperative administration of protease inhibitor on surgical stress.

Kinetic and CoMFA studies on the novel muscarinic antagonists N-methylpiperidinyl and tropinyl esters as acetylcholinesterase and butylcholinesterase inhibitors.

KNI-764, a novel dipeptide-based HIV protease inhibitor containing allophenylnorstatine.

Cathepsin K antisense oligodeoxynucleotide inhibits osteoclastic bone resorption.

Peptide mapping of HIV-1 N_{co} Vif protein: peptides that inhibit the viral protease and virus production.

The rational design and synthesis of novel orally active thrombin inhibitors.

(木曾良明：京都薬大・薬品化学教室)

4. The 3rd UK-Japan Cell Cycle Workshop

昨年11月、京都において開催された本国際学会は、24日夕刻のOpening remark から27日の閉会まで、ぎっしりとつまった質量共に密度の高い4日間であり、昨今のこの分野の隆盛を端的に物語っていた。本稿では、ユビキチン-プロテアソーム系に関連したトピックスを中心に紹介するが、プロテオリシスに多少なりとも関連した話題は15題以上にものぼっており、蛋白質分解がリン酸化、脱リン酸化と並んで細胞周期コントロールの中心的な役割を果たしていることが実感される会議となった。以下にそのレポートを、口演を中心にまとめてお届けする。

サイクリンの発見者である**T. Hunt** (ICRF, UK)は、その発見当初から一貫してサイクリンの分解制御機構こそ細胞周期研究の最重要課題であるとの認識を持ちつづけている。今回の発表では、サイクリンの分解とその特異的分解への鍵となる配列“デストラクションボックス”との関連の詳細な解析を報告した。従来から、デストラクションボックスを含むサイクリンのN端70残基のペプチドは、サイクリンの分解を抑制することが知られている。Huntらは、このペプチドのLys残基（ユビキチン化サイトと推定されている）を改変したペプチドは、サイクリンのユビキチン化を拮抗しないが、にもかかわらずサイクリンの分解を阻害し得ることを見出した。さらに驚くべきことに、デストラクションボックスを含むわずか12~2

0残基程度のペプチドも、サイクリン分解を阻害できることを示した。さらに、サイクリンAとサイクリンBのデストラクションボックスを交換したキメラサイクリンが、各々ポリユビキチン化はされるものの、分解を受けないことを、Huntらは見出ししている。これらの結果を考えあわせると、デストラクションボックスの機能は、ユビキチン化、そして分解にいたる複数の段階で多面的な働きを有している可能性も推察されよう。意外だったことは、サイクリンB1のノックアウトマウスが、若干体が小さいこと以外、大きな表現型が出ないことだった。J. Pines (Univ. Cambridge)らが報告したように、サイクリンB1やB2など各種サイクリンファミリー群は、その発現パターンはもちろん細胞内局在性もそれぞれ大きく異なっているが、それでも互いに相補しあえるとしたら、それはどのような機構によるのであろうか？ 本大会を主催された柳田充弘(京大・理)は、染色体分離時におけるユビキチン依存的蛋白質分解を、Cut2とAPC/サイクロソームを中心に基質と酵素の両面から解析した結果を発表した。柳田らは、かねてからCut2蛋白質はその分解が姉妹染色体の分離に必要であること、Cut2はポリユビキチン化を受けた後分解されることを示していたが、さらに今回、Cut2のデストラクションボックスに変異を入れると染色体分離が阻害されることを示し、Cut2のデストラクションボックス依存的な分解がM期からの脱出に重要であることを示した。Cut2の分解はM期サイクリンと同様にAPC/サイクロソームを介した経路でなされるが、このAPC/サイクロソームは、柳田らが染色体分離に関連した産物として既に同定していたCut4, Cut9, Nuc2などを構成要素として含むことが明らかにされている。彼等は、このサイクロソームの構成要素のうちCut4について詳細な検討を加えた結果、なんらかの修飾をうけたCut4のみが20Sの沈降係数を示すこと、また修飾型Cut4は細胞周期を通じて存在するもののその複合体の沈降係数は細胞周期の進行に応じて大きく変化することを見出した。さらに、国立遺伝研の山尾文明らが同定したE2酵素UbcP4の変異株を用いた実験などから、柳田らはこのCut4の修飾が少なくともその一部はポリユビキチン化を含むものであることを報告した。その他、柳田らはデストラクションボック

スと相互作用し得る蛋白質を同定しつつあるそうで、デストラクションボックスと APC/サイクロソームがどのように相互作用しているのかが明らかになる日も近いように感じられた。さらにサイクロソームサブユニットCut9については、その細胞周期依存的なリン酸化の意義を調べる目的で種々のキナーゼ、ホスファターゼの変異株と掛け合わせ実験を行った結果、柳田らが以前からM期への関与を報告していたホスファターゼDis2 とcAMP 依存性キナーゼA (PKA) に強い遺伝的相互作用が見い出された。興味深いことに、PKA の欠失はCut9 変異の表現型を抑制し、またCut9 蛋白質のリン酸化も減少させることから、PKAによるAPC/サイクロソームの負の調節機構の存在が示唆された。このことは、つぎに述べる戸所らの発表でも一致している。理研筑波ライフサイエンスセンターの戸所一雄らは、APC の活性がplk (Polo-like kinase) とPKAによってそれぞれ正と負に制御されていることを見出した。彼等は、in vitro においてPlk が少なくとも3種のAPCサブユニットを直接リン酸化しうること、このリン酸化がAPC のB型サイクリンユビキチン化能を活性化すること、Plk の活性化はMPF (cdc2-cyclin B 複合体)でリン酸化によりなされることを明らかにした。さらに、動物細胞内においてPlkを過剰発現した場合、APC の構成的なリン酸化をもたらしてこれを活性化することにより細胞終期をM期開始前に停止させること、Plk を不活化すると細胞は分裂中期に停止することを見出した。plk の作用を拮抗するのがPKAによるAPCのリン酸化であり、APCの活性は、複数のキナーゼにより幾重にも制御されているらしい。従来、APC/サイクロソームは、その発見者Hershko らのin vitro の実験によりcdc2/cyclin によって直接的なリン酸化を受け活性化されると報告されていたが、実際にはさらに複雑な活性制御のリン酸化カスケードの存在が示されたことになる。Plk については、**D. Glover** (Univ. Dundee, UK) も

ショウジョウバエ細胞分裂におけるplkの役割を彼のこれまでの結果を中心に総括し、このキナーゼは中心体の複製や分離、細胞質分裂などM期の進行に密接に関与していることを遺伝学的に示した。

サイクロソーム研究の大幅な進歩と並んで、安田秀世研の田中弘文（東薬大）

らは、大変に興味深いサイクリンE3 酵素を単離したことを報告した。彼等は、まず哺乳動物細胞を用いたサイクリンBのin vitro ユビキチン化系を確立し、サイクリンBに特異的なユビキチン輸送蛋白質hE2C (UbcH10) を同定した。さらに、hE2C と相互作用する蛋白質をtwo-hybrid 法により検索した結果、Hect-likeドメインを有する新規なE3、H10BH を単離した。H10BH はサイクリンBに結合能を持ち、このユビキチン化を促進する。さらに、H10BH はcdc27 などのAPCサブユニットとも結合するらしく、同じくサイクリンBに対するE3 として同定されたAPCとの機能的関連に興味もたれる。DNA 複製開始制御の鍵を握るG1サイクリン及びCDKインヒビターの代謝制御に関連して、大坪素秋（久留米大）は、サイクリンE とp21 のBait-cobait expression 法による酵母Two-hybrid により、サイクリンE とp21 の結合蛋白質Ceb1 を単離した。Ceb1 はそのC 端にHectドメイン（p53 に対するE3 ユビキチン結合酵素E6-AP で見い出された触媒活性ドメイン）を有し、Hectドメイン中の触媒システイン残基等も保存されていることから、Ceb1 はこれらG1サイクリン及びCDKインヒビターの新規なE3 と考えられる。Ceb1 は、Cdk2 により直接リン酸化される細胞質蛋白質であり、リン酸化による活性および基質との相互作用の制御に興味もたれる。P. Nurse (ICRF, UK) らが、酵母CDK (Cyclin-dependent kinase) の阻害蛋白質であるRum 1および染色体複製に関与するcdc18 などの蛋白質量が細胞周期の進行に伴い増減すること、これらの蛋白質の過剰発現が染色体の倍数化をもたらすことを報告したのにつき、T. Toda (ICRF, UK) らは、分裂酵母染色体の倍数性に異常を示す変異体 Pop1およびそのホモログPop2 の単離を報告した。Pop1 変異株でも、高次倍数体の出現、核の巨大化が観察された。これらの表現型はRum 1あるいはcdc18 を過剰発現した場合と似通っているが、実際、彼等の実験によって、Pop1 変異株ではRum1, Cdc18 の蓄積が観察された。さらに、Pop1 変異株中のRum1, Cdc18 にはポリユビキチン化が観察され、Pop1 の表現型はRum1, Cdc18 の分解異常により引き起こされていることが明らかとなった。それでは Pop1 はユビキチン化において如何なる役割を果たしているのでしょうか？ 出芽酵母サイクリンインヒビターSic1のユ

ユビキチン化に関与する蛋白質Skp1には、F-boxとWD40リピート配列が存在するが、Todaらの解析によりPop1, Pop2においてもこれらの配列が保存されていることが明らかになった。Skp1は、cdc34, cdc4, cdc53等と共にSic1のE2, E3複合体を構成していることが知られているが、Skp1はその中で特にCDKによりリン酸化された基質とのインターフェースに関与することが知られている。これとの推論で、Pop1, Pop2もE3複合体の構成要素としてリン酸化型Rum1, Cdc18の認識の過程で機能していること、およびRum1, Cdc18以外のCDKリン酸化蛋白質をもユビキチン経路へターゲティングしている可能性をTodaら指摘した。なお、Rum1についてはS. Moreno (Univ. Salamanca)らもRum1のユビキチン化がプロテアソームMts3変異株中で亢進すること、Rum1のCDKリン酸化サイトを置換するとRum1が安定化し核の倍数化が誘導されることを見出している。このようにG1/S期に起こる細胞周期蛋白質のユビキチン化の多くは基質のリン酸化を介しており、そのE3の基質リン酸化サイトへの特異性が中心的な役割を果たしているものと考えられる。一方、前述したように、M期サイクリンにおいてはユビキチン化酵素の側も厳密な制御を受けており、その対照が興味深い。

このように、細胞周期におけるユビキチン化機構の研究の進展報告には目を見張るものがあったが、分解の側の主役であるプロテアソームに関しても幾つかの画期的な進展が報告された。まず、田中啓二(都臨床研)が、プロテアソームの全構造について彼のグループの最新の知見を紹介すると共に、その活性化因子PA700、阻害因子PI31などによるプロテアソームの機能調節について総合的に議論した。特に、プロテアソーム活性化因子PA28については、従来から田中らが報告していた免疫応答に関与する α 型、 β 型と並んで、細胞増殖に密接に対応する第三のファミリー蛋白質 γ 型を突き止め、その詳細な解析を報告した。 α 型、 β 型および γ 型は全体のアミノ酸配列は互いに保存されているものの、 γ 型には典型的な核局在化配列が挿入されている。事実、細胞質に存在する α 型、 β 型とは対照的に、 γ 型には極めて特徴的な核局在化を示すことを田中らは示し、 γ 型PA28こそプロテアソームの核

内機能解明の鍵を握る調節因子である可能性を示唆した。一方、東江昭夫（東大・理）らは、出芽酵母プロテアソームのユビキチン結合サブユニットSun1 と相互作用する因子として、two-hybrid 法によりLes1p (Soilp) を同定した。Les1 は酵母26Sプロテアソームの構成因子であり、Les1 欠失株は高温下でG2/M 期停止及びユビキチン化蛋白質の蓄積をひき起こす。大変興味深いことに、Les1 欠失株より調製した抽出液中には極めてわずかの26Sプロテアソームしか検出されない。さらに、Sun1 サブユニットはLes1 欠失株において、26Sプロテアソームにも19S制御サブユニット複合体中にも含まれていない。このことは、Les1 はSun1および26Sプロテアソームのアッセンブリの過程で非常に重要な役割を有していることを示している。このようにLes1 変異は26Sプロテアソームの分子構成に広範な影響をおよぼすにも関わらず、細胞周期における表現型は比較的特異的であり、プロテアソームの他のサブユニットSug1 やNin1変異株などのそれとも異なることは注目に値する。これらの結果は、東江が発表の冒頭でいみじくも語ったように、プロテアソームの側にも基質選別を含む能動的な役割があることを示しているように思われてならない。その他、東江らは、酵母プロテアソームSun2 サブユニットの変異は、ハエあるいはヒトのホモログにより置換可能であることなどを示し、プロテアソームサブユニットの機能が種間で高く保存されていることを明らかにした。続いて、C. Gordon (MRC, UK) らは、プロテアソームサブユニットの細胞内局在を分裂酵母を用いて解析した結果を報告した。彼によると、抗mts4 抗体による免疫染色の結果、抗原は核の周囲に極めて明瞭なリングとして局在する。ほかの真核生物と異なり、分裂酵母はM期においても核膜が消失しないことから、この局在は細胞周期を通じて観察されるが、分裂終期においては分裂しつつある2つの娘核の中間に局在化する。同様な局在性は、mts2のみならず、mts3 や20Sプロテアソームの染色においても同様であった。これまで、幾つかの生物種、サブユニットについてその細胞内局在が検討されているが、彼等の示した分裂酵母におけるそれは核膜上の動的な変化という点で極めてユニークなものであり、その機能との関連が興味深い。

その他、プロテオリシス関係で興味深い話題として、東工大の岸本健雄、永井、大隅らのグループが、サイクリンの分解速度の変動がツメガエル減数分裂期におけるS期スキップの現象と密接に関わることを見出し、DNA合成とプロテオリシスとの関係について議論していたこと、国立精神神経センターの松崎文雄らが、ショウジョウバエ神経芽細胞の分裂に際して、転写因子Prosperoの不均等分配を支配する新規遺伝子産物MirandaがProsperoのGMC (Ganglion Mother Cell)への分配、核移行時に急速に消失することなどの発表が注目された。また、細胞周期阻害薬剤に耐性を示す酵母およびヒト変異細胞株を探索する過程で、C.Norbury (ICRF, UK)らはヒトプロテアソーム遺伝子Poh1を同定した。Poh1の酵母ホモログは転写因子AP-1を介する経路で薬剤耐性に関与すること、Poh1はc-Jun結合蛋白質との相同領域も有することなどから、プロテアソームはおそらくは転写因子の代謝制御を通じて細胞の薬物耐性の付与に関与していることも考えられる。

以上、プロテオリシスに関する話題を中心に記載してきたが、この分野の進展は従来無関係と考えられていた分野をも急速に巻き込みつつ進展し続けているように思われる。筆者は、前回の2nd UK-Japan cell cycle workshopに参加する機会を得たが、当時はプロテオリシスに関する話題は極く限られていた。今回の第3回会議では、細胞周期の制御は、まさに蛋白質生合成とプロテオリシス、リン酸化と脱リン酸化が相互にからみあいながら達成されているとの感を深くした。また、本稿では紹介できなかったが、細胞周期の制御が個体発生のパターン形成にも密接に関わりつつあることが本学会の発表を含め次々と明らかにされつつあり、細胞周期の主要な制御因子としての蛋白質分解系も直接、間接にこれに関わってくることが予測される。将来の研究の進展が楽しみな次世代の分野と考えられよう。

このように、今回の3rd UK-Japan Cell Cycle Workshopは、日本と英国の気鋭の研究者を一同に集めて、蛋白質分解と細胞周期、そしてそれを超えた将来の展望をも示唆する、他に類を見ない国際シンポジウムとなったように思われる。このような有意義な討論の場を企画していただいたオーガナイザーの先生方にも、この場をお

借りして心からのお礼を申し上げたい。

なお紙面の関係上、多くの興味深い話題に触れられなかったことを深くお詫び申し上げます。また、文中、敬称は全て省略させていただいた。

(川原裕之：都臨床研)

5. 第20回日本分子生物学会年会シンポジウム“選択的タンパク質分解による生理機能の調節”

近年、日本分子生物学会は時流の後押しもあって拡大の一途を辿っており、今回の年会（平成9年12月16-19日に開催）では、多くの新しい試みが見られた。本年は、例年に行われる国外から著名科学者を招いての特別講演会は行われず、12のシンポジウムと多数のワークショップが組織された。その一つのシンポジウムに「プロテオリシス」が選ばれた（オーガナイザー：田代啓博士・京都大学・医学部）。本シンポジウムの演者は、イスラエルのAaron Chichenover博士、米国のSigeki Miyamoto博士と筆者（都臨床研・田中）の3名で、一人の講演時間はこの種のシンポジウムとしては異例に長く、50分であった。最初の講演者Chichenover博士（親しい友人であるので、以後Aaronと記載）には、ユビキチンシステムのgeneralな紹介を依頼したので（私はオーガナイザーではないが、田代博士からの伝言による）、講演の最初は、ユビキチンシステム全般のまとめを例によつての激しい口調で述べた後、本題のI- κ Bのユビキチン化に関するリガーゼの研究についての詳細を講演した。

Aaronとは昨年、3月にフランスで、また5月には米国での学会で会っているので、当初から新しい話しは聞けないと思っていたが、この予想は見事に的中した。シンポジウムの前に、どのように喋ったら良いかと訊ねられたので、ともかく、“Sinkansen”並のスピード講演ではなく“Local Train”並のゆっくりしたスピードで話して欲しい旨を伝えた。OKと調子良く返答したので、少しはアドバイスを参考

にするかなと思っていたが、期待に反して、彼のtalkは最初から最後まで、“Sinkansen”並に終始した。本講演の骨子については、最近出版された論文(EMBO J. 21, 6486-6489, 1997)を参照されたい。この論文に記述されていること以外に新しい内容は語られなかった。従って、ここでいい加減な解説を加えるよりは、原著論文を見て頂いた方が、正鵠を得ていると思った次第である。

Aaronは、彼のかつての師匠であるAbram Hershko博士と共にユビキチンシステムを発見し、その原理を完成させた第一人者として高い評価を得ていることは、衆目の一致するところである。この師弟の共著の総説：The Ubiquitin System (Annu. Rev. Biochem. 1998刊行予定)の原稿をAaronかから入手しているので、必要な班員にはコピーしてお送りします(但し、80ページもある大作なので、本当に読む必要性のある班員に限定したい)。彼らは同じタイトルで1992年に総説を書いているが、1992年版はユビキチンシステムの原理の確立についての、まとめであった。以来、6年が経過し、1998年版では、ユビキチンシステムのバイオロジーの発展が詳細に記載されている。因みに、ユビキチンと細胞周期に関しては、Hershko博士の最新の総説(Curr. Opin. Cell Biol. 9, 788-799: Roles of Ubiquitin-mediated Proteolysis in Cell Cycle Control)が大変に素晴らしいと、私個人は感心したので(G1/Sリガーゼ：SCF複合体とmitosisリガーゼ：サイクロソーム/APC複合体が上手くにまとめられている)、この領域に関心をお持ちの方には、一読を勧めたい。

2番目の演者はSigeki Miyamoto博士(以下宮本博士と記す)で、やはりI- κ Bの分解に関する彼の最近の研究成果を詳細に示した。当初の演者は、Tom ManiatisのラボにおいてI- κ Bの分解に関する研究で大変重要な貢献をしたChen博士であったが、学会の少し前に彼の来日が困難となり、Chen博士の推薦で宮本博士へバトンタッチされたとのことであった。田代博士は、宮本博士とは米国のソーク研究所において旧知の間柄であるとのことであった。私は宮本博士とは面識はなかったが、前日に会食する機会があったので、色々と個人的に話をすることができた。宮本博士は18才のときに渡米し、従って大学から米国滞在中と言うことで、感覚的には日本人と言

うより、もはや米国人の研究者と考えると良いと思われる人物であった。彼の講演の骨子はI- κ Bの分解がユビキチン/プロテアソーム系以外によっても担われる可能性を示し、I- κ Bの代謝的不安定性は、細胞種に依存して複数の経路が作動しているとのことであった。よく知られているようにNF- κ Bシステムを刺激する細胞外シグナル、そして活性化されたNF- κ Bの標的遺伝子が数十にもおよび極めて多数であることから、この転写システムの活性化機構が一つの経路でのみ説明できないことは、大いに考えられるべき提案と思われる（宮本博士は、最近注目されているI- κ Bキナーゼ α/β のクローニングにも成功しており、必要な方には分与するとのことであった：この酵素の発見者の大御所に依頼しても入手は困難で、宮本博士には分与の依頼が殺到しているとのことである）。しかし、プロテアソーム系以外の酵素の分子の実体は、カルパインの可能性を示唆したものの、まだ十分に解明されていないことは、残念であった（宮本博士の講演内容が納められた論文が、ごく最近Mol. Cell. Biol.18, 19-29, 1998に出版されたので、参照されたい）。今回、宮本博士は久しぶりに母国日本へ帰国したとのことであったので、日本の学会の印象を聞いた。一言でいうと、予想していたよりレベルが高いと言うことであった。世辞とは受け取らず素直に喜びたいとも思うが、彼の本心から出た言葉であるか否かは分からない。また、斯くも言った。米国では、超一流が大変立派で彼らが世界をリードしていることに異論はないが、それらはほんの一握で、その後には無数のグループが乱立して技（成果）を競っている。これらのレベルだと日本とは全く遜色のない感じがしたそうである（良く考えてみると、日本の生命科学研究を褒めているのか、けなしているのかよく分からない）。また、米国でも科学者として生き抜くためには質の高い論文が必要で、特に彼のNF- κ Bの領域は大ボスが蠢いていて、互いに新参者を排除する傾向が強く、この垣根を超えてゆくことは大変とのことであるらしい（真偽のほどは定かでないが）。

最後に筆者がプロテアソームに関して講演した。私の話はあちこちで喋っているので省略する。シンポジウム終了後、Aaronからスライドを見せて欲しいと言われ

たので、何か質問があるのかなと思っていたが、スライドを隅から隅まで慎重に見ているので変だなと思っていると、「8枚ほど頂きたい、との申し出」があり、実は上述の総説原稿のコピーと交換になった次第である。

「閑話休題」以下、余談。

Aaronをよく知っている仲間内では、最近の彼の大いなる変貌がいつも話題となる。何しろ相撲取り並の巨漢で迫力満点であった彼が、僅か半年の間に体重を約60kg減量して、80kgのスリムな躰を維持しているからである。食事制限でこれを実践し、現在なおこれを維持しているのは、神業としか思いようがない。あれほどの好物であったケーキ類を全く口にせず、懇親会においてもビールを飲まなかった彼を見ると、最近とみにに腹が張ってきて見苦しい肢体をさらけ出している筆者などは、啞然とするばかりであった。シンポジウム後、古寺散策に連れて行ってくれと言うので、嵐山で彼の体重維持を慮って、昼食に豆腐料理をご馳走してから、天竜寺と仁和寺の庭園を案内すると、頻りにbeautifulを連発していた（多く外国人が、いつも言うように）。が、個人的にはAaronとの京都の散策では何の楽しみもなく、早々に休憩してビールでもと思っても一向に飲む気はなく、コーヒーを注文してもsugarlessを注文してくれと頼む有り様で、彼の減量維持についての意志の強さに舌を巻いて言葉も無かった（私だけビールを飲むわけにもゆかず、変に虚しかった）。

以上、学会報告としては漫談風になり、内容がないとの謗りを受けそうですが、本当はちゃんとした見聞録も書けるので、それはまた別の機会に。

（田中啓二：都臨床研）

(5) ミニレビュー

1 ミトコンドリアプロセシングペプチダーゼ：分子進化と機能分化

ミトコンドリアタンパク質の大部分は、アミノ末端部に20-60アミノ酸から成る延長ペプチドを持つ前駆体として合成される。延長ペプチドに存在するターゲティングシグナルに従ってミトコンドリアに輸送された前駆体タンパク質は、延長ペプチドが除去され成熟体となり、次にシャペロン等の助けにより機能分子へと構築される。この一連の過程の中で、成熟体への変換、ミトコンドリア内局在化、高次構造形成不全タンパク質の除去、等いくつかのステップにおいてプロテアーゼが重要な役割を果している。

私たちは、一連の過程の最初の段階において、すべての前駆体タンパク質に作用するミトコンドリアプロセシングペプチダーゼ (MPP) について研究を進めてきた。MPPは分子量50,000~57,000の大小2つのサブユニット (α -MPP、 β -MPP) から成る金属エンドペプチダーゼである。本酵素が他のプロテアーゼとは異なる大きな特徴は、その基質認識にある。ミトコンドリアタンパク質の前駆体に特異的に作用するが、前駆体の切断点付近にはアミノ酸配列における明確な類似性はない。あいまいな情報にもかかわらず、本酵素は前駆体を正確に認識して特定の位置を切断する。このような機構の解明はこのペプチダーゼの基質認識機構の解明にとどまらず、タンパク質の細胞内局在化シグナルなど同様の認識を行っている系での機構の解明に有益な情報を与えている。この分子機構に関しては、最近かなりわかってきたが、詳細な解説は別の機会に譲ることにして、本稿では、この酵素の持つ別の興味ある点について紹介したい。

I. MPPは新規金属プロテアーゼファミリー (pitrilysin family) --大腸菌からヒトに至る広く生物界に存在する一群のプロテアーゼファミリー--の一員である

本酵素はまず、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、アカパンカビ (*Neurospora crassa*)、ラット肝のミトコンドリアマトリクス画分から精製され、酵素化学的性質が詳しく調べられた。酵素は α 、 β と呼ばれる大小二つのサブユニットから構成されていること、活性がEDTA、*o*-フェナンスロリンの様な金属キレート剤によって強く阻害され、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 等の金属イオンの添加でほぼ完全に回復する金属プロテアーゼの一種であることが示された。その後相次いで、cDNAクローニングにより一次構造が決定された。二つのサブユニットは一次構造上30~50%程度の相同性を有しており、両者は同一祖先分子に由来するものと考えられる。また、両サブユニットとも生物種間において高い相同性を保持している。これらは共に大腸菌の pitrilysin (プロテアーゼIII)、ヒトのインスリン分解酵素などと、低いながらも類似性があり、新規なプロテアーゼファミリー (pitrilysin family) を形成している。pitrilysinやインスリン分解酵素は約10kDの分子量を持つが、それらのアミノ末端側半分がMPPと相同性がある。これら一群のプロテアーゼに共通する特徴は、金属プロテアーゼであるがサーモライシン族における金属結合モチーフ (HExxH) は存在せず、かわりに逆配列であるHxxEHが存在する。この配列も金属結合部位として機能していることはピトリリシンにおいて示された。私たちが β -MPPについて、変異体を用いてこの部分が切断活性に必須であることを確認した。 α -MPPでは完全な形でのモチーフは存在せず、例えばラットではHxxEKとなっており、触媒機能は持っていないと考えられる。したがって、 β -MPPが触媒活性を担っていると考えられるが、サブユニット単独では活性は全く見られず、複合体を形成して初めて切断活性を示す。最近、私たちは酵素による前駆体の認識にも複合体形成が必要であることを見つけた。両者で作られる数ヶ所の認識部位により、一見共通性が無いように見える数百に及ぶ前駆体を極めて正確に、高い親和力 (K_m ; 約 $10^{-7}M$) で認識していると考えられる。

II. MPPはミトコンドリア電子伝達系成分として働いていた(いる)のか?

これまで述べてきたラット、酵母などの酵素はいずれもミトコンドリアのマト

リクス内に可溶性タンパク質として存在するが、高等植物（ポテト、ホウレンソウなど）では前駆体のプロセシング活性がミトコンドリア内膜に見いだされる。プロセシング酵素の精製やcDNAクローニング等の詳細な解析の結果、 α -MPP、 β -MPPはそれぞれ、電子伝達系のシトクロムbc1複合体の構成成分であるコアII、コアIタンパク質と同一であることが確かめられた。またラットや菌類のMPPサブユニットは、同じ生物のbc1複合体のコアタンパク質と、分子全体にわたって有意なアミノ酸の一致が見られる。植物ではMPPとこのコアタンパク質が同一分子であることを考えると、生物進化に伴うプロセシング酵素とbc1複合体の共進化や機能分化がうかがわれる。

なぜ、プロセシング酵素と電子伝達系タンパク質が似た構造を持っているのか、一つのタンパク質が両方の働きを持っている生物が存在していることは何を意味しているのか、どちらが祖先でどちらが派生したものかなど、いろいろな疑問が出てくる。植物のMPPを扱っているSchmitzらは、コアタンパク質はMPPの進化的遺物であると考えている。真核細胞内に共生した原始原核細胞の遺伝子が宿主の核に移行し、タンパク質がターゲティングシグナルを獲得して外から輸送されるようになって、内部のプロテアーゼがプロセシングプロテアーゼとして膜タンパク質の一つ（bc1複合体）に結合して膜タンパク質として存在するようになる（ii）。このときはまだ特異性としては低いですが、あるとき遺伝子の重複が起こり、多くの前駆体に対応できるようになる（iii）。その後、再びそれぞれの遺伝子が重複して、電子伝達系とタンパク輸送系が独立した調節を受けられるようになるとともに、プロテアーゼは再び膜から離れる（v）。植物ではiiiの状態、酵母や動物ではvの状態、また、*Neurospora*では α -MPPだけが分化した（iv）の状態にあると言える。コアタンパク質は電子伝達系活性そのものではなく、それらのアセンブリーに関与していると言われているが、以上の仮説からはMPPの遺物がそのような働きをするようになったと言える。コアタンパク質の本当の機能とともに、MPPの起源（延長ペプチドを切断する必要性も含めて）と機能分化は今後の課題である。

III. 寄生生物由来のオルガネラのプロセッシング酵素の祖先は同じか？

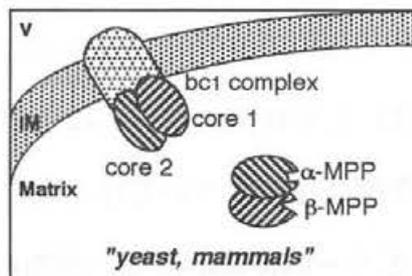
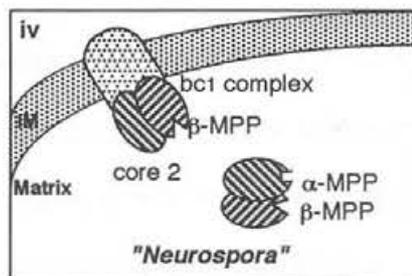
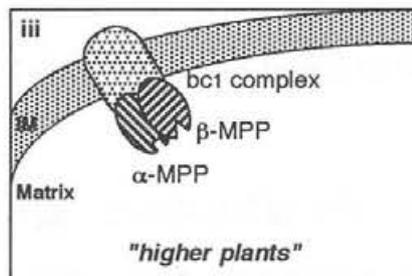
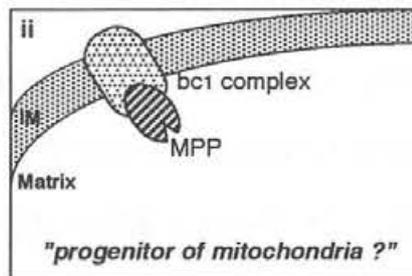
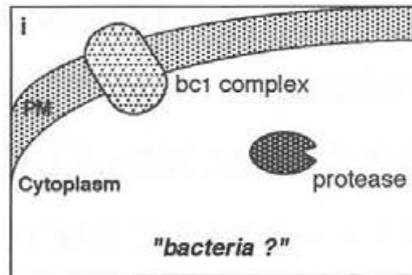
ミトコンドリア、クロロプラスト、ペルオキシソームなどは寄生原核生物に由来するオルガネラであると考えられており、ミトコンドリアやクロロプラストではタンパク質の合成系、透過系、高次構造形成系など現存する原核生物との類似性やオルガネラ同士の類似性が議論されている。前駆体のプロセッシング系はどうであろうか？クロロプラストへの前駆体タンパク質の輸送機構やターゲティングシグナルは、ミトコンドリアのそれらと極めて類似している。プロセッシングペプチダーゼは145kDと143kDの2つのタンパク質として精製されており、両者の抗体を用いて140kDタンパク質をコードするcDNAが得られている。このタンパク質のアミノ末端部はpitriylsinなどと25-30%のホモロジーがあり、HxxEHのモチーフを含んでいる。分子量やサブユニット構成は異なるが、やはりアミノ末端部に共通部を持つpitriylsinファミリーの一員である。したがって、植物では異なった原核生物がミトコンドリアとクロロプラストとして共生したが、それらは同じ祖先分子に由来するプロテアーゼを持っており、それらがそれぞれのプロセッシング酵素として進化したと考えられる。

ミトコンドリアを欠く寄生嫌気生物には、炭水化物代謝とエネルギー生産の場としてヒドロゲノソームが存在する。最近、このオルガネラにおいても、ミトコンドリアの系と類似したタンパク質輸送系により前駆体タンパク質が2つの膜を通過して中に入り、成熟体へとプロセスされることがわかってきた。私たちは、ヒドロゲノソームタンパク質前駆体の延長ペプチドの構造がミトコンドリアのそれらと似ていることに注目して、前駆体のアミノ末端部に相当する合成ペプチドをつくり、ほ乳動物のミトコンドリアのMPPを作用させたところ、正確な位置で切断することを観察した。このことは、ヒドロゲノソームにも同様なプロセッシング酵素が存在することを示している。詳細な構造については現在私たちの研究室でクローニング中であるが、pitriylsinファミリーの仲間がもう一つ加わることになるだろう。

以上、MPPをめぐるプロテアーゼの分子進化と機能分化について述べた。生命

現象の解明とともにますますその複雑さを思い知らされてきたが、その中に意外なつながりがあることが伺え、その糸をたどることにより案外単純な解答が得られるのかも知れない。

(伊藤 明夫：九州大学理学部化学教室)



(Braun & Schmitz; TIBS, 20,171(1995)を改変)

2. 転写制御因子の分解機構

プロテアーゼが標的とする転写制御因子

転写制御因子（およびその複合体）の分解反応の重要性を示す教科書的に有名な例は、やはりMycとI κ Bと思われる。細胞が血清など増殖刺激により増殖を開始するときに、すなわちG0からG1へ細胞周期を周り出すときに、Mycが誘導増加し、しばらくして分解され低い発現レベルが維持される。また、I κ B（阻害因子）が後述するような刺激に応答して分解すると、I κ Bをそれまで結合していたNF- κ B（転写制御因子本体）が細胞質から核へ移行する。またショウジョウバエ（*Drosophila*）の初期発生にも、同様の因子〔Cactus（I κ Bに相当）とDorsal（NF- κ Bに相当）〕が背腹の決定に重要な役割を果たしている。すなわち、転写制御因子の分解反応は進化の過程で保存された機構であるともいえる。

I κ Bが広く注目されていることは、文献検索をしてみてもよくわかる（1992年以降1998年1月までのMEDLINE）。”転写因子（もしくはDNA結合蛋白質）と蛋白分解”をキーワードとして選んだ場合（必ずしも網羅できていないが、また、高等真核生物に限るが）、前者の組み合わせでは23件中16件、後者の組合せでも16件中8件がI κ BとNF- κ Bに関連している。それ以外には、筆者らの報告しているGATA-6を含め、AP1（c-fos, c-jun, junB, junDなど）、Ci、E2F、TH3、Myb、p53、SP1、SREBPとYY1が検索された。

また、最近の総説「蛋白分解による転写因子機能の制御」〔文献1〕では、NF- κ B、Notch、SREBP、IRF2が取り上げられている。NF- κ BについてはRelファミリーとして7種、I κ Bには6種のメンバーが存在する。このような多様性の意味に加え、TNF α やIL1のようなシグナル、あるいはUV、TPA、LPSなどのシグナルが、最近報告されたNIKやIKKにどのように伝えられ、I κ Bのリン酸化、ユビキチン化、プロテアソームによる分解につながるのか詳細な検討が進められようとしている〔文献2〕。

その他上記の転写因子でプロテアソームが分解に関わっているのは、AP1、E2F、GATA-6、Myb、Myc、p53、SREBPである。また、SP1にはシステインプロテアーゼ、IRF2にはICE様システインプロテアーゼ、YY1にはカルパイン（myogenic Ca²⁺-activated）が作用する。しかし、NotchやCi、TH3の切断、またIRF2のカルボキシ末端領域のアンマスキングの詳細は不明である。SREBPについては三種の蛋白分解の形態があるので、我々が研究対象としているGATA-6とともに後述する。

GATA-6と蛋白分解

個体の発生や細胞の分化は、その引き金を引くマスター因子の時期および位置特異的な発現に支配されている。脊椎動物に6種見つかっているGATA転写制御因子は、それぞれ発現時期や場所を異にし特有の遺伝子発現を制御しており、そのようなマスター因子に近いものと考えられている。しかし、6種類のみで複雑な遺伝子発現を制御しきれはるはずはなく、複数の他の因子も協調して働いている。遺伝子構造や発現部位などからGATA1, 2, 3とGATA4, 5, 6の2グループに分類できるが、筆者は後者のグループを発見した。

さて、このような転写制御因子の機能を直ちに発揮させたり停止させる場合、その因子の遺伝子転写を促進・抑制するよりも、蛋白をプロセッシングして活性化するか不活化してしまうほうが時間的に有利と考えられる。もちろん、その転写制御因子の合成量をかえることは必要で、最終的な転写の促進・抑制が達成される〔文献3〕。このように考えると、発生や分化の鍵となる転写制御因子の機能を速やかに制御する機構として、蛋白分解は重要である。

cAMP類似体（多くの研究者が使用する濃度と処理時間において）が存在すると、GATA-6はAキナーゼを介してプロテアソームによって分解されてしまうことを、我々は偶然見つけた〔文献4〕。この現象を上記のモデルにあてはめて詳細な検討を行おうとしている。GATA-6依存的に抗生物質耐性になっている培養細胞の耐性はdbcAMP存在下には現われないことを利用して（GATA-6が分解され抗生物質耐性遺伝子の転写が促進しない）、dbcAMP存在下にもGATA-6の分解が起きない、すなわ

ち抗生物質耐性株を分離し、それらの性状を解析しようとしている。特にAキナーゼやその調節サブユニットを細胞内に保持する複数の蛋白が現在報告されており〔文献5〕、それらとの関係を明らかにする知見が得られるのではないかと考えている。また、興味深いことに、先のCiが活性化される際に、Aキナーゼが抑制的に作用することが報告されている〔文献6〕。

GATA転写制御因子について、昨秋イタリアでEMBO Workshop「Regulation and Function of GATA Proteins」が開かれたが、蛋白分解に着目した話はなく、GATA-6の分解は興味を持たれた。さて、この分解経路が内在的に発現する6種類すべてのGATA蛋白質に共通のものなのかということを確認することも、普遍性の点で重要である。最近我々は、GATA-4を内在的に発現する培養細胞を見つけたので、これを用いてGATA-4の蛋白分解についても研究を開始している。

SREBPと蛋白分解

SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) には1と2の2種があり、小胞体膜や核膜に局在する膜蛋白質として合成される。SREBPはN末端側の約1/3の領域に転写制御因子としての機能があり、その領域に続いて2回膜を横切っている。細胞内コレステロールが減少すると、SREBPの膜からの切り出しが起こる。このプロセッシングは二段階の切断反応からなる。SCAPに依存して小胞体膜の内腔側でまず最初の切断が起き、その後N末側に向かった膜貫通領域で二度目の切断が起きる。二度目の切断にはコレステロール依存性はない。この後、膜から遊離したN末側は核へ移行し、コレステロール生合成系やLDL受容体の遺伝子を活性化する。内腔側での切断には、新規のプロテアーゼが関与している可能性がある。

SREBPは、このようなコレステロールセンサーの一部として、プロテアーゼによる制御を受けているが、あと二通りのプロテアーゼが関与する制御が知られている。先のようにしてSREBPが核に移行し転写活性化を果たすが、核内での寿命は短く、プロテアソームの働きで分解される。また、アポトーシスの過程で、ICE様のプロテアーゼによりDNA結合能のあるSREBPの断片が切り出されるが、その作用は

不明である。

おわりに

以上述べてきたように、相当数の転写制御因子がプロテアーゼによって制御を受けていることが明らかになっている。しかも、複数のプロテアーゼもしくはプロテアーゼ系が関わっていることは明白である。それらはまだ同定されていなかったり、介在する因子が不明であったりする。従って、転写制御因子の働きを解明する研究の一端は、まさにプロテアーゼの研究に支えられていると言ってもよい。

文献

- 1) Goodbourn, S. and King, P. (1997) *Biochem. Soc. Trans.* 25, 498-502.
- 2) Verma, I. M. and Stevenson, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11758-11760.
- 3) Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T. and Maeda, M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 26461-26464.
- 4) Nakagawa, R., Sato, R., Futai, M., Yokosawa H. and Maeda, M. (1997) *FEBS Lett.* 408, 301-305.
- 5) Dell'Acqua, M. L. and Scott, J. D. (1977) *J. Biol. Chem.* 272, 12881-12884.
- 6) Sisson, J.C., Ho, K. S., Suyama, K. and Scott, M. P. (1997) *Cell* 90, 235-245.

[略語]

- AP1 : activating protein 1
Ci : Cubitus interruptus
E2F : Adenovirus E1AやE2遺伝子の制御領域に結合する host factor
ICE : interleukin-1 β -converting enzyme
IKB : inhibitor of NF-KB
IKK : IKB kinase ;
IL1 : interleukin 1
IRF2 : interferon regulatory factor 2
LPS : lipopolysaccharide
NF-KB : nuclear factor KB
NIK : NF-KB-inducible kinase
Myb : avian myeloblastosis virus
Myc : avian myelocytomatosis virus
Rel : avian reticuloendotheliosis virus
SCAP : SREBP-cleavage-activating protein
SP1 : stimulation protein 1
SREBP : sterol regulatory element binding protein

Su[H] : suppressor of Hairless
TH3 : tetrahexamer binding protein 3
TNF α : tumor necrosis factor α
TPA : 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
YY1 : Yin-Yang 1

(前田 正知 : 大阪大学・薬学部・生物薬品化学講座)

3. プロテアソームによる精子鞭毛運動の制御

精子は受精という目的のために極端に分化した細胞である。始原生殖細胞から発し、体細胞分裂、減数分裂を経て精子が作られるが、精子形成時の形態変化は核の凝縮、先体の完成、鞭毛の伸長と非常にダイナミックである。一方、形態的に完成された精子も、ほとんどの場合運動性をもたないか、もっていても完全ではなく、放精後精子がさらされる外部の環境（淡水、海水、卵由来の活性化物質、雌性生殖器内）が刺激となり運動が活性化され、受精が可能となる。すなわち、精子にとって受精直前に運動性の変化を起こすことが、卵に到達するための最後の仕上げの段階に当たる。

精子の運動装置である鞭毛のなかには9本のダブルット微小管、2本のシングルット微小管およびそれらに付属しているいくつかの構造物からなる軸糸が存在する。精子運動の原動力は、ダブルット微小管に結合しているモータータンパク質であるダイニンがATP分解のエネルギーを利用して微小管を滑らせることにより生まれる。精子の運動性の変化も、つまるところはこの滑り運動を何らかの機構で調節することによって起こると考えられる。

サケ科魚類精子運動の調節因子を検索している過程で、プロテアーゼ阻害剤により精子運動が阻害されることを見出したのが、本研究の発端である(1)。この阻害はATP濃度が低い場合には観察されず、高い場合にのみ阻害が見られた。この内在性のプロテアーゼに興味を持ち、阻害剤と同様に運動を阻害する合成基質を検索したところ、Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCAがその効果を持つことが明らかになった(2)。

さっそくこの基質を分解するプロテアーゼを精子から精製した結果、20Sプロテアソームと分子量950kDaのプロテアーゼが精製された(3)。950kDaプロテアーゼはチューブリンと結合した形で単離され、このプロテアーゼが微小管と密接な関係があることが推測された(4)。ATP存在下で精製した場合、分子量1,500kDaのプロテアーゼが精製され、その分子構成から26Sプロテアソームであると結論した(5)。26Sプロテアソームの調節サブユニット複合体(PA700)に相当する部分と950kDaプロテアーゼの分子構成を比較したところ、両者は極めて似ていることから、26Sプロテアソームが20Sプロテアソームと950kDaプロテアーゼの複合体である可能性が極めて高いといえる。しかしながら、950kDaプロテアーゼに含まれる50kDaサブユニットの等電点が26Sプロテアソーム中では酸性側にシフトしていることや、950kDaプロテアーゼに比べて26Sプロテアソームに含まれるチューブリン含量が低い点など違いがある(5)。この相違は20S-26S変換に関わっているかもしれない。

20Sプロテアソームに対する抗体を作製し間接蛍光抗体法で調べたところ、プロテアソームが鞭毛に沿って存在することがわかった(3)。免疫電顕によりさらに詳しい局在を調べたところ、外腕ダイニンの根元あたりから細胞膜に向かって伸びている突起にプロテアソームが結合していることがわかった(6)。微小管に結合している構造にプロテアソームが局在しているということは、上記の950kDaプロテアーゼあるいは26Sプロテアソームにチューブリンが含まれている事実とも一致している。従って、950kDaプロテアーゼ中にチューブリンと結合できるサブユニットが含まれており、その部分で微小管と結合していると考えられる。最近、26Sプロテアソームのサブユニット間を分子内にジスルフィド結合を持つ二価性架橋試薬を用いて架橋を行った結果、117kDa付近にチューブリン抗体と反応する架橋産物が得られた。ジスルフィド結合を切断するとチューブリンと約60kDaの解離産物が得られた。60kDaサブユニットはチューブリン結合サブユニットである可能性が高い。現在さらに詳細に解析中である。

プロテアソームが分解する内在性基質については、まだわかっていない。抗ユ

ビキチン抗体を用いて精子運動開始に伴い消失するタンパク質を調べたところ、ユビキチン抗体と反応するタンパク質が鞭毛にいくつかあることがわかったが、いずれも精子運動開始に伴い分解されなかった。一方、プロテアソームの基質(Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCAおよびZ-Leu-Leu-Glu-2NA)あるいは阻害剤(MG-115およびPSI)によって鞭毛運動が阻害されるが(2, 5)、これらの基質あるいは阻害剤存在下で鞭毛タンパク質のcAMP依存性のリン酸化を調べたところ、分子量22kDaのタンパク質のリン酸化が著しく阻害されることがわかった(6)。このタンパク質を軸糸から抽出し、ショ糖密度勾配遠心による分画を行ったところ、外腕ダイニンのサブユニットの一つである22kDaダイニン軽鎖であることが明らかになった(6)。つまり、プロテアソームはcAMP依存性のリン酸化を調節することによりダイニン軽鎖のリン酸化を促し、その結果、ダイニンによる微小管の滑り運動が活性化され、精子運動の活性化に至ると考えられる。プロテアソーム阻害剤はダイニン軽鎖の脱リン酸化には影響がないことから、プロテアソームはcAMP依存性プロテインキナーゼの活性化に関与していると考えられる。プロテアソームはcAMP依存性プロテインキナーゼの制御因子を分解している可能性が高いが、これまで調べたところR-サブユニットの分解は観察されず、新規のcAMP依存性プロテインキナーゼ調節因子が存在しプロテアソームの基質になっている可能性がある。現在あらゆる方法を考えて、基質タンパク質を同定すべく研究を進めている。

これまでサケ、ニシン、ウニ、ホヤ、ハムスターの精子から20Sプロテアソームを単離してきた。また、サケ、ウニの精子からは26Sプロテアソームの単離にも成功している。各々の動物の精子におけるプロテアソームの局在を詳しく調べる必要があるが、おそらくプロテアソームによる鞭毛運動の調節機構はかなり普遍的ではないかと考えている。精子運動活性化の様子は動物種によってさまざまであるが、特にサケ科魚類の精子は淡水に放精されてから1秒以内に運動開始が起こる。この点、プロテアソームが基質タンパク質を一瞬にして切断し、ある反応を不可逆的に進めると考えると納得がゆく。完成された精子に転写活性やタンパク質合成活性は

ほとんど無く、運動開始にかかわるタンパク質はすべて揃っていると考えられる。精子が放精されてから瞬間的に多くのカスケード反応を起こすためには、運動開始を起こすために必要なさまざまな因子が空間的にかなり厳格に配置あるいは会合している必要がある。おそらくプロテアソームにとっては、目の前に餌があってもお預けを食らっている状態ではないであろうか。お預けをくらっているのではなく、単に眠っているのかもしれない。何がプロテアソームを叩き起こすのか、その活性化機構の解明は、プロテアソームのタンパク質基質が同定された後、その次に与えられた興味深いテーマである。

文献

1. Inaba, K. and Morisawa, M. (1991) *Biomed. Res.* 12, 435-437
2. Inaba, K. and Morisawa, M. (1992) *Biol. Cell* 76, 329-333
3. Inaba, K. et al. (1993) *J. Cell Sci.* 104, 907-915
4. Inaba, K. et al. (1996) *Biomed. Res.* 17, 87-93
5. Ohkawa, K. et al. (1997) *Biomed. Res.*, 18, 353-363
6. Inaba, K. et al. (1998) *J. Cell Sci.*, in press

(稲葉一男：東京大学大学院理学系研究科附属臨海実験所)

(6) トピックス

1. Protein Kinase CとApoptosis

Protein Kinase C (PKC)の強力な活性化剤として知られるTPAを細胞に添加すると、細胞増殖や、分化、細胞死 (Apoptosis) 等が引き起こされることが報告されている。また逆に、他の刺激によって誘導されるこれらの現象が、TPAの添加により抑制されることも知られている。TPAによってどの現象が誘導されるかは、細胞毎に異なっている。哺乳動物には少なくとも11種類のPKC分子種が同定されており、このうちcPKC、或いはnPKCとして分類される8分子種がTPAによって活性化されることから、TPAによる多彩な生理作用は、細胞毎に発現しているPKC分子種の種類と量が異なるためであると考えられている(1)。即ち、PKCは細胞の増殖、分化、死という最も根源的な現象の制御に深く関わっていることは確かである。しかし、各々の分子種の生理機能が異なっているにもかかわらず、一つ一つを区別して解析することが困難であるため、PKCの分子機序に関しては未だ不明の点が多い。

apoptosisにおけるPKCの限定分解

筆者は、PKC分子種の中でも特にPKC δ に着目して、これ迄解析を進めてきた。PKC δ は細胞増殖の制御にも深く関わっている分子であるが、1995年にEmoto等により、放射線照射により誘導されるapoptosisにおいてPKC δ の限定分解が引き起こされ、酵素活性を有した活性部位断片が細胞内に蓄積されることが報告されたことで(2)、俄然PKCとapoptosisの関係を明確に結び付ける分子として注目されている。放射線照射のみならず、Fasの活性化やTNF α 等のcytokine刺激や、ara-C等のDNA-damaging試薬、或いはTPAそのものによるapoptosisの誘導時にも、PKC δ の限定分解が起きる(2-4)。現在我々が試した限りにおいては、apoptosisの誘導と δ の限定分解は細胞の特異性、刺激依存性、更にそのTime courseにおいて非常によく一致している。また、限定分解によって遊離するのは活性部位断片のみではなく、制御

部位断片もほぼ全長を保持したまま細胞内に蓄積することが明らかとなった(4)。その後、我々やEmoto等の解析から、 δ 分子種のみならず、同じnPKC分子群に所属する θ や ε 分子種もapoptosis刺激にともなって限定分解を受けるが、 α 、 β II、 ζ 分子種では分解が見られないことが明らかとなった(2-5)。

apoptosisの時誘導されるPKC δ の限定分解は、どのプロテアーゼによって生じるのであろうか？最初Emoto等は、apoptosisが起きる時に活性の上昇するキナーゼとしてPKC δ の活性部位断片を精製した。そのN末端のシーケンスを調べることにより決定した切断部位のアミノ酸配列(DMQD/N)から、PKC δ がCaspaseにより直接切断されると考えた(2)。その後、 δ の限定分解は、Caspase1の阻害剤では阻害されないが、Caspase3の阻害剤では阻害されること、in vitroで直接Caspase3によって δ 及び θ が切断、活性化されること、等からPKCの限定分解は、Caspase3-likeのプロテアーゼにより担われていると考えられている(2-6)。

PKC限定分解の生理的意義

ところで、apoptosisにおけるPKCの限定分解とは何を意味するのであろうか？PKCはN端に活性制御部位、C端に活性部位を配しており、制御部位にジアシルグリセロールやカルシウム等の活性化因子が結合することにより活性化される(1)。しかし、PKCが発見されたかなり当初から、PKCがプロテアーゼによって切断され制御部位による抑制がはずれて活性化するという図式が考えられていた。事実、精製したPKCをin vitroでCalpainやTrypsin等のプロテアーゼで処理すると、PKCの限定分解により活性部位断片が生成し、活性化因子が存在しなくてもリン酸化活性を呈するようになる(7, 8)。そこで、PKCの活性化剤(TPA等)をはじめ様々な刺激を細胞に与えて活性部位断片の生成を捕えようとする甚大な努力が払われたが、そのほとんどが水泡に帰した。その代わりPKCに何が起こったか、ということ---PKCは跡形もなく消えたのである。細胞にPKC活性化因子を加えると、最初細胞質画分に分画されていたPKCは速やかに膜画分に検出されるようになる(translocation)。その後、徐々にPKCの含量は減少していき、刺激が十分に強ければ2~4時間で細胞から完全に

消失する。この間、特に分解物と思われる産物は見られない。これをPKCの down-regulation と呼び、その後、translocation と並んでPKCの活性化の指標として盛んに用いられるようになった(1)。大事なことは、同じPKCの分解過程でありながら、down-regulationがPKC活性の消失であるのに対し、限定分解はPKCの活性化である、という点である。

従って、少しでもPKCの研究に従事していたものならば、apoptosisでPKC δ が限定分解される、との報告を受けた時、apoptosisでもPKCが活性化されるのかということの他に、限定分解によるPKCの活性化が生理的条件下でも起きるのだ、という衝撃を受けたはずである。apoptosisでPKC δ が活性化されるならば、何かをしているはずである。決して、単なるついでで分解されたはずはない。そこで、PKC δ 、及び θ の活性部位断片のリコンビナント蛋白質を作製し、細胞への導入実験を試みた。すると、見事にapoptosisが起きたのである(4,-6)。この様なapoptosisの誘導能は、活性部位断片のみならず、点変異により作製したconstitutive active型のPKC δ を導入した場合にも見られた(4)。即ち、リン酸化活性の異常な亢進がapoptosisにつながったと考えられる。活性型PKCを高発現した細胞をよく観察すると、まず異常な形態が目につく。死んで丸くなった細胞が多数あるのはいうまでもないが、かろうじて生き残ってはいるものの縮こまっている細胞が多い。これまでに、PKCの基質、或いは結合蛋白質として複数の細胞骨格因子が同定されている(1)。断片化により活性化されたPKCが、これらの細胞骨格蛋白質をリン酸化することによりこれらの再構成を誘導し、apoptosisにともなうダイナミックな細胞形態の変化をもたらしているのではないかと考えられる。これに対して、活性化PKC δ の導入による核の形態変化は比較的マイルドである。核の凝集、断片化は見られるが、断片は比較的大きく数も少ない。Caspaseの下流でgenomic DNAの断片化をもたらす因子としては、すでにDFF1 (9)や、ICAD-CAD (10)複合体等が報告されている。おそらく、これらの因子と競合することにより、PKCはapoptosisの進行に一役買っていると考えられるのである。

apoptosis初期におけるPKCの関わり

さて、これらの研究成果から、PKCとapoptosisとの関係は一応の決着を見たと考えられる向も多いかと思う。しかし、話しはそれほど単純ではない。apoptosisに伴って起きるPKC δ 、 θ 、 ε の限定分解は、apoptosisがかなり進行してから起きる遅い事象であるが、PKCがapoptosisのもっと早い段階でこれに関与しているという報告がある。TNF α やセラミド等のapoptosis誘導因子を細胞に添加すると、PKCの速やかなtranslocationが起きることが知られている(11, 12)。これらのPKCは、限定分解を受けていない完全長のものである。また、TPAが一部の細胞のapoptosisを阻害する機構として、PKCの活性化によりスフィンゴシンキナーゼが活性化され、その結果生じたリン酸化スフィンゴシンがapoptosisの進行を阻害する、という報告がある(13)。また、TNF α やFasL等は、膜蛋白質として合成され、細胞膜に存在するメタロプロテアーゼによって切り出されることが知られているが、これらメタロプロテアーゼの活性がTPAの添加によって増強することから、これらapoptosis誘導因子もまたPKCによって制御されている可能性がある。即ち、PKCはapoptosisの様々な段階でこの制御に関わっていることが示唆されているのである。

さらに、いわゆるPKC活性化因子であるTPAやジアシルグリセロールに応答しないPKCとして知られるatypical PKC (aPKC)もまた、apoptosisの制御に関わることが知られている。例えば、aPKCに属する λ や ζ 分子種を細胞に高発現すると、apoptosis誘導に対する細胞の感受性が変化するという報告(14)や、apoptosis誘導因子として知られるセラミドが低濃度で直接PKC ζ の制御部位に結合して活性化するとの報告(15)がある。また、 ζ や λ に結合する因子としてクローニングされたPar-4蛋白質は、細胞内でも ζ の制御部位に結合して、その活性を阻害することによってapoptosisを誘導することが報告されている(16)。

PKC---細胞の生と死をつなぐもの？

筆者は、apoptosisにおけるPKCの限定分解に伴って、活性部位断片のみならず制御部位断片もまた細胞内に蓄積することを明らかにした。そこで、制御部位断片の

生理機能を明らかにするため、 δ 制御部位断片のリコンビナントを作製しCOS細胞への高発現を試みた。その結果、 δ 制御部位断片の高発現は細胞の多核化をもたらした(水野、未発表)。先にも述べたように、PKCは細胞の増殖や分化の制御にも大きく関わっていることが知られている(1)。PKC δ の高発現株は細胞増殖能が低下していることが報告されているが、中でもCHO細胞の δ 高発現株では、TPA存在下で長期間培養することにより、G2/M期で増殖が停止して細胞の多核化が誘導されることが知られている(17)。即ち、PKC δ が制御部位を介した何らかの作用により細胞分裂を抑制している可能性が示唆される。また、apoptosisに伴うPKC δ の限定分解の結果生成した制御部位断片が、G2/M期を抑制することによってapoptosisの進行を増強する役目を担っていることが示唆された。

また、骨髓性白血病細胞株であるHL60やU937は、TPA存在下で培養することにより単球、或いはマクロファージ系の細胞に分化することが知られている(18, 19)。そこで筆者は、培地中にTPAを加えその挙動を観察した(4)。もともと浮遊細胞であるHL60は、TPAを加えて一時間余でディッシュに接着した。しかし、時間の経過と共に一部の細胞がまた浮遊をはじめ、それと共にapoptosisを起こす細胞が増えてきた。そこで、TPA添加24時間後に、ディッシュに接着したままの細胞と浮遊した細胞とに分離して回収し、各々についてapoptosisの有無とPKCの挙動について検討した。すると浮遊した、細胞群はそのほとんどがapoptosisを起こしており、またPKC δ 、及び ϵ の限定分解による活性、及び制御部位断片の生成が認められた。それに対し、接着したままの細胞群ではapoptosisはほとんど認められず、PKC限定分解の産物も見られないまま、ただPKCが消失していた。即ち、PKCのdown-regulationが起きたのである。同様の現象はU937細胞でも見られた。つまり、TPA処理によって引き起こされた細胞の運命(分化とapoptosis)と、PKC δ 、及び ϵ の運命(down-regulationと限定分解)に一致を見たのである。ここから次のような仮説が導き出される。初期のPKCの活性化はこれらの細胞の増殖停止を引き起こすが、速やかにPKCのdown-regulationを起こした細胞は生き残り分化の方向に向かうのに対して、

PKCが長く残存している細胞ではその後の限定分解が誘導されapoptosisに向かうものである。この様なTPAに対するPKCの応答性の違いは、刺激を受けたときの細胞の状態（例えば、細胞周期のどの段階にあるのか）によるのかもしれない。いずれにしてもPKCが細胞の増殖、分化、死といった大きな分岐点を制御する因子であると考えられるのである。

終わりに

以上、PKCとapoptosisとの関連についてはまだまだ混沌としているといわざるを得ない。apoptosis自体が細胞の全てを巻き込む大イベントであるがゆえ、PKCに関わらず、そこで起きる全ての現象に対して、それがapoptosisにおける中心的なイベントであるか、単なる副産物であるのかを見極めることが大変重要になってくる。更にPKCは、apoptosisのみならず、増殖や分化をも制御する因子である。apoptosisに限らずもっと広い分野から見通すことによって、はじめてPKCとapoptosisの関係が見えてくるのかもしれない。

文献

1. 大野茂男 (1996) 生化学 68, 345-361.
2. Emoto, Y., et. al. (1995) EMBO J. 14, 6148-6156.
3. Emoto, Y., et. al. (1996) Blood 87, 1990-1996.
4. Mizuno, K., et. al. (1997) Eur. J. Biochem. 250, 7-18.
5. Datta, R., et. al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 20317-20320.
6. Ghayur, T., et. al. (1996) J. Exp. Med. 184, 2399-2404.
7. Sando, J. J., et. al. (1992) Cell Signaling 4, 595-609.
8. Kishimoto, A., et. al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 4088-4092.
9. Liu, X., et. al. (1997) Cell 89, 175-184.
10. Enari, M., et. al. (1998) Nature 391, 43-50.
11. Schutze, S., et. al. (1990) J. Immunol. 144, 2604-2608.
12. Sawai, H., et. al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 2452-2458.
13. Cu villier, O., et. al. (1996) Nature 381, 800-803.
14. Murray, N. R., et. al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 27521-27524.
15. Muller, G., et. al. (1995) EMBO J. 14, 1961-1969.
16. Diaz-Meco, M. T., et. al. (1996) Cell 86, 777-786.
17. Watanabe, T., et. al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10159-10163.
18. Huberman. E., & Callaham, M. F. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1293-1297.

2. 生体内ユビキチンの定量：イムノアッセイの問題点

はじめに

基礎医学に関する者（筆者もその一人である）にユビキチンの存在を強く印象づけたのは、1987年、アルツハイマー病の神経原繊維変化（NFT）の構成成分としてユビキチンを同定した森らの研究（1）であろう。これを契機に、様々な疾患について、生体内ユビキチンの動態に注目した免疫化学（主に免疫組織化学）的検討が数多く行われた（2）。その中には、イムノアッセイによってユビキチンを定量し、臨床医学上の意義を指摘するものも現れた（3-8）。ユビキチンは、蛋白分解を誘起するシグナルとしてストレス応答等に関する。従って、その量的な変化が何らかの病的過程を反映する可能性は否定できない。しかし、これらの報告で測定されているユビキチン分子は、必ずしも同一とは言えない。例えば、ヒト髄液のユビキチン濃度は報告によって1桁異なる（5, 7, 9）。我々も近年2種類のイムノアッセイ（10, 11）を構築し、遊離型ユビキチンとマルチユビキチン鎖の分別定量を行っているが、まだ問題を抱えている（後述）。そこで、今迄に報告されたイムノアッセイによるユビキチン定量について、その現状と展望をまとめた。なお、本文中での“ユビキチン”は、遊離型、結合型等すべてを含む“広義のユビキチン”を意味し、モノユビキチンに限定しないものとする。また、小文字および大文字のアルファベットは、それぞれ表1および表2の該当項目を表している。

イムノアッセイのユビキチン型特異性

ヒトや実験動物の組織・体液のユビキチンを定量する場合、イムノアッセイが現実的な選択となる。一方、生体内のユビキチンは、E1, E2, E3さらに脱ユビキチン化酵素（DUB）により、複数の型に変換される（表1 a~f）。これらの生理意義は異なり、例えば、anchor型のG76-K48イソペプチド結合によるマルチユビキチン鎖

(e) は、蛋白分解シグナルである。従って、イムノアッセイで得た結果の意味を考える上で、どの型のユビキチンが測定されているかという（特異性に関する）情報が重要である。また、杞憂かも知れないが、ユビキチン遺伝子産物 (g, h) やUCRP等のユビキチン様蛋白質 (i, j) が抗体に結合し測定に影響する可能性も考慮すべきである (12)。このように、ユビキチンの測定と言っても、厳密には、これだけ多様な各型の交差性を把握する必要がある。しかし、既報の測定系 (表2 A~J) は、そうした検討が無いが、有っても十分と言えない。例えば、HaasとBrightが確立したBの測定系は、結合型ユビキチンに特異的であるとされている (表2 #4参照)。しかし、bからfまでであるユビキチン結合体のどれを認識し易いか判らない。Bはマルチユビキチン鎖の発見 (13)以前に作られた歴史的な測定系であり、近年も用いられている (14, 15)。特異性の再検討を願いたい。CやGのイムノアッセイは、NFTの主要成分paired helical filament (ユビキチン化タウ蛋白質を含む) を抗原にして得たモノクローナル抗体 (mAb 5-25) を用いたもので、抗体の性格から結合型ユビキチンに特異的と推定されている。Iqbalのグループは、この方法によって、アルツハイマー病患者の髄液や剖検脳のユビキチン濃度が高いことを示した (3, 4, 16)。しかし、KやLの測定系を用いた我々の検討は、この結果を支持しなかった (未発表)。もしも、CやGの系がKやLで測定される型 (後述) 以外のユビキチン (例えばn=1~3程度の短鎖ユビキチン) に特異的であれば、この矛盾は解消する。機会があれば解明したい。我々が確立した測定系KとLに関しては、網状赤血球由来E1, E2, E3で調製した様々な長さのマルチユビキチン鎖 (主にG76-K48イソペプチド結合からなると思われる) を用いて特異性を検討した。その結果、Kはn> 3~6のマルチユビキチン鎖を、Lはモノユビキチンを中心とする遊離型ユビキチンを検出することを見出した (表2 #8, #9参照)。しかし、Kにおける、G76-K48以外のマルチユビキチン鎖 (c, f) の交差性は判らない。また、識別可能とは思えないが、bとcの比較、すなわちanchor型とunanchor型の交差性の異同も未検討である。Lにおいては、ユビキチン遺伝子産物 (g, h) やユビキチン様蛋白質 (i, j) の交差を懸念しているが、検証で

きずにいる。今後、こうした各型を用いた検討が必要であるが、同時に、分析対象の細胞・組織における、unanchor型G76-K48マルチユビキチン鎖やG76-K6, G76-K11, G76-K29, G76-K63の各マルチユビキチン鎖、さらにユビキチン様蛋白質などの存在(量)を生化学的に調べることも重要だろう。

我々は、Lの系を確立する際、様々なユビキチン抗体を用いた数種類のcompetitive RIA (Lと同じ原理による方法)も作り、各々の性格を比較した(11)。その結果、多少抗体の性質が異なっても、特異性は互いに良く似ていることを見出した。従って、それに類する測定系(A, D, E, F, H, J)の性格も、Lと同様(表2#9参照)である可能性が高い。実際、Dの特異性を検討したところ、Lと変わらなかった(未発表)。今後、各系の標準品(モノユビキチン)を統一できれば、これらによる測定値は比較可能となるかもしれない。

以上、現在、ユビキチン測定用イムノアッセイ系は多数報告されているが、完全なものはなく、その特性を理解した上で利用する以外にない。また、既報のデータに関しても、同じ測定系を用いていない限り、相互の比較はきわめて困難と結論される。

今後のイムノアッセイ

望まれる測定系のひとつとして、蛋白分解シグナルとしてのユビキチンを的確に定量化できるものが挙げられよう。現在、G76-K48マルチユビキチン鎖でかつ長鎖のものが、より有効なシグナルになると考えられている(表1c解説参照)(17)。これに基づけば、anchor型のG76-K48マルチユビキチン鎖($n > 6$ 程度)に特異的な測定系が候補となる。また、研究目的によっては、特定の標的蛋白質と結合したマルチユビキチン鎖だけを検出する系も有用だろう。ただし、シグナルとしてのユビキチン研究には、G76-K48以外のマルチユビキチン鎖の意義など課題も多く、今後の展開ではまったく予想外の系が必要となるかもしれない。

ユビキチン自身ではないが、ユビキチン様蛋白質(i, j)のSUMO-1やUCRPに対する特異的イムノアッセイも、今後必要とされる可能性がある。また、最近、孤発

性アルツハイマー病の脳から高頻度でフレームシフト型のubiquitin-B遺伝子の変異（おそらく転写レベルでの2塩基欠失）が見出され、この翻訳により生じる変異ユビキチン（C末端グリシンモチーフを失っている）の病態への関与が示唆された（18）。このタイプの分子は蛋白分解を攪乱するとの報告もあり（19）、イムノアッセイで組織や髄液中の量を調べる価値があるように思える。

おわりに

イムノアッセイによるユビキチン定量の現状と展望について述べてきた。しかし、こうした方法で得た情報を何に生かすのか、また、本来何を目的にユビキチンを定量するのか。そういう疑問が残る方も多いかもかもしれない。筆者なりの答えとして、測定系KとLから得たいくつかの知見を紹介する。

始めに述べたように、生体内のユビキチンは、病態に伴い質的量的に変化する可能性がある。我々は、他の施設と共同して、各種疾患の患者体液ユビキチンを定量している。その結果、①急性白血病の患者血清におけるマルチユビキチン鎖、②急性肝炎やアルコール性肝硬変の患者血清におけるマルチユビキチン鎖と遊離型ユビキチン、③無酸素脳症の患者髄液の遊離型ユビキチン、等において特徴的な動態を見出している（発表準備中、一部20）。これらの背景の解明は今後の課題である。一方、正常な細胞や組織中のユビキチンを定量することで意外なことに気付くこともある。例えば、培養細胞に熱ストレスを負荷し細胞内ユビキチンレベルを経時的に分析したところ、“遊離型ユビキチンは激減、マルチユビキチン鎖は変化なし”という興味あるステージを見出した（発表準備中）。ユビキチンのリサイクルが破綻しているのかもしれない。また、もっと単純な検討では、ラットの組織中の遊離型ユビキチンを定量すると、臓器によりその濃度（単位蛋白当たりの量）に顕著な違いが認められた（未発表）。例えば、脳の遊離型ユビキチン濃度は際立って高く、神経特異的なDUBと関連するのかもしれない。

ユビキチン系の研究は、今後もE2, E3やDUBおよび、これらと相互作用する分子の解明を軸に展開されよう。その中で、生体ユビキチンの定量は、先端の研究成果

を補填するだけでなく、新たな問題を提起するため、巧みに利用していくべきであろう。

文献

1. Mori, H., Kondo, J., and Ihara, Y. (1987) *Science* 235, 1641-1644
2. Mayer, R.J., Arnold, J., Laszlo, L., Landon, M., and Lowe, J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 141-157
3. Wang, G.P., Iqbal, K., Bucht, G., Winblad, B., Wisniewski, H.M., and Grundke-Iqbal, I. (1991) *Acta Neuropathol.* 82, 6-12
4. Wang, G.P., Khatoon, S., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (1991) *Brain Res.* 566, 146-151
5. Manaka, H., Kato, T., Kurita, K., Katagiri, T., Shikama, Y., Kujirai, K., Kawanami, T., Suzuki, Y., Nihei, K., and Sasaki, H. (1992) *Neurosci. Lett.* 139, 47-49
6. Okada, M., Miyazaki, S., and Hirasawa, Y. (1993) *Clin. Chim. Acta* 220, 135-144
7. Blennow, K., Davidsson, P., Wallin, A., Gottfries, C.G., and Svennerholm, L. (1994) *Int. Psychogeriatrics* 6, 13-22
8. Asseman, C., Pancre, V., Delanoye, A., Capron, A., and Auriault, C. (1994) *J. Immunol. Meth.* 173, 93-101
9. Kudo, T., Iqbal, K., Ravid, R., Swaab, D.F., and Grundke-Iqbal, I. (1994) *Neuroreport* 5, 1522-1524
10. Takada, K., Nasu, H., Hibi, N., Tsukada, Y., Ohkawa, K., Fujimuro, M., Sawada, H., and Yokosawa, H. (1995) *Eur. J. Biochem.* 233, 42-47
11. Takada, K., Hibi, N., Tsukada, Y., Shibasaki, T., and Ohkawa, K. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1290, 282-288
12. Lowe, J., McDermott, H., Loeb, K., Landon, M., Haas, A.L., and Mayer, R.J. (1995) *J. Pathol.* 177, 163-169
13. Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A. (1989) *Science* 243, 1576-1583
14. Haldeman, M.T., Finley, D., and Pickart, C.M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 9507-9516
15. Haas, A.L., Baboshina, O., Williams, B., Schwartz, L.M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 9407-9412
16. Kudo, T., Iqbal, K., Ravid, R., Swaab, D.F., and Grundke-Iqbal, I. (1994) *Brain Res.* 639, 1-7
17. Piotrowski, J., Beal, R., Hoffman, L., Wilkinson, K.D., Cohen, R.E., and Pickart, C.M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 23712-23721
18. van Leeuwen, F.W., de Kleijn, D.P.V., van den Hurk, H.H., Neubauer, A., Sonnemans, M.A.F., Sluijs, J.A., Koycu, S., Ramdjielal, R.D.J., Salehi, A., Martens, G.J.M., Grosveld, F.G., Burbach, J.P.H., and Hol, E.M. (1998) *Science* 279, 242-247
19. Hodgins, R.R., Ellison, K.S., and Ellison, M.J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 8807-8812

20. Takada, K., Nasu, H., Hibi, N., Tsukada, Y., Shibasaki, T., Fujise, K., Fujimuro, Sawada, H., Yokosawa, H., and Ohkawa, K. (1997) Clin. Chem. 43, 1188-1195
21. van Nocker, S. and Vierstra, R.D. (1993) J. Biol. Chem. 268, 24766-24773
22. Shaeffer, J.R. and Kania, M.A. (1995) Biochemistry 34, 4015-4021
23. Galan Pickart, C.M. (1997) FASEB J. 11, 1055-1066
24. Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., and Finley, D. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 1265-1273
25. Saito, H., Pu, R.T., and Dasso, M. (1997) TIBS 22, 374-376
26. Loeb, K.R. and Haas, A.L. (1992) J. Biol. Chem. 267, 7806-7813
27. Kumar, S., Yoshida, Y., and Noda, M. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 195, 393-399
28. Haas, A.L. and Bright, P.M. (1985) J. Biol. Chem. 260, 12464-12473
29. Lippert, T.H., Seeger, H., Schieferstein, G., and Voelter, W. (1993) J. Androl. 14, 130-131
30. Phillips, M.E. and Platt, J.E. (1994) Gen. Comp. Endocrinol. 95, 409-415
31. Morimoto, T., Ide, T., Ihara, Y., Tamura, A., and Kirino, T. (1996) Am. J. Pathol. 148, 249-257

(高田耕司：東京慈恵会医科大学・生化学講座第1)

表1 生体内のユビキチンおよびユビキチン様蛋白質の各型

	名称 ^{#1}	ユビキチン間の結合	解説
a	Monoubiquitin		遊離型ユビキチン。将来のユビキチン化に備えた貯蔵としての意義を持つ。細胞内量は様々な要因で変動する。
b	Unanchored multiubiquitin chain ^{#2}	G76-K48 isopeptide bond	標的蛋白質と結合していないマルチユビキチン鎖。細胞内では短鎖(n<6程度)のもの程多い傾向がある(14, 21)。遊離型ユビキチンとしての機能の他、26S proteasomeによるユビキチン化蛋白質の分解を競合的に阻害する働きもある(17)。
c		G76-K6, 11, 29 or 63 isopeptide bond	細胞内での存在は検証されていない。
d	Anchored monoubiquitin		標的蛋白質と結合したモノユビキチン。ヒストン2Aに結合したものが量的に多い。標的蛋白質によっては、分解やエンドサイトーシスのシグナルとなる(22, 23)。
e	Anchored multiubiquitin chain	G76-K48 isopeptide bond	標的蛋白質と結合したユビキチン鎖。分解シグナルであり、n=2~8の範囲での検討では長鎖ほど分解誘起活性が高い(17)。
f		G76-K6, 11, 29 or 63 isopeptide bond	酵母等で生成され得ることが証明されているが、細胞内の量は不明。G76-K63結合鎖は、分解シグナル以外の機能があるらしい(24)。
g	Ubiquitin (or ubiquitin-like protein) -ribosomal protein fusions		モノユビキチン(またはユビキチン様蛋白質)がリボソーム蛋白質と連結したユビキチン遺伝子の産物。脱ユビキチン化酵素で切断される。
h	Linear poly-ubiquitin	G76-M1 peptide bond	ユビキチンがタンデムに結合したポリユビキチン遺伝子の産物。脱ユビキチン化酵素によって切断されモノユビキチンとなる。
i	Ubiquitin-like proteins		哺乳類細胞に限っても、SUMO-1(25), UCRP(26), NEDD-8(27)等複数存在する。
j	Anchored ubiquitin-like proteins		SUMO-1やUCRPで見出され、前者は核移行に関与する(25)。

^{#1} 正式名称という訳ではない。他にも様々な表現で呼ばれている(特にb~h, jにおいて)。

^{#2} unanchoredは freeと、multiubiquitinは polyubiquitinと表されることも多い。

表2 ユビキチン測定のためのイムノアッセイ系^{#1}

	発表年	測定法	抗体 ^{#2}	ユビキチン型特異性	文献
A	1985	Competitive RIA	pAb	遊離型ユビキチン ^{#3}	28
B	1985	Solid phase immunoassay	SDS変性Ubに対するpAb	結合型ユビキチン ^{#4}	28
C	1991	Competitive ELISA	PHF Ubに対するmAb 5-25	結合型ユビキチン(?) ^{#5}	3
D	1992	Competitive RIA	pAb	不明	5
E	1993	Competitive RIA	pAb (Sigma社)	不明	6
F	1993	Competitive RIA	pAb	不明	29
G	1994	Competitive ELIFA	PHF Ubに対するmAb 5-25	結合型ユビキチン(?) ^{#5,6}	9
H	1994	Competitive FIA	pAb (Sigma社)	不明	30
I	1994	Competitive ELISA	mAb 1510 (Chemicon社)	遊離型ユビキチン(?) ^{#7}	7
J	1994	Competitive RIA	pAb (Sigma社)	不明	8
K	1995	Sandwich ELISA	Ub化リゾチームに対するmAb FK2	マルチユビキチン鎖 ^{#8}	10
L	1996	Competitive RIA	pAb	遊離型ユビキチン ^{#9}	11

略語: RIA, radioimmunoassay; ELIFA, enzyme-linked immunoflow assay; FIA, fluoroimmunoassay; pAb, polyclonal antibody; Ub, ubiquitin; mAb, monoclonal antibody; PHF, paired helical filament.

^{#1} 通常のimmunoblotやdot blotなど半定量的な方法は除いた(Bは例外)。

^{#2} 抗原の記載がない抗体は、UbをKLH等のキャリアー蛋白質に結合したものを免疫して得ている。

^{#3} モノユビキチンが結合型ユビキチン(ユビキチン化ヒストン等)より30倍程度高い交差性を示す。

^{#4} 結合型ユビキチン(ユビキチン化ヒストン等)がモノユビキチンより約10倍高い交差性を示す。

^{#5} 抗体の特異性から推測したものであり、直接検証していない。

^{#6} Cと同様の方法。標準品がモノユビキチンであるため、測定値が表すユビキチン量は相対値と理解すべきか。

^{#7} 直接検証していない。また、mAb 1510は遊離型ユビキチン特異的でない(31)。

^{#8} Ub鎖が長いほど交差性が高まり、 $n > 6$ でほぼ一定になる。モノユビキチンや短鎖($n < 3$)は検出されない。

標準品(MUCRP1)が暫定的なものであるため、将来、測定値を補正する可能性がある。

^{#9} モノユビキチンが最大の交差性を示し、Ub鎖が長いほど交差性が減じ、長鎖($n > 10$ 程度)は検出されない。

従って、短鎖Ubの交差は無視できないが、短鎖Ubには遊離型Ubの性質もあり概ね遊離型Ub特異的と考えた。

(7) 海外留学中研究者からの最新情報

1. ロンドン通信

ここ英国は、昨年自動車事故で亡くなったダイアナ元妃に代表されるようにチャリティー活動が大変盛んな国で、医療・福祉・ホームレスの救済等様々な分野で多くのチャリティー団体が活躍しており、弱者にとっても優しい社会である。私が所属しているImperial Cancer Research Fund (ICRF) もその一つで、英国女王エリザベス2世のいとこのアレキサンドリア妃をパトロンとして戴くが、完全にチャリティーによって運営されている機関である (<http://icrfweb.icnet.uk>)。その歴史は意外と古く、1902年に設立され、今日まで癌の原因究明と治療研究のための英国の癌研究の1/3を行っているといわれている。驚くことに運用資金は、主に一般市民からの寄付金、遺産贈与、またICRFの看板を掲げたチャリティーショップからの収益金等で賄われており、英国政府からの補助等は受けていない。このことから英国の懐の深さを感じ取ることができる。年間5000万ポンド程の収益金は、そのほとんどが研究開発あるいは制癌・避癌の啓蒙活動のために費やされている。

ICRFは、古くからDNA腫瘍ウイルス等の研究で有名な癌研究所である。現在は細胞周期、転写因子、発生生物学など癌研究とは直接関係の少ない基礎研究にも力を入れている。それというのも、Cdc2 キナーゼの発見者として有名な細胞周期分野での世界的第一人者Paul Nurse博士が1993年より研究部所長に、また1996年より総責任者としてICRFを統括しているからである。彼は研究所の若返りも推進しており、多くの若いラボヘッドが誕生した。1994年に京都大学から移籍した登田隆博士もその中の一人で、唯一の日本人ラボヘッドとして細胞制御研究室を任されている。ICRFには、100以上の研究室があり。基礎研究はロンドン市内のLincoln's Inn Fields (約40研究室) と郊外のClare Hall (約10研究室) に集まっている。この他、発生研究部門がオックスフォードに、また臨床や癌の治療開発に携わっている研究室が、英国各地の大学や病院にあり、ヨーロッパにおける分子生物

学研究の一大組織となっている。

現在ICRFで特に注目に値する研究者は、細胞周期のDr. Paul Nurse, サイクリンの発見者Dr. Tim Hunt, アポトーシスのDr. Gerard Evan, 転写調節のDr. Nicholas Jones, Golgiの細胞周期変化を追っているDr. Graham Warren, T細胞分化のDr. Michael Owen、CキナーゼのDr. Peter Parker、発生生物学のDr. David Ish-Horowicz、CDKインヒビターのDr. Gordon Peters等が挙げられる。若手では、シグナル伝達のDr. Julian Downward、S期開始調節のDr. John Diffley、転写調節のDr. Richard Treisman等があり、今後の活躍が期待される場所である。登田博士がICRFで仕事をする理由として、ここには優秀な人材が集まっているからだという通り、現在Dr. Paul Nurseを含む5名が"Cell"誌のeditorial boardのメンバーになっている。

さて、ICRFの紹介はこれ位にしておき、次に私の仕事とラボの紹介に移りたいと思う。私は登田博士の研究室でポスドクとして早3年半程ご厄介になっている。ラボのメンバーは8人で、日本・イギリスを含む合計5ヵ国から学生・ポスドクが集まっており、とても賑やかだ。中でもラテンの国・スペイン人の学生は、ジェットコースターのように気分が上がり下がりし、見ていて飽きない。私たちは全員、研究材料として分裂酵母を用いており、その研究成果は生物の基本を捉えていると考えている。現在、登田研究室では各々のメンバーがそれぞれほぼ違ったプロジェクトを進めている。細胞極性、チェックポイント、MAPキナーゼ系、細胞周期、等等など。その中で私は細胞周期だ。分裂酵母では、S期とM期のカップリング、すなわち細胞倍数性の維持に少なくとも2つの機構が存在する。一つはCDKインヒビターRim1を含むCdc2/Cdc13キナーゼ複合体を通じて、もう一つはS期開始因子Cdc18を通じてである。

私は、細胞倍数性が上昇するという全く新しい表現型の変異株を分離することにより、新規の遺伝子*pop1*を得た。遺伝学、及び生化学的解析により*pop1*変異株では、驚いたことに細胞周期制御における最も重要な2つのキーファクターであるRim1とCdc18が極度に蓄積していることが判明した。また、Pop1はこれら2つの因

子の細胞内量を、以前の知見からの予想に反して、それぞれ独立に調整していることが明らかになった。さらに、これらの蛋白は、26Sプロテアソームの調節サブユニットS14の変異株*mts3*を制限温度で処理すると蓄積することから、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されていると考えられた。実際、*mts3*変異株中では高度にユビキチン化されたRum1やCdc18が蓄積するが、*pop1*変異株中ではこれら基質蛋白のユビキチン化は検出されないことから、Pop1は基質蛋白のユビキチン化のステップで機能していると考えられる。また、Pop1は*in vivo*でCdc18に結合することが見出されたので、基質の認識に重要な役割を果たしていると考えられる。塩基配列を決定したところ *pop1* 遺伝子産物は、F-boxと7回繰り返しのWDリピート構造を持っており、出芽酵母のCdc4と強い相同性を示した。つい最近、Cdc4はCdc53 (Cullin-1)、Skp1と共にユビキチン化の為の基質の認識に働いていることが示され、新しいタイプのE3であると考えられている。これらのことから、Pop1/Cdc4遺伝子ファミリーは生物種を越えてCDKインヒビターや、その他細胞周期制御における重要なキーマターを認識し、ユビキチン化することによって、細胞内量を調節していると考えられる。

近年、様々な生物のゲノムプロジェクトが推進されている。当初の計画では分裂酵母のそれも、'98年内に終了する予定になっている (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombeを見て頂いたらお解りのように、かなり進んでいることも事実だ。これには一般の遺伝子バンクに登録されていない分裂酵母の最新の遺伝子情報が詰まっている)。私共も早速その恩恵に与った。分裂酵母のゲノムプロジェクトからPop1ホモログが見つかったのだ。その遺伝子を破壊したところ、*pop1*変異同様、多倍数性変異を引き起こしたので *pop2* と名付け、現在解析を進めている。また、Pop2は*in vivo*でPop1に結合し協調的に働いているらしい。これについては、またの機会に詳しくご紹介させて頂きたいと思う。

2月末頃には、ICRFで分裂酵母を使っているDr. Paul NurseおよびDr. Nicholas Jonesの研究室と共に登田研究室のメンバー全員でラボトリートに出かける。これ

は周りに何も無い、ある田舎町に行き、参加者全員で缶詰になって月曜から金曜まで徹底的に細胞周期を中心として深く討論するものだ。日本ではあまり体験できないヘビーなディスカッションが毎日続くので、一見恐ろしいようにも感じるが、実は、皆交代でお国自慢の料理を作ったり、夜はゲームをしたりと、楽しいお祭りでもあるのだ。日本食はいつも結構受けが良いので、登田さんも含め日本人は総出で腕によりをかけて頑張る。筆者にとっては今回で4回目のラボトリートになるが、準備の忙しさはさておき、その日が来るのを心待ちにしている今日この頃である。

**(小南欽一郎：英国王立癌研究所、細胞制御研究室、
kominami@icrf.icnet.uk)**

(8) 掲示板コーナー

“夏期ワークショップにおけるポスター企画の案内”

本年度のワークショップは、7月8－9日、六甲山ホテルで開催する予定です。今回は、昨年のプログラムと同様に、プロテオリシスを活性化するための特別講演と新班員の自己紹介・研究計画の発表の他にポスター発表を予定しています。ポスター発表については、次の2点を基本的な条件と考えています。

その1：テーマを設定して発表を募集する。現在次の課題を予定しています。

- (1) プロテオリシスと細胞周期制御
- (2) 蛋白質のリモデリングと高次細胞機能
- (3) オルガネラの機能と蛋白質のソーティング機構
- (4) プロテアーゼと脳神経系異常疾患
- (5) プロテオリシス研究の新しい方法論・解析法

その2：発表者は、班員以外からも募集する。但し、本「ぶろておりしす」誌を配布している研究者から募ることとし、一般の学会誌・商業誌等には公募しない（班員が口コミで参加を依頼することは推奨）。班員については、自発的な参加以外に「本重点」事務局（研究代表者）より指定する予定であり、指名された班員は原則として発表が義務づけられます。

ポスター発表希望者は“発表者名”と“演題”を5月末までに「本重点」副研究代表者：木南英紀までファックス（03-5802-5889）で連絡して下さい。

シンポジウムの案内：1

大阪大学蛋白質研究所セミナー：蛋白質社会の不可逆的リモデリング

日時：1998年6月29—30日

場所：大阪大学蛋白質研究所・講堂

世話人：横沢英良（北海道大学薬学部）、田中啓二（東京都臨床医学総合研究所）、畠中 寛（大阪大学蛋白質研究所）

趣旨

生命現象の最前線で働く蛋白質の寿命は、生合成と分解との平衡関係で規定されている。蛋白質の分解に関する最近の研究の爆発的進展により、蛋白質の分解、即ち、プロテオリシスの生物学的概念が大きく変わりつつある。様々の生命現象が、細胞内シグナル伝達を制御するリン酸化—脱リン酸化の例のように、可逆的な機構によって制御されていることは言うまでもない。一方、プロテオリシスの持つ不可逆性という特性が、生命現象の直接的担い手である蛋白質のネットワーク（蛋白質社会）の不可逆的再構築（リモデリング）をもたらし、それによって、生命現象のプロセスが一方向に決定づけられていることが、最近、広く認識されつつある。本セミナーでは、プロテオリシス・システムを蛋白質社会の不可逆的リモデリングという新しい視点でとらえ直し、このシステムの持つ生命現象における意義について考えてみたい。

予定シンポジスト：鈴木絃一（東大）、長田重一（阪大）、東江昭夫（東大）、山尾文明（遺伝研）、藤沢淳子（神経研）、徳永文穂（姫路工大）、西道隆臣（理研）、遠藤昌吾（理研）、秋山芳展（京大）、横沢英良（北大）、田中啓二（都臨床研）、畠中 寛（阪大）ほか5～6名。

シンポジウムの案内：2

第71回日本生化学会大会（10月14～17日）シンポジウム：「プロテオリシス研究の最前線 - 細胞機能と生体機能の制御 -」

日時：1998年10月14—17日

場所：名古屋国際会議場

世話人：小椋 光（熊本大）、小出武比古（姫路工大）

趣旨

最近、プロテオリシスは、単なるタンパク質の「分解」ではなく、種々の調節機構との関連で論じられるようになり、大きく様変わりしてきている。特定のタンパク質が特定の時期に特定の場所で選択的に分解されることによる制御、また、プロテオリシスによる細胞機能の活性化と調節などが明かとなってきた。本シンポジウムでは、細胞機能および生体機能の調節機構を支えるプロテオリシスの生物学的意義に焦点を当て、プロテオリシス研究の最前線を紹介する。

予定シンポジスト：Thomas Langer（Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany）、田村具博（Max-Planck-Institute for Biochemistry, Martinsried, Germany）、川原裕之（臨床研）、丸山征郎（鹿児島大）、徳永文稔（姫路工大）ほか数名。

シンポジウムの案内：3

第13回臨床研国際カンファレンス：“ユビキチンとプロテアソーム：蛋白質分解の新しい世界” Ubiquitin and Proteasome : A New World of Proteolysis

期日：平成10年11月25日～27日（3日間）

会場：日暮里サニーホール（東京都荒川区東日暮里5-50-5）

主催：東京都臨床医学総合研究所（田中啓二）

The organizing committee members are:

President of the Conference: Michio Ui (Director of Rinshoken)

Organizer: Keiji Tanaka (Department of Cancer Therapeutics, Rinshoken)

Advisory board: Ichiro Yahara (Vice Director of Rinshoken)

Seiichi Kawashima (Department of Molecular Biology, Rinshoken)

Alfred L. Goldberg (Harvard Medical School, USA)

Wolfgang Baumeister (Max-Planck-Institut für Biochemie, Germany)

Secretary General: Hiroyuki Kawahara (Department of Cancer Therapeutics, Rinshoken)

趣旨

編集局が所属する「臨床研で」は毎年、国際シンポジウムを開催しています。かつて、本重点領域の研究代表者である鈴木分生研所長が、臨床研に在任中にプロテアーゼについてのテーマで開催したことがあるので、ご承知の方々もおられると思います。今回は第13回で、上記のテーマで開催を企画しています（東京都は財政難で、本年をもってこの国際会議シリーズは終焉する可能性が大きくなりました）。ユビキチンとプロテアソームに関する国際会議は、欧米ではこれまでに幾度となく開催されていますが、国内では最初です。現在、国外の研究者に講演を依頼中ですが、現在のところ、この領域の世界の主な研究者がほとんど参加の意志を示してくれています（下記参照）。開催期間が実質2日半ですので、国内の講演者は限られた構成にならざるを得ないのは残念ですが、折角の機会ですので、世界の研究者を中心にした会議を企画し、この領域における日本の研究を活性化して頂こうと考えています。しかし、ポスター発表も募集しますので、できる限り多くの研究者に参加を願いたいと考えています。本国際会議の詳細については次号「ぷろておりす」7号に掲載する予定です。以上、この会議については、本重点班班員のご協力を宜しくお願い致します。

Speakers from abroad (招聘・確定)

1. R. Huber (Max-Planck-Inst., Germany)
2. A. Hershko (Technion-Israel Inst., Israel)
3. A. Varshavsky (CA Inst. Technology, USA)
4. K. Nasmyth (Res. Inst. Mol. Pathol., Vienna, Austria)
5. A. L. Goldberg (Harvard Medical School, USA)
6. W. Baumeister (Max-Planck-Inst. Biochemie, Germany)

7. R. Kemler (Max-Planck Inst. Immunobiol., Germany)
 8. A. Ciechanover (Technion-Israel Inst., Israel)
 9. D. H. Wolf (Univ. Stuttgart, Germany)
 10. G. N. DeMartino (Univ. TX SW Medical Center, USA)
 11. H. U. Hartl (Max-Planck-Inst. Biochemie, Germany)
 12. P. M. Klotzel (Humbolt Univ., Germany)
 13. J. J. Monaco (Howard Hughes Med. Inst., USA)
 14. M. Hochstrasser (Univ. Chicago, USA)
 15. K. Hendil (Univ. Copenhagen, Denmark)
 16. C. H. Chung (Seoul National Univ., Korea)
 17. S. Wilk (Mount Sinai School Med., USA)
 18. M. Rechsteiner/Carlos Gorbea (代理) (Univ. Utah, USA)
- その他、数名（交渉中）

国内講演者（未定）

“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、御意見をいただけ

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せんが、現在のところ、本誌「ぷろておりしす」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います。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はなかなか響きが良い言葉ですが、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。

(ぶ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（一昨年は第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。

（ふ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。

（ふろておりしす事務局）

(8) 編集後記

“ぶろておりす”は、重点領域研究「細胞内蛋白分解」のニュース誌であり、基本的には班員間の連絡・情報交換などを主目的に発行されているものでありますが、「日本のプロテオリシス研究の活性化を目指す」と言う少し欲張った意図をもって編集に取り組んでいます。今回は第6号です。本号の編集には大変に苦しみました（多くの学会報告でページ数は確保されましたが）。しかし、投稿がほとんどない状況を考えますと、いま少しは班員からのネタの提供を切望します。教室のセミナー等で大学院学生が面白い論文を取り上げた場合、少しまとめて投稿するように勧めてください。このような例は、かつて数編ありましたが、全て編集局の研究室のみです。なお一層のご協力をお願いいたします。さて、本年も「プロテオリシス」に関する様々な会議が、国内外で企画されています。まさに、「ぶろておりす」の研究領域はバブルの時代の感もあります（科学技術立国を目指す政府の後押しもあって）。しかし、バブル後が恐いのは、昨今の日本の経済事情を考えれば、一目瞭然です。少しばかりの蓄え（研究業績？）で生き延びられる程、到来する高齢化社会では甘くはないと肝に命じる必要性がありそうです。班員各位がこのバブルの後に、倒産しないことを願って止みませんが、そのためには将来を見据える見識の高さが問われそうです。バブルに酔い踊る者、バブルの恩恵を被るに遠く離れて達観している者、世の中の生き方は様々のようですが、みなさんが本年も素晴らしい成果をあげられることを期待します。本号では“海外に留学中の若手研究者からのコーナー”ではICRFの小南博士から、素晴らしい内容の原稿を頂いて掲載することができました。今後もこの企画を続行して行きたいと思っていますので、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。

Proteolysis of the phage λ CII regulatory protein by FtsH (HflB) of *Escherichia coli*

Y. Shottland,¹ S. Koby,¹ D. Teff,¹ N. Mansur,¹ D. A. Oren,¹ K. Tatematsu,^{3†} T. Tomoyasu,³ M. Kessel,² B. Bukau,⁴ T. Ogura³ and A. B. Oppenheim^{1*}

¹Department of Molecular Genetics and Biotechnology, and ²Department of Membrane and Ultrastructure Research, The Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem P.O.B. 12272, Israel 91120.

³Department of Molecular Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan.

⁴Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg, Heidelberg, Germany.

Summary

Rapid proteolysis plays an important role in regulation of gene expression. Proteolysis of the phage λ CII transcriptional activator plays a key role in the lysis-lysogeny decision by phage λ . Here we demonstrate that the *E. coli* ATP-dependent protease FtsH, the product of the host *ftsH/hflB* gene, is responsible for the rapid proteolysis of the CII protein. FtsH was found previously to degrade the heat-shock transcription factor σ^{32} . Proteolysis of σ^{32} requires, *in vivo*, the presence of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone machine. Neither DnaK-DnaJ-GrpE nor GroEL-GroES chaperone machines are required for proteolysis of CII *in vivo*. Purified FtsH carries out specific ATP-dependent proteolysis of CII *in vitro*. The degradation of CII is at least 10-fold faster than that of σ^{32} . Electron microscopy revealed that purified FtsH forms ring-shaped structures with a diameter of 6–7 nm.

C

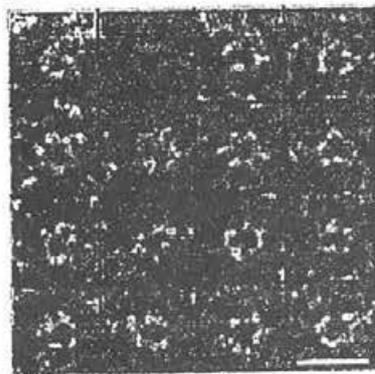


Fig. 6. Electron microscopy of FtsH. A. Purified FtsH-His-6-Myc resolved by SDS-PAGE and stained by Coomassie brilliant blue. B. A typical field of purified FtsH observed by electron microscopy in which irregular ring-shaped structures are circled. The bar represents 50 nm. C. A montage of ring-shaped structures. The bar represents 10 nm.

Table 1. Half-life of CII in different mutant strain backgrounds.

Parental strain	Relevant genotype	Half-life (min) of CII Protein	
		A	B
C600	WT	3	1
C600	<i>ftsH1</i>	>30	>16
W3110	WT	2	
W3110	<i>ftsH1</i>	>20	
W3110	<i>ftsH1 sthC</i>	>20	
N99	WT	2	2
N99	<i>dnaK7</i>	2	2
N99	<i>dnaK756</i>	2	2
N99	<i>dnaJ259</i>	3	2
C600	<i>grpE280</i>		2
C600	<i>groEL100</i>	2	

The results summarize the half-life of CII as determined by pulse-chase experiments, in three different sets of strains. Stability of CII was assessed following expression from plasmid placCII (A) or plasmid pAO38 (B). Half-life measurements are based on at least two experiments; the error in half-life determination was ± 0.5 min.

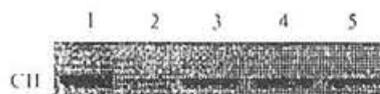


Fig. 4. ATP-dependent proteolysis of purified CII by FtsH *in vitro*. Proteolysis of CII (22 pmole) was carried out with 3.4 pmol of FtsH at 42°C for 20 min without ATP (lane 1), with 5 mM ATP (lane 2), or with 5 mM of the ATP analogues ATP- γ -S (lane 3), AMP-PNP (lane 4) or AMP-PCP (lane 5). Reactions were carried out as described in the *Experimental procedures*. The proteins were resolved by SDS-PAGE (15% gel) and visualized by silver staining. Similar results were obtained with purified FtsH-His-6-Myc.

【要旨】速やかな蛋白分解は遺伝子発現調節において重要な役割を演じる。 λ ファージの転写アクチベーターCIIの分解は λ ファージの溶菌-溶原化の決定の鍵である。大腸菌のATP依存性プロテアーゼFtsHがこのCII蛋白の速やかな分解を行うことを見いだした (Table 1)。FtsHはすでに熱ショック転写因子 σ^{32} を分解することが明らかにされている。 σ^{32} の分解は*in vivo*でDnaK-DnaJ-GrpEシャペロンマシーンを必要とする。これに対し、CII蛋白の分解にはDnaK-DnaJ-GrpEもGroEL-GroESシャペロンも必要でない (Table 1)。精製したFtsHは*in vitro*でCIIをATP依存的に分解する (Fig. 4)。In vitroでのCIIの分解は σ^{32} の分解より10倍速い。電顕観察により、精製したFtsHが直径6-7 nmのリング状構造を形成することが分かった (Fig. 6)。[FtsHの電顕写真がこの号のカバーページとして掲載されます]

Characterization of the *ftsH* gene of *Bacillus subtilis*

Elena Lysenko,¹ Teru Ogura² and Simon M. Cutting^{1†}

Author for correspondence: Simon M. Cutting. Tel: +44 1784 443760. Fax: +44 1784 434326.
e-mail: s.cutting@rhnbc.ac.uk

¹ Department of Microbiology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA 19104-6076, USA

² Department of Molecular Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 862, Japan

Members of the AAA-protein family are found in both prokaryotes and eukaryotes. These ATPases are involved in a number of diverse activities ranging from protein secretion to cell cycle control. This paper reports the functional analysis of the *Bacillus subtilis* *ftsH* gene, which encodes a member of this protein family. In cells containing reduced levels of a truncated FtsH protein cell growth was impaired under certain nutritional conditions. In a hypersaline environment FtsH was required in increased amounts for the cells' recovery from osmotic stress. In the absence of FtsH the abundance of several of the major penicillin-binding proteins (PBP2A and 2B) in the cytoplasmic membrane was affected. Lastly, it has been established that FtsH is required for entry into the developmental life cycle.

Keywords: FtsH, cell cycle, *B. subtilis*, AAA-protein family, protease

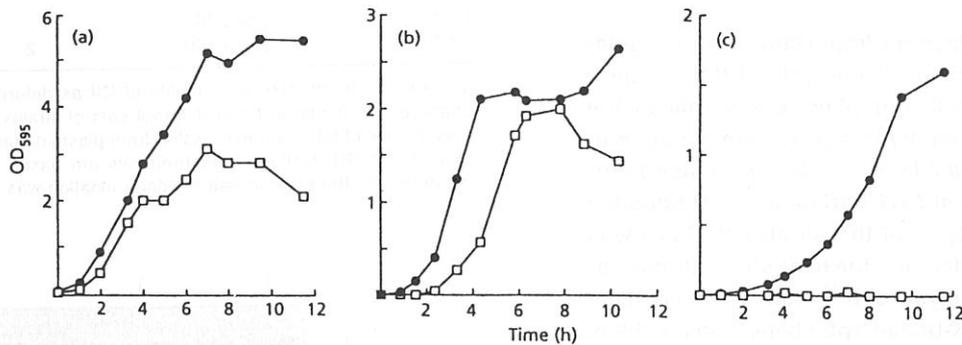


Fig. 3. Growth of *ftsH::spc*. Wild-type (PY79, ●) or *ftsH::spc* (EL273, □) cells were grown at 37 °C in LB medium (a), DSM sporulation medium (b), or glucose minimal medium (c).

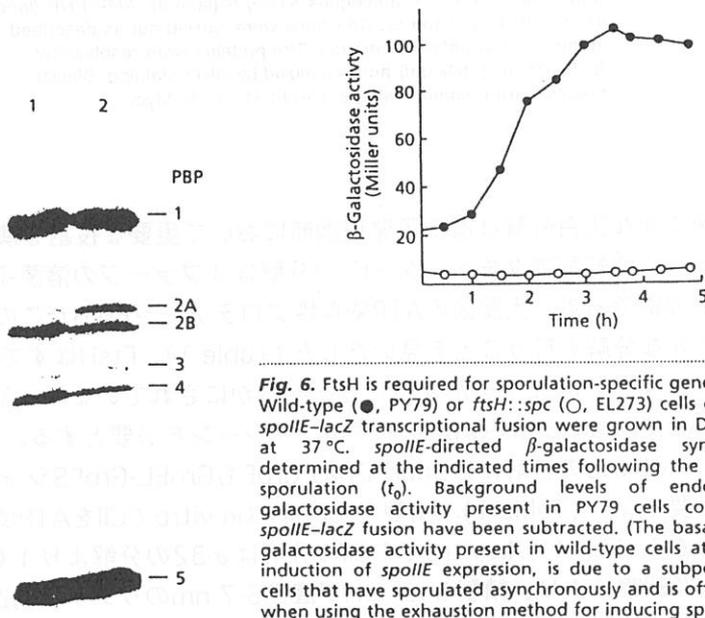


Fig. 6. FtsH is required for sporulation-specific gene expression. Wild-type (●, PY79) or *ftsH::spc* (○, EL273) cells containing a *spoII*-*lacZ* transcriptional fusion were grown in DSM medium at 37 °C. *spoII*-directed β-galactosidase synthesis was determined at the indicated times following the initiation of sporulation (t_0). Background levels of endogenous β-galactosidase activity present in PY79 cells containing no *spoII*-*lacZ* fusion have been subtracted. (The basal level of β-galactosidase activity present in wild-type cells at t_0 , prior to induction of *spoII* expression, is due to a subpopulation of cells that have sporulated asynchronously and is often observed when using the exhaustion method for inducing sporulation.)

Fig. 5. Synthesis and assembly of penicillin-binding proteins during vegetative cell growth. Fluorograph of [³H]benzylpenicillin-labelled membrane proteins purified from vegetatively growing cells (OD₆₀₀ ~ 3.0) of strain PY79 (wild-type; lane 1) and EL273 (*ftsH::spc*; lane 2). A 50 μg sample of protein was labelled with [³H]benzylpenicillin and fractionated on a 10% SDS-polyacrylamide gel.

【要旨】 AAA蛋白質ファミリーのメンバーは原核細胞と真核細胞の両方に存在する。これらのATPaseは蛋白質分泌から細胞周期の調節まで多様な機能に関与する。本論文では、このファミリーに属する枯草菌の *ftsH* 遺伝子の機能について報告する。C末端を欠失したFtsH蛋白を低レベルで発現する細胞では、細胞増殖がある栄養条件下で阻害される。高塩濃度環境下では浸透圧ストレスからの細胞の回復のためにFtsHが必要である。FtsHが欠損すると細胞質膜の主要なペニシリン結合蛋白質のいくつかの量が変化する。FtsHは枯草菌の発生過程（孢子形成過程）へのエントリーに必要である。

図3：*ftsH::spc*変異株は定常期で溶菌が起こり、最小培地では生育できない。

図5：*ftsH::spc*変異株ではペニシリン結合蛋白質2Aが増加し、逆に2B, 4は減少する。

図6：*ftsH::spc*変異株は孢子形成が出来なく、孢子形成遺伝子 *spoII* の発現が見られない。

ORIGINAL PAPER

S. Makino · J.-N. Qu · K. Uemori · H. Ichikawa
T. Ogura · H. MatsuzawaS. Makino · J.-N. Qu · K. Uemori · H. Ichikawa
H. Matsuzawa (✉)
Department of Biotechnology, The University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, JapanT. Ogura
Institute of Molecular Embryology and Genetics,
Kumamoto University School of Medicine,
Kumamoto 862, Japan**A silent mutation in the *ftsH* gene of *Escherichia coli* that affects FtsH protein production and colicin tolerance**

Abstract Among *Escherichia coli* *tolZ* mutants tolerant to colicins E2, E3, and D, one, KH110, had a high frequency of λ lysogenization, like the *tolZ21* mutant, but unlike *tolZ21* KH110 grew on nonfermentable carbon sources. The *tolZ10* gene of KH110 was cloned and sequenced, and found to have a silent mutation in the *ftsH* gene, causing an alteration of a minor codon, CUA, for Leu-5 to a suboptimal codon, CUC. In spite of the change in a minor codon, the amount of the FtsH protein present in mutant cells was much less than that in the parental strain. In vivo transcription of the *tolZ10* gene was not decreased relative to the wild-type *ftsH* gene. Analysis of other silent mutations altering the Leu-5 codon (CUA) to CUG or CUU (optimal and suboptimal codons, respectively) revealed that the decrease in concentration of FtsH was seen only with the CUC (*tolZ10*) codon. Prediction of the mRNA secondary structure suggested that the change from A to C extends the base pairing region longer by one base pair at the root of the stem structure, thus sequestering the Shine-Dalgarno sequence and decreasing the rate of the translational initiation of FtsH.

Key words Silent mutation · FtsH protein · Translation initiation · Colicin tolerance

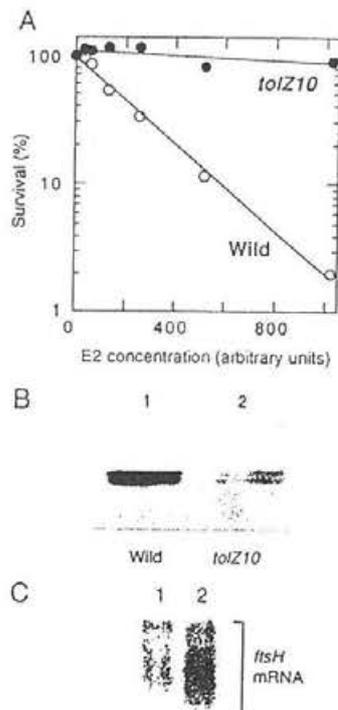


Fig. 1 A Colicin E2 sensitivity of the *tolZ10* mutant KH110 (●) and its parental strain KL228 (○). Cells were treated with colicin E2, and surviving cells were counted. The colicin E2 concentration is expressed in arbitrary units; one unit is defined as the concentration of a colicin E2 solution diluted $10^2 \times 2^{20}$ -fold. B Amount of FtsH in cells of wild-type KL228 and mutant KH110 cells. Proteins from cells (0.15 OD₆₀₀ unit) were fractionated by SDS-PAGE with 6 M urea, and immunoblotting was done with anti-FtsH antiserum. FtsH gave two bands, as reported previously (Akiyama et al. 1995). Lane 1, KL228; lane 2, KH110. C Effects of the *tolZ10* mutation on the level of *ftsH* mRNA. A 10- μ g portion of total RNA was used for Northern blotting. Lane 1, KL228; lane 2, KH110

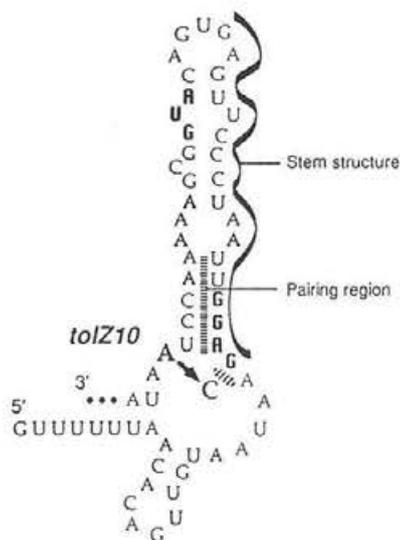


Fig. 3 Relationship of the *tolZ10* mutation to the predicted secondary structure of the *ftsH* mRNA. The A to C alteration caused by the *tolZ10* mutation makes base pairing possible between the third base of the Leu-5 codon, C, and the first base of the SD sequence, G. The original and altered bases, the SD sequence, and the initiation codon for the *ftsH* mRNA are shown in boldface

Table 2 Phenotypes and mutation sites of *tolZ* mutants

Strain	Phenotype ^a				Codon change in the <i>ftsH</i> gene
	Tol	Nfc	Ts	Hfl	
KH110	-	+	+	-	CUA (Leu-5) → CUC (Leu)
WH160	-	+	+	-	GGU (Gly-218) → AGU (Ser)
UM21	-	-	-	-	CAU (His-418) → UAU (Tyr) ^b
UM31	-	-	-	-	AAA (Lys-161) → AAAAAA (Lys insertion)
UM37	-	-	-	-	GGC (Gly-452) → GG (-1 frameshift)

^a Tol, tolerance to colicins E2, E3, and D; Nfc, growth on nonfermentable carbon sources; Ts, temperature-sensitive growth; Hfl, high frequency of λ lysogenization. +, wild-type phenotype; -, mutant phenotype

^b *tolZ21* mutation as reported by Qu et al. (1996)

【要旨】 大腸菌の *ftsH* 変異のうち、コリシン耐性を示す *tolZ* 変異株の一つ KH110 は *tolZ21* 変異株同様 λ ファージの溶原化頻度が上昇するが、*tolZ21* とは異なり、非発酵性の糖源で生育する (Table 2)。KH110 の変異 (*tolZ10*) は *ftsH* 遺伝子内の 5 番目の Leu のマイナーコドン CUA をサブオプティマルコドン CUC に変えるサイレント変異であった。マイナーコドンの変異にもかかわらず、FtsH 蛋白の量は親株に比べてずっと少ない (Fig. 1)。変異株において転写 (mRNA の量) は変化がなかった。mRNA の二次構造の予測から、この A から C への変化はステムの根元の塩基対を 1 塩基延長し (Fig. 3)、シャイン-ダルガーノ配列を隠すことになり、このため FtsH の翻訳開始頻度が減少するものと考えられる。

Activation of Human Neutrophil Procollagenase by Nitrogen Dioxide and Peroxynitrite: A Novel Mechanism for Procollagenase Activation Involving Nitric Oxide¹

Tatsuya Okamoto,*† Takaaki Akaike,* Tetsuo Nagano,‡ Seiya Miyajima,* Moritaka Suga,† Masayuki Ando,† Koji Ichimori,§ and Hiroshi Maeda*²

*Department of Microbiology and †Department of Internal Medicine I, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860, Japan; ‡Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113, Japan; and §Department of Physiology, Tokai University School of Medicine, Kanagawa 259-11, Japan

Received December 30, 1996, and in revised form April 1, 1997

The involvement of nitric oxide (NO) and its reactive intermediates such as nitrogen dioxide (NO₂) and peroxynitrite (ONOO⁻) in the activation of matrix metalloproteinase was investigated. The human neutrophil procollagenase (matrix metalloproteinase-8) (M_r, 85 kDa) was purified to homogeneity from human neutrophils by using column chromatography. After incubation of human neutrophil procollagenase with various nitrogen oxide-generating systems, collagenolytic activity in each reaction system was measured. In addition, neutrophil collagenase activity was determined by assessment of proteolysis of human α₁-protease inhibitor. NO was formed by the propylamine NONOate, and NO₂ was generated by oxidation of NO with 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide (carboxy-PTIO). NO₂, formed by NONOate and carboxy-PTIO, and the synthetic ONOO⁻ exhibited strong activation of the procollagenase at 1–20 μM. Significant activation of the procollagenase was observed

with use of authentic NO₂ gas as well. Constant flux infusion of ONOO⁻ into the procollagenase solution resulted in stronger procollagenase activation than did a bolus addition of ONOO⁻ to the reaction mixture. However, NO showed only weak activating potential under the aerobic (ambient) condition; an NO concentration of more than 10 mM was needed for appreciable activation of the procollagenase. Of considerable importance was the fact that NO participates in activation of the neutrophil collagenase through its conversion to NO₂ or ONOO⁻ in human neutrophils. These results suggest that NO₂ and ONOO⁻ may be potent activators of human neutrophil procollagenase. © 1997

Academic Press

Key Words: human neutrophil procollagenase; nitric oxide; peroxynitrite; nitrogen dioxide; reactive nitrogen oxides.

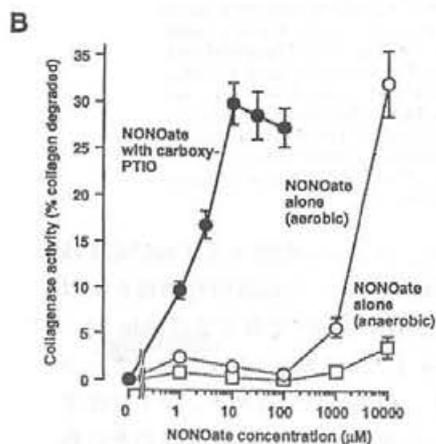


FIG. 3. Activation of human neutrophil procollagenase with an NO-releasing system with or without carboxy-PTIO.

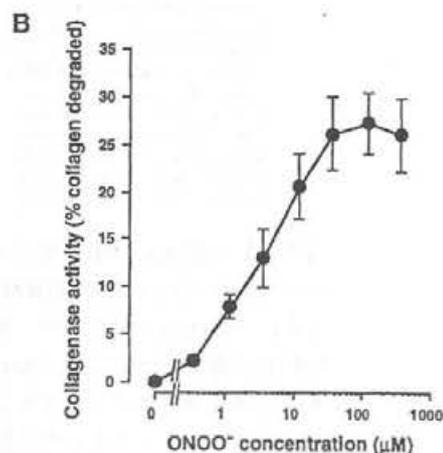


FIG. 4. Activation of neutrophil procollagenase by ONOO⁻.

【要旨】

一酸化窒素合成酵素 (NOS) より産生される NO は、NO₂ あるいは ONOO⁻ へと変換され、多彩な生理活性を発現している。一方、好中球コラゲナーゼは不活性型前駆体 (proMMP-8) として産生され、細胞外で活性化され、細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲンを分解することが知られている。我々は NO およびその酸化的中間体による proMMP-8 の活性化機構について検討した。

まず、ヒト白血球より proMMP-8 を精製し、NO₂、ONOO⁻ 産生系に曝露したのち活性を測定した。NO₂ は NONOate および carboxy-PTIO により生成させ、ONOO⁻ は Radi らの方法により合成した。さらにヒト好中球を PMA で刺激した際の培養上清中のコラゲナーゼ活性に対する種々の NO、NO₂ 阻害剤の効果を検討した。その結果、NO₂、ONOO⁻ は濃度依存性に proMMP-8 を活性化し、10–100 μM で最大であった。活性化に伴い proMMP-8 の分子量は変化しなかった。NO₂ による活性化は bilirubin, DAN (2,3-diaminonaphthalene) 等で抑制されたが、ONOO⁻ による活性化は、いずれでも抑制されなかった。好中球を PMA で刺激するとコラゲナーゼ活性が発現し、これは carboxy-PTIO により増強され、L-NMMA, oxyhemoglobin, DAN 等で抑制された。NO₂ による活性化は、proMMP-8 の特定アミノ酸残基 (Cys など) の酸化修飾によるものと考えられたが、ONOO⁻ による活性化は、NO₂ とは異なった化学修飾によるものと考えられた。さらに、好中球においては、脱顆粒により分泌される proMMP-8 が自らの NOS に由来する NO およびその酸化的中間体により活性化されることが明らかとなった。

Serum concentrations of free ubiquitin and multiubiquitin chains

KOJI TAKADA,^{1*} HIDEKAZU NASU,⁴ NOZOMU HIBI,⁴ YUTAKA TSUKADA,⁴ TOSHIAKI SHIBASAKI,² KIYOTAKA FUJISE,³ MASAHIRO FUJIMURO,⁵ HITOSHI SAWADA,⁵ HIDEYOSHI YOKOSAWA,⁵ and KIYOSHI OHKAWA¹

Ubiquitin, which can conjugate with cellular proteins, is classified into two forms: free ubiquitin and multiubiquitin chains. The latter is active as a signal for degradation of the targeted proteins. We found both forms in human serum and, using two immunoassays, quantitated them in sera from healthy subjects and patients with some diseases. Because of putative leakage of erythrocyte ubiquitin, hemolytic serum and serum obtained after long incubation (>1-2 h) of blood at room temperature were excluded. Serum concentrations of multiubiquitin chains and free ubiquitin were substantially higher in rheumatoid arthritis and hemodialysis patients, respectively, than healthy subjects. Additionally, in acute viral hepatitis, serum multiubiquitin chain concentrations were increased in the acute phase, decreased in the recovery phase, and correlated with alanine and aspartate aminotransferase activities ($r = 0.676$ and 0.610 , $P < 0.0001$ and < 0.001 , respectively). Therefore, serum ubiquitin may have prognostic value.

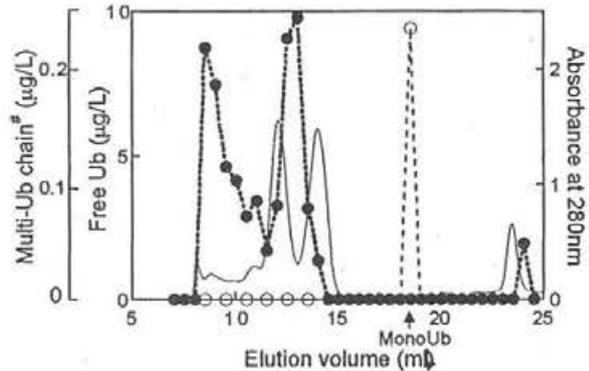


Fig. 2. Superdex 200 gel-filtration of human serum. Lipoprotein-free human serum was fractionated by gel-filtration on Superdex 200. The concentrations of free ubiquitin (Free Ub, O) and multiubiquitin chains (Multi-Ub chain, ●; # in terms of MUCRP1) in each fraction were estimated by the RIA and the ELISA, respectively, and absorbance at 280 nm of the eluate (—) was monitored. The location of eluted monoubiquitin in the separate experiment with the same column is indicated as MonoUb (---).

Table 3. Positive rates of free ubiquitin, multiubiquitin chains, and laboratory tests, and correlation between each ubiquitin and the test data, in sera from patients with acute viral hepatitis.

	% positive ^{a,b}	Reference upper limit ^c	r with multiubiquitin chains ^d	r with free ubiquitin ^d
Multiubiquitin chains, µg/L	77, 63	5.78, 6.96		0.464**
Free ubiquitin, µg/L	90, 20	60.3, 175	0.464**	
AST, U/L	100	33	0.610***	0.209
ALT, U/L	100	35	0.676****	0.126
LDH, U/L	81	235	0.587**	0.159
ChE, U/L	17	700	-0.207	-0.214
ALP, U/L	57	300	-0.156	-0.246
LAP, U/L	80	80	0.312	0.280
γ-GTP, U/L	71	65 M, 27 F	0.175	-0.158
CRP, mg/L	55	3	0.075	0.431*
DBi, mg/L	97	3	0.151	0.286

^a Ratio of serum specimens that gave higher estimates than reference upper limit to the total for 30 serum samples from the patients.

^b For paired values, the first value is compared with the mean ± 2SD upper limit value calculated in control group 1, the second with that calculated in control group 2.

^c Correlation coefficient calculated from all 30 serum samples from the patients. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

[要約] 生体内のユビキチンは遊離型とマルチ鎖型に大別され、後者が蛋白分解のシグナルとして機能する。ヒト体液中のユビキチン濃度が神経変性疾患などで上昇するとの報告が過去にあるが、測定されたユビキチンの型は明確でない。そこで、近年我々が開発した2種類のイムノアッセイ系を用い、ヒト血清中の遊離型ユビキチンとマルチユビキチン鎖の定量を試みた。ゲル濾過を用いた分析、および両測定系の添加回収試験と希釈試験の結果、ヒト血清中には遊離型ユビキチン（主にモノユビキチン）とマルチユビキチン鎖が存在し、その定量に両測定系が適用できることが証明された。但し、溶血した試料や常温での血清分離に長時間（1-2時間以上）を要した試料では、赤血球からの遊離型ユビキチンの漏出が疑われ、測定対象外にすべきと判断された。数種類の疾患に関し患者血清中の両ユビキチンを定量したところ、リウマチ様関節炎患者の血清マルチユビキチン鎖や体外透析患者の血清遊離型ユビキチンの各濃度は健康人よりも高値を示した。また、急性ウイルス性肝炎の患者血清中のマルチユビキチン鎖濃度は、病状に伴い変動し、肝細胞傷害マーカー ALT および AST 活性と正の相関を示した。これらの検討から、血清ユビキチンの定量は疾患の予後推定に役立つ可能性がある。

Downregulation of Calpastatin in Rat Heart after Brief Ischemia and Reperfusion¹

Yoshihide Sorimachi,^{*2} Kazuki Harada,^{*} Takaomi C. Saïdo,¹ Tomio Ono,¹ Sei-ichi Kawashima,¹ and Ken-ichi Yoshida^{*3}

^{*}Department of Legal Medicine, Yamaguchi University School of Medicine, 1144 Kogushi, Ube, Yamaguchi 755; and ¹Department of Molecular Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113

Received for publication, April 23, 1997

The activities of calpain and its endogenous inhibitor, calpastatin, were measured in the soluble fraction of perfused rat heart after ischemia for 5–20 min and reperfusion for up to 30 min. The method for *m*-calpain measurement was modified: washing of the DEAE-cellulose column with 0.18 M NaCl instead of 0.15 M NaCl increased the *m*-calpain activity 12.5-fold. Ischemia for 20 min followed by reperfusion for 30 min did not affect the *m*-calpain activity but decreased the calpastatin activity. *m*-Calpain was enriched in the nucleus-myofibril fraction but was not further translocated on ischemia-reperfusion. μ -Calpain was below the limit of detection on immunoblotting or casein zymography, but its mRNA was substantially expressed, as detected on Northern blotting. Casein zymography also revealed a novel Ca²⁺-dependent protease without the typical characteristics of μ - or *m*-calpain. The immunoblotting of myocardial fractions showed that calpastatin was proteolyzed on ischemia-reperfusion. The calpastatin proteolysis was suppressed by a calpain inhibitor, Ac-Leu-Leu-norleucinal. Calpastatin may sequester calpain from its substrates in the normal myocardium, but may be proteolyzed by calpain in the presence of an unidentified activator in the early phase of calpain activation during ischemia-reperfusion, resulting in the proteolysis of calpastatin and then other calpain substrates.

Key words: calpain, calpastatin, ischemia, myocardium, reperfusion.

ラット心臓内カルパスタチンは短時間虚血再灌流後、カルパインによりダウンレギュレーションされる。灌流心を20分虚血後、30分再灌流するとカルパスタチンが分解され、失活していた。カルパイン阻害剤が分解を抑制した。主要なm-カルパインの活性と局在は無変化であった。 μ -カルパインの存在はcasein zymographyによっても証明されなかったが、DEAE 0.18M, 0.40 M 溶出分画のいずれにも存在し、Ca依存性、カルパイン阻害剤で抑制される新奇?のプロテアーゼを見出した。

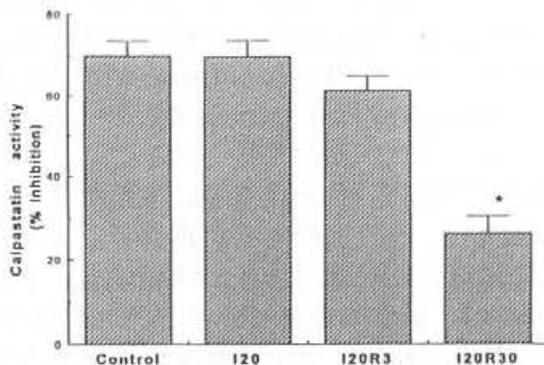


Fig. 7. Calpastatin activity of the rat heart after ischemia or ischemia-reperfusion. Reperfusion for 30 min (I20R30) but not for 3 min (I20R3) after ischemia for 20 min decreased the calpastatin activity, as compared with in the control (* $p < 0.05$), in the 100,000 $\times g$ supernatant (mean \pm SE, $n = 3$), as measured against *m*-calpain. Ischemia for 20 min (I20) did not affect the activity.

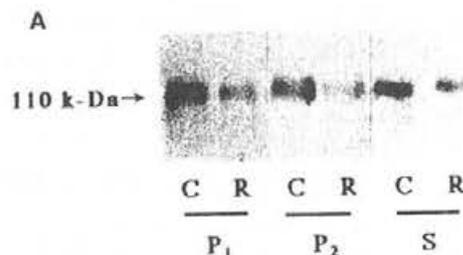


Fig. 9. Distribution of calpastatin in rat heart subcellular fractions before and after ischemia-reperfusion. Calpastatin immunoreactivities in the 1,000 $\times g$ pellet (P1), 100,000 $\times g$ pellet (P2), and 100,000 $\times g$ supernatant (S) fractions were reduced after ischemia (20 min)-reperfusion (30 min) (R), compared with in the control heart (C) (* $p < 0.05$), as shown in a representative immunoblot with an anti-calpastatin antibody (Panel A), and on its quantification (Panel B; mean \pm SE, $n = 3$). The same amount of protein was applied for each fraction.

Activation of Human Matrix Metalloproteinases by Various Bacterial Proteinases*

(Received for publication, July 23, 1996, and in revised form, October 28, 1996)

Tatsuya Okamoto^{‡§}, Takaaki Akaike[‡], Moritaka Suga[§], Sumio Tanase^{||}, Hidechika Horie[‡], Seiya Miyajima[‡], Masayuki Ando[§], Yoshio Ichinose^{||}, and Hiroshi Maeda^{‡**}

From the Departments of [‡]Microbiology, [§]Internal Medicine I, and ^{||}Biochemistry II, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860 and the ^{||}Department of Bacteriology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852, Japan

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-containing proteinases that participate in tissue remodeling under physiological and pathological conditions. To test the involvement of bacterial proteinases in tissue injury during bacterial infections, we investigated the activation potential of various bacterial proteinases against precursors of MMPs (proMMPs) purified from human neutrophils (proMMP-8 and -9) and from human fibrosarcoma cells (proMMP-1). Each proMMP was subjected to treatment with a series of bacterial proteinases at molar ratios of 0.01–0.1 (bacterial proteinase to proMMP), and activities of MMPs generated were determined. Among six different bacterial proteinases, thermolysin family enzymes (family M4) such as *Pseudomonas aeruginosa* elastase, *Vibrio cholerae* proteinase, and thermolysin strongly activated all three proMMPs via limited proteolysis to generate active forms of the MMPs. N-terminal sequence analysis of the active MMPs revealed that cleavage occurred at the Val⁸²-Leu⁸³ and Thr⁹⁰-Phe⁹¹ bonds of proMMP-1 and proMMP-9, respectively, which are located near the N terminus of the catalytic domain of MMPs. In contrast, *Serratia* 56-kDa proteinase and *Pseudomonas* alkaline proteinase, both of which are classified as members of the serralyisin subfamily of zinc metalloproteinases (family M10), and *Serratia* 73-kDa thiol proteinase did not evidence proteolytic processing or activation of proMMP-1, -8, and -9 under these experimental conditions. These results indicate that bacterial proteinases may play an important role in tissue destruction and disintegration of extracellular matrix at the site of infections.

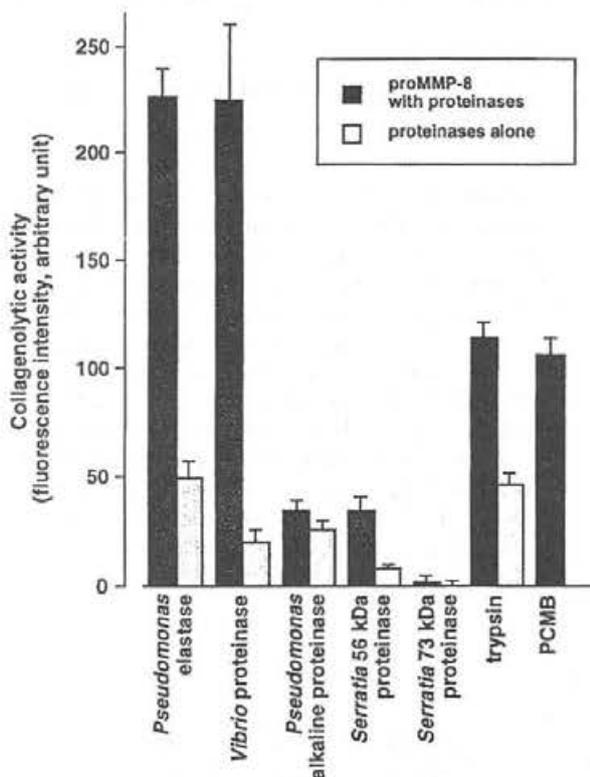


FIG. 2. Generation of collagenolytic activity of proMMP-8 determined fluorometrically by using FITC-labeled type I collagen after treatment with PCMB, trypsin, or various bacterial proteinases. ProMMP-8 (6 μ M) was treated with PCMB (1 mM), trypsin (200 nM), or a bacterial proteinase (200 nM) in PBS (pH 7.4) at 35 °C for 60 min. The reaction mixture containing FITC-labeled collagen (10 μ g) was then incubated at 35 °C for 120 min. Ethanol-soluble collagen fragments generated in the reaction were quantified fluorometrically.

要旨

菌感染病巣における組織破壊機序とし、菌の産生する蛋白分解酵素が、直接的細胞外マトリックス蛋白を分解する事に、宿主の matrix metalloproteinase (MP) を活性化することで、より高度の組織障害を惹起している可能性について検討した。そこで、精製した 3 種類の不活性型駆体 (proMMP)、即ち、好中球コラゲナーゼ (proMMP-8)、好中球ゼラチナーゼ (proMMP-9)、繊維芽細胞コラゲナーゼ (proMMP-1) を種々の細菌性プロテアーゼ反応させ、活性化機構について検討し、その結果、緑膿菌エラスターゼは 3 種の proMMP を著明に活性化した。活性化 proMMP の限定分解によるもので、その新部位はこれまでに知られている内因性プロテアーゼによるものと異なるものだった。一方、緑膿菌アルカリプロテアーゼはいずれの MMP も活性化しなかった。同の活性化は thermolysin、*V. cholerae*、*P. givialis* protease 等の細菌性プロテアーゼにおいても認められた。

上の知見は、緑膿菌等の高度の組織障害を伴う細菌感染病巣において、細菌性プロテアーゼが MMP を活性化する事で組織破壊を増強し、また菌体の組織侵入を促進する可能性を示唆している。

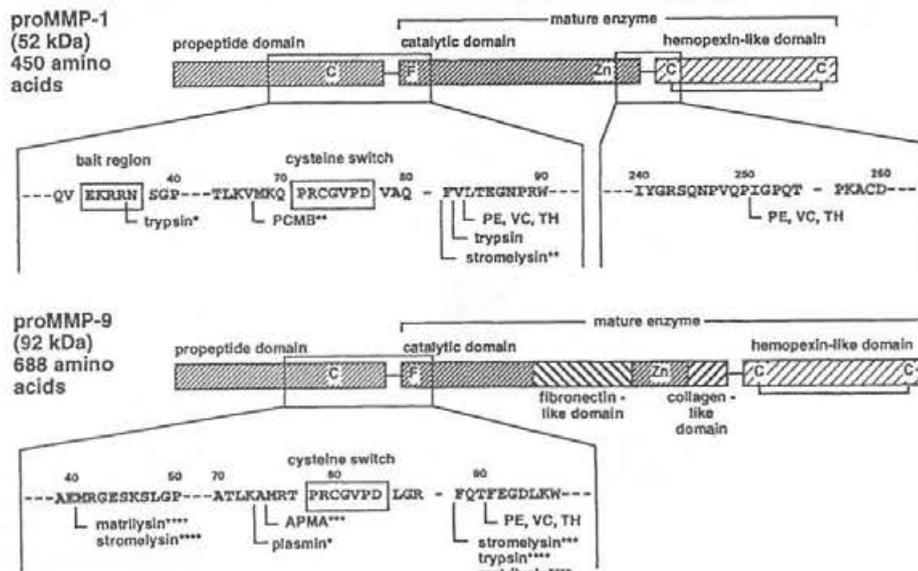


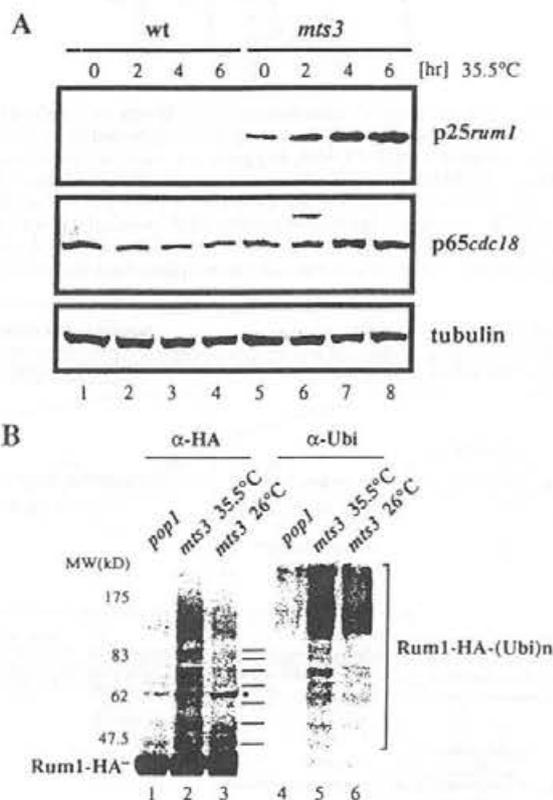
FIG. 3. Schematic drawings of the location of cleavage sites of proMMP-1 and -9 by various proteinases, APMA, and PCMB. Data for *Pseudomonas* elastase (PE), *Vibrio* proteinase (VC), and thermolysin (TH) were obtained during this experiment, and data for PCMB, trypsin, and stromelysin, as indicated by *, **, ***, and ****, were from Refs. 5, 31, 33, and 39, respectively.

Fission yeast WD-repeat protein Pop1 regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor Rum1 and the S-phase initiator Cdc18

Kin-ichiro Kominami and Takashi Toda¹

Laboratory of Cell Regulation, Imperial Cancer Research Fund (ICRF), London WC2A 3PX, UK

In fission yeast, maintenance of genome ploidy is controlled by at least two mechanisms. One operates through the Cdc2/Cdc13 kinase, which also involves the CDK inhibitor Rum1, and the other through the S-phase regulator Cdc18. By screening for sterile mutants that show increased ploidy, we have identified a new gene, *pop1*⁺, in mutants that become polyploid. The *pop1* mutation shows a synthetic lethal interaction with the temperature-sensitive *cdc2* or *cdc13* mutation. In a *pop1* mutant Rum1 and Cdc18 proteins become accumulated to high levels. The high ploidy phenotype in the *pop1* mutant is dependent on the presence of the *rum1*⁺ gene, whereas the accumulation of Cdc18 is independent of Rum1. The predicted sequence of the Pop1 protein indicates that it belongs to a WD-repeat family with highest homology to budding yeast Cdc4, which participates in the ubiquitin-dependent pathway. Consistent with this notion, in a mutant of the 26S proteasome, higher molecular weight forms of Rum1 and Cdc18 are accumulated corresponding to polyubiquitination of these proteins. In the *pop1* mutant, however, no ubiquitinated forms of these proteins are detected. Finally we show that Pop1 binds Cdc18 *in vivo*. We propose that Pop1 functions as a recognition factor for Rum1 and Cdc18, which are subsequently ubiquitinated and targeted to the 26S proteasome for degradation.



分裂酵母では細胞倍数性の維持に、CDKインヒビター-Rum1を含むCdc2/Cdc13キナーゼ活性と、S期開始因子Cdc18の活性制御が重要である。我々は、細胞倍数性が上昇する変異株*pop1*を得た。*pop1*変異株では、Rum1とCdc18が極度に蓄積していることが判明した。さらに、これらの蛋白は、26Sプロテアソームの変異株*mts3*で蓄積することから、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されていると考えられた。実際、*mts3*変異株中では高度にユビキチン化されたRum1やCdc18が蓄積するが、*pop1*変異株中ではこれら基質蛋白のユビキチン化は検出されないことから、Pop1は基質蛋白のユビキチン化のステップで機能していると考えられる。さらに、Pop1は*in vivo*でCdc18に結合することが見いだされたので、基質の認識に重要な役割を果たしていると考えられる。また、*pop1*遺伝子産物は、出芽酵母のE3関連蛋白Cdc4と最も強い相同性を示した。

Figure 7. Degradation of Rum1 and Cdc18 through the 26S proteasome and ubiquitination of Rum1 and Cdc18. (A) Wild type (lanes 1-4) or *mts3-1* (lanes 5-8) cells grown at 26°C were shifted to 35.5°C. Aliquots were taken at 0 hr (lanes 1,5), 2 hr (lanes 2,6), 4 hr (lanes 3,7), 6 hr (lanes 4,8), and immunoblotting was performed. (B) Extracts were prepared (Materials and Methods) from *mts3-1* (lanes 2,3,5,6) or *pop1* (lanes 1,4) containing pREP41-*rum1*-HA/6His, which was grown in the absence of thiamine for 24 hr at 26°C and then shifted to 35.5°C for 4 hr. Immunoblotting was performed either with anti-HA antibody (lanes 1-3) or with anti-ubiquitin antibody (lanes 4-6). Overlapping bands between these two blots were emphasized with horizontal lines. Note that an abundant 38-kD nonubiquitinated form (Rum1-HA) was not detected with anti-ubiquitin antibody. (●) A band that is present in both *mts3-1* and *pop1*. This band may be nonspecific because it is not detected with anti-ubiquitin antibody.