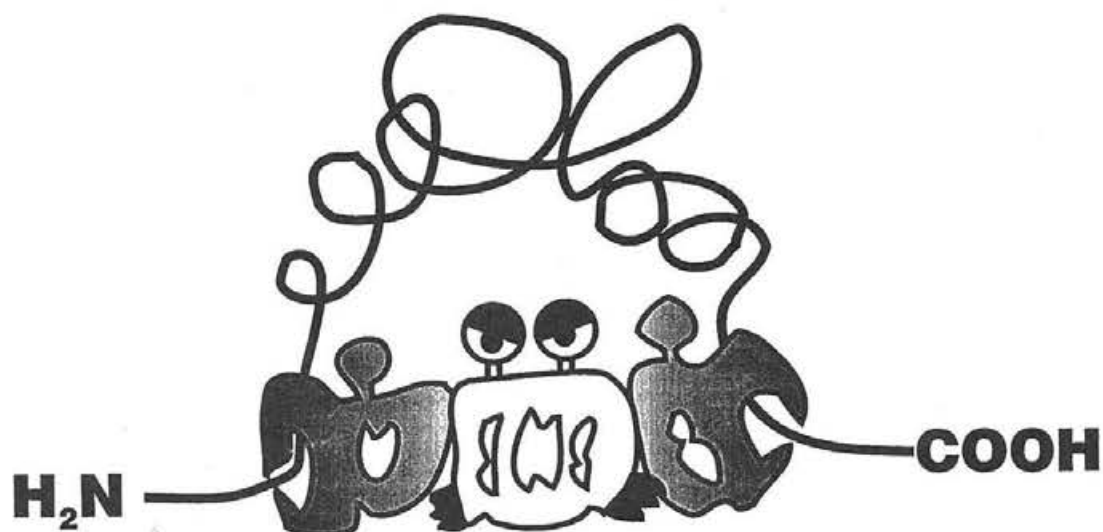


特定領域研究

「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7号（平成10年6月発行）

文部省科学研究費特定領域研究 「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 平成9年度班会議開催
- (4) 学会・集会報告
 - 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
 - 2 「生体膜研究会」
- (5) ミニレビュー
 - 1 メタロプロテアーゼ-ディスインテグリンファミリー
 - 2 LFA-1/ICAM-1を介した接着とプロテアソーム
 - 3 サイクリンBのユビキチン化
 - 4 SCF複合体による「選択的」かつ「時期特異的」なユビキチン化
 - 5 血液凝固反応はどのようにして始まるのか：血中活性型凝固第VII因子 (VIIa) の意義
- (6) トピックス
 - 1 分子シャペロンHsp70の新しい酵素活性、NDPキナーゼの発見と、作用機構の新仮説
 - 2 外来性抗原提示とカテプシン群-ノックアウトマウスを用いての解析
- (7) 海外留学中研究者からの最新情報
マックスプランク研究所：紹介とそこでの研究成果
- (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

三年目を迎えて

早いものでこの「特定領域研究」、(今年から「重点領域研究」の名前が変わりました、)も三年目を迎えました。我々の特定領域研究は全体の研究計画が四年ですから、早くも後半に入ったことになります。一昨年、この研究が始まった当時は、この蛋白分解の研究目的がなかなか理解していただけないことがありました。しかし、それから二年経った今日、蛋白分解をめぐる状況は大きく変化し、まさに隔世の感があります。蛋白質の分解やペプチド結合の切断を伴う蛋白質の修飾が様々な細胞機能で不可欠な役割をする事が次々と明らかになり、蛋白質分解に関係した論文や記事がNature, Science, Cellなど一流雑誌に毎号見られるといってもよい状況になってきました。国内の雑誌やシンポジウムでも蛋白分解に関係する企画や記事が非常に多くなっただけでなく、細胞機能における蛋白分解の重要性がごく当然の事として受け入れられ、ことさら強調されなくなったので気付かないことも多くなりました。本特定領域研究の重要な目的の一つは「研究領域全体の活性化」ですが、その点ではこの状況は大変喜ばしい事です。見方を変えれば、様々な研究領域の人が蛋白分解の研究に参入して

来るようになり、これまで一見関係ない領域で研究をしていた人が突然競争相手になる事態がおき、競争が一段と激しくなってきました。蛋白分解の研究は全体としては大いに活性化され、進展しましたが、蛋白分解の最も基本的な研究である「蛋白質の分解シグナルとその認識機構」のように、殆ど以前の状況と変わらない部分も多く、蛋白分解の全体像の解明をめざす研究の発展が期待されます。

我々が先見性を持って開始した新しい研究領域「細胞内蛋白分解」に多くの研究者が参入される事は大変うれしい事で、競争の激化を前向きな刺激と捉え、これまで以上に努力をしなければならないと考えます。研究計画が後半期に入る三年目を迎えるにあたり、研究期間内に現在進行中の研究に区切りをつけると共に、次の研究、次の飛躍に向けて確固たる足場を築く様、更なる努力をお願いしてご挨拶とさせていただきます。

平成10年5月

文部省科学研究費特定領域研究 (A)

「蛋白分解のニューバイオロジー」

(略称：細胞内蛋白分解) 領域代表者 鈴木 絃一

(2) 平成10年度重点研究班会議日程

1 第3回「細胞内蛋白分解」ワークショップ

日時：平成10年7月8日(水)午後～10日(金)午前

場所：六甲山ホテル(〒657-01 神戸市灘区六甲山南六甲1034)

TEL: 078-891-0301; FAX: 078-891-0736

8日：午後 受け付け

8日：夕食後:ポスターセッション

9日：午前 ミニシンポジウム:蛋白質のリモデリングと細胞機能

9日：午後 特別講演:蛋白分解研究の活性化を目指して

1. 成宮 周(京大医)

2. 勝木 元也(東大医科研)

3. 垣塚 彰(大阪バイオサイエンス研究所)

4. 井原 康夫(東大医)

講演終了後:懇親会

10日：午前 平成10年度新班員:紹介と研究計画

10日：昼食後 解散

2 平成10年度:第1回 総括班会議

日時:平成10年7月9日(木)午前8時～9時

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

3 第1回国際シンポジウム

"New Impact of Proteolysis on Biological Science"

日時:平成10年11月24日(火)午後1時～5時

会場:東京ガーデンパレス

〒113-0034 東京都文京区湯島1-7-5 電話:03-3813-6211

JRお茶の水駅下車 徒歩5分

4 第3回 公開シンポジウム:「タイトル 企画中」

主催:文部省科学研究費特定領域研究「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10年12月7日(月)午後1時～5時

会場:東京ガーデンパレス・雅(2階)

〒113-0034 東京都文京区湯島1-7-5 電話：03-3813-6211

JRお茶の水駅下車 徒歩5分

5 第3回班会議

日時：平成10年12月8日（火）～9日（水）「日時未定」

場所：東京ガーデンパレス

総括班メンバー

- 鈴木 紘一 東京大学分子細胞生物学研究所教授：領域代表・第一班班長
- 木南 英紀 順天堂大学医学部教授：領域副代表・第二班班長
- 岩永 貞昭 九州大学名誉教授：研究評価, チェック・レビュー
- 大島 泰郎 東京薬科大学生命科学部教授：研究評価, チェック・レビュー
- 勝沼 信彦 徳島文理大学健康科学研究所教授：研究評価, チェック・レビュー
- 志村 令郎 生物分子工学研究所所長：研究評価, チェック・レビュー
- 中西 重忠 京都大学大学院医学研究科教授：研究評価, チェック・レビュー
- 村上 和雄 筑波大学応用生物化学系教授：研究評価, チェック・レビュー
- 矢崎 義雄 東京大学医学部教授：研究評価, チェック・レビュー
- 矢原 一郎 東京都臨床医学総合研究所副所長：研究評価, チェック・レビュー
- 川島 誠一 東京都臨床医学総合研究所部長：研究企画, 調整
- 田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所部長：研究企画, 調整
- 石浦 章一 東京大学大学院総合文化研究科教授：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10年度）発行：平成10年6月作成

2 重点ニュース誌“ぷろておりしす”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)

"Biology of the Lysosome" (Eds. by Lloyd J.B. and Mason R.W.) Subcellular Biochemistry Vol. 27, Plenum Press, New York, 416pp (1996)

"Proteasomes and Related Complexes" : Mol. Biol. Rep. Special issues (Guest editors: Schmid, H.-P. and Briand, Y.), Vol. 24, 1-138pp (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. by Hopsu-Havu, V.K., Jarvinen, M., and Kirschke, H.), IOS Press, 576pp (1997)

"Ubiquitin and the Biology of the Cell" (Eds. by Peters J.-M., Harris J.R., and Finley D.) Plenum Publishing, London, 462pp (1998)

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”

1997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) 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。

(2) 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）。

(3) 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。

(4) 第28回 日本免疫学会シンポジウム：「**Antigen Processing and**

MHC」平成10年12月2～4日：神戸国際会議場（田中啓二、他）

同ワークショップ：「**抗原プロセッシングと提示**」

（田中啓二、笠井道之）

(5) 第21回 日本分子生物学会年会ワークショップ：「**タンパク質のプロ**

セッシングと局在化」平成10年12月16～19日：

パシフィコ横浜（田中啓二、市山 新）。

(6) 第25回 日本医学会総会シンポジウム：「**プロテアーゼバイオロ**

ジー」平成11年4月2～4日、東京（田中啓二、鈴木絃一）

国際学会

- (1) Gordon Research Conference on "**Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors**" July 5-10, 1998. New Hampshire (C. Craik)
- (2) 第15回国際キニン会議 Kinin '98 Nara on "**From Molecular Biology to Pathophysiology of the Kallikrein-Kinin System**" October 19-24, 1998. Nara (S. Iwanaga et al.) 掲示板コーナーに詳細情報。
- (3) International Symposium "**Recent Advances in Protease Research in Human Diseases**" October 27, 1998. Kumamoto
(H. Fritz, H. Maeda et al.) 掲示板コーナーに詳細情報。
- (4) "**New Impact of Proteolysis on Biological Science**" November 24, 1998, Tokyo (K. Suzuki and E. Kominami) 掲示板コーナーに詳細情報。
- (5) 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。
- (6) Keystone Symposium "**Metalloproteases: Chemistry, Biology and Medicine**" February 25-March 3, 1999 Tamarron (H. Nagase et al.)
- (7) 3rd Workshop on "**Proteasomes**", March 24-27, 1999, Clenmont-Ferrand, France (Y. Briand).
- (8) 5th FASEB Summer Research Conference "**Ubiquitin and Protein Degradation**" July 31 -August 3, 1999, Saxtons River, Vermont, USA
(C. Pickart, and G. DeMartino)
- (9) Vth International Symposium "**Proteinase Inhibitors and Biological Control**" October, 1999, Brdo (V. Turk)
- (10) 12th ICOP Conference on "**Proteolysis and Protein Turnover**" Fall, 1999 North America (B. Sloane)

(4) 学会・集会報告

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日に岡崎コンファレンスセンターにおいて、上記のシンポジウムが、約70名の参加者を得て開催された。このシンポジウムは、AAAファミリーATPaseに焦点を当て、その機能と構造について徹底的な討論を行った。まず最初に小椋(熊本大)が、AAAファミリーATPaseについてレビューし、構造の明らかになっている近縁のATPaseとの比較から、AAAファミリーATPaseの構造モデルを提示した。Finley(Harvard Medical School)は、プロテアソームを構成する6つのAAA ATPaseについてsystematicに解析し、これらの6つのATPaseが1個のプロテアソームに含まれ、それぞれ固有の機能を持つことを明らかにした。秋山(京大)は、FtsHの多機能性について述べるとともに、ペリプラズミック領域がホモオリゴマー形成、ヘテロオリゴマー形成に重要であることを明らかにした。多賀谷(東京薬科大)は、小胞輸送に関わるAAA ATPase、NSFとVCPについて、膜融合におけるこれらのAAA ATPaseの機能と細胞内局在、およびこれらと相互作用する新しい因子について述べた。大隅(姫路工大)は、ペルオキシソーム形成に関わるAAA ATPase、Pex1pとPex6pについての最近の知見を紹介し、それらのドメイン構造と機能の関係を、欠失変異、ドメイン交換実験の結果などから推定した。本シンポジウムでは、AAA ATPaseと近縁のWalkerタイプATPaseについて優れた研究をされてきた方々のうちから4名の方に特別講演をしていただき、AAA ATPaseとの類似点、相違点を明らかにするとともに、今後の研究の方向や参考になる新手法について紹介していただいた。まず二井(阪大)が、プロトンATPaseの構造と機能について紹介した。プロトンATPaseの回転モデルは、1997年度のノーベル化学賞に輝いたので、関心を持たれた方も多かろうと思います。次に、安楽(帝京科学大)は、液胞型ATPaseについて紹介した。基本的にはプロトンATPaseの一種である。これらのATPaseについ

ての今後の課題は、膜に埋め込まれたFo（あるいはVo）部分の構造と回転するATPase本体との共役機構の解明と思われる。品川（阪大）は、DNA修復、組換えにはヘリケースを始めとする多数のWalkerタイプATPaseが関与することを紹介し、Holliday構造特異的ヘリケースRuvABC複合体の構造と機能について考察した。RuvB ATPaseはAAA ATPaseとは極めて近縁であることが配列から予想されているものの一つである。最後に、柳田（阪大）は、表面エバネッセント波によって励起される蛍光を測定するまったく新しい方法で、1分子の動きやATPaseの加水分解反応を直接見ることに成功した。特に興味深かったのは、1分子のミオシンATPaseが1分子のATPを分解するとき、ミオシン頭部は1回の動きではなく、数回にわたって動くことができるという話であった。このことは、ミオシン分子に記憶効果があるということを示している。従来のATP型とADP型の構造変化が動きと1：1に対応するという考えでは説明できない現象である。この現象は、今後様々なATPase研究への波及効果が極めて大きい。なお、柳田先生は、一連の1分子の運動を直接観察するという先駆的な功績により、今年4月に学士院賞恩賜賞を受賞された。この場を借りてお祝い申し上げたい。ATPaseの研究が内外で注目されることは喜ばしいことで、真にタイムリーな講演を拝聴することができた。シンポジウム後の懇親会では、AAAファミリーATPaseの研究は今後大いに発展するであろうと講師の先生方からも熱いエールが送られる一方で、まだATPaseとしての研究レベルは低いという厳しい指摘もあった。AAA ATPaseの研究に対する強い興味と励ましの言葉と捕らえた。

二日目は、ワークショップとしてAAA ATPaseの研究に日々いそしんでいる若手研究者を中心とした発表会を行い、初日のシンポジウム以上に熱い議論が行われた。最後に、全体を通しての総合討論が行われ、当面の課題、今後の方向と研究室間の連携・交流体制に至るまで、院生など若い人からも活発な発言・提案があった。今後も何らかの形でこのような集会を定期的に行うことを目指すこと、そのためには個々の研究をさらに一層充実させることが肝要であるという認識に至った。

このシンポジウムを開催するにあたり御尽力いただいた多くの方々に、この場

を借りて感謝したい。本シンポジウムの講演要旨は「AAAファミリータンパク質」のホームページに掲載していますので、興味のある方はご覧下さい。なお、4月からホームページは<http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/AAA/aaainfo.html>に移動しました。今後も順次内容を充実してゆく予定です。御意見などお寄せいただければ幸いです。

(小椋 光：熊本大学・医学部)

2 「生体膜研究会」

3月16日基礎細胞生物学研究所内で部門公開セミナーとして「生体膜研究会」が、大隅良典教授の主催で開催されました。参加者は約30名で、会議室は満員となりました。講演は

1. 「哺乳動物細胞の膜代謝機構に対する遺伝生化学的アプローチ」(花田賢太郎博士・国立感染症研究所)
2. 「A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure/function」(小林俊秀博士・ジュネーブ大学)
3. 「小胞体でのタンパク質の選別輸送に関わる因子Emp24pの輸送調節機構」(中村暢宏博士・九州大学)
4. 「メタノール資化性酵母ペルオキシソームのアッセンブリーとオートファジー」(阪井泰能博士・京都大学)

の四演題を各一時間かけてじっくりと行なわれました。

花田先生の御講演では、CHO細胞から温度感受性のスフィンゴミエリン合成系酵素の変異細胞株を分離し、酵母で報告された遺伝子のアミノ酸配列からESTを検索、遺伝子を分離し、更にそのcDNAを導入することによりレスキューできたお話と、新たに最近分離されたスフィンゴミエリンに特異的に結合する溶血毒素ライセニンを用いることによって新たな変異株を分離したお話をされました。酵母では欠損株や特定の遺伝子を破壊した株を用いて特定の遺伝子の機能を検討することが

比較的容易ですが、動物ではKOマウスの作成はなかなか大変で有り、動物細胞での温度感受性変異株の分離による特定遺伝子の機能解析が進歩することが期待されます。

小林先生はジュネーブから一時帰国されているところで、おりよくお話を聞くことができました。先生の作成された後期エンドソームに対するモノクローナル抗体が後期エンドソームの内側に存在している構造を認識する抗体で、そのエpiteopeが後期エンドソーム/リソソームを構成する主要な脂質である lysobisphosphatidic acid (LBPA) であること、Antiphospholipid Syndrome (SLE患者の約30%で発症)の患者にはこのLBPAに対する抗体が血液中に存在していることを話されました。先生の分離されたモノクローナル抗体をBHK細胞にかけると、この細胞では後期エンドソームに見いだすことが出来ないマンノース6リン酸受容体(MPR)が後期エンドソームに蓄積してくることを示され、後期エンドソームの成熟過程におけるMPRの後期エンドソームからの離脱にLBPAが関与している可能性を強く感じました。

中村先生は酵母の粗面小胞体からのタンパク質の脱出を制御しているEmp24pの細胞質部分および膜貫通部分の機能解析のお話をされました。膜の内側に Invertase:Emp24pのキメラタンパク質を酵母内で発現させ、糖鎖の獲得および Invertaseのプロセッシングによりキメラ蛋白がシスゴルジ、トランスゴルジ、液胞に到達する時間を解析するという技法を用いて、Emp24pの細胞質ドメインには粗面小胞体からの脱出シグナルが存在していること、それにたいして膜貫通ドメインにはゴルジを通過する速度を遅くする機能があることを示されました。

阪井先生は、*Candida boidinii*を用いてメタノール存在下で培養し増殖したペルオキシソーム(GFPで標識)がエタノール存在下ではマクロオートファジーで、グルコース存在下ではミクロオートファジーで液胞(FM4-64で標識)に取り込まれる過程をレーザー顕微鏡を用いて解析されたお話をされました。更にこの酵母でミクロオートファジーとマクロオートファジーの両方、あるいはマクロオートファ

ジーが出来ない変異株を分離しておられました。このようなオートファジーの過程の蛍光染色での可視化は動物細胞にも応用可能ではないかと、あらぬことを考えてしまいました。

以上四演題について活発な議論が交わされ、大変充実した研究会でした。この研究会自体は細胞内蛋白分解とは直接関係がないかも知れませんが、我々、リソソームの蛋白分解系を研究しているものにとっては、大変勉強になりました。最後にこの研究会を開催してくださいました大隅先生およびその研究室のスタッフの皆さんに感謝致します。

(順天堂大学・医学部：石堂一巳)

(5) ミニレビュー

1 メタロプロテアーゼ - ディスインテグリンファミリー

はじめに

これまで私は、はっきり言ってプロテアーゼというものが好きではなかった。まず第一に、種類が多くて覚えられない。そして、いろいろな局面で出てきてややこしい。多くの場合、基質特異性がわかっているようでよくわからない、研究人口も多い、などなど。しかし、最近になって、私は、にわかにならプロテアーゼに親しみを感じ始めている。その理由のひとつは、今年度、「細胞内蛋白分解」班に入れていただいたことである。それに対して、これまで入れていただいていた「転写制御」の班からは、つれなくもシャットアウトされてしまった。それはさておき、私がプロテアーゼに興味を持ち始めているより大きな理由、ここではこれをお話しします。

高等動物の形態形成において、その基礎を成す受精後の細胞分化は、どのような分子機構によってもたらされるのか？ 決して新鮮ではないその疑問に、私はいまだにこだわっている。これまで、それに関する多くの研究が、細胞分化に関わる転写因子とそれらの活性化をもたらすシグナル分子の同定・機能の解析に捧げられてきた。私も、筋分化を中心に、転写制御の研究を行ってきた。しかし、研究が進むにつれ、このような転写・翻訳の制御だけでは秩序だった個体の発生・形態形成を説明することが出来ないという事実、誰もが突き当たり始めているように思う。そしてそのことに、私は大いに興味を引かれているのだ。ここで特に重要だと考えられるのは、翻訳後のタンパク質のリン酸化などの修飾とともに、タンパク質のプロセッシングによる機能ドメインの活性化が、発生に関わる多くの遺伝子の働くタイミングや細胞特異性を制御しているらしい、ということである。そして私も、苦手だったプロテアーゼと向き合うことを迫られる事態になってきたのである。私達の

グループでは、近年、世界に先駆けて、新しい膜タンパク質メルトリン $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ をコードする遺伝子群をクローニングした。これらは後述するメタロプロテアーゼ・ディスインテグリンドメインを有する糖タンパク質であり、中でもメルトリン α は、何らかの機構により筋形成を制御していることを見出した。筋形成において、この膜型メタロプロテアーゼは、一体何を切断しているのか？ 従来からプロテアーゼインヒビターを用いて、メタロプロテアーゼが筋形成に重要であることは報告されていた。現在私は、筋形成などの形態形成プログラムのなかで、膜型メタロプロテアーゼが果たしている役割をぜひとも解明したいと思っている。

1. ヘビ毒メタロプロテアーゼ-ディスインテグリンについて

そもそもメタロプロテアーゼ-ディスインテグリンとはなにか。ディスインテグリンは、ハブやガラガラヘビなどの溶血性ヘビ毒中から相次いで見つかった、一連の低分子量タンパク質（約50-90アミノ酸）の血液凝固阻止因子である。エキスタティン、トリグラミン、キストリン、ビティスタティン、パーブリン等、恐ろしい名前をもつこれらディスインテグリンの多くはRGD（あるいはKGD）配列を有し、この配列を介して、血小板上のインテグリン α IIb β 3とフィブリノーゲンの結合を阻害し、血栓形成を阻止することが明らかにされている。

その生理活性から、血栓症などの治療薬として大いに期待されたが、これらヘビ毒ディスインテグリンは、相互作用するインテグリンの特異性が低いことや、その抗原性の強さゆえに、実用化への期待はうすれてしまった。しかし、反面、ここ数年の数々の研究によって、それらの分子としてのおもしろさが、再びクローズアップされることになってきた。

そのおもしろさは、メタロプロテアーゼとディスインテグリンの2つを合わせ持つヘビ毒が発見されたことに始まる。それまで、ヘビ毒メタロプロテアーゼは、ヘビ毒に含まれる溶血活性を有する因子として単離され、その一次構造やcDNA配列が報告されていた。これらのメタロプロテアーゼは活性中心の亜鉛イオン、それに

配位するヒスチジンに富む活性部位を持ち、コラゲナーゼなどのマトリックスメタロプロテアーゼとホモロジーを持っている。ガラガラヘビ *Crotalus atrox* 由来のそれらは、血管の基底膜を構成するタイプIVコラーゲン、ラミニン、ニドジェン等を分解する活性を有する、との報告がなされている。

ところが、このような溶血因子の中で、そのC末側にディスインテグリンドメインを持つものがでてきたのである。例えばハブ毒HR1Bや南米の毒ヘビ由来の jararhagin などの溶血因子は、そのアミノ酸配列を調べるとメタロプロテアーゼのC末側にディスインテグリンドメインを持ち、さらにcDNAをクローニングしてみると、プロテアーゼを前駆体に保つ為に存在するらしい前駆体ドメインがN-末端にコードされていることがわかった。そして、最初に述べた低分子量のディスインテグリンの場合も、実はこれがメタロプロテアーゼドメイン、プロドメインを含む前駆体として産生されていることが報告された。こうして、溶血因子と血液凝固阻止因子の2つの機能ドメインをもつ一群のヘビ毒遺伝子が存在すること、これらが切断されて独立に機能する場合と、その両方をもったタイプとがあることがわかってきた。ハブやガラガラヘビに咬まれると、私たちは、これら2つの因子によって溶血を引き起こされることになるというわけである。

2. メタロプロテアーゼ-ディスインテグリンドメインをもつ膜タンパク質遺伝子群について

さて、メタロプロテアーゼ-ディスインテグリンがさらに注目を集めたのは、このようなヘビ毒に相同性のある分子が、私たち哺乳類でも産生され、重要な機能を担っているらしいことがわかってきたからである。その代表的なものには、(1) モルモットの受精を阻害するモノクローナル抗体に反応する因子で、成熟精子の先体の細胞膜に局在が見られる膜タンパク質ファーティリン、(2) 上述のメルトリン(あとで更に詳しく言及)、(3) ショウジョウバエの遺伝子で、細胞分化にかかわるNotchと遺伝学的に相互作用し、Notchのプロセッシングによる活性化をおこなっ

ているらしいKuzbanian、(4) TNF α のプロセッシングをおこなう酵素 (TACE) などがある。いずれも、前駆体ドメイン、メタロプロテアーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、システインリッチドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメインがなっている。

ファーティリンに関しては、メタロプロテアーゼドメインの機能は分かっていない。ファーティリンはヘテロダイマー α 、 β からなり、それらのうち β のメタロプロテアーゼドメインの活性部位はつぶれているので、こちらはプロテアーゼとしては働いていないと考えられる。Mylesら、続いてAlmeidaらは、ファーティリンのディスインテグリンの機能に着目している。まず彼らは、成熟精子のファーティリンが卵細胞のインテグリンとの相互作用によってその接着に関与している可能性を検討した。その結果、卵子のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ が精子と卵子の接着に関与していること、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ を発現させた培養細胞に精子が接着でき、その接着がファーティリン β のTDEを含む非RGDペプチドによって阻害されることを見いだした。そこで彼らは、ファーティリン β はヘビ毒同様、そのディスインテグリンドメインを介して、卵子インテグリンと相互作用すると考えている。このように、溶血作用をもつ可溶性因子のヘビ毒とこれら受精や形態形成にかかわる膜分子が、大きな遺伝子ファミリーを形成しており、これらをADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) ファミリーと呼ぶようになってきている。私たちは、自分たちの体作りの際に、ヘビ毒のプロトタイプのような遺伝子を用いているらしいのである。

3. メルトリンについて

私達は、細胞融合にはおそらく共通の機構が存在し、多核の骨格筋を形成する際においても、受精ではたらくファーティリンのような分子が機能しているのではないかと考え、そのような分子のクローニングを試みた。その結果、すでに述べたように、メタロプロテアーゼ・ディスインテグリンファミリーに属する新しい分子を3種類クローニングすることができ、これらの分子を融合(融け合う、fuse)を

意味するmeltと、fertilinとの相同性、ファーティリンとは異なる細胞質ドメインを有することから、新たなサブファミリーを形成するタンパク質としてそれぞれメルトリンmeltrin α , β , γ と命名した。メルトリンが構造上ファーティリンと特に異なるのは細胞質ドメインであり、これがかなり長い。そして、そのドメインの特徴としては、C-キナーゼのコンセンサス配列を持つことと、srcのSH3ドメインと相互作用するらしい、プロリンリッチな配列を有することなどが挙げられる。このような構造上の違いは、受精と筋形成におけるこれらの分子の機能の独自性を示すものであろう。分化誘導によって筋管を形成する樹立筋芽細胞C2でメルトリンmRNAの発現を調べると、増殖培地中では、 α の発現レベルは非常に低く β の発現量もあまり多くはないが、細胞を分化条件下におくと、 α と β の発現が強く誘導される。また、 α の転写誘導は筋型クレアチンキナーゼのような筋分化のマーカーの転写活性化に先行して起こり、筋分化誘導因子であるマイオジェニンの発現と同じようにごく早い時期から見られることから、 α は筋分化の初期段階から働く分子であることが予想される。

一方、メルトリン α に対するポリクローナル抗体を用いてC2細胞抽出液のウェスタンブロットティングを行うと、複数の分子種が検出される。これらの分子種は、細胞への発現ベクターのトランスフェクションなどの実験から、メルトリン α の細胞外領域の翻訳後のプロセッシングによって生ずることが分かっている。先に述べたように、ファーティリンやヘビ毒においても同様なプロセッシングが起こっており、これはこのファミリーに属するタンパク質に共通の特性であるらしい。筋形成におけるメルトリン α の役割を知るため、次のような実験をおこなった。まず、前駆体ドメインを含むメルトリン α をC2細胞で大量に発現させたところ、筋管形成はむしろ抑制された。プロセッシングを受け、メタロプロテアーゼドメインを欠失した分子種が存在することから、その様な分子種のみが生ずるような発現ベクターを作成し、C2細胞で発現させたところ、筋管形成の時期が早まり、筋管形成率も上昇した。その上、そのようなトランスフォーマントは、多くの場合分化後の細胞凝集が亢進し、

極性の低い筋管を形成した。これに対し、そのアンチセンスRNAの発現は筋細胞融合を抑制した。これらの結果から、メルトリン α が何らかの形で多核の骨格筋の形成を制御しているものと考えられた。

以上のように、精子や筋細胞において膜貫通型メタロプロテアーゼ-ディスインテグリンが発現し、受精や多核の筋管形成に関与することがわかったわけであるが、それらは、細胞融合タンパク質自身ではない。何故かという、少なくともメルトリンは、細胞融合を起こさない細胞でも発現が見られるからである。in situ hybridizationで調べてみると、メルトリン α は、マウス胎児の骨形成や内臓形成にかかわる間葉細胞で非常に強い発現がみられる。メルトリン β は、やはり胎児において骨格筋での発現とともに、末梢神経系で非常に強い発現が見出される。このような発現パターンや最近の予備実験から、メルトリンは、どうやらこれらの細胞の分化に関わっているようである。このように、メタロプロテアーゼ-ディスインテグリンファミリーは未だ、未知なる遺伝子群ではあるが、細胞間あるいは細胞と細胞外基質との相互作用、それらの制御に関わる遺伝子群として重要なのでは、と考え、新しく引越したラボでこれから頑張るつもりです。どうぞよろしくお願いいたします。

(東京都臨床医学総合研究所 細胞生物学研究部 瀬原(藤沢) 淳子)

2 LFA-1/ICAM-1を介した接着とプロテアソーム

I. インテグリンとインテグリンを介した細胞接着

インテグリンは細胞間または細胞と細胞外マトリックス間を結合させる接着分子で、 α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマーである。両鎖とも細胞外領域と膜貫通部、細胞内領域からなり、 α 鎖と β 鎖の組み合わせにより、リガンド特異性が決定される。インテグリンは β 鎖サブユニットの相違によって $\beta 1$ から $\beta 7$ までの7つのサブグループに分けられる。 $\beta 1$ サブファミリーは、Tリンパ球をマイトゲンで刺激し

その後1-2週間たってはじめて誘導されるのでvery late antigen (VLA)と呼ばれる。代表的なものに $\alpha 1$ から $\alpha 6$ に会合しているVLA-1からVLA-6がある。発現は広範囲であり、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスと結合する。一方、 $\beta 2$ サブファミリーには α 鎖の異なるLFA-1 (αL)、MAC-1 (αM)、p150p95 (αX)、 αd が知られており、これらはリンパ球、マクロファージ、好中球といった免疫系細胞にのみ特異的に発現している。LFA-1はICAM-1, 2, 3を、MAC-1、p150p95は補体第3成分分解物C3biやフィブリノーゲンを、また、 $\alpha d \beta 2$ はICAM-3をリガンドとすることが判明している。 $\beta 2$ インテグリンの欠損が原因で発症する先天性異常としてLAD (leukocyte adhesion deficiency)が報告されている。症状の特徴は感染症を繰り返して罹患することであり、10及至12歳で死亡する。

$\beta 2$ サブファミリーに属するLFA-1は、上述のように αL 鎖と $\beta 2$ 鎖からなり、免疫系細胞にのみ特異的に発現する。リガンドは血管内皮細胞などの細胞表面に存在するICAM抗原である。免疫系細胞表面のLFA-1は、通常はリガンドに結合できないが、感染時や腫瘍の出現に伴って、はじめて活性化される。LFA-1が活性化された免疫細胞は、血管壁にまず接着し、血管壁を通過し、標的に向かって結合組織内を遊走して、炎症局所に到達する。免疫細胞はその場で、貪食を中心とした異物処理や種々の抗原特異的免疫反応をおこして、生体防御機構の一員として機能する。このときLFA-1は免疫細胞の移動に関与するだけではなく、特異的免疫応答の発現にも重要な役割を担っている。すなわち、Tリンパ球が抗原を認識する時に、共刺激分子として抗原レセプターからのシグナルの増強に一役買っていることが証明されている。以上述べたように、免疫系細胞では、線維芽細胞などと異なり、LFA-1等のインテグリンは、その接着能が厳密に調節されており、必要な時、必要な場所で抗原やサイトカインの刺激により活性化されて、特異的リガンドへの接着性を発揮するようになる。

免疫細胞の接着機能は、細胞表面のLFA-1の発現量によっては推し量ることはできず、通常の免疫細胞はLFA-1を発現していても接着することができない。インテ

グリンを介した接着能は、細胞内からの活性化シグナルによって、制御されており、1, 2)、こうした細胞内からのインテグリンの接着性の調節機構を"Inside-out signaling"という。一方、インテグリンはそのリガンドであるICAMや細胞外マトリックスと結合すると、その結合部位に接着斑と呼ばれる骨格系蛋白質やシグナル伝達分子群の集積によって形成される特殊な構造が発達し、それを介して情報を細胞の内側に伝える。このようなインテグリンを介したシグナル伝達を"Outside-in signaling"という。インテグリンはその名の通り、細胞外環境からのシグナルを細胞内に伝達するレセプターとして、細胞の様々な機能や、増殖、分化、アポトーシスを調節していることが示されている。

II. 細胞接着と細胞凝集

従来、LFA-1を介した細胞の接着と凝集とは、同時にしかも同一のメカニズムで誘導されるものと考えられていたが、我々は最近LFA-1を介した細胞凝集の誘導プロセスには、LFA-1の活性化と低分子量G蛋白質分子を介した細胞骨格系の変化という二つのステップが必要であることを明らかにした³⁾。

前骨髄性白血病細胞株HL-60は、 $\beta 2$ インテグリンとしては、LFA-1のみを発現している。LFA-1の接着能を、プレートにコートした精製ICAM-1に対するHL-60細胞の接着能で測定したところ、HL-60細胞は無刺激の状態では、ICAM-1にほとんど結合することはできないが、HL-60細胞をレチノイン酸(RA)で24時間培養すると、顕著な接着能が誘導されることが判明した。この時、LFA-1の発現量には、全く差が認められなかった。すなわち、レチノイン酸はLFA-1の接着性を上昇させることが明らかとなった。同様のことは、TPAで24時間培養した場合も認められる。

HL-60細胞は、RA刺激によってLFA-1が活性化されるばかりでなく、ICAM-1を発現するようになるが、細胞間凝集は認められない。ところが、活性型H-Ras(V12)をHL-60細胞に強制発現させたtransfectantsは、RA刺激によって顕著なLFA-1/ICAM-1依存性の凝集を示した。transfectantsでは、LFA-1/ICAM-1の発現量も、

ICAM-1に対する接着性も、parentのHL-60細胞に比べて増加していなかった。活性型Rasのtransfectantsでは、レチノイン酸刺激でパキシリンのチロシンリン酸化が特異的に認められ、接着斑の形成を伴うLFA-1の裏打ち構造が発達していることが示唆された。Cytochalasin D及び低分子量G蛋白質Rhoの阻害剤であるC3毒素に加えて、サイトカインのひとつTGF β がパキシリンのチロシンリン酸化を抑制し、細胞凝集の形成を阻害した。しかしながら、こうした薬剤は、LFA-1のICAM-1への接着性の上昇には、影響を与えなかった。このことから、LFA-1の活性化には、intactなアクチン細胞骨格は必要がないことが示唆されるとともに、細胞凝集するためには、二つのステップ、すなわち、LFA-1の活性化並びに低分子量G蛋白質の活性化とアクチン細胞骨格の再構成が必要であることが明らかとなった。

III. プロテアソームはLFA-1の接着性の誘導に関与する

TPAでHL-60細胞を24時間培養すると、LFA-1の接着性の上昇とともに、Rasの活性化も生じ、LFA-1・ICAM-1を介した細胞凝集が起こる。プロテアソーム阻害剤ZLLLal、及びラクタシスチン共存下でHL-60細胞をTPA刺激したところ、細胞凝集が抑制された⁴⁾。一方、カルパイン阻害剤ZLLalは影響を与えなかった。上述の精製ICAM-1をコートしたプレートを用いて、プロテアソームがLFA-1の接着性の上昇に関与するかどうかを検討した。プロテアソーム阻害剤は、Cytochalasin D、Rho阻害剤C3毒素やTGF β とは異なり、用量依存的に、LFA-1の活性化を抑制した。一方、カルパイン阻害剤はLFA-1の活性化を全く抑制しなかった。またプロテアソーム阻害剤が細胞遊走に影響を与えている可能性をrandom migration assayで検討したが、対照群と有意な差は認められなかった。従って、プロテアソーム阻害剤は、LFA-1の接着性の上昇を阻止することによって、細胞凝集を抑制していると結論した。

実際に、プロテアソーム阻害剤存在下でHL-60細胞をTPAで刺激すると、膜分画に大量のユビキチン化された蛋白質分子群の蓄積が見られた。このことから、TPAで刺激されたHL-60細胞においては、LFA-1の活性化に伴い、プロテアソームにより

分解されている蛋白質分子が膜分画に存在することが明らかとなった。これらのユビキチン化蛋白質分子群のなかに、LFA-1の接着性の制御に関与するものがあると考えられる。

以上の結果から、TPAによるLFA-1の接着性の上昇には、膜蛋白質分子のユビキチン化とプロテアソームによる分解が必要であることが判明した。おそらくLFA-1の接着性はなんらかのメカニズムで抑制されており、抑制に関与する蛋白質分子のプロテアソームによる分解が、接着性の誘導に必須なステップのひとつであると予想している。

Tリンパ球をthapsigarginなどのカルシウム流入剤で刺激してLFA-1を活性化する系に、カルパイン阻害剤を共存させると、LFA-1の活性化が阻止されるという報告⁵⁾が最近掲載された。我々はいくつかの細胞を使って、また異なる活性化刺激を用いて、カルパイン阻害剤の効果を検討していたが、LFA-1の活性化を阻止する効果は全く認められなかった。おそらくLFA-1の活性化に直接関与するのではなく、カルシウム依存性のシグナル伝達経路上に、カルパインによる蛋白質分解が必要なステップがあるのだろうと思う。いずれにせよ、分解される基質がなんであるのか明らかにしなければならない。インテグリンの細胞内領域に会合する分子はtwo hybrid systemによって単離されているが、いまだLFA-1を含めて、Inside-out signalingに関与するものは明らかとなっていない。特に、LFA-1に会合する唯一の分子として、Cell (1996) 6)に報告されたcytohesinという分子に関しては、いくつかのラボで追試が効かず、疑問視されている。Outside-in signalingは随分明らかになって来たが、インテグリンの活性化のメカニズムは、仮説ばかりが先行している。着実に進むしかないと考えている。

文献

- 1) Dustin, M, Springer, TA. (1989) Nature 342, 619.
- 2) Kinashi, T, Springer, TA. (1994) Blood 83, 1033.
- 3) Katagiri, K, Kinashi, T, Irie, S, Katagiri, T. (1996) Blood 87, 4276.

- 4) Katagiri, K, Yokozawa, H, Kinashi, T, Irie, S, Kawashima, S, Tanaka, K, Katagiri, T. Submitted.
- 5) Stewart, MP, McDowall A, Hogg N. (1998) J. Cell. Biol. 140, 699.
- 6) Kolaus, W, Nagel, W, Schiller, B, Zeitmann, L, Godar S, Seed B. (1996) Cell 86, 233.

(ニッピ・バイオマトリックス研究所：片桐晃子)

3 サイクリンBのユビキチン化

はじめに

細胞周期の進行はcdk (cyclin-dependent kinase)の活性により調節されているが、cdkの活性は特異的サイクリンとの結合、cdk自身のリン酸化状態、さらにcdk inhibitors等により厳密に調整されている。M期への進行にはcdc2/サイクリンB複合体であるMPF (mitosis promoting factor)の活性化、即ちcdc2の161Thrのリン酸化と14Thrと15Tyrの脱リン酸化が必要である。最近、GADD45がcdc2活性を阻害することが学会報告され、哺乳類においてもcdc2の活性調節にinhibitorも関与しているものと思われる。cdc2の活性化により染色体の凝縮、核膜の崩壊等が誘導され細胞はM期へと進行する。M期からの脱出にはMPFの不活性化が必須であり、これはサイクリンBが分裂後期から終期においてユビキチン化を介したプロテアソーム系を介して分解されることによる。サイクリンBのユビキチン化には、ユビキチン運搬酵素(E2)としてはE2-C (clam)/UBCx (xenopus)/UbcH10 (human)が、ユビキチンリガーゼ(E3)としてはサイクロソームあるいはAPC (anaphase-promoting complex)と呼ばれる沈降定数20Sの複合体が機能することが明らかとされている。APCに関する研究は最近急速に進展しており、また幾つかの優れた総説(1-5)も出ているので、本稿では多少古い話題も含まれるが我々の研究について主に紹介させていただき、終わりのほうで最近のトピックスについて簡単に述べたい。

サイクリンBに選択的な E 2

我々の研究室では哺乳動物細胞の細胞周期の制御機構の解明を主眼に研究を行っており、サイクリンBのユビキチン化についてもマウスやヒト培養細胞を用いて系を開発することから研究を開始した。サイクリンBは、出来るだけ*in vivo*の状態を反映させるために、マウスサイクリンBの全長をGSTとの融合蛋白としてバキュロウイルス系でcdc2と共発現させ、suc1カラムでcdc2と複合体を形成しているものを精製し使用した。E1もバキュロウイルス系で発現させ精製したものをを用いた。実験を始めた時点ではE2, E3ともに全く未知であり、E2/E3源としてはM期後期から終期に同調したHeLa細胞の抽出液を使用した。サイクリンBのユビキチン化は検出できなかった。系の確立が出来ずに苦労している間に、Kirshnerら(6)によりUBC4がサイクリンBに対するE2であると報告されたので、早速ヒトUBC4とそれに非常に近いUBCH5を単離・作製し使用したところ、初めてサイクリンBのユビキチン化が認められた。各時期に同調したHeLa細胞の抽出液についてE3活性を検討すると、G1/S期、S期やコルセミドで分裂中期に停止させた細胞の抽出液ではサイクリンBのユビキチン化は認められないが、コルセミドを除いて1時間後(分裂後期～初期G1期)の抽出液には高い活性がみられ、*in vivo*におけるサイクリンBのユビキチン化の時期と良く一致した。

その後、Rudermanら(7)によりclamからE2-Cが、Kirschnerら(8)によりXenopusからUBCxが相次いでクローニングされた。そこで、BLAST searchにより得られたEST断片の配列をもとに、RT-PCRによりヒトのホモログ(hE2-C)を単離した。hE2-CとUBCH5についてサイクリンBのユビキチン化触媒能を比較すると、hE2-Cが高い活性を示すだけでなく、UBCH5がcdc2と複合体を形成しているサイクリンBと単体のサイクリンBを同程度にユビキチン化させるのに対し、hE2-Cはcdc2と複合体を形成しているサイクリンBに対してより高い活性を示すことから、hE2-Cが真のサイクリンB選択的E2であると考えられた。hE2-Cの配列は後にRudermanらにより報告されたUbcH10と全く同一であった(9)。Rudermanらはさらに、dominant negative UbcH10の発

現によりサイクリンAとBが蓄積し細胞周期が分裂中期で停止することも明らかにし、UbcH10がサイクリンBだけでなく広くAPCの関与するユビキチン化経路のE2であることを示した(9)。

UbcH10と結合する蛋白質

サイクリンBのユビキチン化の系の開発と並行して、我々はサイクリンBと相互作用する蛋白質の単離を酵母Two-hybridシステムにより試みた。全長サイクリンBの発現は酵母の生育を阻害したため、cdc2との結合に必要な cyclin box を欠失させたN末側 (destruction boxを含む) をbaitに用いてマウスリンパ腫細胞のcDNA libraryのスクリーニングを行った。その結果、たった1個のpositive cloneが得られたが、これは小胞体/ゴルジおよびゴルジ/ゴルジ間の小胞輸送に係わるコート蛋白質の一員である β^1 -COPのC末側をコードしていた。ゴルジ体も分裂期には核膜と同様に崩壊するので興味が持たれた。 β^1 -COPとサイクリンBの結合は*in vitro*でも再現できたが、 β^1 -COPはcdc2によるリン酸化は受けないこと、またサイクリンBのユビキチン化にも顕著な影響は与えなかったことから、サイクリンBとの結合の生理的な意義は不明である。しかしながら、 β^1 -COPはcdc4やcdc20と同様にWD-40モチーフを持つことから、今後のさらなる検討が必要と思われる。Two-hybrid法を利用して、久留米大の大坪素秋先生がサイクリンE-p21について新規*hect*蛋白質を、九大の小林英紀先生がサイクリンAについて新規のユビキチン関連遺伝子の単離に成功しているが、サイクリンBをbaitとしてはユビキチン系と関連のある遺伝子の単離は不成功に終わった。

UbcH10がサイクリンB選択的E2であることが明らかになるとともに、UbcH10とAPCは直接複合体を形成していないことから、UbcH10をAPCへと導く蛋白質あるいはE3自体を得ることを目的に、UbcH10をbaitとしたTwo-hybrid法を試みた。その結果、マウスリンパ腫細胞のcDNA libraryより、同一の新規蛋白質をコードする2個のクローンが得られた。バキュロウイルス系で発現させたこの蛋白質とUbcH10が*in*

*in vitro*で結合することも確認できた。次にBLAST searchで得られたヒトEST配列をもとに5' RACE法を繰り返しこの蛋白質のヒトcDNAを単離したところ、このcDNAは357個のアミノ酸をコードしており、C末側に*hect*様の配列が存在したので、H10BH (UbcH10-binding protein with *hect*-like domain)と命名した。H10BHの全長は*hect* domain とほぼ同じ長さであり、E6-APとのidentityは19%、similarityは51%であり、最も相同性の高いC末45個のアミノ酸についても、E6-APとのidentity, similarityはそれぞれ29%、54%と他の*hect*蛋白質と比較して低い相同性しか示さないが、C末近くに存在しE6-APのE3活性に必須のCys残基は保存されていた。

バキュロウイルス系でH10BHのGSTとの融合蛋白質(GST-H10BH)とサイクリンBをSf9細胞に共発現させると、GSH-SepharoseでGST-H10BHとともにサイクリンBの一部が共沈してくることから、H10BHとサイクリンBが結合することが明らかとなった。そこで、サイクリンBのユビキチン化に与えるH10BHの効果を検討するためにE1, UbcH10とHeLa細胞抽出液存在下でのユビキチン化の系にH10BHを添加すると、サイクリンBのユビキチン化が著しく促進された。さらにSf9細胞でのhuman CDC27との共発現から、H10BHはAPCの構成成分であるCDC27とも結合することも明らかとなった。以上より、H10BHは基質であるサイクリンBとE2 (UbcH10)さらにE3であるAPCを結び付ける新規の蛋白質であることを明らかとした。また、H10BHはE1とUbcH10の存在化で自身がユビキチン化されること、さらにH10BHはHeLa細胞の抽出液がなくともE1とUbcH10の存在下で弱いながらサイクリンBのユビキチン化を引き起こすことも明らかとなり、H10BHがサイクリンBのユビキチンリガーゼである可能性が示唆された。H10BHに対して作製した抗体が免疫沈降に使えないことから、H10BHが*in vivo*でAPCの構成成分であるか、あるいはAPCと結合するか否かについては今後の検討が必要である。さらに、東大の東江昭夫先生との共同研究で、出芽酵母におけるH10BH homologueの破壊株を作製したところ、この遺伝子が酵母の生育に必須であることも明らかとなった。

APCの構成成分

サイクリンBに対するユビキチンリガーゼは、clam eggからHershkoら(10)により、Xenopus eggからはKirschnerら(6)により相次いで精製され、沈降定数20Sの複合体を形成していることが明らかにされ、それぞれcyclosome, APC (anaphase promoting complex)と命名された。APCは、分子量の大きい順にAPC1~APC8と名付けられた8種類の蛋白から構成され、当初APC3がCDC27、APC6がCDC16であることが報告された(6)。分裂酵母ではそれぞれがNuc2p、Cut9pに相当する。その後、APC1がXenopus(11)と出芽酵母(12)ではAspergillus nidulansのBIMEとマウスのTsg24に相同性のある蛋白質であり、分裂酵母ではCut4pであること(13)が明らかとされた。つい最近、XenopusのAPC構成成分のマイクロシーケンスをもとにヒトのAPC1~8の全配列がKirschnerらにより決定され(表1参照)、APC2はCdc53等のcullinとホモロジーのある領域を含む新規蛋白質であり、APC8がCDC23に相当すること、APC7はCDC16, 23, 27と同様にTPR (tetra-trico-peptide repeats)を持った新規蛋白質であること、APC4とAPC5は全く新しい蛋白質であることが明らかとされた(14)。また同時に Nasmythらにより出芽酵母のAPC構成成分についても報告された(15)。出芽酵母では、APC7を除くAPC1~8以外に、Apc9p(新規)、Apc10p(以前報告されていたDoc1p)、Apc11p(新規)、Apc12p(Cdc26p)、Apc13p(未同定)が含まれていることが明らかにされ、以前より出芽酵母のAPCが20Sではなくより大きな複合体(36S)を形成していることが報告されていた事(12)と一致する。

これらAPCの構成成分のうち、APC2がcullin様の配列を保持していることから、sic1等のユビキチンリガーゼであるSCF (Skp1/cdc53, cullin/F-box protein)の構成成分であるcdc53に相当する役割を担うと考えられている。一方、SCFではE2であるcdc34がcdc53と結合した状態で存在するとともに、cdc4等のF-box proteinがリン酸化された基質を認識するが(4)、APCにはE2 (UbcH10)は結合しておらず、また基質の認識を行う蛋白がAPCに含まれているか否かも不明である。その意味でも、手前みそではあるが、我々の見出したH10BHはAPCとUbcH10さらにサイクリンBを結び付ける

重要な蛋白質であると考えられる。なお、Kirschner, Nasmythらの報告した成分にH10BHと一致するものはない。

APCの活性制御

APCの活性制御については、Hershkoらが間期の不活性型cyclosomeをMPFとインキュベートすることにより活性型に変換されることを報告していた(16)。最近、理研の戸所一雄先生達により、MPFによりリン酸化を受け活性化されたPlk (polo-like kinase)がAPC1, APC3(CDC27), APC6(CDC16)の3成分を直接リン酸化することによりAPCの活性化を行うこと、さらにcAMP-dependent kinase (PKA)がAPC1とAPC3 (CDC27)をリン酸化しPlkによる活性化を乗り越えてAPCを不活性にすることを見出した(17)。京大の柳田充弘先生のグループも、cAMP/PKA系により分裂酵母のAPCが負に制御されていることを報告するとともに(13)、Cut4p(APC1)がユビキチン化されることによっても負に制御されていることをしめしている。またNiggらは、*Xenopus*においても polo-like kinase (Plx1)がM期の進行とサイクリンB等の分解に必須であることを報告している(18)。

APCは、サイクリンBのユビキチン化を行うだけでなく、サイクリンB同様にM期の後半でAse1や他の紡垂体蛋白質等のユビキチン化や、それ以前の姉妹染色分体の分離に関与するPds1やcut2のユビキチン化も触媒する。このように、少なくとも2つの時期、すなわちmetaphase-anaphase transition期とM期からの脱出期にそれぞれ厳密な基質特異性を発揮する。この基質特異性の制御については、WD-40 repeatを含むCdc20とそのホモログであるHct1/Cdh1がそれぞれの時期に関与すると考えられている。Visintinら(19)は出芽酵母においてCDC20の欠損がPds1の分解を抑制するがAse1やM期サイクリンの分解は抑制されないことを、またVisintinらとSchwabら(20)はHCT1/CDS1の欠損によりAse1とCib2の分解が抑制されるがPds1は影響を受けないことを報告している。また、*Drosophila*においてもCdc20のホモログであるfizzyとfizzy-related(fzr)がサイクリンの制御を行っており、fizzyの欠損ではanaphaseへの進行

が阻害される(21)。また、ヒトfizzy (p55cdc)はキナーゼと複合体を形成しているとの論文もある(22)。さらに、Kirschnerらは哺乳動物細胞でもfzrがAPCの活性化を引き起こしサイクリンBのユビキチン化を誘導すること、fizzyとfzrにはリン酸化体が存在することを学会報告しているが、詳細は不明である。

おわりに

以上述べてきたように、サイクリンBを含めたM期の進行に関与する蛋白質群のユビキチン化については非常に複雑であり、APCの全構成成分が同定された現在やっと主役（の一部？）が出揃ったにすぎない。SCFについても、哺乳動物では既知の成分だけでは活性が無いとの私信もあり、APC自体には強く結合していないか、あるいは結合していても微量のため未だ同定されていない蛋白質による制御が存在するものと思われる。今後は基質特異性を含めたAPCの活性制御機構の詳細な解明が期待される。

文献

1. King, R.W. et al. (1996) *Science* 274, 1652-1659.
2. Lane, H.A. & Nigg, E.A. (1997) *Trends Cell Biol.* 7, 63-68.
3. Osmani, S.A. & Ye, X.S. (1997) *Trends Cell Biol.* 7, 283-288.
4. Hoyt, M.A. (1997) *Cell* 91, 149-151.
5. Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) *Ann. Rev. Biochem.* *in press*.
6. King, R.W. et al. (1995) *Cell* 81, 279-288.
7. Aristarkhov, A. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4294-4299.
8. Yu, H. et al. (1996) *Curr. Biol.* 6, 455-466.
9. Townsley, F.M. et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2362-2367.
10. Sudakin, V. et al. (1995) *Mol. Biol. Cell* 6, 185-198.
11. Peters, J-M. et al. (1996) *Science* 274, 1199-1201.
12. Zachariae, W. et al. (1996) *Science* 274, 1201-1204.
13. Yamashita, Y.M. et al. (1996) *Nature* 384, 276-279.
14. Yu, H. et al. (1998) *Science* 279, 1219-1222.
15. Zachariae, W. et al. (1998) *Science* 279, 1216-1219.
16. Lahav-Baratz, S. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9303-9307.
17. Kotani, S. et al. (1998) *Mol. Cell* 1, 371-380.

18. Descombes, P. & Nigg, E.A. (1998) EMBO J. 17, 1328-1335.
19. Visintin, R. et al. (1997) Science 278, 460-463.
20. Schwab, M. et al. (1997) Cell 90, 683-693.
21. Sigrist, S.J. & Lehner, C.F. (1997) Cell 90, 671-681.
22. Weinstein, J. et al. (1994) Mol. Cell Biol. 14, 3350-3363.

(東京薬科大学：田中弘文)

表 1. Anaphase-promoting Complex (APC)の構成成分

<i>Xenopus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Human	Motif
APC1 220K(210K)	Apc1p	Cut4	APC1 (1944aa)	
APC2 112K	Apc2p (YLR127c)		APC2 (822aa)	cullin
APC3 130K	Cdc27p	Nuc2	CDC27 (823aa)	TPR
APC4 100K	Apc4p (YDR118w)		APC4 (808aa)	
APC5 82K	Apc5p (YOR249c)		APC5 (755aa)	
APC6 78K(75K)	Cdc16p	Cut9	CDC16 (619aa)	TPR
APC7 69K			APC7 (563aa)	TPR
APC8 69K(66K)	Cdc23p	Hcn1	CDC23 (591aa)	TPR
	Apc9p (YLR102c)			
	Apc10p (Doc1p)			
	Apc11p (YDL008w)			RING
	Cdc26p			
	Apc13p			

4 SCF複合体による「選択的」かつ「時期特異的」な

ユビキチン化

Cdc34はG1/S期の進行に必須なユビキチン結合酵素E2である。これまでにS期サイクリン依存キナーゼSic1、G1サイクリン、Cdc6およびFar1など、複数の細胞周期制御蛋白質のユビキチン化にCdc34が関わっていることが明らかにされている。しかしながら、これらの蛋白質が「選択的」かつ「時期特異的」にユビキチン化される機構については不明であった。最近になって、Cdc34経路で作用するE3ユビキチンリガーゼがSCF-(Skp1-Cdc53-F-box proteins)複合体であるというモデルが出され、この問題に対して多くの進展が見られた。

SCF複合体はSkp1、Cdc53およびF-box蛋白質からなる複合体である〔文献1・2・3〕。Cdc53はSkp1と結合する。Skp1はCdc53と結合すると同時にF-box蛋白質と結合する。ここでF-box蛋白質とは、F-boxモチーフを持つ蛋白質で、このモチーフを用いてSkp1と結合する〔文献4〕。この複合体がユビキチンライゲースE3であるといわれる所以は、この複合体がE2であるCdc34とユビキチン化の標的蛋白質を結合するからである。すなわち、(1) Cdc53はCdc34を結合し、Cdc34とSkp1-F-box蛋白質のスキヤフォールドとして機能する〔文献3〕。また、(2) F-box蛋白質はF-box以外のモチーフ、たとえばWD40リピートあるいはロイシンリッチリピートを持ち〔文献4〕、このモチーフでユビキチン化の標的蛋白質を結合する(F-box蛋白質は基質認識に関わる)。

ゲノム解析の結果、出芽酵母には複数のF-box蛋白質が存在しており〔文献4〕、後述するとおり、個々のF-box蛋白質が特定の基質のユビキチン化に関与することが遺伝学的に示されている。したがって、F-box蛋白質は基質の「選択的」なユビキチン化を担うと考えられる。

1 「選択的」なユビキチン化を担うF-box蛋白質

これまでに発芽酵母で機能が報告されているF-box蛋白質は3種あり、それらが認識する蛋白質と細胞周期の制御についてまとめた。

(1) Cdc4

Cdc4はS期サイクリン依存キナーゼインヒビター-Sic1の分解に関与する〔文献5〕。S期サイクリンをコードするCLB5/CLB6はG1後期に発現する。しかしながら、Clb5/Clb6はCdc28と結合しても活性を持たない。それは、M期後期よりSIC1が発現しているからである。すなわち、Sic1はClb5/Cdc28およびClb6/Cdc28と結合し、それらの活性を抑制する。しかし、Sic1はG1後期にCln/Cdc28によりリン酸化されるとユビキチン化され分解される。その結果、Clb5/Cdc28およびClb6/Cdc28が活性化しS期に進行する。

Sic1のユビキチン化には、Cdc34と、SCFCdc4 (Skp1、Cdc53、F-box蛋白質であるCdc4)が関与する〔文献1・2〕。したがって、SCFはS期の進行制御に必須の役割を果たす。Cdc4はリン酸化されたSic1と結合する。この結合には、Cdc4に存在するWD40リピートが関与する (*in vitro*)。また、バキュロウイルスで生産したCdc4、Cdc53、Skp1と大腸菌で生産したCdc34、Uba1 (E1)、ユビキチンを用いてSic1のユビキチン化が再構成され、Skp1、Cdc53、Cdc4がE3として機能することが最初に証明された例である。

また、Cdc6もSCFCdc4に依存してユビキチン化されると考えられる〔文献6〕。Cdc6は、DNA複製起点でのpre-replicative complexの形成に必須である。Cdc6は、その蛋白質量は細胞周期に応じて変動し、G1期でピークとなるが、*cdc4*株ではCdc6は安定化される〔文献6〕。Druryらは、Cdc6と結合する蛋白質としてTwo-hybrid systemを用いてCdc4を同定した〔文献7〕。この場合も、Cdc4のWD40リピートがCdc6の結合に関与する。SCFによるCdc6の分解は、複製開始した複製起点で再びpre-replicative complexが形成されるのを妨げる一つの方法である。

Far1は、接合フェロモンに依存した細胞周期の停止に必須で、G1サイクリンに結合してその活性を阻害する。Far1は*cdc34*株で安定化され、酵母抽出液を用いたユ

ビキチン化実験で、Far1はCdc34およびCdc4に依存してユビキチン化される〔文献8〕。Far1の分解は、接合フェロモンにより細胞周期を停止した細胞が再び細胞周期を進行するのに必須である。

(2) Grr1

GRR1はこれまでに、大きくわけて3つのスクリーニングで分離されてきた。まず、(1) FlickとJohnstonは、出芽酵母ではグルコース存在下ではガラクトース代謝に必要な遺伝子の発現は抑えられているが、この機能の欠損株を分離し、この原因遺伝子をGRR1 (Glucose Repression Regulation)とした〔文献9〕。次に、(2) Barralらは、G1サイクリンを安定化する変異株を分離し、原因遺伝子としてGRR1をクローン化した〔文献10〕。彼らは、分離した*grr1*変異株にグルコースリプレッションの欠損を示す*grr1*変異のサプレッサー*rgt1*を導入したが、G1サイクリンは依然安定化したままであった。したがって、GRR1にはグルコースリプレッションの調節とG1サイクリンの代謝に関与していることが示された。さらに(3)我々は、*cdc34 sic1*二重変異のサプレッサーの原因遺伝子としてGRR1をクローン化し、GRR1がユビキチン系で作用することを明らかにした〔文献11〕。また我々は、*cdc34 sic1*二重変異株にGRR1を過剰発現すると*cdc34 sic1*二重変異株の制限温度が低下することを見だし、これの多コピーサプレッサーをスクリーニングした結果、SKP1をクローン化し、Grr1とSkp1が結合することを見いだした。ちょうどこのころ、Cdc4とF-boxモチーフの論文〔文献4〕が出て、Grr1に新たに見いだされたF-boxモチーフがあり、Grr1-Skp1の結合がF-boxに依存することを示した〔文献11〕。Grr1-Skp1に関しては、(1)でGRR1をクローン化したJohnstonのラボからも報告がなされた。彼らはGrr1と結合するものをTwo-hybrid systemを用いてSKP1をクローン化した〔文献12〕。

以上のことから、SCFGRR1はG1サイクリンのユビキチン化およびグルコースリプレッションに関与する蛋白質のユビキチン化に関与することが示唆される。しかしながら、*in vitro*のユビキチン化の実験(先のSic1のユビキチン化と同様の系)で

は、G1サイクリンのユビキチン化を検出することはできなかった〔文献1〕。これに対して我々は、Grr1はリン酸化したCln2と*in vitro*および*in vivo*で結合すること、Grr1のロイシンリッチモチーフがCln2との結合ドメインであること、また、ロイシンリッチモチーフの一部を欠失した*grr1*変異株(この変異型Grr1はSkp1とは結合できるがCln2とは結合できない)ではCln2が安定化することを明らかにしており、Grr1がSCFの構成員として機能することは間違いないと思われる〔文献13〕。

(3) Met30

Met30はメチオニン存在下でのメチオニン合成系の遺伝子の発現を抑制することが知られていたが、PattonらはCdc53と結合する蛋白質としてTwo-hybrid systemを用いてMet30を同定した〔文献3〕。Met30はF-boxを持ち、Skp1を介してCdc53と結合する。また、Met30はCdc4と同様にWD40リピートを持つ。*MET30*のドミナントネガティブアリアルである*MET30-1*を持つ株では、メチオニンに依存して抑制される*MET25*の発現は脱抑制される。今のところ、標的蛋白質は不明である。*cdc4*株ではG1サイクリンの分解およびメチオニン存在下での*MET25*の発現パターンは正常であるので、Cdc4はこれらの制御には機能していない。同様に、*grr1*株ではS期の進入は正常におこり、また、メチオニン存在下での*MET25*の発現パターンにも異常はない。さらに*MET30-1*株ではS期の進入およびG1サイクリンの分解は正常である。したがって、F-box蛋白質が基質の「選択性」の担い手であるといえる。

2 「時期特異的」なユビキチン化

次に「時期特異的」ユビキチン化はどのように保証されているのか考察したい。

(1) 基質のリン酸化

前述したとおり、Sic1はCln/Cdc28によってリン酸化される。このリン酸化はG1後期に起こる。また、Sic1は*cdc34*株の制限温度下ではリン酸化フォームで蓄積すること、*cln1 cln2 cln3*三重変異株は*inviable*であるが、*cln1 cln2 cln3 sic1*四重変異株は*viable*である〔文献14〕ことは、Sic1の分解にはG1サイクリンに依存したリン酸化

が必須であることを示唆する。さらに、*in vitro*でSCFCdc4はリン酸化フォームのSic1とのみ結合する〔文献1. 2〕。

同様に、G1サイクリンCln2もG1後期にPEST配列を含む領域がリン酸化される。このPEST配列を欠くCln2は安定化される。また、*grr1*株ではCln2はリン酸化フォームで蓄積する〔文献10〕。さらに、前述の通り*in vitro*および*in vivo*において、Cln2はリン酸化に依存してGrr1と結合する。

以上のことは、基質蛋白質の、リン酸化に依存したSCF複合体への結合が、「時期特異的」ユビキチン化を保證するメカニズムであることを示唆する。Cdc6とFar1については、リン酸化に依存してSCFCDC4と結合するかどうかについては報告がないが、Cdc6はPEST配列を持ちリン酸化されること、Far1は*cdc34*株では制限温度においてリン酸化フォームで蓄積することは、これらもリン酸化がユビキチン化の引き金となっていることを示唆する。

(2) SCF自身も修飾により活性が調節されているのではないか？

しかしながら、基質のリン酸化だけが、「時期特異的」ユビキチン化を保證するメカニズムではないように思われる。BlondelとMannは、Cln2の分解にはG2期およびM期サイクリンが必要である、と報告している〔文献15〕。これは、Sic1とCln2の分解される順序を規定するメカニズムがあることが示唆される。すなわち、G2期およびM期サイクリンはSic1が分解されてS期に進行して初めて活性を持つので、Cln2はSic1が分解された後に分解されることになる。この制御は、Cln2はSic1の分解を誘導するという事を考えると、G1期からS期の進行に必要な制御である。

今のところG2期およびM期サイクリンがCln2の分解に対して何を制御しているのかについては不明であるが、サイクロソームの活性がリン酸化脱リン酸化で制御されるように、SCFの活性もG2期およびM期サイクリン/Cdc28に依存したリン酸化で制御されている可能性はあるのではないだろうか？ 私はこの可能性を現在、検討中である。

今後の展望

SCF複合体の活性制御は、今後の研究の一つの方向となろう。SCGGRR1がG2期およびM期サイクリン/Cdc28で制御される可能性とは別に、グルコースによって、Grr1-Skp1のアフィニティーが上がるという報告もある〔文献12〕。これは、栄養状況による遺伝子発現の調節と細胞周期の調節をリンクするメカニズムの存在を意味するのかもしれない。

また、Cdc53はRub1(Ubiquitin Related protein)によって修飾されることがLammerらによって明らかにされた〔文献16〕。この修飾自体は成育に必須ではなく、今のところ意義は不明であるが、たとえば、SCF複合体のアセンブリーに関与する、基質の選択制に関与する、あるいは、mitosisとDNA replicationをカップリングするチェックポイントである、などの可能性が考えらる。

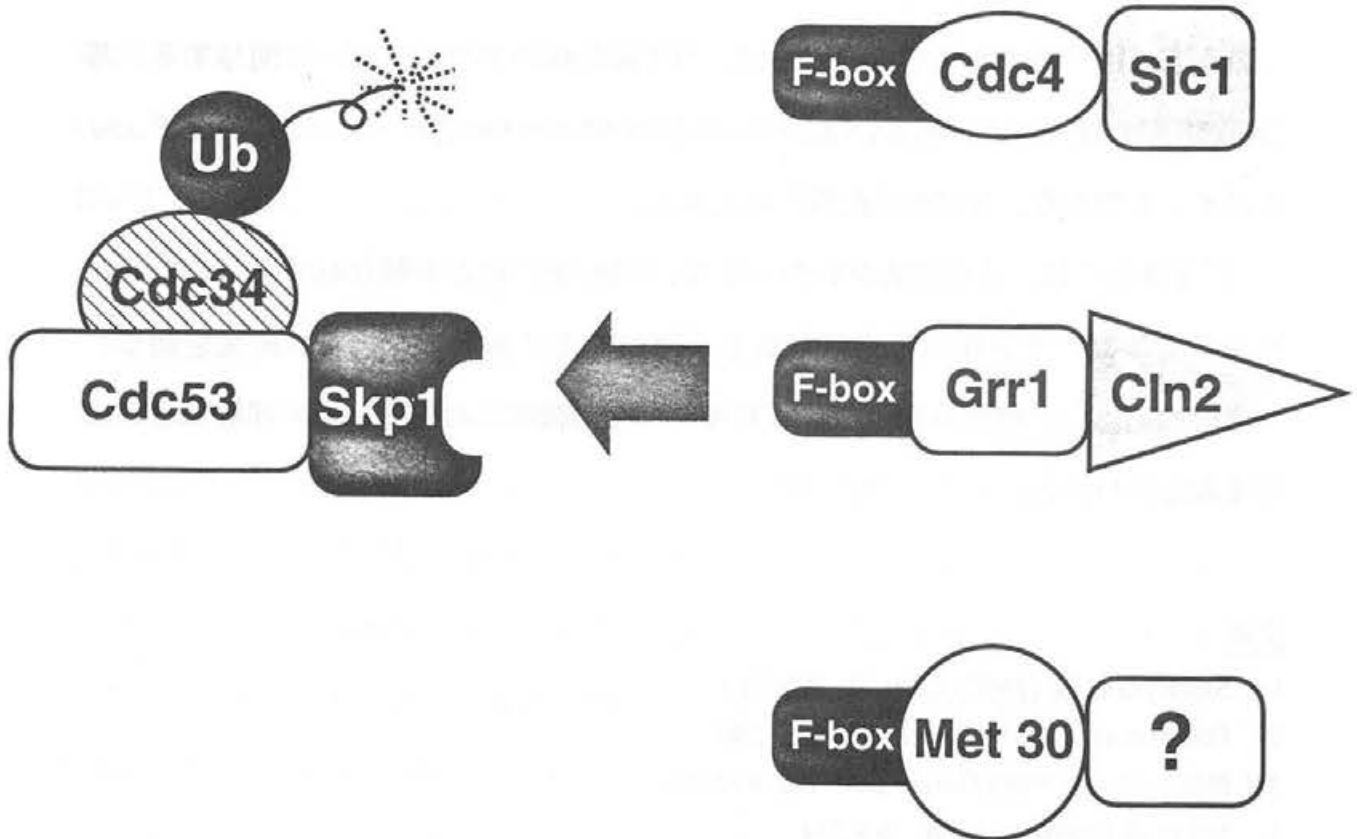
出芽酵母には、まだ機能がわかってないF-box蛋白質が6種存在する。これらが担当するユビキチン化の標的蛋白質も不明のままである。これらの研究を通じ、「選択的」かつ「時期特異的」なユビキチン化の機構に対する我々の理解はさらに深まると思われる。

文献

1. Skowyra et al. (1997) Cell 91, 209-219
2. Feldman et al. (1997) Cell 91, 221-230
3. Patton et al. (1998) Genes Dev. 12, 692-705
4. Bai et al. (1996) Cell 86, 263-274
5. Schwob et al. (1994) Cell 79, 233-244
6. Piatti et al. (1996) Genes Dev.10, 1516-1531
7. Drury et al. (1997) EMBO J.16, 5966-5976
8. Henchoz et al. (1997) Genes Dev. 11, 3046-3060
9. Flick and Johnston (1991) Mol. Cell Biol. 11, 5101-5112
10. Barral et al. (1995) Genes Dev.9, 399-409
11. Kishi et al. (1998) Mol. Gen. Genet. 257, 143-148
12. Li and Johnston (1997) EMBO J. 16, 5629-5638
13. Kishi et al. submitted

14. Schneider et al. (1996) Science 272, 560-562
15. Blondel and Mann (1996) Nature 384, 279-282
16. Lammer et al. (1998) Genes Dev.12, 914-926

(国立遺伝学研究所：岸 努)



5 血液凝固反応はどのようにして始まるのか：血中活性型凝固第

VII 因子 (VIIa) の意義

はじめに

"ぷろておりしす"は細胞内での蛋白質分解に関するイベントを主に取り扱っているので、細胞外で起こるプロテオリシスとして広く知られる血液凝固反応機構は少しフォーカスがずれているかもしれないが、近年その機構の解明が著しく進んだので凝固の開始反応に関する知見をまとめてみたい。臨床医向けに既にまとめたものがある(1)。入手しにくいものもあるので、Eメールでお知らせ下されれば別刷りをお送りできます(miyata@ri.ncvc.go.jp)。

血液凝固反応には陰電荷物質(例えばガラス)で惹起される内因系凝固反応と組織因子で始まる外因系凝固反応がある。内因系凝固反応をとり行なう因子(XII因子、XI因子、プレカリクレイン、高分子キニノーゲン)の各先天性欠損症ヘテロ接合体患者が同定されているものの、出血をおこさないため、これらの因子が引き金となって脳梗塞や心筋梗塞が起こるとは考えられていない。一方、外因系凝固(この言葉は血液だけでは固まらず、固めるには組織片のような物を外から加えないといけないことに由来する)は、数多くの所見から生体内の血栓形成の経路であると結論されている。この外因系凝固が血管内でおこると、脳梗塞や心筋梗塞をおこす。因みに、両疾患は日本人の死因の2位と3位であり、両者をあわせると1位のガンによる死亡を凌ぐ。このように、外因系凝固の血管内での作動は、ヒトにとって文字通り致命的である。

外因系凝固の開始反応機構

外因系凝固反応では、活性型凝固第VII因子・組織因子(VIIa・TF)複合体がIXとXを限定分解を伴って活性化し、IXaはVIIIaの存在下でXを活性化し、生成したXaがVaの存在下でプロトロンビンをトロンビンに変換し活性化する。また、このよう

にして生成したXaはVII・TF複合体中のVIIを活性化し、トロンビンはVやVIII、IXをフィードバック機構で活性化する。このような反応により凝固反応は増幅される。しかし、なによりも凝固の開始反応に重要なイベントは、2つの蛋白質（TFとVIIa）の結合である。

TFは膜貫通領域を有する一本鎖の糖蛋白質であり、219残基の細胞外ドメインがVIIおよびVIIaの結合領域である。通常TFは血液が接する内皮細胞や単球に発現していない。TFは血管外膜を構成する平滑筋細胞に恒常的に発現しており、外傷などではこのTFが止血機能を発揮する。一方、グラム陰性菌由来のリポ多糖（LPS）や炎症性サイトカインにより、TFは単球や内皮細胞上に発現誘導され、汎発性血管内凝固症候群（DIC）や血栓症をおこす原因となる。TF遺伝子の転写調節は文献2を参照してください。

開始反応に必須のもう一つの蛋白質は、活性型凝固第VII因子（VIIa）である。ここで指摘しておきたいことは、前駆体のVIIではなくて活性型因子が必要である点である。前駆体のVIIは、TFと結合してもプロテアーゼ活性を示さない。VIIaとは、VII中のArg152-Ile153結合が水解された2本鎖型のプロテアーゼのことである。ここでプロテアーゼというのは誤解を与えるかもしれない。というのも、VIIa単独では合成基質水解活性もX活性化能も極めて低いからである。VIIaはTFに結合すると 10^3 - 10^4 倍活性が増大し、一人前のプロテアーゼになる。この増大は主にkcat値の上昇に起因する。即ち、TFに結合したVIIaは、IXやXの活性化の触媒効率が高くなる。事実、VIIa-TF複合体の結晶構造解析によると、TFはVIIaの触媒ドメインに結合している（3）。また、TFが結合すると、VIIaの触媒ドメインのN末端Valのアミノ基が分子内に入りこんで、キモトリプシンの活性化で明らかとなっている様に、活性中心Ser残基の1つ前にあるAspの側鎖と塩結合することも明らかとなっている（4）。逆にいうと、VIIa単独でプロテアーゼ活性が低いのは、この塩結合が形成されていないからである。このように、血漿中のVIIaはそれ自身では凝固能はなく、組織に発現しているTFと複合体を形成してはじめて凝固能を獲得する。したがって、凝固

反応はTFを発現している局所で進行する。

プロトロンビンやX、IX、VIIの血中濃度は、各々1.4 μ M、140nM、90nM、10nMである。これらのプロテアーゼ前駆体は、いずれも僅かながら生体内で活性化されている。しかし、その結果生じる活性型因子はVIIaを除いて血中に検出されない。というのも、活性型因子は血漿中のアンチトロンビンIIIなどのプロテアーゼインヒビターにより素早く不活性化され、網内系にとりこまれてクリアランスされるからである。VIIaはTFと結合するとアンチトロンビンIIIで不活性化されるが、先述の如くVIIa単独では酵素活性が極めて低いため、血中インヒビターで中和されずに安定に循環しているものと考えられる。因みに、VIIとVIIaの血中半減期は4時間と2.5時間であり余り変わらない。他の活性型凝固因子の半減期は約20分である。

VIIaの測定法

血漿中にはVIIaがわずかではあるが（総VII因子量の0.5-1%に相当する量）循環していることが判明した。この血漿中のVIIa量は、可溶性TFを用いた凝固時間法で測定される。これまでVII因子はVII抗原量とVII凝固活性として測定されていた。VII凝固活性は、試料をVII欠乏血漿およびTF、Ca²⁺と混合し凝固時間を測定する方法で求められる。この方法では測定中にVIIがVIIa・TF複合体により自己活性化されるため、測定値はVIIを反映しているのか、VIIa量を反映しているのか曖昧であった。この測定法でTFに代わって細胞外ドメインだけから成る可溶性TFを用いると、VIIの自己活性化反応が抑えられ、その結果、測定値はVIIa量を反映する。この性質を用いて可溶性TFを用いたVIIa測定法が開発された（5）。

VIIa量の意義

凝固反応がVIIaとTFで始まるということは、血中VIIa量の上昇は心筋梗塞や脳梗塞といった血栓性疾患の原因となることが考えられる。VIIa量と発症疾患の関係は、卵が先か鶏が先か、という問題と似ている点があるが、これを解決するために

コホート研究が待たれる。少々古いが、1986年に行なわれたNorthwick Park Heart Studyというコホート研究がある(6)。この研究は、VII凝固活性、フィブリノーゲンおよびコレステロールが虚血性心疾患の独立したリスクファクターであることを示したが、ここで用いられたVII凝固活性測定法は、通常のVII凝固活性測定法とは異なったVII欠乏血漿を試薬として用いたため、実はVIIa量を反映していたことが最近になって判明した。即ち、本コホート研究は、VIIa量が高くなると心筋梗塞がおこり易くなることを示している。現在、2nd Northwick Park Heart StudyがVIIa量を含めて行なわれている。80年代に比べて、心筋梗塞患者数が少なくなったため、2nd Studyのデータのとりまとめが遅れていると聞く。私達も国内でVIIaを取り入れたコホート研究を進めているが、イギリス人より心筋梗塞の発症が少ない日本人を対象としているため、データのとりまとめは21世紀になると考えている。

血中VIIa量を測定すると、日本人では平均2.7 ng/mlであった。欧米人の平均値は3.6 ng/mlもしくは4.3 ng/mlと報告されていることから、日本人の血中VIIa量は欧米人に比較して低い(5)。このことは、日本人は欧米人より虚血性心疾患が少ないことと関連しているのかもしれない。また、心血管系疾患患者や糖尿病患者のVIIa量は健常人に比べて高い。VIIa量は個人差がある。6週間にわたって7人のVIIa量を追跡したところ、5 ng/ml程度の高値を示す人はいつもこの程度の高い値を示し、2 ng/mlという低値を示す人はいつも低値を示した。このことは、VIIa測定法を用いて高値を示す人を同定し、何らかの方法でVIIa量を下げて心筋梗塞等の発症を未然に防ぐことができる可能性を示唆している。

VIIaはどのようにして生成するのか

試験管内の反応では、VIIはXaによって限定分解をうけ活性型となる。生理的にも、Xaによる活性化が重要であると考えられている。この他にも、VIIはIXa、XIIa、トロンビン、VIIa・TF複合体によっても活性化される。VIIIとIXの先天性欠乏症を血友病AおよびBという。IXはプロテアーゼ前駆体で、活性型のIXaは補助因子であ

るVIIa因子の存在下でXを活性化する。血友病B患者（IX欠乏症）のVIIa量は極めて低い（正常人の8%）ので、生体内でのVIIaの生成にはIXが関与している（7）。しかし、血友病A患者（VIII欠乏症）のVIIa量は正常人の62%で、あまり低くない。試験管内の反応ではXIIaがVIIを活性化するが、XII因子欠乏症患者のVIIa量は正常値を示したので、XIIは生体内でのVIIaの生成に関与していないと考えられる。血中VIIa量は、脂質の多い食事をとると上昇することも示されている。VIIは肝で合成され分泌される。この肝細胞で既に一部は活性型に変換されていると考える報告がある。肝細胞にはヘプシンとよばれる膜結合型セリンプロテアーゼが存在する。このヘプシンがVIIを活性化すると報告された（8）。この仮説を調べるため、ごく最近ヘプシン遺伝子欠損マウスが発生工学の手法で作成された。この学会発表の報告をみる限り、ヘプシン依存性のVIIa生成はないようである。

VIIaの医薬品としての応用

VIIaはTFと結合してはじめて凝固能を発現するため、先天性の凝固因子の欠乏による出血症に使用すると局所で止血作用を発揮する。出血傾向を示す血友病患者のうち、特にIXやVIIIに対する自己抗体保有患者の止血にVIIaは極めて有効である。また、VIIaをクロロメチルケトンで不活性化したものは、TFにたいする親和性がVIIaより高い（4）。そこで、血栓形成を防ぐため不活性化VIIaを静注し、TFの凝固活性をブロックすることが試みられており、かなり良い成績を納めている。将来、このようなアイデアに基づいた抗血栓性製剤が現われるかもしれない。

文献

- (1) 苅尾七臣、松尾武文、宮田敏行. 臨床病理、43、1201—1208、1995；苅尾七臣、松尾武文、阪田敏幸、加藤久雄、宮田敏行. 循環器病研究の進歩、16、176—186、1995；宮田敏行. 血液腫瘍科、35、539—545、1997
- (2) 宮田敏行. 医学のあゆみ、182、273—277、1997；Mackman, N., FASEB. J., 9, 883-889, 1995.
- (3) Banner, D. W., D'Arcy, A., Chene, C., Winkler, F. K., Guha, A., Konigsberg, W. H.,

- Nemerson, Y., Kirchhofer, D. *Nature*, 380, 41-46, 1996.
- (4) Higashi, S., Matsumoto, N., Iwanaga, S. *J. Biol. Chem.*, 271, 26569-26574, 1996.
- (5) Morrissey, J. H., Macik, B. G., Neuenschwander, P. F., Comp, P. C. *Blood* 81, 734-744, 1993 : Kario, K., Miyata, T., Sakata, T., Matsuo, T., Kato, H. *Arterioscler. Thromb.*, 14, 265-274, 1994.
- (6) Meada, T. W., Mellows, S., Brozovic, M., Miller, G.J., Chakvabarti, R. R. *Lancet* ii, 533-537, 1986.
- (7) Wildgoose, P., Nemerson, Y., Hansen, L. L., Nielsen, F. E., Glazer, S., Hedner, U. *Blood* 80, 25-28, 1992.
- (8) Kazama, Y., Hamamoto, T., Foster, D. C., Kisiel, W. *J. Biol. Chem.*, 270, 66-72, 1995.

(国立循環器病センター研究所：宮田敏行)

(6) トピックス

1 分子シャペロンHsp70の新しい酵素活性、NDPキナーゼの発見 と、作用機構の新仮説

はじめに

全ての蛋白質は、細胞内で合成されると共に必ず分解されている。分解の主役は本重点領域研究のキーワードの蛋白質分解酵素であるが、蛋白質分解酵素は出会う基質蛋白質をかたっぱしから分解しているわけではなさそうである。それでは分解を受けずに作用しつづける蛋白質と分解される蛋白質を蛋白質分解酵素はどのようにして識別しているのだろうか。これまでに様々な蛋白質分解酵素が識別するシグナルが研究されてきたが、こうした研究の基本的な考え方には、分解を受ける基質と受けない基質には様々な修飾や立体構造の変化によって両者は識別されるという前提がある。このように考えてくると、蛋白質の立体構造変化を誘起したり、おそらくは化学修飾や立体構造変化を識別する能力を持つ分子の実体としての分子シャペロン蛋白質群を、このシステムの中で考えなくてはならない。このように、蛋白質分解酵素と分子シャペロン蛋白質は車の両輪のごとくイメージされるのだが、具体的なデータに関しては、まだそれほど決定的なデータがあるわけではない。

筆者の教室では若手の研究者がこの問題に真っ向から取り組み始めたが、どうせやるなら、分子シャペロンと言われている分子そのものの性質を徹底的に理解してみたいということになった。分子シャペロンの機能はよく調べられているが(1-3)、その作用機序と言うと、解っていないことがあまりにも多い。しかも、この蛋白質の持つ唯一の酵素活性がATPaseと教科書に載っているが、酵素反応速度論的にこれを調べてみると、まるで理論通りでないことが判明した。色々悩み抜いた末、酵素反応中間体をとらえて反応論の大筋を明らかにしたところ、最終的には分子シャペロン蛋白質Hsp70の持つ酵素活性は、これまでに言われているようなATPaseではな

くて、Nucleoside Diphosphate (NDP) Kinase に類似した酵素活性であることが判明した。

分子シャペロン蛋白質 Hsp70, DnaK, 14-3-3蛋白質(MSF)は、酵素活性としていわゆる "シャペロン型 NDP Kinase" 活性を持つ

Hsp70, DnaK蛋白質には、これまで弱いATPase活性があるとされていた(4,8)。我々も、この酵素活性をATPからADPへの変換をマーカーに測定した場合と遊離したPiの定量で測定したところ、反応の初速度はこれまでと大きな違いはないが、時間とともに両者の測定結果にギャップが認められることを見出した。さらに、反応システムにProduct inhibitorのADPを入れると、予想に反して図1Aに示すように6倍近くATPの分解活性の上昇が認められ、これらのシャペロン蛋白質には他の酵素活性が混入しているかHsp70の酵素活性が今まで言われているようなATPase活性ではないことが示唆された(9,10)。そこで、逆反応としてのATP合成活性を $[^{14}\text{C}]$ ADPから $[^{14}\text{C}]$ ATPへの変換で測定してみると、図1Bに示すように明らかなADPからATPへの合成反応が認められ、しかもATPase活性と似たような反応速度で酵素反応が進んでいることが判った。なお、図1AのADPによるATPase活性の促進効果はAMPでは認められず、更にATP合成反応系においてもAMPは何の効果も認められなかった。以上のことからHsp70やDnaK蛋白質にはNDPKinase (11-13)様の酵素活性があり、この反応はAdenylate kinaseやATP synthaseとは異なる反応であることが明らかとなった。

Hsp70のATPからADPへの変換反応における基質ATPの K_m 値は、0.5mMのADP存在下で4.3mMを、逆にADPからATPへの変換反応における基質ADPの K_m 値は、5mMのATP存在下に0.31mMを示し、いずれも細胞質内の生理濃度のATPとADPレベルよりわずかに低い値を示した。このことは、細胞内のATP, ADPレベルの変化に伴って、Hsp70のNDP Kinase様活性は大きく変化することを意味している。

しかし、Hsp70の持つNDP Kinase様活性は、これまでに報告されているような分

分子量16kDaのNDP Kinase(11-13)とは、種々の点で性質を異にする。通常のNDP Kinaseはリン酸供与体としていずれのNucleoside Triphosphateもほぼ同じように利用するが、Hsp70の場合ATPを最も良いリン酸供与体とし、dATP, GTPなどその他のNucleoside Triphosphateがリン酸供与体となった場合、反応速度は約1/3以下に低下する。また、ATPアナログのAMP-PNP, ATP γ Sでは全く活性は認められなかった。更に、リン酸基受容体としての基質特異性は、NDP KinaseがいずれのNucleoside Diphosphateも良い基質とするのに比べ、GDPやdGDPが特に基質になりやすく、他の核酸はいずれもリン酸基受容体になりうる事が明らかとなった。以上の基質特異性は、分子シャペロン蛋白質の種類の違いによって多少の差は認められるが、いずれの場合もこれまでに報告されているNDP Kinaseの特異性と異なることから、このようなNDP Kinase活性を"分子シャペロン型 NDP Kinase" と総括することにする。

Hsp70は酵素反応中間体として自己リン酸化反応中間体を形成する。

NDP Kinaseは、Histidine Kinaseと同様、Nucleoside Triphosphateの γ 位のリン酸を活性中心のHistidineに転移し、この時点で自己リン酸化酵素反応中間体を形成する(11-13)。その後、基質としてのNucleoside Diphosphateにリン酸を転移することが知られている。図2に示す如く我々は、Hsp70分子に自己リン酸化反応中間体の検出と、Nucleoside Diphosphateに依存した自己リン酸化反応中間体の減少と同時にNucleoside Triphosphateの形成を検出することに成功した。このことは、Hsp70蛋白自体がNDP Kinase作用としてのリン酸基転移反応の母体になっていることを証明したもので、その他のいくつかの傍証も加えて、Hsp70のNDP Kinase様作用はHsp70の分子そのものによるものによるもので、混在する他の蛋白質によるものではないことを立証した。また、このリン酸化反応中間体は、酸性条件下ですぐに消滅することから、塩基性アミノ酸のHis, Lys, Argのリン酸化であることが推定されており、Ser, Thr, Tyrのリン酸化ではないことが明らかとなった。

Hsp70の持つシャペロン型NDP Kinase作用の新仮説

分子シャペロンHsp70と基質蛋白質の解離、会合は、Hsp70に結合するADPとATPによって調節されていることが知られている。すなわち、図3に示すように、ADPが結合したHsp70はNon-nativeな基質蛋白質と強く結合し、その結果、基質はNative/Activeな基質蛋白質になると推定されているが、その後、Hsp70がATPの結合型に入れかわると共に基質蛋白質は解離し、Hsp70は再び新たな基質を迎え入れるべくADP結合型に戻る。ここにATPase活性が関与すると思われる。以上のサイクルが順次回転してゆくためには、ADP/ATPの交換反応が絶えず起り、その反応の強さは調節されていなくてはならない。従来バクテリアのHsp70蛋白質類似体のDnaKでは、DnaK蛋白質の活性調節因子としてDnaJが、そしてADPからATPへの交換反応を促進するGrpEが知られていたが、eukaryoteの細胞質内にはこれらの調節因子に相当する因子がいまだに発見されていない(3,15-18)。上記の我々の発見は、Hsp70やDnaK蛋白そして14-3-3蛋白質(三原等の言うMSF)は、自らがADP-ATP変換反応を行うことを示している。すなわち、生理濃度のATP(5mM)とADP(0.5mM)の存在下では、これらのシャペロン分子は基質分子と会合し、立体構造の変換を行って基質を解離するサイクルを回しつつける。Hsp70の持つこのような酵素反応をさらに調節する因子群が、細胞質に存在している可能性はある。

最近NDP Kinaseに、Protein Kinaseと同様、Phospho-histidine 中間体から蛋白質内のSerかThrにリン酸基を転移する反応のあることが知られてきた。Hsp70の持つシャペロン型NDP Kinase活性の場合も、リン酸基をNucleoside Diphosphateだけでなく、リン酸化反応中間体から基質蛋白質に転移させ、その結果、基質蛋白質の立体構造変化を誘導しているケースがあるのではないかと想定している。この考え方は"何故どのようにして分子シャペロン蛋白質が基質蛋白質の立体構造を変えるだろうか"という、未解決でしかも本質的な分子シャペロン作用の疑問にヒントを投げかけ

ているように思われる。我々のグループは、蛋白質分解酵素の基質認識機構の解明を前提として分子シャペロン蛋白質の持つこれらの可能性につき現在解析を続けている。

文献

1. Georgopoulos, C., and Welch, W. J. (1993) *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 601-634.
2. Hendrick, J. P., and Hartl, F. U. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
3. Hartl, F. U. (1997) *Nature* **381**, 571-580.
4. McCarty, J. S., and Walker, G. C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 9513-9517.
5. Blond-Elguindi, S., Fourie, A. M., Sambrook, J. F., and Gething, M. -J. H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12730-12735.
6. Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L., and Fink, A. L. (1993) *FEBS Lett.* **336**, 124-128.
7. Sadis, S., and Hightower, L. E. (1992) *Biochemistry* **31**, 9402-9412.
8. Rassow, J., Voos, W., and Pfanner, N. (1995) *Trends Cell Biol.* **5**, 107-121.
9. Hiromura, M., Yano, M., Mori, H., Inoue, M., and Kido, H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 5435-5438.
10. Yano, M., Mori, S., Niwa, Y., Inoue, M., and Kido, H. (1997) *FEBS Lett.* **419**, 244-248.
11. Biondi, R. M., Walz, K., Issinger, O-G., Engel, M., and Passeron, S. (1996) *Anal. Biochem.* **242**, 165-171.
12. Deville-Bonne, D., Sellam, O., Merola, F., Lascu, I., Desmadril, M., and Veron, M. (1996) *Biochemistry* **35**, 14643-14650.
13. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
14. Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L., and Fink, A. L. (1993) *FEBS Lett.* **336**, 124-128.
15. Leung, S-M., and Hightower, L. E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2607-2614.
16. Schmid, D., Baici, A., Gehring, H., and Christen, P. (1994) *Science* **263**, 971-973.
17. Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L., and Fink, A. L. (1993) *FEBS Lett.* **336**, 124-128.
18. Prasad, K., Barouch, W., Greene, L., and Eisenberg, E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23758-23761.

(徳島大学分子酵素学研究センター：木戸 博)

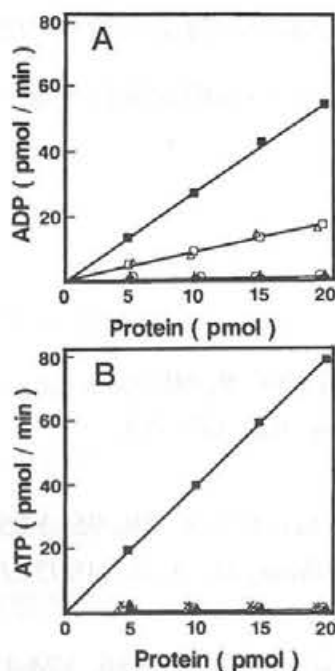


FIG. 1. The ATP hydrolysis and ATP synthesis activities of Hsp70. A, the activities of ATP hydrolysis of Hsp70 (■, □, △) and BSA (●, ○) were assayed under the conditions given under "Experimental Procedures" using 0 to 20 pmol of each protein (monomeric form), 5 mM ATP, 0.05 μ Ci of [3 H]ATP, and 6 mM MgCl₂ in the presence (■, ●) or absence (□, ○) of 0.5 mM ADP. The activity in the presence of 0.5 mM AMP instead of 0.5 mM ADP (△) was also analyzed. After a 30-min reaction at pH 8, samples were analyzed by TLC, and ADP formation was calculated with an imaging analyzer. B, the ATP synthesis activities of Hsp70 (■, □, △, ×) and BSA (●, ○) were assayed under the conditions given under "Experimental Procedures" using 0.02 μ Ci of [3 H]ADP in the presence (■, ●) or absence (□, ○) of 0.5 mM ADP. The ATP synthesis activities of Hsp70 were also examined at 37 °C for 30 min in the reaction mixture containing 0.5 mM AMP instead of ADP (×) and 5 mM P_i instead of ATP (△).

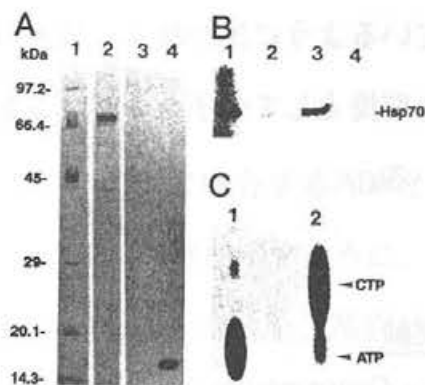
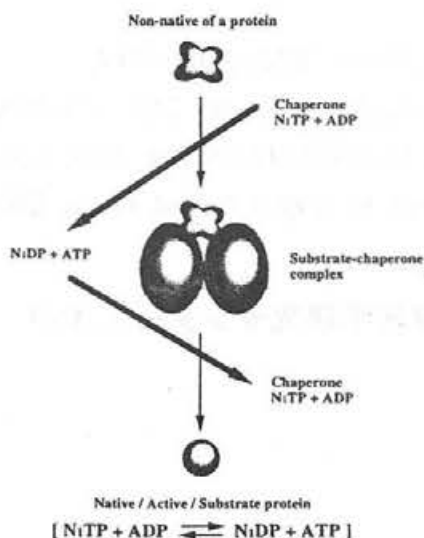


FIG. 2. SDS-PAGE and immunoblot analyses of Hsp70 (A), autophosphorylation of Hsp70 in an alkali-stable and acid-labile manner, and CDP-dependent dephosphorylation (B and C). A, silver-stained SDS-PAGE (4–20% gradient) of 1 μ g of Hsp70 (lane 2) and immunoblot analysis of 1 μ g of Hsp70 (lane 3) and NDP kinase (lane 4) using a 1:100 dilution of a monoclonal antibody raised against human nm23-H1 protein (NDP kinase-A), followed by ECL Western blotting detection reagent (Amersham). Lane 1, molecular weight markers. B, the autophosphorylation and CDP-dependent dephosphorylation of Hsp70 (10 μ g) were analyzed as described under "Experimental Procedures." The autophosphorylation of Hsp70 in the absence (lane 1) and presence (lane 2) of 5 mM CDP for 2 h. Half of each sample was treated with the traditional (pH 6.8) SDS sample buffer without boiling, subjected to 15% SDS-PAGE, and then dried without acid fixation. To determine the stability of the autophosphorylated Hsp70 as a function of pH, phosphorylated Hsp70 was treated with basic (pH 8.5) (lane 3) SDS sample buffer without boiling and then electrophoresed, and the gel was dried without acid fixation. For acid stability, phosphorylated Hsp70 was boiled in the SDS sample buffer at pH 6.8 and then electrophoresed. The gel was fixed in 20% trichloroacetic acid, followed by Coomassie staining, destaining in methanol/acetic acid, and drying (lane 4). The samples were then analyzed with an imaging analyzer. C, the remaining halves of the samples in B with (lane 1) or without (lane 2) 5 mM CDP in the reaction mixture were then analyzed by TLC, followed by imaging analysis.

FIG. 3. **NDPK activity in HSP70**



2 外来性抗原提示とカテプシン群—ノックアウトマウスを用いての解析

生体に侵入したウイルスや細菌などの病原体は、その表面抗原をII型主要適合性抗原 (MHCII) によりT細胞 (CD4+) に提示され、その抗原を認識するB細胞が増殖・形質細胞化し、抗体が産生されることにより、病原体が生体内から排除され、生体は再感染に対して耐性となる。培養細胞を用いた系では、システインプロテアーゼ阻害剤やアスパルチックプロテアーゼ阻害剤を投与することにより抗原提示が阻害されるという事実から、マクロファージや樹状細胞、皮膚のランゲルハンス細胞による外来性抗原のプロセッシングによる抗原ペプチドの生成には、様々なリソゾームプロテアーゼが関与していることが知られていた(1)。また、MHCIIの生合成過程においては、MHCIIをエンドソームに移行させるシグナルとなっているインバリアント鎖 (Ii) の分解は特に重要であり、Ii鎖の限定分解によって生じたCLIPがHLA-DMと結合してMHCIIの抗原結合領域が開放され、外来性抗原の限定分解によって生じた抗原ペプチドがMHCIIの抗原結合領域に結合できるようになり、細胞表面に抗原ペプチドが提示される。この過程においては、カテプシンSの特異的阻害剤であると考えられているLHVs (N-morpholinurea-leucine-homophenylalanine-vinylsulfon-phenyl) によってIi鎖の分解が阻害されることから、カテプシンSが重要な機能を果たしていることが明らかにされている(2)。しかしながら、阻害剤を用いた研究では、未知のプロテアーゼを阻害しているための結果を見ている可能性が否定できない。最近、相次いで、リソゾームプロテアーゼのノックアウト (KO) マウスが作製され、これらの抗原提示過程におけるカテプシンの役割が明らかにされ始めた。

まず、初めに作製されたカテプシンDのKOマウスは、出生はするものの、生後早い時期に腸管出血などで死んでしまう(3)。このマウスの脾細胞でのIi鎖の分解は正常マウスと何ら変化が認められず、外来性抗原のT細胞への抗原提示も全く影響が無かった(4)。更に、T細胞の数や末梢のCD4陽性細胞/CD8陽性細胞比

率も正常マウスと同じであった。

次に作製されたのがカテプシンBのKOマウスである。このマウスも、カテプシンDのKOマウスと同様に、Ii鎖の限定分解や外来性抗原の抗原提示能に関して、正常マウスと何ら変化が認められなかった。また、脾細胞や胸腺細胞のT細胞数およびCD4陽性細胞/CD8陽性細胞比率も正常マウスと変化が無かった(5)。

さらに、カテプシンLのKOマウスが作製された(6)。このマウスは周期的脱毛という異常は認められたものの、外来性抗原の抗原提示能は正常マウスと何ら変化が認められなかった。しかしながら、脾細胞や胸腺細胞のCD4陽性T細胞は正常マウスよりはるかに減少していた。このKOマウスを放射線処理することで胸腺上皮細胞に影響を与えず骨髄細胞を死滅させた後、正常マウスから骨髄移植を行っても、CD4陽性T細胞は減少したままであった。逆に、正常マウスを放射線処理した後、KOマウスの骨髄を移植した場合では、正常マウスと同じ数のCD4陽性T細胞をもつようになった。この事実から、T細胞の「種(タネ)」に異常が生じているのではなく、「畑(ハタケ)」である胸腺上皮細胞に異常が生じていることが示唆された。実際、このKOマウスでは、脾細胞では正常にIi鎖の分解がおこるにもかかわらず、胸腺皮質上皮細胞においてはIi鎖の分解は途中で止まってしまい、システインプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチンを投与した時に細胞内に認められるペプチド(LIP: Leupeptin induced peptide)が検出された。このペプチドにはCLIP部分が残存しており、多くのMHCIIの抗原結合部位は外来性抗原を結合できない状態にあると考えられた。幼弱T細胞は胸腺皮質上皮細胞から提示される抗原—MHCII複合体を認識できるT細胞受容体をもつものは生き残り、認識できないT細胞はアポトーシスにより排除される(Positive Selection)。さらに、胸腺髄質上皮で提示される自己抗原—MHCII複合体を認識するT細胞受容体をもつ細胞はアポトーシスにより排除される(Negative Selection)。この前者の過程において、カテプシンLのKOマウスの胸腺上皮細胞は抗原—MHCII複合体を細胞表面に提示することができないために、CD4陽性T細胞が減少しているのであった。実際、胸腺上皮細胞では大量のカテプシンLが存在して

おり、カテプシンSは検出されていない。この組織特異的なカテプシンSの発現抑制により、カテプシンLがIi鎖の最終的な分解を行っていると考えられた。以上のことから、カテプシンLは抗原ペプチドの生成に関与しているのではなく、胸腺皮質上皮細胞におけるIi鎖の分解を介して、免疫系で重要な役割を果たしていることが明らかにされた。しかしながら、Ii鎖の初期分解に関与しているプロテアーゼは依然、不明であった。

現在、カテプシンSのKOマウスも作製されているらしい。このマウスの解析によって、様々な抗原提示細胞におけるIi鎖の分解に関与しているプロテアーゼがカテプシンSであるかどうか明らかにされるであろう。

最近、抗原提示細胞の一種であるJ774.A1細胞を細胞分画すると、初期エンドソームにはカテプシンHが存在し、後期エンドソームにはカテプシンSが存在していることが示された(7)。この細胞ではカテプシンB、DやLはリソゾームに存在している。外来性抗原のプロセッシングが行われている場合は後期エンドソームの一種であると考えられていることから、カテプシンHの外来性抗原プロセッシングへの関与も考えられる。さらに、カテプシン群はその前駆体型の多くは自己触媒的に成熟型酵素に変換するタンパク分解活性をもっていることから、ある種のプロカテプシンの外来性抗原プロセッシングへの関与も検討されるべきであろう。

今後、KOマウスを用いた検討により、外来性抗原のプロセッシングに関与しているプロテアーゼが明らかにされていくであろうか？カテプシン群のようなプロテアーゼにも、チロシンキナーゼのような冗長性が存在している可能性が高い。複数のカテプシンのKOマウスを交配することが必要であるかもしれない。また、抗原提示細胞でのIi鎖の初期分解に関与するプロテアーゼが明らかにされることが期待される。

文献

1. Chapman, H.A. (1998) Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr. Opin Immunol.* 10, 93-102.
2. Riese, R.J. et al. (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class

- II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4, 357-365
3. Saftig, P. et al. (1995) Mice deficient for the lysosomal cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J.* 14, 3599-3608.
 4. Villadangos, J.A. et al. (1997) Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsins S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism. *J. Exp. Med.* 186, 549-560.
 5. Deussing, J. et al. (1998) Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4516-4521.
 6. Nakagawa, T. et al. (1998) Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280, 450-453.
 7. Claus, V. et al. (1998) Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages - enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J. Biol. Chem.* 273, 9842-9851.

(順天堂大学・医学部・生化学第一：石堂一巳)

(7) 海外留学中研究者からの最新情報

「マックスプランク研究所」： 紹介とそこでの研究成果

Max-Planck-Institut für Biochemie, D-82152, Martinsried bei München, Germany

田村 具博

マックスプランク協会 (Max-Planck-Gesellschaft, MPG) は、1948年にカイザー・ヴェルヘルム協会 (1911年設立) の後を引き継ぐ独立した非営利研究団体として創設された。当初、25の研究所を旧西ドイツ各地に配する体制でスタートしたが、それから50年、15人のノーベル賞学者を輩出する輝かしい歴史を持つMPGは、80研究所を抱える巨大な研究組織となり今日に至っている。ドイツ国内における研究所の分布は、旧東西ドイツの統合により見直され、均一に分布するよう旧西ドイツ側にあった幾つかの研究所が廃止され、旧東ドイツ側に新しい研究所の建設が進められている。MPGに関する詳細はインターネット (<http://www.mpg.de/>) を介して見ることが可能なのでそちらを参照していただき、ここでは私の所属する研究所を中心に記述したいと思う。

私が所属する研究所は、数あるMax-Planck-Institut (MPI) の中でも最大規模を誇るMPI für Biochemie (生化学研究所) で、ミュンヘン郊外の緑に囲まれた静かな場所に位置している。建物の一角ではMPI für Neurobiologie が組織化・運営されており、2つの研究所が同じキャンパスに居を構えている。生化学研究所は、基礎研究を主として行う主9部門と、研究に加え研究所内へのサービス (ペプチド合成、アミノ酸配列決定等) を提供する2部門、若手の研究者をリーダーとする5-6人からなる独立したグループ (現在8グループ) から構成されている。各部門を率いるヘッドはそれぞれの分野で業績を上げてきた方々ばかりであり、その詳しい研究内容等もWWWサイトで見ることが出来るので (<http://www.biochem.mpg.de/>)、ここでは特に蛋白質分解に直接あるいは間接的に関与しているラボに絞って紹介したい。

まず最初に、ノーベル賞学者であるHuber博士が率いるラボ(Strukturforschung部門)では、プロテアソームを中心とした高分子量プロテアーゼの結晶構造解析を進めている。このラボにはメタロプロテアーゼや血液凝固因子の結晶構造解析で著名なBode博士も所属しており、世界におけるプロテアーゼ結晶構造解析の中心的ラボの一つであると思われる。ここのラボは、人数が多いこともあるが、昼となく夜となくそして週末も必ず誰かが働いている非常にアクティブなラボである。次に、分子シャペロンの分野で著名なHartl博士が昨年ニューヨークから移り、新しい部門(Zelluläre Biochemie部門)のヘッドとなった。ここでは、蛋白質のフォールディングのメカニズムとそれに関与する因子を中心に、研究を進めている。細胞内蛋白質の"Quality control"に分子シャペロンが重要な役割を担っていることは疑いの余地がないことから、分子シャペロンと蛋白質分解系との機能的或いは物理的相互作用に関する研究は、今後ますます重要になってくるものと思われる。第3に、エネルギー依存性蛋白質分解系における標的蛋白質のユビキチン化に必須な酵素の一つ、ユビキチン結合蛋白質(E2)の研究で知られるJentsch博士が今年ハイデルベルグから移り、新しい部門(Molekulare Zellbiologie)を設立することが決定している。ユビキチン化は、基本的にE1,E2そしてE3蛋白質によって反応が進むが、E2とE3が多様であるためにそのメカニズムにはまだまだ不明な点が多く、解決されるべき問題が山積みされている。このことから酵母あるいはマウスの系を用いたユビキチン依存性の蛋白質分解の機能解析は、これからも重要な知見を与えてくれるに違いない。最後に、Baumeister博士が率いるMolekulare Strukturbiologie部門は、プロテアソームを中心に高分子量蛋白質の構造解析を、電子顕微鏡を用いて進めている。電子顕微鏡は、少量のサンプルで目的の蛋白質を見ることが可能なので、分子全体像の解析には威力を発揮する一方、結晶構造解析ほどの解像度は得られないのが難点であった。しかし最近の技術の発達から、サンプルの条件次第では、分子内の α -ヘリックスや β -シート構造などを含む3次構造を認識出来るレベルまで解像度を高めることが可能になってきている。この情報は、特に高分子量蛋白質の結晶構造解析での位相問題をかな

り軽減できることや、結晶構造解析出来なかった分子群への応用に有効であることから、電子顕微鏡による構造解析は今後も益々重要になってくるものと思われる。

各研究部門は教授を筆頭にスタッフ、ポスドクそして学生を合わせて50-100人の規模で運営されている。ちなみに私の所属するMolekulare Strukturbiologie 部門 (Prof. Dr. W. Baumeister) は、教授の下に、日本で助教授に相当する教授陣5人、秘書とテクニシャンを含めたスタッフが16人、ポスドク16人そして学生23人の計61人が所属しており。各人がそれぞれのテーマに従って研究を進めている。ポスドクはヨーロッパを中心に世界各国から研究に参加し、学生はドイツ国内各地あるいはヨーロッパ各地から集まり、国際色豊かなメンバー構成となっている。MPGは学生に学位を授与することは出来ないので、学生たちは最終的に大学で学位の審査を受ける必要がある。このことから、各部門の教授は大学の教授も併任している場合が多く、学生は大学に所属しながらMPIで研究するスタイルをとっている。

さて研究を進める上での、研究所のサポート体制に触れてみたい。まず、これだけのラボと研究者が研究を進めているのであるから、必要とされる試薬類・ガラス器具類は膨大な数に及ぶ。そこで、ここでは購買部(試薬類及び一般、ガラス器具類、培養器具類そして文房具類を扱う4種)が設置されており、通常頻繁に使用する物に関しては、自分で該当する購買部まで行けばサイン一つで手に入れることが出来る。次に、研究所に付属する工場(ガラス、電気、一般の3部門)では、研究に必要な簡単な実験機器を製造・提供してくれる。例えば、電気泳動装置、ウェスタンブロットィングのためのプロッター、クロマトグラフィーに必要なカラム、電気泳動のガラス板やスぺーサー等々、またそれぞれの器具やガラス製品に必要性にあわせて特殊加工も引き受けている。更に学会発表のスライド、OHPやポスターなどは、インターネットを使ってファイルを送っておけば数日後には出来上がっており、研究所内で受け取ることが出来る。このような研究に対する支援体制は、物品の注文と配達までの手間と時間を大幅に削減できるので非常に便利なシステムであり、日本ではあまり経験がなかったことから、私がMPIに来た当初は非常に感心した記憶

がある。

次に、この研究所で私がどのような研究を進めているか記したい。私は、現在古細菌 *Thermoplasma acidophilum* を中心に細胞内蛋白質分解機構について、それに関与する分子群の同定とその機能解析を行っている。

原核生物の細胞内蛋白質分解を考えた時、例えば大腸菌では、最高80%までがエネルギー要求性プロテアーゼ Lon と Clp に依存しているという報告があり、いかにこれらのプロテアーゼが細胞内蛋白質分解に重要であるか示唆している。細胞内の可溶性エネルギー依存性プロテアーゼは、この2種に加え HslUV (プロテアソームの祖先蛋白質と考えられる) の3種類しか同定されていないが、これらプロテアーゼを構造的に見ると、全て触媒活性部位をリング状の複合体内部に配置させている "self-compartmentalizing" 分子であるという事に気が付く (Lon に関しては推定)。この分子構造形態は原核生物にとって特に重要な意味を持つに違いない。なぜなら、原核細胞は、真核細胞に見られるような多種のプロテアーゼ群やペプチダーゼ群を含有する膜で仕切られた "Lysosome" を持たないので、プロテアーゼ自身が蛋白質分解を厳密に制御する必要があるからである。その点 "self-compartmentalizing" 分子は、基質蛋白質が入り込む口が狭いためにフォールディングしている分子は中に入れず、高次構造を持たない蛋白質やペプチドのみが分解可能となる。しかし細胞内の大部分の蛋白質は高次構造を持つので、無作為に分解される可能性はほとんどない。このことは、真核細胞のプロテアソームが細胞内可溶性蛋白質の1%にあたる量存在していても細胞には何等影響を及ぼさないことから推察できる。実際、フォールディング蛋白質の分解は、プロテアーゼ特異的なリバースシャペロン様分子 (Clp の場合 ClpA, ClpX, HslV の場合 HslU が該当) がエネルギー依存的に標的蛋白質の高次構造をほぐし、プロテアーゼの触媒部位へ転送するプロセスが必要になる。この分解過程の特徴は、標的蛋白質が一旦分解され始めると、分解中間産物を放出することなく連続的に分解が進み最終分解産物のオリゴペプチドがプロテアーゼから放出されるが、アミノ酸までは分解されないことである。この分解プロセスは全ての生物種に

保存されているが、翻って古細菌で考えてみると、この分解を担う可溶性のエネルギー依存性プロテアーゼはプロテアソームとLonプロテアーゼの2種しか同定されていない。従って古細菌では、両プロテアーゼが細胞内蛋白質の異化作用の最初のステップ、即ち選択的な蛋白質のペプチドへの分解に重要な役割を果たしていると考えられる。

さて"self-compartmentalizing"分子は前述したような特徴的な構造を持ち、細胞内蛋白質の分解を整然且つ厳密に進めるために重要であると考えられるが、我々は最近新規の"self-compartmentalizing"分子、トリコーンプロテアーゼ(TRI)を発見した。TRI、はプロテアソームより僅かに大きい分子量約73万のエネルギー非依存性の蛋白質分解酵素複合体として、古細菌 *Thermoplasma acidophilum* から精製された。電気泳動と電子顕微鏡観察から、この分子は121kDaサブユニットが3分子で3角形状のリングを形成し、そのリングが2層からなる複合体で分子内部に大きな空間をもつことが判明し、プロテアソーム同様、触媒部位を分子内部に配置している可能性が高い。クローニングしたTRIをコードする遺伝子から推定されたアミノ酸一次構造は、既知の蛋白質との間に全長にわたる相同性を示さなかったが、そのC-末端にtail-specific protease (TSP)の触媒活性部位をコードするInterphotoreceptor retinol-binding protein様のドメインが確認され、TRIの場合もこのドメインがTSP同様の機能をもつものと予想される。TRIの酵素学的特異性を見ると、TRIはトリプシン様、キモトリプシン様の異なるタイプの合成基質に対しペプチダーゼ活性を示すことが判明した。またプロテアソームと比較すると、カゼインやインスリンB鎖といったポリペプチドの分解速度は非常に遅く、逆に低分子のオリゴペプチドに対して非常に強い活性を示すことから、基質特異性、特にサイズに対する特異性がプロテアソームとは大きく異なることが判明した。

TRIの興味深い点は、この730kDaのTRI分子を濃縮するだけで、ウイルスのCapsid様の正二十面体構造を持つ超巨大分子複合体を形成することである。この複合体形成にあたり、TRI自身のペプチダーゼ活性には何等変化は見られない。

14.6MDaにもなるこの巨大複合体は直径55nmにも及び、26Sプロテアソームが中に収まるほどの大きさをもつ。複合体内部そして表面のTRI分子間に大きなスペースがあり、細胞内ではそれらに何らかの分子が結合し、多機能性複合体として存在している可能性がある。現時点では、このCapsid複合体に関する機能あるいは構造に不明な点が多く、その同定には更なる研究が必要である。もう一点TRIの興味深い点は、TRIと低分子量蛋白質が協調的にペプチダーゼ活性を高めることにある。合成基質を用いてペプチダーゼ活性を測定すると、個々の分子では活性が低いか或いは見られなかったものが、両者を混ぜて反応させると著しい活性化が見られる。この協調的ペプチダーゼ活性発現に関与する分子を検索し2種の蛋白質を同定したところ、それらはプロリンイミノペプチダーゼとメタロアミノペプチダーゼで、両アミノペプチダーゼはアミノ酸基質に対して幅広い基質特異性を示すことが判明した。各種プロテアーゼ阻害剤を用いた実験や、変異を導入したりコンビナント蛋白質を用いた実験より、協調的ペプチダーゼ活性の発現にはTRIとアミノペプチダーゼの両者の活性が必須であることが判明し、このペプチダーゼ活性発現は両酵素による連続的な反応による可能性が考えられ、この点について解析を進めている。

○ このような特徴を持つTRIは、"self-compartmentalizing"分子として、細胞内でどのような機能を果たしているのだろうか。TRIの基質特異性を考えると、分子量の大きいポリペプチドを分解するよりは、より小さいオリゴペプチドを選択的に分解するペプチダーゼとして機能している可能性が高い。もしそれが事実であるならば、プロテアソームやプロテアーゼLonから放出される分解産物ペプチドがよい基質となるかもしれない。実際、エネルギー依存性プロテアーゼから放出される分解産物ペプチドは、最終的にアミノ酸まで分解される必要があるが、その分解は漠然とアミノペプチダーゼ群によって行われていると理解されている。しかしアミノペプチダーゼはより短いペプチドほど特異的に分解することから、プロテアソームやLonから放出される分解産物としてのオリゴペプチド(3-20アミノ酸残基)の大部分は、分解効率上まだ長いと思われる。従って、オリゴペプチドを特異的に分解し短いペプ

チドを放出するペプチダーゼが存在すれば、蛋白質からアミノ酸までの分解効率は著しく向上するものと考えられる。もしTRIがその機能を担うのであれば、プロテアソームとアミノペプチダーゼ両酵素間のペプチド分解を調節するモジュレーター分子として機能している可能性があり、この点に焦点を当てて現在研究を進めている(TRIとアミノペプチダーゼに関する詳細は下に記す参考文献を見ていただければ幸いである)。

最後に、ここではMPI für Biochemieの紹介を中心に私が現在進めている研究について記したが、総勢1000人以上が働いているこの研究所で日本人研究者は私を含めて10人にも満たない。果たしてこれが多いのか少ないのかは定かではないが、研究の質・レベルそして環境から考えると、もっと多くの日本人研究者に興味を持ってもらってもいいのではないかと思う。この紹介でMPIに興味を持ち、滞在することを希望する研究者が増えれば幸いである。

文献

- 1) Tamura, T. et al., (1996). Tricorn protease - the core of a modular proteolytic system. *Science* 22, 1385-1389.
- 2) Tamura, T et al., (1996). Tricorn protease (TRI) interacting factor 1 from *Thermoplasma acidophilum* is a proline iminopeptidase. *FEBS Lett.* 398, 101-105.
- 3) Walz, J., et al., (1997). Tricorn protease exists as an icosahedral supermolecule in vivo. *Mol. Cell* 1, 59-65.
- 4) 田村具博 他(1997). 「トリコーンプロテアーゼ」蛋白質核酸酵素 42, 2218-2224.

(8) 掲示板コーナー

【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。

プログラム

1998年6月29日（月）

13:00 ~ 13:05 開会の挨拶 京極 好正 （阪大蛋白研・所長）

13:05 ~ 13:15 世話人挨拶 横沢 英良 （北海道大薬）

田中 啓二 （都臨床研）

第 I 部 プロテオリシス・スーパーシステムの基盤 座長：横沢 英良

- 13:15 ~ 13:45 **プロテアソーム：新しい生体反応制御システム**
田中 啓二（都臨床研・化学療法）
- 13:45 ~ 14:15 **カルパイン・スーパーファミリー**
鈴木 紘一（東大・分生研）
- 14:15 ~ 14:45 **カスパーとカスパーにより活性化されるDNase**
長田 重一（阪大・医・遺伝）
- 14:45 ~ 15:00 コーヒーブレイク
- 15:00 ~ 15:30 **膜結合型プロテアーゼ FtsH による蛋白質のクオリティコントロール**
木原 章雄・伊藤 維昭（京大・ウイルス研）
- 15:30 ~ 16:00 **小胞体における新生蛋白質の品質管理システム**
徳永 文稔・小出 武比古（姫路工大・理・生命科学）
- 16:00 ~ 16:15 コーヒーブレイク

第 II 部 細胞周期制御機構 座長：畠中 寛

- 16:15 ~ 16:45 **プロテアソームと細胞周期制御**
東江 昭夫（東大・院理・生物科学）
- 16:45 ~ 17:15 **ユビキチン系における分子識別と細胞周期**
山尾 文明（国立遺伝研）
- 17:15 ~ 17:45 **APCによるM期制御**
戸所 一雄（理研・ライフサイエンス筑波研）
- 18:00 ~ 19:30 懇親会

1998年6月30日（火）

第 III 部 細胞間相互作用の分子機構 座長：田中 啓二

- 9:30 ~ 10:00 受精と卵の活性化におけるプロテアソームの役割
横沢 英良 (北大・薬)
- 10:00 ~ 10:30 細胞分化におけるメタロプロテアーゼ・ディスインテグリンファミリーの機能
瀬原 (藤沢) 淳子 (都臨床研・細胞生物)
- 10:30 ~ 11:00 膜型マトリックスメタロプロテアーゼと細胞浸潤
佐藤 博 (金沢大・がん研・腫瘍分子)
- 11:00 ~ 11:15 コーヒープレイク
- 11:15 ~ 11:45 ユビキチン・プロテアソーム系はLFA-1/ICAM-1を介した接着能の誘導に関与する
片桐 晃子 (ニッピ・バイオマトリックス研)
- 11:45 ~ 12:15 α 及び β カテニン分子の安定化機構
永淵 昭良 (京大・医・分子細胞情報)
- 12:15 ~ 13:30 昼食

第 IV 部 高次生命現象の分子機構

座長：鈴木 紘一

- 13:30 ~ 14:00 ニューロンのアポトーシス
畠中 寛 (阪大・蛋白研)
- 14:00 ~ 14:30 リソソームカテプシン群による神経細胞死の制御
内山 安男 (阪大・医・解剖)
- 14:30 ~ 15:00 アメフラシの記憶に関与するプロテアーゼtolloid/BMP-1様蛋白質とTGF- β カスケード
遠藤 昌吾 (理研・脳科総研・記憶学習)
- 15:00 ~ 15:30 神経変性とプロテアーゼ
西道 隆臣 (理研・脳科総研・蛋白制御)
- 15:30 ~ 15:35 閉会の挨拶 畠中 寛 (阪大・蛋白研)

【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。

プログラム

10月14日（水）

8：30～11：00

Thomas Langer（ミュンヘン大学）

Biogenesis and Quality Control of Mitochondria Mediated by Proteolysis

荻島 正（九大）

ミトコンドリアプロセッシングプロテアーゼによる特異的基質認識および切断機構の解明

徳永文稔（姫路工大）

小胞体における新生タンパク質の品質管理とプロテオリシス

松崎英樹（京大）

保護タンパク質としてのカテプシンA：タンパク質化学的側面からの考察

鎌田真司 (阪大)

カスパーゼとアポトーシス

14:30~16:30

馬場 忠 (筑波大)

受精関連精子タンパク質の選択的分解機構

丸山征郎 (鹿児島大)

トロンビンによる細胞応答とそのシグナル伝達

川原裕之 (東大)

プロテアソーム研究の新展開

田村具博 (マックスプランク研)

トリコーンプロテアーゼ: 新規の高分子量プロテアーゼ複合体の構造とモジュ
ラー蛋白質としての機能

【シンポジウムの案内: 3】

第15回国際キニン会議 開催

Kinin '98 Nara

**From Molecular Biology to Pathophysiology
of the Kallikrein-Kinin System**

開催日時: 1998年10月19日(月)~24日(土)

開催場所: 奈良市、奈良県新公会堂

一般演題締め切り: 1998年5月15日(金)

主なプログラム:

特別講演: 村上和雄 教授 (筑波大学)

"Transgenic and knockout models in renin-angiotensin system"

Prof. Werner Muller-Esterl (University of Mainz)

"Structure and function of G protein-coupled receptors

-Lessons from the kinin receptors"

Symposia:

1. Bradykinin receptors, their subtypes, distribution and signal transduction
Organizers: D. Regoli (Canada) & H. Higashida (Japan)
2. Cardiovascular system - Cell growth
Organizers: B. A. Scholkens (Germany) & T. Unger (Germany)
3. Activation of plasma kallikrein both on the cell surface and by bacterial proteases
Organizers: R. W. Colman (USA) & H. Maeda (Japan)
4. Renal function and hypertension
Organizers: O. A. Carretero (USA) & K. Shimamoto (Japan)
5. Bradykinin receptor antagonists
Organizers: J. M. Stewart (USA) & D. Proud (USA)

* Symposium 毎に 2 - 3 題は一般からの応募を受けつけ、選択の上採用する。

連絡先： 事務局 C/O アイシーエス企画
〒102-8646 東京都千代田区平河町2-7-4 砂防会館別館
TEL: 03-3263-6474, FAX: 03-3263-7077, E-mail: kinin98@ics-inc.co.jp

【シンポジウムの案内：4】

下記の要領で国際シンポジウムを開催いたします。
ご興味のある方は奮ってご参加下さい。(参加費無料)
申込先：熊本大学医学部微生物学教室 (Tel: 096-373-5098, Fax: 096-362-8362)

International Symposium "Recent Advances in Protease Research in Human Diseases"

October 27 (Tue), 1998
(Kumamoto City International Center, Kumamoto, Japan)
(A total of 30 minutes for each speaker)

[Tentative]

Session I. Caspase and Other Proteases for Cytokine Regulation

Chair: M. Ogawa

Guy Salversen (The Burnham Institute, USA)

Caspases in the execution of programmed cell death

Keisuke Kuida (Vertex Pharmaceuticals, USA)

Apoptosis by caspase-dependent or independent pathway in vivo

Tsutomu Ogura (National Cancer Center Research Institute East, Japan)

Role of nitric oxide in a caspase-mediated apoptosis

James Travis (Univ. Georgia, USA)

Disruption of cytokine networks by bacterial proteinases

Session II. Proteases and Protease Inhibitors in Cancer

Chair: C.A.M. Sampaio

Viktor Magdolen (Frauenklinik der Technischen Univ. Munchen, Germany)

The urokinase-type plasminogen activator system: A new target in tumor invasion and metastasis

Motoharu Seiki (Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo, Japan)

Degradation of ECM at the periphery of cancer cells

Ann R. Kennedy (University of Pennsylvania, USA)

The Bowman-Birk inhibitor as an anticarcinogenic agent

Session III. Sepsis/SIRS and Other Diseases: Regulation of Systemic Protease Activity

Chair: H. Fritz

Heinz Neuhof (University of Giessen, Germany)

Rationale for the inhibition of lysosomal proteases in SIRS and sepsis

Marrian Jochum (University of Munich, Germany)

Antithrombin III treatment in sepsis and SIRS: New aspects on mode of action

John C. Cheronis (Cortech Inc., USA)

The serine elastases in vascular and inflammatory diseases

Jan Potempa (Jagiellonian Univ., Poland)

A biochemical link between periodontitis and cardiovascular disease

Koichi Suzuki (Inst. Mol. Cell. Biosic., Univ. Tokyo, Japan)

Implication of skeletal muscle calpain, p94, in muscular dystrophy

Session IV. Hot topics [Tentative]

Chair:

- 1) Maeda/Miyamoto/Akaike --- Nitroso α 1 PI and bacteriostatic action
- 2) K. Yamamoto --- Biological function of gingipain.

- 3) T. Yamamoto --- Protolytic control of S19 ribosomal protein-induced monocyte infiltration
- 4) M. Ogawa ---
- 5) C.A.M. Sampaio --- Plant inhibitor of factor Xa

Session V. Protease Inhibitors as Therapeutics

Chair: H. Mitsuya

Akhteruzzaman Molla (Abbott Laboratories, USA)

New frontier in HIV protease inhibitor therapy

Nobuhiko Katunuma (Tokushima Bunri Univ., Japan)

Osteoporosis and cathepsins: Role of cathepsins in bone resorption

Organizers: : H. Fritz, H. Maeda, M. Ogawa, J. Travis and T. Yamamoto

Secretariat: : Takaaki Akaike

Department of Microbiology, Kumamoto University School of Medicine

Tel: +81-96-373-5098, Fax: +81-96-362-8362

E-mail: takakaik@gpo.kumamoto-u.ac.jp

【シンポジウムの案内：5】

New Impact of Proteolysis on Biological Science

主催：文部省科学研究費特定領域研究(A)「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：1998年11月24日（火曜）午後1時～5時

会場：東京ガーデンパレス

〒113東京都文京区湯島1-7-5 電話：03-3813-6211

JRお茶の水駅下車 徒歩5分

（本特定研究領域研究班主催のシンポジウムであるので、できる限り多数の班員の参加を期待しています）

【シンポジウムの案内：6】

第13回臨床研国際カンファレンス

Ubiquitin and Proteasome: A New World of Proteolysis

“ユビキチンとプロテアソーム：蛋白質分解の新しい世界”

期日：1998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）

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、本特定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、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3日ですので、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お願いしたいと考えています。以上、この会議については、本特定班・班員のご協力を宜しくお願い致します。詳細は以下の通りです。

Registration

Receipt of registration fee, 5250 yen, is regarded as the conference registration. Please use the enclosed form for the payment. We will send the final program, the abstracts, and the name card around the beginning of October to the registrants. If you have not sent an application, send a letter, FAX or E-mail including Name,

Affiliation, Address, Telephone number, FAX number, E-mail address (if available) to Keiji Tanaka.

Poster Abstracts

The abstract must be prepared with the two forms enclosed in the present cover. Request them if you have not yet applied for poster presentation. The abstract as submitted will appear in the final program. Faxed or e-mailed abstracts can not be accepted. Conference registration is required for presenting a poster. You will be informed of details for poster presentation later. Send abstracts to : Keiji Tanaka, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, Japan.

Deadline for registration and receipt of abstracts is August 31, 1998.

For additional information:

Keiji Tanaka or Kazuko Ichihara
TEL : +81-(0)3-3823-2101 (ext. 5351 or 5350)
FAX : +81-(0)3-3823-2237
E-mail : kichihar@rinshoken.or.jp
www : <http://www.rinshoken.or.jp/conf/ric98/conf-jp.htm>

Preliminary Program

----- Wednesday, November 25

- 9:45-10:00 **Opening Remark**
M. UI (Director, Rinshoken, Japan)
- 10:00-10:50 **Plenary Lecture**
R. HUBER (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
Structure and function of the archaeal and yeast 20S proteasome and of *E. coli* HslV
- 10:50-11:25 A. HERSHKO (Technion-Israel Institute of Technology, Israel)
1. The ubiquitin system for protein degradation - An overview
2. Mechanisms and regulation of cyclin degradation (*Keynote lecture-1*)
- 11:25-12:00 S. OMURA (The Kitasato Institute, Japan)
Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome (*Keynote lecture-2*)
- 12:00-13:30 Lunch
- Session-1: Mechanism and Functions of the Ubiquitin System**
13:30-14:05 A. VARSHAVSKY (California Institute of Technology, USA)

- The N-end rule pathway in yeast and mice (*Keynote lecture-3*)
- 14:05-14:30 S. P. JENTSCH (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
- Enzymes and functions of the ubiquitin systems and related pathways
- 14:30-15:05 A. CIECHANOVER (Technion-Israel Institute of Technology, Israel)
- Degradation of transcriptional factors by the ubiquitin system
(*Keynote lecture-4*)
- 15:05-15:30 Coffee Break
- 15:30-15:55 M. W. HOCHSTRASSER (University of Chicago, USA)
- Proteolytic targeting in the yeast ubiquitin-proteasome pathway
- 15:55-16:30 R. KEMLER (Max-Planck Institute for Immunobiology, Germany)
- Regulation of the cytoplasmic pool of β -catenin (*Keynote lecture-5*)
- 16:30-17:05 J. H. SCHWARTZ (Columbia University and New York State Psychiatric Institute, USA)
- Regulated proteolysis and long-term memory (*Keynote lecture-6*)
- 17:05-17:30 C. H. CHUNG (Seoul National University, Korea)
- A new family of ubiquitin-specific protease with distinct N- and C-terminal extensions
- 18:30-20:30 **Reception**

----- **Thursday, November 26**

Session-2 : Cell Cycle and the Ubiquitin Pathway

- 9:15- 9:50 T. HUNT (ICRF Clare Hall Laboratories, United Kingdom)
- Programmed proteolysis in the cell cycle (*Keynote lecture-7*)
- 9:50-10:25 K. A. NASMYTH (Research Institute of Molecular Pathology (IMP), Austria)
- Separating sister chromatids (*Keynote lecture-8*)
- 10:25-11:00 M. YANAGIDA (Kyoto University, Japan)
- Proteolysis and mitotic anaphase (*Keynote lecture-9*)
- 11:00-11:25 Coffee Break
- 11:25-11:45 H. YASUDA (Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Japan)
- Novel activator of APC, which has a hect-like domain
- 11:45-12:05 K. TODOKORO (The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Japan)
- Regulation of APC activity and mitosis progression
- 12:05-12:25 F. YAMAO (National Institute of Genetics, Japan)
- UbcP4/APC pathway in fission yeast
- 12:25-14:00 Lunch

Session-3 : Structural and Functional Features of Proteasomes

- 14:00-14:35 W. BAUMEISTER (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
- Recent advances in understanding the 26S proteasome structure
(*Keynote lecture-10*)
- 14:35-15:00 G. N. DeMARTINO (University of Texas Southwestern Medical Center, USA)
- Regulatory proteins of the proteasome
- 15:00-15:25 S. WILK (Mount Sinai School of Medicine, USA)
- Small molecule proteasome modulators
- 15:25-15:50 D. J. FINLEY (Harvard Medical School, USA)
- The proteasome regulatory particle from yeast
- 15:50-16:15 Coffee Break
- 16:15-16:40 C. M. GORBEA (University of Utah, USA)
- Assembly of the regulatory complex of the 26S protease
- 16:40-17:05 K. B. HENDIL (August Krogh Institute, Denmark)

- Structure of the 26S proteasome probed with antibodies
 17:05-17:30 A. TOH-E (University of Tokyo, Japan)
 Dissection of the regulatory complex of the yeast 26S proteasome
 17:30-17:55 K. TANAKA (Rinshoken, Japan)
 Degradation mechanisms of target proteins by the 26S proteasome
 18:00-22:00 **Poster Festival**

----- Friday, November 27

Session-4 : Proteasomes and Antigen Processing

- 9:15- 9:50 A. L. GOLDBERG (Harvard Medical School, USA)
 Functions of the proteasome in protein breakdown and antigen presentation (*Keynote lecture-11*)
 9:50-10:15 P. M. KLOETZEL (Humboldt University, Germany)
 Rule and role of proteasomes in MHC class I antigen processing
 10:15-10:40 J. J. MONACO (University of Cincinnati, USA)
 20S proteasome assembly and specificity
 10:40-11:00 M. KASAHARA (The Graduate University for Advanced Studies, Japan)
 IFN- γ -regulated proteasome subunit genes: implications for the origin of the major histocompatibility complex
 11:00-11:20 Coffee Break

Session-5 : Proteasomes and Quality Control

- 11:20-11:55 D. H. WOLF (University of Stuttgart, Germany)
 Function of the ubiquitin-proteasome system in endoplasmic reticulum degradation of membrane and luminal proteins (*Keynote lecture-12*)
 11:55-12:15 T. KOIDE (Himeji Institute of Technology, Japan)
 Intracellular degradation of aberrant proteins by proteasome through quality control in the ER
 12:15-12:50 F. U. HARTL (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
 Protein folding *in vivo*: The role of molecular chaperones (*Keynote lecture-13*)
 12:50-13:10 Y. MINAMI (Oita Medical University, Japan)
 The proteasome activator PA28 is required for proper Hsp90-dependent protein folding in association with Hsc70 and Hsp40
 13:10-14:30 Lunch

Session-6 : Topics in Advanced Proteolysis Research

- 14:30-14:55 W. BODE (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
 Tryptase: a cage-like serine protease involved in asthma, allergic and inflammatory disorders
 14:55-15:15 T. TAMURA (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
 The role of Tricorn protease and its aminopeptidase cofactors in cellular protein degradation
 15:15-15:35 T. OGURA (Kumamoto University, Japan)
 Cellular activities controlled by the bacterial AAA protease, FtsH
 15:35-15:55 H. SAWADA (Hokkaido University, Japan)
 Role of extracellular ubiquitin-proteasome system in *Ascidian* sperm-egg interaction
 15:55-16:15 S. KAWASHIMA (Rinshoken, Japan)
 Inhibition of proteasome activity leads cells to differentiation and/or apoptosis
 16:15-16:35 Coffee Break
 16:35-16:55 A. FUJISAWA-SEHARA (Rinshoken, Japan)
 Roles of metalloprotease-disintegrins (ADAMs) in morphogenesis

- 16:55-17:15 H. SORIMACHI (University of Tokyo, Japan)
Physiological function of calpain and its homologues
- 17:15-17:35 Y. OHSUMI (National Institute for Basic Biology, Japan)
Novel protein conjugation system essential for autophagy in yeast
- 17:35-17:55 E. KOMINAMI (Juntendo University School of Medicine, Japan)
Mechanism and regulation of proteolysis by endosomal-lysosomal system
- 17:55-18:00 **Closing Address**
Y. Suzuki (Vice Director, Rinshoken, Japan)

” PS. 全ての招待講演者は24-27日の間は「RIC'98」会議のために拘束されますが、他には予定がありません。ユビキチンとプロテアソームの著名な研究者を海外から多数招いていますので、興味のある先生方は本国際会議の前後にセミナーにご招待頂き情報交換などしていただければ幸いです。主催者（田中啓二）には、Address/TEL/FAX/E-mail 等全ての情報がありますので、必要な先生方はご連絡下さい。一部の研究者にはすでに問い合わせもありますので、ご興味のある先生方は至急ご連絡頂ければ幸いです。”

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

(小椋 光：熊本大学・医)

“特別販売”

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

Proteolysisの「訳語」再募集!

英語のProteolysisはなかなか響きがよい言葉ですが、この単語を「蛋白分解」と訳すと、どうも負のイメージがあって生命科学研究領域に幅広くインパクトを与え

る用語にはなっていません。また、カタカナで「プロテオリシス」と書いても、どうも意味が十分に把握できない。そこで、適訳を募集します。意識、あるいは思い切って造語でも結構です。事務局において合意が得られれば、本重点研究で積極的に浸透させたいと考えています。 (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、本特定領域研究の代表者である鈴木絃一教授と副代表者である木南英紀教授が日本支部の組織委員である。主な活動としては、2年毎に"Proteolysis and Protein Turnover"のICOP国際会議を開催すること(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絃一教授及び木南英紀教授で、ICOP Newsletterの配布を希望する場合は、直接鈴木教授に申し込めばよい。 (ぶろておりしす事務局)

書評

"Intracellular Protein Catabolism" (Eds by Suzuki, K. and Bond, J.S.) Adv. Exp. Med. Biol. vol. 389, 1996, Plenum Press, New York. 本書は本重点研究代表者である鈴木絃一教授が1994年10月に東京で開催した第10回 International Conference on Intracellular Protein Catabolism 国際会議 (ICOP)での主要講演者の総説を成書に編集したものである。現在の蛋白質分解の世界が網羅的に整理されており、初心者のみならずこの領域の研究者の座右の書として利用されるべき好書である。

(ぶろておりしす事務局)

"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)

(9) 編集後記

“ぶろておりしす”は、特定領域研究「細胞内蛋白分解」のニュース誌であり、職員間の連絡・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7号です。これまで、「よく頑張ってきたな」と多少疲れながら独白しているところです。今後も少しだけ手抜きしながら、意欲的に編集してゆきたいと思っています。今回は、2-3の投稿記事があり、ラブレターを貰った感じで編集部としては非常に喜んでいますが、ともかくも投稿記事は有り難いので、今後も宜しくお願いします。本号を編集している丁度今、インドネシアのスカルノ大統領が辞任したとのニュースがインターネットから流れてきました。32年間の独裁体制の終焉とのことです。この独裁の評価については後世の史家の判断に委ねればなりません、政治のみならず科学の世界においても「保守」と「革新」の確執は日常茶飯事のように思われます。「蛋白質分解」の世界においても例外ではなく「伝統」を重んじるか「創造」を目指すか、少なからず頭を痛める課題です。しかし、本特定研究は「蛋白質分解のニューバイオロジー」を目指しているため、「泣いて馬謖を斬る」諸葛孔明の精神で過去を清算し、新たな展開を計るべきとするのが妥当と思われる。昨今の社会状況を鑑みると、21世紀は、もはや過去の栄光で生き延びられるほど甘い時代ではなさそうです。若く新しい世代が旧世代を越えて表舞台に登場してくるのは、世の習いであり、寧ろこの淘汰の見られない世界は世間から抹殺されるかもしれません。若さと美貌を保ちたいのは始皇帝以来の永遠の課題であり、年齢を重ねたくない――ことも事実ではありますが、閑話休題。本号では「発表論文の概要紹介」が皆無となりました。どうかこの欄が終焉しないようにご協力下さい！さらに“海外に留学中の若手研究者からのコーナー”の記事も切望していますので、毎号のことですが、有望な方をご存じの方はお知らせ下さい。日本語の原稿は細明朝体、英語の原稿はTimesで作成し、e-mail (tanakak@rinshoken.or.jp) かdiskでお送り下さい。「文字化け」防止のために、e-mailでなくdiskでお送り頂ければ幸いです。

(重点ニュース“ぶろておりしす”事務局：都臨床研 田中・川島)

(10) 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「蛋白質分解研究者」からの掲載原稿の提出を強く希望します。

Functional Defects of a Muscle-specific Calpain, p94, Caused by Mutations Associated with Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A*

(Received for publication, October 6, 1997, and in revised form, February 24, 1998)

Yasuko Ono[‡], Hiroko Shimada[‡], Hiroyuki Sorimachi^{‡§}, Isabelle Richard[¶], Takaomi C. Saido^{||}, Jacques S. Beckmann[¶], Shoichi Ishiura[‡] and Koichi Suzuki[‡]

From the [‡]Laboratory of Molecular Structure and Functions, Department of Molecular Biology, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan, [¶]Généthon, 1, Rue de L'internationale, 91000 Evry, France, and the ^{||}Department of Molecular Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

p94 (calpain3), a muscle-specific member of the calpain family, has been shown to be responsible for limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A), a form of autosomal recessive and progressive neuromuscular disorder. To elucidate the molecular mechanism of LGMD2A, we constructed nine p94 missense point mutants found in LGMD2A and analyzed their p94 unique properties. All mutants completely or almost completely lose the proteolytic activity against a potential substrate, fodrin. However, some of the mutants still possess autolytic activity and/or connectin/titin binding ability, indicating these properties are not necessary for the LGMD2A phenotypes. These results provide strong evidence that LGMD2A results from the loss of proteolysis of substrates by p94, suggesting a novel molecular mechanism leading to muscular dystrophies.

骨格筋特異的カルパインである p94 は、肢帯型筋ジストロフィー 2A(LGMD2A)の責任遺伝子である。LGMD2A で同定されている p94 の点変異体 9 種 (Fig.1) を解析した結果、野生型 p94 を COS7 細胞に発現した際に起こるフォドリンの分解が、すべての変異体で認められなかった (Fig.6)。一方、p94 の特徴である強い自己消化活性、及びコネクチン/タイチン結合能は、必ずしも失われていない (Fig.2)。これらの結果より、LGMD2A は、p94 の基質がタンパク質分解を受けないために発症するという、他の筋ジストロフィーとは異なる分子機構によることが示唆される。

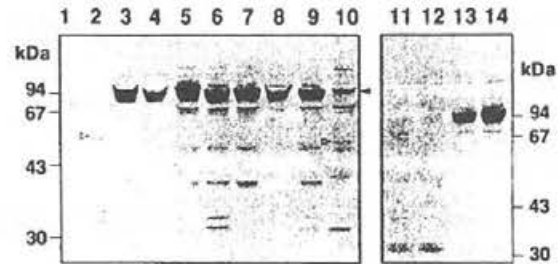


FIG. 3. Expression of wild type and mutant p94 in COS7 cells. Seven mutants lost autolytic activity to various extents. Lysates from COS7 cells transfected with wild type and mutant p94 were analyzed by Western blotting with anti-IS2 antiserum. pSRD (lane 1), wild type human p94 (lane 2), active site mutated C129S (lane 3), L182Q (lane 4), G234E (lane 5), P319L (lane 6), H334Q (lane 7), V354G (lane 8), R490W (lane 9), R572Q (lane 10), S744G (lane 11), R769Q (lane 12), S744G/C129S (lane 13), and R769Q/C129S (lane 14). Closed and open arrowheads indicate the 94-kDa translation product and 55-kDa proteolyzed fragments, respectively.

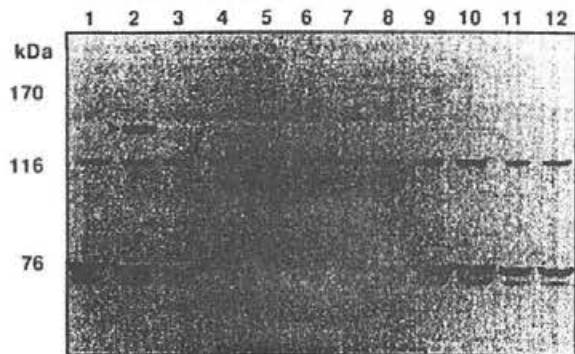


FIG. 6. Proteolysis of fodrin by p94 overexpression. Lysates from COS7 cells transfected with wild type and mutant p94 were analyzed by Western blotting with an antibody specific to the proteolyzed 150-kDa alpha fodrin fragment. pSRD (lane 1), wild type human p94 (lane 2), active site mutated C129S (lane 3), L182Q (lane 4), G234E (lane 5), P319L (lane 6), H334Q (lane 7), V354G (lane 8), R490W (lane 9), R572Q (lane 10), S744G (lane 11), and R769Q (lane 12). The closed arrowhead indicates the 150-kDa fragment.

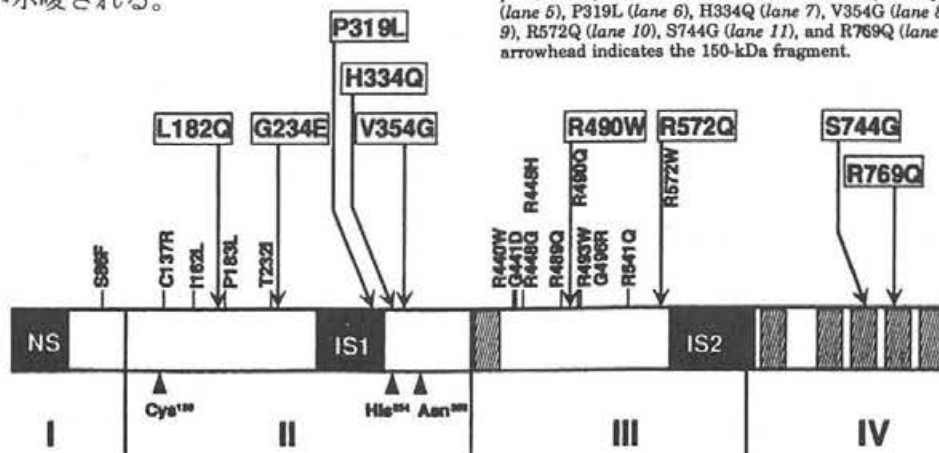


FIG. 1. Schematic structure of human p94. Missense mutations so far identified in LGMD2A are shown. Boxed arrows indicate the nine mutations analyzed in this study. I, II, III, and IV represent the four calpain domains. II is the cysteine protease domain, and IV is the Ca^{2+} binding domain with four EF-hand motifs represented by hatched boxes. Cys¹³⁰, His²³⁴, and Asn²⁵⁸ represent the active-site residues. NS, IS1, and IS2 indicate three insertion sequences unique to p94.