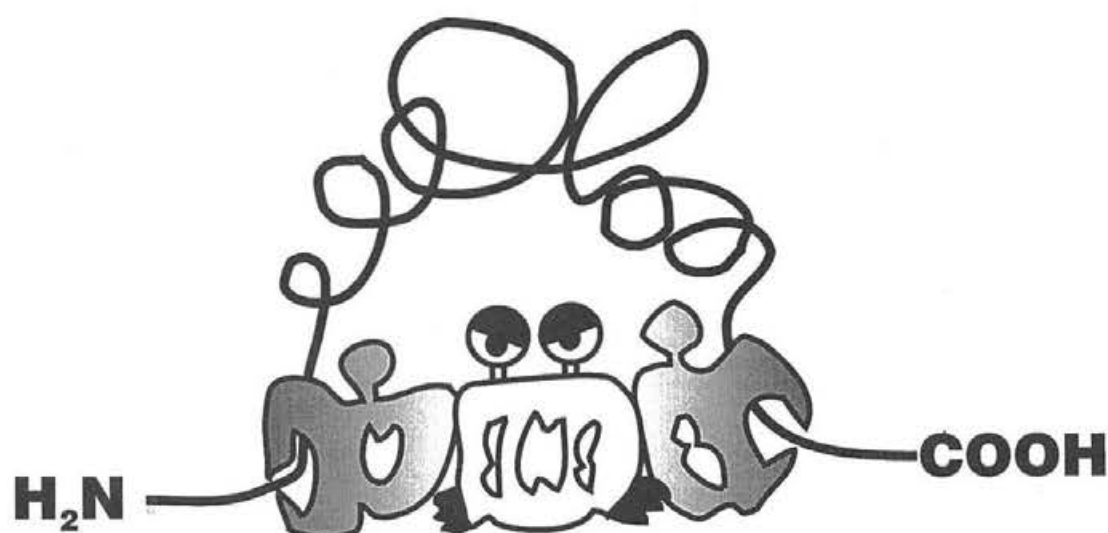


特定領域研究

「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8号（平成10年11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年度特定領域研究班・会議日程
- (3) 活動および関連事業
 - 1 班員名簿発行
 - 2 特定領域ニュース誌“ぶろておりしす”発行
 - 3 出版案内
 - 4 学会・集会案内
 - 5 第3回「細胞内蛋白分解」ワークショップ報告
- (4) 学会・集会報告
 - 1 蛋白研セミナー：蛋白質社会の不可逆的リモデリング
 - 2 FEBSミーティング傍聴記
 - 3 Gordon Research Conference on "Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors"
 - 4 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」
 - 5 日本遺伝学会シンポジウム：蛋白質分解による細胞機能制御
- (5) ミニレビュー
 - 1 神経線維腫症2型(NF2)蛋白質のカルパイン分解による新しい腫瘍発生機構
 - 2 Notch 研究の進展
 - 3 Wnt/Winglessのシグナル伝達研究の進展
 - 4 カドヘリン・カテニン接着機構とカテニン分解機構の関係
- (6) トピックス
 - 1 ユビキチン様蛋白質NEDD8によるcullin/Cdc53p family 蛋白質群の新しい修飾システム
- (7) 海外留学中研究者からの最新情報
ウィーンでサイエンス～”Kimとはこうしたもの”
- (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

本平成10年で「蛋白分解のニューバイオロジー」の班は3年目になり、終わりに近づきました。此の研究班の特徴は、これ迄の「プロテアーゼ」に関する数々の研究班と異なる力点が意識的に取り上げられていると思います。それは、プロテアーゼそのものよりも「蛋白分解が重要に関与する生物現象の解明」が意識して取り上げられている点であります。関与するプロテアーゼで分類すると、此の3年間でプロテオゾーム-ユービキチン系が40%、リソゾーム関連が30%、カルパイン関連が15%、セリン・メタロ・アシド-プロテアーゼを合わせて約15%でありました。此の数字は旧きもの、新しいものというよりも、我が国におけるプロテアーゼ研究のブームの歴史的推移を示しているとも見る事が出来ます。一つには、それらのプロテアーゼ研究の輸入された年代とこれらを裏打ちしている新しく台頭して来た生物現象が組合わさって大きな影響を与えていると言えます。先ず筋生理 Ca 代謝との関連でカルパインが多く研究されました。更に細胞周期や免疫関連でプロテオゾームが多く取り上げられ、システインプロテアーゼ系ではアポトーシスとの関連が新たな関心を呼んでいます。また膜結合プ

ロテアーゼ群はプロセッシングプロテアーゼとして、これから多くの研究が進むことでしょう。初期の頃のプロテアーゼそのものの研究の上に乗って、次のステップとしてプロテアーゼ、プロテオリシスを手段とし、研究目的を生物現象の解明に求める姿勢が実現しているのが此の班の特徴と思います。

さて、サイエンスという学問は歴史的体系の上に成り立っているものです。先人の積み上げた正しい学的体系の上へ上へと構築されていくものであります。歴史的背景の無いノイエスなどは無いので、歴史的構築の延長線上に、如何に新しい知を独創的概念を付け加えるかが重要と言えます。即ち、[温故知新]こそが科学者の進むべき道と信じています。新しい「流行り」の研究に乗るのが尊いのではなく、強い個性的研究により「ブーム」を創造することが尊ばれるべきと考えます。

現在の日本の深刻な経済不況は、政治が悪かった為でも、経済政策の失敗でもないと思います。日本国民の一人一人に、特に学者には大きな責任があると思っています。今の日本人には「安く、非常に良い」ものを産生する力は皆無であると言えます。労力は高価で、贅沢で怠惰、流行りには乗りたがるが独創的、知的財産を大切にはしません。日本がかって経済大国を作

り上げた時代のように「良き齒車」であれば良い時代は終わりました。現在日本の経済不況を救うのに最も必要なのは独創的、知的財産の蓄積であると信じています。日本は科学的にも後進国であると考えています。典型的一例をあげれば、米国、ロシアではとくに人を宇宙に出している時代にペンシル型ロケットに成功したと言って騒ぎ、今でも2人～3人と米国の宇宙ロケットに乗せてもらって有名になり、新聞は騒ぐ、等はほんの一例であります。医学・生物学でも同様であり、人ゲノムの決定・重要なベクター、モデル動物・特殊細胞等々は大半が輸入であり、地力では後進国であると言わざるを得ません。此の班には大きなエネルギーがあるのが特徴なので、此の班が独創的な知的財産を生むモデルグループとなり、日本の後進性を脱却する原動力になることを願っています。

平成10年10月下旬

特定領域研究(A)「細胞内蛋白分解」総括班メンバー

勝沼信彦 徳島文理大学健康科学研究所教授

(2) 平成10年度重点研究班・会議日程

1 International Symposium organized by Scientific Research on Priority Areas (Intracellular Proteolysis) from the Monbusho 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・錦（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

Final Program

13:00-13:05 Opening remark : K. Suzuki

13:05-13:35 W. BODE (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
Structures of MMPs and their endogenous inhibitors, the TIMPs

13:35-14:05 D. FINLEY (Harvard Medical School, USA)
Ubiquitination and the cell cycle

14:05-14:35 M. HOCHSTRASSER (University of Chicago, USA)
Targeting specificity and its regulation in the ubiquitin system

14:35-15:05 P.-M. KLOETZEL (Humboldt-University, Germany)
Immunoproteasomes: alteration of the peptide generation pathway and
cooperativity with PA28

15:05-15:25 Coffee Break

15:25-15:55 G.N. DEMARTINO (University of Texas Southwestern Medical Center, USA)
Regulation of proteasome function

15:55-16:25 A. L. GOLDBERG (Harvard Medical School, USA)
Proteasome homologs in prokaryotes that function as ATP-dependent proteases

16:25-16:55 W. BAUMEISTER (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
Structural studies on Tricorn protease

16:55-17:00 Closing remark : E. Kominami

Organizing committee:

K. Suzuki (Inst. Mol. & Cell. Biosci., Univ. of Tokyo)

E. Kominami (Juntendo University School of Medicine)

K. Tanaka (Tokyo Metropolitan Inst. Med. Sci.)

2 第3回 文部省科学研究費「蛋白分解のニューバイオロジー」シンポジウム

“プロテオリシス：生理機能と病態の多面的アプローチ”

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・高千穂（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

プログラム

13:00-13:10 領域代表者挨拶

13:10-13:40 名取俊二（東大院・薬）

「昆虫の発生・生体防御とプロテアーゼ」

13:40-14:10 瀬原（藤沢）淳子（都臨床研）

「膜結合型メタロプロテアーゼ-ディスインテグリン、メルトリンの形態形成における役割」

14:10-14:40 深水昭吉（筑波大・応用生物）

「プロテアーゼカスケードと血液脳関門修復機構」

14:40-15:00 休憩

15:00-15:30 大隅良典（国立基生研）

「酵母を用いた自食作用の分子機構の解析」

15:30-16:00 山本健二（九大・歯）

「カテプシンEとカテプシンDの新しい機能と病態」

16:00-16:50 P. Saftig (Universitaet Goettingen, Germany)

「Studies on the in-vivo function of cathepsins using mouse knockout models」

16:50-17:00 副代表者挨拶

問い合わせ先：木南英紀（順天堂大・医）

3 第2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

4 平成10年度：第2回 総括班会議

日時：平成10年12月7日（月）11：00～12：30

場所：東京ガーデンパレス

議題： 1. 経過報告

2. 本年度の研究組織と活動計画, 総務, 研究・企画など

3. 来年度の活動計画

4. その他

総括班メンバー

鈴木 紘一 東京大学分子細胞生物学研究所教授：領域代表・第一班班長

木南 英紀 順天堂大学医学部教授：領域副代表・第二班班長

岩永 貞昭 九州大学名誉教授：研究評価, チェック・レビュー

大島 泰郎 東京薬科大学生命科学部教授：研究評価, チェック・レビュー

勝沼 信彦 徳島文理大学健康科学研究所教授：研究評価, チェック・レビュー

志村 令郎 生物分子工学研究所所長：研究評価, チェック・レビュー

中西 重忠 京都大学大学院医学研究科教授：研究評価, チェック・レビュー

村上 和雄 筑波大学応用生物化学系教授：研究評価, チェック・レビュー

矢崎 義雄 東京大学医学部教授：研究評価, チェック・レビュー

矢原 一郎 東京都臨床医学総合研究所副所長：研究評価, チェック・レビュー

川島 誠一 東京都臨床医学総合研究所部長：研究企画, 調整

田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所部長：研究企画, 調整

石浦 章一 東京大学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“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勧め下さい。

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. Suzuki, K. and Bond, J.S.), Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 389, Plenum Press, New York, 306pp (1996)

"Biology of the Lysosome" (Eds. 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, 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. Hopsu-Havu, V.K., Jarvinen, M., and Kirschke, H.), IOS Press, 576pp (1997)

"Ubiquitin and the Biology of the Cell" (Eds. 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）

細胞工学 特集号 “ユビキチンシステムと細胞周期制御” 1999年5月号
発行予定（監修：田中啓二）

4 学会・集会案内

国内学会

- (1) 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（水）～19日（土）
パシフィコ横浜（田中啓二、市山 新）。
- (2) 平成10年度国立遺伝学研究所研究会：「新展開するユビキチンワールド」平成11年3月18日（木）～19日（金）
国立遺伝学研究所（静岡県三島市谷田1111）（横沢英良、山尾文明）
- (3) 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日（金）～4日（日）、東京国際フォーラム
東京（田中啓二、鈴木絃一）

国際学会

- (1) **"Mechanisms of Tumor Growth and Invasion mediated by Proteases"** November 5-6, 1998, UCSF, California, USA (M. Shuman et al.)
- (2) 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。
- (3) **"Proteolytic Processing and Physiological Regulation"** February 25-March 3, 1999, Beckman Center, California, USA (C. Craik et al.)
- (4) Keystone Symposium **"Metalloproteases: Chemistry, Biology and Medicine"** February 25-March 3, 1999, Tamarron, USA (H. Nagase et al.)
- (5) Keystone Symposium **"Protein Folding, Degradation, and Molecular Chaperones"** April 10-16, 1999, Copper Mountain Resort, USA
- (6) 3rd Workshop on **"Proteasomes"**, March 24-27, 1999, Clenmont-Ferrand, France (Y. Briand).
- (7) Third International Meeting on **"AAA Proteins and Their Cellular Functions"** April 16-19, 1999, The Salk Institute, La Jolla, California, USA (M. Latterich and S. Subramani)
- (8) CSHL Symposium **"Biology of Proteolysis"** May 5-9, 1999, Cold Spring Harbour, USA
- (9) 平成11年度日本生化学会春期シンポジウム：「**蛋白分解酵素による生物活性の制御とその医学的応用**」 平成11年5月19日（水）－21日（金）、 鳴門（松田佳子他）
- (10) **"Second International Serpin Conference"** June 27-July 1, 1999, Queens' College, Cambridge, UK (R. Carrell)

- (11) 5th FASEB Summer Research Conference on "**Ubiquitin and Protein Degradation**" July 31 -August 3, 1999, Saxtons River, Vermont, USA
(C. Pickart and G. DeMartino)
- (12) Vth International Symposium on "**Proteinase Inhibitors and Biological Control**" October, 1999, Brdo, Slovenia (V. Turk)
- (13) The First General Meeting of the **IPS** (International Proteolysis Society)
September 25-30, 1999, the Mission Point Resort on Mackinac Island, Michigan, USA (J. Bond et al.)

5 第3回「細胞内蛋白分解」ワークショップ

去る平成10年7月8-10日、神戸・六甲山ホテルにおいて第3回「細胞内蛋白分解」ワークショップが開かれた。今回は、7月8日夕刻に現地に集合し、夕食後、特別企画のポスタープレゼンテーションによる研究成果発表が行われた。この形式での発表は今回が初めてで、分野・方法論ともに多岐にわたる計24題の演題が集まった。蛋白分解の基礎的なメカニズムに関する発表では、基礎生物学研究所・水島昇先生から、ユビキチン化に相当する新しいprotein conjugation システムについて興味深い報告があった。水島先生らは、酵母の実験系からオートファジーに必須な遺伝子 (APG)を単離・同定し、そのうちAPG12およびAPG5遺伝子産物が、新しいprotein conjugation システムを構成していることを明らかにした。この過程にはさらに、APG7およびAPG10遺伝子産物がユビキチンリガーゼ様の機能で関与している可能性があり、このうちAPG7遺伝子産物に関する解析についても、順天堂大学・医学部・生化学教室の谷田以誠先生から報告があった。細胞死の基本的なメカニズムに関しては、大阪大学医学部・神経機能解剖の嘉糠洋陸先生から、線虫で細胞死に関わる遺伝子として同定されていたCed-4が、ショウジョウバエ由来の培養細胞株で内在性

のCaspaseを活性化し細胞死を促進するというデータが示された。また、国立精神神経センターの藤田恵理子先生らは、活性化されたCaspase3に特異的な抗体を作成し、この抗体を用いて神経系の発生過程でCaspase3の発現と活性化の時間的・空間的パターンにずれがあることを発見し、Caspaseの発現だけでなく、そのCaspaseの活性化刺激の存在が神経系の形成過程において重要であることを示された。その他、リソゾーム酵素の生体機能・病態への関与、カルパイン・カルパスタチンの発現調節とさまざまな細胞障害との関係、種々の蛋白質に特異的な活性化（あるいは不活性化）プロテアーゼの探索などに関しても多くの発表があった。ポスターによる発表は、口演形式の発表とは異なり時間を気にすることなく議論することができるため、夜遅くまで会場の至る所で活発に討論を行う姿が見られ、合宿形式で行うこのようなワークショップに非常に適した企画であると感じられた。

一夜明けて2日目、7月9日には、午前にミニシンポジウム、午後に特別講演というプログラムで、蛋白分解をめぐるさまざまな話題についてじっくりと各演者の方に講演していただいた。午前のミニシンポジウムでは5名の班員の先生が最新の実験データを示しながら「蛋白質のリモデリングと細胞機能」というテーマのもとに30分ずつの持ち時間で話された。まず、東京大学・生物生産工学センターの田之倉優先生は、20年近く前に単離されていたながら、その生化学的な解析が進んでいなかったクロコウジカビ由来の非ペプシン型酸性プロテアーゼに関して、結晶解析法やpeptide library法を用いてその活性中心の構造と基質特異性を解析した結果を報告された。次に、群馬大学・生体調節研究所の竹内利行先生は、Kex2型プロテアーゼであるfurinが胃粘膜上皮の増殖帯の上部に特異的に発現することを報告し、この上皮を構成する細胞が分化する際にfurinが重要な役割を果たしている可能性を示された。続いて、熊本大学・医学部微生物学教室の前田浩先生は、ウイルス・細菌感染による炎症反応によってマクロファージ・好中球等の細胞から放出されるNO代謝産物が、これらの細胞から同時に分泌されるさまざまなmatrix metalloprotease (MMPs)を活性化することを示し、このような活性化過程が炎症の病態を増悪させている可能性を示

唆された。また、京都大学・大学院医学研究科の岩井一宏先生は、鉄代謝に関するtransferrin receptor (TfR)とferritinの翻訳調節に重要な役割を果たしているRNA結合蛋白、Iron responsible element binding proteins (IRPs)のうち、IRP2が細胞内で鉄イオン依存的にユビキチン化され分解されることを示し、現在この過程に特異的なユビキチンリガーゼの単離・同定をめざしているところであることを報告された。午前のシンポジウムの最後には、九州大学・理学部化学教室の伊藤明夫先生が、ミトコンドリア前駆体蛋白のプロセッシングペプチダーゼ(MPP)の分子進化と機能分化に関して概説され、さらにその触媒部位・活性中心の同定や基質特異性の解析に関する最新のデータを示された。

昼食に続く午後の特別講演では、「蛋白分解研究の活性化をめざして」というタイトルのもと、班員以外から4名の先生をお招きして、1時間ずつそれぞれの専門の領域について概説していただいた。最初に、京都大学・大学院医学研究科・薬理学教室の成宮周先生には、低分子量G蛋白質のひとつのサブファミリーであるRhoをめぐる研究の最近の進歩について話していただいた。Rhoは細胞の運動・形態維持等の調節を行う重要な蛋白であるが、成宮先生はGTP結合型Rhoの下流のシグナリングカスケードを構成する機能分子として、p160ROCK、p140mDia、citron kinaseについて概説され、これらがそれぞれfocal adhesionやstress fiberの形成・細胞分裂といった過程にどのように関与しているのか、最新のデータを示しながら解説された。次に、東京大学・医科学研究所の勝木元也先生には、動物レベルでの遺伝子操作技術の進歩・発展について、これまでの歴史、そしてこれからの展望も含めて概説していただいた。個体レベルでの遺伝子操作は、外来遺伝子を卵細胞に導入することによるtransgenic動物の作成から始まり、その後ES細胞が樹立されたことにより遺伝子相同組換えで特定の遺伝子座を破壊することができるようになり(knock-out動物の作成)、さらに現在では第3世代の技術として破壊した遺伝子座にさらに人工的に改変した遺伝子を再導入するknock-in動物の作成ができるところまで進歩した。このような遺伝子導入技術の進歩と、動物の配偶子・胚の凍結保存法の進歩を基盤にし

て、勝木先生のグループでは目下、ヒト疾患モデル動物の系統的作成およびその凍結胚・配偶子バンクの構築を進めているとのことであった。3番目には、大阪バイオサイエンス研究所の垣塚彰先生に、最近神経変性疾患発症の分子機構として注目されているトリプレットリピート病のうち、CAGリピートがその原因となっている一連の疾患について概説していただいた。CAGリピート病は、遺伝子上のトリプレットリピートコードが実際に蛋白（ポリグルタミン）に翻訳されるという点で他のトリプレットリピート病とは異なっており、その異常蛋白が神経細胞の変性・細胞死に関与していると考えられている。垣塚先生は、この異常蛋白が細胞内のどの場所で機能障害を誘起するのかについて最新のデータを示しながら話された。最後に、東京大学・大学院医学研究科の井原康夫先生に、アルツハイマー病における神経細胞死について、病理学の立場からその病態の本質が何であるのかを解説していただいた。アルツハイマー病では神経原線維変化とアミロイドが沈着した老人斑のふたつが特徴的な病理所見として知られている。井原先生は、痴呆という臨床症状の程度とよく相関するのは神経細胞死の程度であり、この神経細胞死に深く関係する病理所見はアミロイド沈着よりむしろ神経原線維変化の程度の方ではないかという考えを述べられた。以上の講演のあと、立食形式の懇親会が開かれたが、その会場においてもさらに引き続き活発な討論が続けられた。

最終日7月10日は、本年度より新たに班員となられた16名の先生に、この特定領域研究の課題研究に関する研究の背景と今後の研究計画についてお話しいただいた。紙面の都合上、すべての発表に関して詳しく報告することはできないが、今年は細胞内シグナル伝達に関わる分子の分解機構に関係する研究が多く見受けられた。京都大学・ウイルス研究所の柳川伸一先生や京都大学・医学研究科の永渕昭良先生が発表されたWntシグナル伝達で重要な役割を果たし、かつ細胞接着装置とも密接に関係する β -カテニンの分解機構の重要性およびその解析、京都大学・医学研究科の黒岡尚徳先生が話された細胞分化に関係するシグナル伝達において重要な働きをしているNotch分子の細胞内ドメインを切り出す酵素の同定、そして東京工業大学・生

命理工学部の宮澤恵二先生が進めておられるHGFのシグナル伝達過程で形成されるHrs-Hbp複合体の分解機構の研究などである。また、東京都臨床医学総合研究所・細胞生物学研究部門の藤沢（瀬原）淳子先生の筋細胞の分化・形態形成における膜結合型メタロプロテアーゼの関与に関する発表も興味深かった。詳しくは前号（第7号）の「ぶろておりしす」に寄せられた総説を見ていただきたいが、藤沢先生は筋細胞の分化に関与する分子として、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メルトリンを同定され、現在その機能解析を進めている。これらの研究は、研究対象としてプロテアーゼがまずあってそこから仕事が始まったというのではなく、むしろ他の生命現象の解明を進めていくうちに対象としている蛋白の細胞内分解やその過程に関わるプロテアーゼが重要な意味を持ってきたことを示唆し、まさに本研究班のめざす方向に合致していると感じられた。その他、従来から活発に進められている新規プロテアーゼの探索・機能解析、プロテアーゼと疾患モデル・病態との関係に関しても新しい切り口の研究が紹介され、今後の成果が期待された。

以上3日間の研究発表は、その対象・方法、そしてそれらの結果すべてにおいて非常に多岐にわたり、蛋白分解という過程が生命現象のあらゆる局面において重要であるということを実感させられた。（大阪大学医学系研究科：渡部 剛）

(4) 学会・集会報告

1 蛋白研セミナー「蛋白質社会の不可逆的リモデリング」の報告

平成10年6月29—30日の2日間、大阪大学・蛋白質研究所にて、蛋白研セミナーが上記のタイトルで開催された。本セミナーは、プロテオリシスの問題を新しい視点からとらえたいという世話人の意図で企画された。プロテオリシスの特性は不可逆性にあると考えることができる。いろいろな生命現象がリン酸化—脱リン酸化のような可逆的な機構によって広範囲に制御されていることは言うまでもない。一方で、プロテオリシスを介する生命現象の制御に関する最近の爆発的な研究から、第一に、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プロセスを一方向に決定づけていること、第二に、プロテオリシスは、「ものごと」のおわりでなく、蛋白質相互のネットワークの再構築、即ち、リモデリングをもたらしていることが、浮かび上がってきている。そのような視点でプロテオリシスをとらえ、それらのキーワードをもりこんで、蛋白質社会の不可逆的リモデリング、という聞き慣れないセミナーのタイトルとなっているが、このタイトルの一つ一つの言葉の意味を深く味わえば味わうほど、プロテオリシスの新しい生物学的意義が見えてくるのではないだろうか。セミナーは4つのセッションに分かれて行われたが、ファジーなタイトルのセミナーにもかかわらず、多くの聴衆の参加のもとに、終始、活発な討論がなされた。

第1部では、プロテオリシスシステムの基盤として働くプロテアーゼに関する5つの話題がとりあげられた。田中啓二（都臨床研）は、ユビキチン-プロテアソームシステムの全体像の説明のあと、血管形成へのプロテアソームの関与、ODCを用いたプロテアソームの活性制御機構、プロテアソームアクチベーターPA28に関して最新の知見を述べた。さらに、今後の解明すべき研究課題（ユビキチンリガーゼE3、脱ユビキチン化酵素、ユビキチン様分子、プロテアソームの分子形態など）につい

て指摘した。ユビキチン-プロテアソームシステムについてモデルが先行しているきらいがあるが、生化学をベースにしたきっちりした研究が必要であることを実感した。鈴木紘一（東大分生研）は、カルパイン・スーパーファミリー（ubiquitous calpain, tissue-specific calpain, atypical calpain）の全体像の説明のあと、組織特異的カルパインの中で、特に病態と関連するp94について、p94の各モチーフの意味、p94に結合するコネクチンの発見とコネクチンが結合する意味、p94の変異と基質フォドリンの分解との関係など、詳細な研究成果について述べた。p94の個体レベルでの役割や、発生と関連するカルパインあるいはatypical calpainの機能についても興味がつきない。

長田重一（阪大院医）は、アポトーシス、特に、Fas ligand/Fas系を介するアポトーシス、そのカスケードを構成するカスパーゼ群とそれらのノックアウトマウスでの結果についての概説のあと、最近彼らが明らかにした、カスパーゼカスケードの下流で機能するCADとその阻害蛋白質ICADについて、それらの単離のストラテジーや両者の関係等を明快に述べた。CAD/ICADの発現がすべての臓器で起こっているのか、カスパーゼカスケードの引き金はなにか、不可逆的リモデリングの例であるプログラム細胞死におけるカスパーゼファミリーの機能など、まだまだ未知の部分が多い。

木原章雄（京大ウイルス研）は、微生物由来のATP依存性プロテアーゼに関する概説のあと、膜結合性プロテアーゼFtsHによる膜蛋白質の分解機構について、彼ら自身の詳細な実験結果に基づくモデルを紹介した。細胞膜におけるプロテオリシスは、発生におけるNotchのプロセッシングや神経変性疾患における異常蛋白質の蓄積の例のように、生命現象の進行やその破綻において極めて重要であるにも関わらず、まだまだ未開拓な研究分野である。FtsHのきれいな結果をお手本にしての研究が望まれる。

徳永文稔（姫路工大）は、小胞体における蛋白質の品質管理機構について、特に、糖鎖のプロセッシング阻害剤を用いた詳細な研究成果について述べた。また、シャペロンの関与についても言及した。最近、品質管理機構について研究の進展が著しい。分解はすべてプロテアソームの仕事と考えて良いのか、品質管理システムを構成している役者はもうそろっているのか、このシステムは単に小胞体で

フォールディングがうまくいかなかった蛋白質を壊すだけのシステムなのか、いろいろの疑問がわいてくる。

第2部では、細胞周期制御機構がとりあげられた。細胞は、増殖して分裂することで自らを複製し、生命活動を維持している。この細胞周期を進行させる機構として、可逆的機構（リン酸化と脱リン酸化）に加えて、プロテオリシスを介する不可逆的機構が重要であり、いまやこの不可逆的機構の研究が細胞周期研究の愁眉の課題となっている感がある。東江昭夫（東大院理）は、次々と単離した細胞周期制御に関わるプロテアソームサブユニットについて詳細に説明した。そして、最近単離されたLes1に関する研究成果から、細胞周期のそれぞれのステージで機能している26Sプロテアソームのサブユニット構成が異なると推論した。26Sプロテアソームのヘテロジェナリティの問題は今後の重要な研究課題であると考えられる。山尾文明（国立遺伝研）は、ユビキチンシステムやユビキチン様分子についての概説のあと、G2/M期でのユビキチン依存的分解に関与する、従来報告されていたE2とは異なる真のE2（UbcP4）について、また、G1サイクリン分解に関与するE3複合体SCFについて、研究成果を述べた。ユビキチンをとりまく世界はどんどん広がる気配である。従来からの考えがどんどん変革されて、その先にどんな役者が演ずる舞台が待っているのだろうか。本当の舞台を早くみたいという欲求に駆られる。戸所一雄（理研）は、M期で機能するE3複合体APCの制御機構に関する最新の研究成果を報告した。APCがリン酸化を介して正（Plkによる）にも負（PKAによる）にも制御されている（リン酸化部位が異なる）ことや、APCの基質認識の特異性を決めているCdc20ファミリー、それらとspindle assembly checkpointで機能する遺伝子産物との関係などを述べた。いまやM期の制御はAPCに集約される感がある。

第3部では、不可逆的リモデリングがまさにおきている、細胞間相互作用の様々な例がとりあげられ、その分子機構が議論された。横沢英良（北大院薬）は、受精と卵の活性化におけるプロテアソームの役割について述べた。受精は、二つの異なる生殖細胞が相互作用することにより新しい細胞の形態を生み出す、まさに不可逆

的リモデリングの良い例である。マボヤの受精の場合に、精子のプロテアソームは細胞表面に存在し、卵黄膜蛋白質のユビキチン依存的分解に関与することを示唆する研究成果が報告されたが、細胞外で機能するユビキチン-プロテアソームシステムの最初の例となろう。また、精子の刺激を受けた卵では細胞分裂が再開され、その時に、カルシウムシグナルで制御されるプロテアソームが働くことが報告されたが、細胞分裂制御におけるプロテアソームレベルでの制御の比重がまだ未知数である。瀬原（藤沢）淳子（都臨床研）は、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、特に筋肉分化におけるメルトリンの役割について、詳細な納得させられる研究成果を述べた。細胞分化にプロテオリシスが関与するとすれば、そこではまさに不可逆的リモデリングがおきている。メルトリンを構成する各ドメインの解析結果の説明もなされたが、すべてのドメインの機能がまだ判明していない。また、マウスにはかわいそうであるが、非常に小さいメルトリン・ノックアウトマウスは生まれるだろうか。佐藤博（金沢大がん研）は、細胞浸潤と形態形成における膜型マトリックスメタロプロテアーゼの役割について述べた。がん細胞が浸潤する時に基底膜の分解に働くゼラチナーゼ（がん細胞に付着している）とがん細胞自身が産生するその活性化因子（膜型マトリックスメタロプロテアーゼ）との関係はいかに巧妙なことか。また、その因子が正常細胞での形態形成にも関与するという。その時にはメタロプロテアーゼのターゲットは何であろうか。片桐晃子（ニッピ・バイオマトリックス研）は、細胞接着におけるユビキチン-プロテアソームシステムの役割について述べた。免疫担当細胞での接着因子LFA-1/ICAM-1を介するシグナル伝達が結果する接着と凝集のシステムを開発し、それをうまく利用してプロテアソームの関与をきれいに証明した。蓄積が観察されるマルチユビキチン化蛋白質の解析から、プロテアソームのターゲットが明らかになるのが待ち遠しい。永渕昭良（京大院医）は、カテニンの安定化機構について説得力ある研究成果を述べた。カテニンは、細胞接着装置の一員としてばかりでなく、発生（形態形成）におけるシグナル分子として機能していることから、カテニンをとりまく研究環境

はまさにホットな領域となっている。 β カテニンのAPCによる安定化とリン酸化を介する分解との制御のバランス、 α カテニンのカドヘリンによる安定化機構や未知の生理機能など、興味が尽きない。このセクションでとりあげられた発生・分化の現象は、時間軸が一方向的であり、不可逆的である。そこでは、役者である蛋白質たちの攻め合いを通しての細胞や組織のリモデリングがおきている。プロテオリシスが大いに役割を果たす舞台であることに間違いない。

第4部では、高次生命現象として、脳神経機能の話題がとりあげられた。脳神経機能の研究は国家的プロジェクトでもあるが、脳神経機能は不可逆的リモデリングの代表的イベントでもある。畠中寛（阪大蛋白研）は、ニューロンのアポトーシスについての概論のあと、ニューロン死を抑制する生存シグナルについての詳細な研究成果について述べた。形態形成ととらえられる、シナプス形成に伴う予定ニューロン死において、生存シグナルと死のシグナルとの微妙なバランスがどのように制御されているのだろうか。内山安男（阪大院医）は、神経細胞死におけるリソソームカテプシン群の役割について述べた。カテプシンインヒビターを巧みに使って、カスパーセカスケードが主導する神経細胞死の裏で、カテプシン類が生と死の重要な役割をはたしている姿が浮かびあがってきた。神経細胞死において、それらはどんな比重で役割を果たしているのだろうか。遠藤昌吾（理研）は、アメフラシの記憶におけるプロテアーゼtolloid/BMP-1とTGF- β カスケードの役割について述べた。記憶の蓄積を計測できるモデルを巧みに用いて、differential display法によるBMP-1の発見と、その研究の発展の成果としてのTGF- β の関与の証明、そして、それらの登場人物をもとにした記憶のモデルが紹介された。記憶を保証する神経の可塑性において、プロテオリシスが示す不可逆性との間を埋める機構はなんだろうか。西道隆臣（理研）は、神経変性におけるプロテアーゼの役割について、脳内におけるペプチドの寿命との関連で述べた。アルツハイマー病における β アミロイドの蓄積を説明する仮説として、脳内にペプチドを注入し、その代謝産物の構造を決めていくという地道であるがきっちりした方法を用いて、N末端のピログルタミル化がアミノ

ペプチダーゼ抵抗性（即ち、寿命の延長）を代謝産物に与えることで蓄積に至るという仮説が説明された。病態と蛋白質（あるいはペプチド）の翻訳後修飾との関係に興味がつきない。

このセミナーに出席されたある先生が、このセミナーはタイトルが良かったと言われた。ある演者の先生は、講演を依頼された時、最初、セミナーのタイトルを見て、これは何だと思ったけど、趣旨説明を読んで納得したという。各演者の先生方がタイトルを意識されてお話しいただいたのが、このセミナーが成功した（自己満足であるが）理由ではないかと思う。各先生方に感謝申し上げます。以上、プロテオリシスを介する不可逆的リモデリングに関する研究のさらなる発展を願って、独断と偏見に満ちた報告とします。

（北大院薬・横沢英良）

2 25周年記念 FEBS Meeting に参加して

はじめに

25周年記念 FEBS Meetingは1998年 7月 5日 から10日まで、デンマークのコペンハーゲン、国際会議・展示場 Bella Center にて開催されました。主催する今年の会長は、デンマーク・アールフス大の**J.E.Celis**（以下全て敬称略）で、総演題数908題、参加者リストがなかったので正確な参加者数は不明なのですが、2000人は優に越えていたと思われます。プリナリーレクチャー7題、ポピュラーレクチャー3題、そして41分野に亘る167題のシンポジウムと731題のポスター発表が5日の期間内に行われました。初日の5日と最終日の10日のセレモニーでは、この「ぷろておりす」諸文の中にしばしば登場なさるスロヴェニアの**V.Turk** が主催者側のチェアマンをつとめておられました。なお、ヨーロッパ各国の生化学会に属するメンバーのミーティングであるため、日本からの参加者は多くはありませんでしたが、演題数は13題、参加人数はおよそ30人くらいであったかと思われます。3日目以外は、1日にひ

とつずつプリナリーレクチャーがあり、主にそのあとシンポジウムが始められました。ポスター発表は9時から5時半までの掲示で1時半から3時までが討論時間でした。幅広い領域を網羅しているミーティングなので、筆者にとっては、広範な知識を学ぶ絶好の機会だったのですが、やはり体力と知力不足(?)のせいか、狭い範囲の分野にとどまってしまいました。本稿ではこのうち、基礎・臨床両側から反響を呼び、常に盛況、活況を呈している「ぷろておりす」に関与する分野の "Matrix proteases in tissue remodelling and invasion" および "Intracellular protein degradation" のふたつのシンポジウムで、どのような話題がとりあげられたか、ご紹介させていただきます。

Matrix proteases in tissue remodelling and invasion

7月8日(4日目)の午前中に Matrix proteases in tissue remodelling and invasion のセッションが開かれました。まず、はじめに**F.Biasi** (イタリア・ミラノ大)が、腫瘍細胞や尿中に高レベルに存在し、再発診断のマーカーとして考えられている uPAR(ウロキナーゼリセプター)/CD87 について、その分子構造とmigrationを中心とした機能制御がどのように関わっているかを報告しました。百日咳毒素によって uPAR/CD87の関わる migration活性が抑えられることから、Gタンパクとの関与を示唆し、また uPARのどの部分がmigration機能に関与しているのかを調べ、uPARのD1D2D3のdomain構造のうち、D1はmigrationと関わりがなく、D2D3の部分が重要であることを示唆しました。

次に、ポスター演題から選ばれた**N.Behrendt** (デンマーク・フィンセンラボラトリ)が、Prourokinase-uPAR complexと特異的に関わる新しい高分子膜タンパクについて話しました。この膜タンパクをU937細胞から単離してマスマスペクトロメトリ等で分析したところ、マウスで見つかっている機能不明の膜構成タンパクと似ていることを見出したと報告しました。このタンパクがPA(プラスミノーゲンアクチベーター)系を介する分解の基質や、接着で役割を果たしている細胞外タンパクの

結合に働いているものと推測し、この膜タンパクが浸潤におけるタンパク分解に重要な関わりを持つ可能性を強調していました。

3番目に**G.Murphy** (英国・イーストアングリア大)が、MMP (マトリックスメタロプロテイナーゼ) の役割解析への分子的アプローチという演題で報告しました。MMPの活性発現制御は、mRNAを合成する転写レベル、潜在型から活性型への変換、MMPの特異的阻害因子であるTIMPによる活性調節といった少なくとも3段階で行われていますが、このように厳格にコントロールされているMMPの活性発現制御の中でも、ゼラチナーゼA (MMP-2) の活性化および調節機構を中心に話しました。TIMP には1から4までの型があることがわかってきていますが、TIMP 2によってMT (膜型)-MMPによるプロゼラチナーゼAの活性化が抑制されることを報告しました。

4番目に、この25周年記念 FEBS Meetingで賞を受けた若き**C.Lopez-Otin** (スペイン・オヴィエド大)が、最近ヒト乳癌から同定されたコラゲナーゼ-3 (MMP-13) の発現調節について、アメリカ仕込みと思われるよどみのない精力的な話し振りで、聴衆を惹きつけました。皆から盛んに「コングラチュレーション!!」を受けていて、はて?なんだろう??若くして教授にでもなったのかしら、それともデンマークに別荘でも買ったのかしら、それとも結婚でも決まったのかしら、それにしてもFEBSの重鎮達が会う度に言っている、と同行の先生と噂をしていましたら、受賞というアカデミックなことだったのです。ですが、その日の講演は、白いノーネクタイのシャツにジーンズで行われました (ヨーロッパも段々アウトロー風の研究者が増えてきているのかなと思いました)。コラゲナーゼ-3は、胎児の成育に際し骨化する時、肥大したchondrocyteやosteoblastで例外的に見られる生理的で限局された発現と比して、乳癌、軟骨肉腫、頭頸部の扁平上皮癌などの悪性腫瘍やリュウマチなど、様々な病的状態で過剰発現されることが見出されました。乳癌でコラゲナーゼ-3の発現に関与するCytokineは、乳癌細胞からリリースされるIL-1とTGF- β であり、これらに呼応してストロマ細胞でコラゲナーゼ-3が発現されることを、彼らが突き止めたとのことでした。このストロマ細胞で産生されるプロコラゲナーゼ-3が、腫瘍

で産生されるプラスミノゲン・PA系からできるプラスミンまたはストロマ自身のMT-MMPによって活性型コラゲナーゼ-3になり、浸潤能を発揮していく可能性を示しました。ヒトコラゲナーゼ-3を過剰に発現したトランスジェニックマウスでは、DMBAで処理した後、乳癌が急速に増殖するので、コラゲナーゼ-3は腫瘍増殖を促進するプロテアーゼであると推測していました。なお、コラゲナーゼ-3は卵巣からの卵の遊離に関与する可能性も述べ、更にこの発現を調べることによって、乳癌や頭頸部の扁平上皮癌などの悪性度の診断に使える可能性もあると言及しました。

このセッションの最後に、デンマーク生化学会きっての有名なK.Dan ϕ （デンマーク・フィンセンラボラトリ）の登場でした。個人的な偏見に満ちているとご叱責を受けそうですが、筆者にとってとても思い入れのある名前なのです。ポストクの頃からこの先生のレビューや論文を、血栓止血線溶系および癌の浸潤などの分野で、度々、読ませていただいたものです。自分の目と耳で間近に見、聞くことができ感激でした。律儀な昔風の学者の雰囲気を漂わせ、にこやかで背の余り高くない優しそうな方で、デンマーク訛りの強い英語（日本語訛りの英語ですら上手く喋れない筆者の述べるべき言葉ではありませんが、自分のことは棚に上げて）を操りながら、細胞外タンパク分解におけるストロマ細胞の関与と機能重複について、整然と話を進めて行かれました。彼は、uPAが生み出すプラスミンとMMPsの間に、マトリックス分解に関して、機能的に重複があるかどうかを検討していました。創傷の修復にはuPA/MMPsの系が必須と考えられているのでこの系に注目し、Plg(プラスミノゲン)欠損マウスを用い、MMPsの広範囲阻害剤、ガラルジンを処理し、どのような条件で創傷修復に変化が見られるかを検討していました。その結果、野生マウスにガラルジンを処理しMMPsを阻害した場合は、無処理のPlg欠損マウスで見られる創傷修復の遅れと同様の遅れが認められましたが、一方で、Plg欠損マウスをガラルジンで処理すると、創傷修復過程は止められ、不完全のままであったと報告しました。創傷修復期間のマトリックス分解過程においては、プラスミンと幾つかのメタロプロテイナーゼの間で機能的に重複があることを示していると解釈していま

した。北欧および中欧は、元々血栓関係の研究が盛んであるせい、ポスター発表にも PA・プラスミンの分野など、凝固線溶関係の研究報告が多く見受けられました。

Intracellular protein degradation

7月9日(5日目)に Intracellular protein degradation のセッションが開かれました。4演題に加えて2演題がポスターから選ばれていましたが、このうち **M.A.Belozersky** (ロシア・モスクワ州立大) が発表予定だった、グロブリン分解のメカニズムの演題が取り消され、5演題となりました。

まず、分野違いの筆者も名前だけはよく存じ上げている **A.Hershko** (イスラエル・テクニオン-イスラエル工科研) が、細胞周期制御におけるユビキチンを介したタンパク分解の役割について、話題を提供しました。ユビキチン化に関与する酵素 E3: ユビキチンリガーゼ (サイクロソーム) は、不活性型がリン酸化されて活性型になること、これがサイクリンBの分解に働いてM期の中期から後期への進行に作用することなど、細胞周期研究およびユビキチン研究両面に大きく寄与した最近の結果のまとめを総説的に話しました。

2番目に **D.H.Wolf** (ドイツ・シュトゥットガルト大) が、タンパク分泌経路の入り口であるER (小胞体) 関与のタンパク分解について、酵母の系で最先端と思われる話を展開しました。折り畳みがうまく行かないなどによる欠陥分子の逆行輸送について、ERの膜に局在する carboxypeptidase yscY(CPY) を基質モデルとして、その mutant form を用いての実験を提示し、この逆行輸送はタンパク透過チャンネル Sec61p に依存していること、また分子シャペロン BiP とチャンネルモジュレーター Sec63p も関与している可能性が示されました。分解の過程では、Ubc6 と Ubc7、更に新しく見出された Der3 や Hrd3 が関与すること、加えて Ubc6 と Ubc7 を欠いている場合は CPY の逆行輸送、分解が不完全であることを示し、cytoplasm へ逆行輸送された CPY がユビキチン化され、26S プロテアソームの働きによって分解されることを示しました。<この話題に関しましては、ぷろておりしす第5号の「海外留学中研究者

からの最新情報」に、徳永文穂先生が専門家の香り高く詳細に書いていらっしゃると思います>。

3番目に**M.C.Rechsteiner** (デンマーク・コペンハーゲン大) が、**26Sプロテアソーム**という間口も奥行きも広く深そうな演題名で(分子動態と生理機能と解釈されますが)、その構造と機能解析について報告しました。26Sプロテアソームに6個存在するATPaseと、彼らが同定したポリユビキチン結合サブユニットS5aを含む幾つかのタンパクの相互関係を、構造と機能面から解析し、特に非ATPaseサブユニットS2はATPaseサブユニットS4のN末、およびS7のC末に結合することなどを示しました。

4番目に**B.Zhivotovsky** (スウェーデン・カロリンスカ研究所) が、**アポトーシス**における**プロテアーゼ**と題して、精力的に話を展開しました。まずアポトーシスに関与すると考えられるプロテアーゼとして、まず第一にカルパインを挙げ、その後エラスターゼやストロメライシンなど次々と列挙し、それらの総括を簡単に説明してから、カスパーゼに絞り込んで話が進みました。カスパーゼファミリーの分類と特徴から始まり、局在、プロカスパーゼの活性化機序に及び、Bcl-2の分解後、チトクロームcがミトコンドリアより放出され、APAF-1を介してカスパーゼの活性化が起きること、カスパーゼの活性化カスケードの増幅まで総論的な話に終始し、講義風で大変勉強になる発表でした。

最後は**W.Dubiel** (ドイツ・フンボルト大) が、**プロテアソームの19S制御サブユニット**に関わる新しい複合体の特徴について報告しました。この新タンパク複合体を彼らは**シグナロソーム**と呼び、この450KDa分子が、JAB1 (Jun activation-domain binding protein 1) および Trip15 (Thyroid hormone receptor-interacting protein 15)を含む少なくとも8つの異なるサブユニットからなっていることを示しました。単離したシグナロソームはI κ B α やc-JunのN末活性化ドメインSer63、Ser73をリン酸化するキナーゼ活性をもつことを報告し、シグナロソームと26Sプロテアソームは同じ細胞内分布を示すので、この両者がシグナルトランスダクションにおいてどのように協同作用をしているのか、現在検討中であるとして発表を終えました。

終わりに

今回のFEBS Meeting のなかでも、プロテオリシスに関するこの2つのシンポジウムは特に聴衆も多く集まり討論も活発であったようです。この分野から今年の受賞があったことも示しているように、今後の展開が益々活発になっていく感触を得た大変有意義なミーティングでした。プロテオリシスの複雑な制御、難解な調節、生理機能への関与等を少しでも深く、か弱い頭で理解するために、活発なミーティングにまた参加したいと願っております。

ミーティングの中身とは関係ありませんが、ポスター会場のパネルは、ずっとピンが入って抜けない程良いコルクで、日本で登場する、堅くてぐらぐらゆらゆらする壊れかけた塀のようなパネルと違って、とても使いよかったです。日本の会場も早く扱いやすいパネルにして欲しいと思います（パネルごと倒れそうになったこともあるので）。

アカデミックな話題の後のデザートに、雑感を少々つけ加えさせていただきます。東京ディズニーランドにも行ったことのない筆者は、夕食後ぶらりとチボリ公園に入って、これがあの有名な遊園地かと眺めてきましたが、目を回して次の日の勉強に支障が出るといけなないので、一度乗ってみたかった空飛ぶじゅうたんにも乗らず、ぐっと我慢して新しい知見の習得に備えました。私はベルギーでポストク時代を過ごしているので、ヨーロッパの夏の気候には多少慣れているように思っていたのですが、今年のデンマーク（北欧全体）は異常に厳しい涼しさ（寒さ）だったようで、暑い日本から行った体と装いでは太刀打ちできませんでした。どんなに心頭滅却すれば、と歯を食いしばって頑張っても寒さは限りなく肌に突き刺さり、遂に「スウェーターマーケット」なるお店で、脱脂していない獣の残り香高い分厚いセーターを買ってしまい、曇天の風吹きすさぶコペンハーゲンの日々を凌いだのでありました。こんな気候の折りの夕暮れ、会場である国際会議場Bella Centerからコペンハーゲン中心部までのおよそ10kmにも及ぶ寒風荒れるバス道路を、徒歩でチャ

レンジしました。行けども行けども街中央の駅付近に聳える重厚な佇まいの建造物に辿りつかず、溜息をつきながら、でもあきらめてバスに乗るようなことをせず、道端の花や草と交流しながらひたすらてくてく歩いて何とか帰り着けました。このことは、何故か今までとこれからの私の研究生生活を描いているような気がし、益々新幹線状態に突入し、鎬を削る領域に参加しながら屈折している私にとって、慰めと小さな希望となりました。たとえ亀の歩みでも、後発隊が＜新幹線のぞみ＞で走り抜けていってしまっても、各駅停車で小さな目標まで何とか辿り着きつつ、一駅ずつ前に進んでいこうと、かぼそく誓ったことは明るい思い出となりました。物価の高さに目を丸くしながら、TuborgやCarsbergの黄金色に目を細めて、有意義で充実したミーティングを終えました。

（都臨床研：芦野洋美）

3 The Xth Gordon Conference on Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors

第10回ゴードンカンファレンスが本年7月5日～10日、New Hampshire, New LondonのColby Sawyer Collegeで開催された。今回は、参加希望の申込が多く、参加人数が150人と限定されていたため、かなりの人に参加を辞退していただいたようで、その調整役を行ったChair personのDr. Charles Craikの苦勞が窺えた会であった。この会は第10回を迎えたが、今後の世界のプロテアーゼ研究の流れを、各セッションタイトルが示しているように思える。すなわちProteaseとProtease Inhibitorそのものの研究から一歩踏み出して、その応用研究、すなわち生理機能の解明の1つの道具としてProteaseを使用している点が特徴的で、Protease研究は今後益々広がりを見せることを予想させるに十分な会であった。本文の最後にSpeakerとタイトルを示すが、具体的に各セッションについて述べてみたい。

Session 1の"Molecular Mechanisms In Viral Pathogenesis"では、HIVに変わってC型肝炎

炎ウイルスに世界の目は集まっていることを強く印象づけた。HIV protease inhibitorを用いたAIDS治療の成功がいかに関に大きな刺激をこの方面の研究に与えているか見せつけられた思いであった。Gordon Conferenceは抄録は作らずできるだけHotなデータを発表するたてまえになっているが、企業秘密に関するこの分野では、むしろ食事の時の会話が刺激的であった。Session 2の "Molecular Mechanisms In Microbial Pathogenesis" では、Malariaに関する研究発表が活発で南米に近いアメリカでは大きな研究フィールドで、Cysteine Protease Inhibitorの有効性が焦点となっていた。また世界中で現在関心の高まっているVancomycin 耐性菌とPeriodontitisの原因菌、寄生虫のcysteine protease阻害剤による治療の有効性や寄生虫と肥満細胞との関連に注目した発表が印象に残った。

Session 3は"Blood Processes"で、このセッションの中でDr. Church (Univ. North Carolina)が生体内ではSerpin familyはヘパリンと結合した形で主に血管壁に存在し、Thrombinをはじめとした血液凝固因子群を調節を行っていることを詳細に報告して、ヘパリンの重要性をあらためて浮きぼりにした。Session 4の "Intracellular Signaling" では、主に Ubiquitin-Proteasome Pathway や20S Proteasomeの構造と機能相関にまで踏み込んだ研究の紹介があった。20S proteasome のProtease活性を比較的選択的に阻害する新しいいくつかのtripeptide vinyl sulfone proteasome inhibitorがDr. Bogoy (MIT) によって発表された。これまで彼等が発表していた化合物にさらに新しいいくつかのinhibitorが加えられ、今後 種々な応用が示唆された。

Session 5の"Extracellular Signaling"では、A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM) family metalloprotease のKuzbanianによるNotchのprocessingがDr. Pan (Univ. California) によって発表され、活発に議論された。発生、分化、種々の病態でのNotchの重要性が確認されたとともに、その活性発現に直接関与するKuzbanianが注目される。

Session 6の "Proteolysis in Apoptosis" で、Livingston (Vertex Pharmaceuticals) は、 "Regulating Apoptosis by Caspase Inhibitor" というタイトルで講演し、種々のICEインヒビターの効果の検証とCaspase 3, 9のノックアウトについて報告していた。なお

Caspase 1, CPP32のノックアウトについては、杭田慶介先生の仕事を引用していた。

Session 7の"Factors That Control Proteolytic Activity"では、後で Conference 賞をもらっていたDr. Venuti (AXYS Pharmaceuticals)による "Metal assisted protease inhibitor"が注目を集めた。この仕事は彼等が本年Nature, vol.391, 608-612に発表したものからかなり進展しており、Serine proteaseの active siteの His と Serに Zn^{2+} を介して、bis (5-amino-2-benzimidazolyl) methane (BABIM)をキレートさせ約1000倍近く親和性を増加させ、さらにその各種誘導体を作成してprotease に対する阻害特性を発現させることに成功していた。発表では抗アレルギー剤を目標に、tryptase阻害剤として APC366, 104, 1167等が臨床研究にまで発展して、強い抗喘息作用のあることを示していた。生体濃度の Zn^{2+} で十分効果を示すことから、このような親しいアイデアに基づく創薬の試みがさらに進展するものと思われる。

最後のSession 8の" Gene Regulation and Proteolysis " では、Goldstein (Univ. Texas Southwestern Medical CTR)や Leahy (Johns Hopkins School Med.)がそれぞれtranscription factorのSREBSやHedgehog Proteinのprocessing おいて、細胞膜内のCholesterolが重要な regulatorとして作用し、それぞれのprocessingに必要であることをみごとに証明していた。

以上のセクションの他に、Dr. James Travis による"Millstones, Milestones and Unturned Stones in Proteolysis"と題してこれまでの彼の仕事をReviewするBusiness Sessionが設定されていた。会は大変活発で、会の間で十分のDiscussion timeがあり満足のゆくものであった。日本のこのような学会との大きな違いは、製薬会社の研究グループが活発に発表し大学の研究室と実質的かつ深い交流のあることをうかがわせる点である。学会報告としては、抄録集がないため私の手帳に書き留めておいたものを今になって読み直し、何を話していたか思い出しながら書いたため正確でない点多々あると思う。書きながらせっきくの情報も何と早く忘れてしまうことかと情けなく、なかばあきらめながら書いた次第です。ともあれ、7月のさわやかな風とNew Englandのロブスターの味は忘れ難く、学問の刺激的な味と共に私の脳裡にし

みついていることは確かなようです。

Gordon Conference on Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors

Session 1 : Molecular Mechanisms In Viral Pathogenesis

Ben Dunn	"Beyond HIV PR"
Sherin Abdel-Meguid	"A Novel Class of Serine Proteases: The Human Herpesvirus Proteases"
Raffaele De Francesco	"Hepatitis C Virus NS3 Protease"
Steve Worland	"Human Rhinovirus 3C protease Inhibitors as Antivirals"

Session 2 : Molecular Mechanisms In Microbial Pathogenesis

James Travis	"A Biochemical Linkage Between Periodontitis and Cardiovascular Disease: Evidence for Proteinase Involvement"
Dan Goldberg	"Pathway of Hemoglobin Degradation by Malaria Parasites"
Chang Park	"Crystal Structure of VanX - the Source of Vancomycin Resistance"
Jon D. Goguen	"Proteases and Bacterial Virulence: A View from the Trenches"
James McKerrow	"Lessons on Protease Function and Evolution from the Parasite Protease Toolbox"

Session 3 : Blood Processes

Chuck Esmon	"Cellular Regulation of the Proteolytic Events that Control the Protein C Anticoagulant Pathway"
Shaun Coughlin	"Thrombin Signaling: Mechanisms and Roles in vivo"
Frank Church	"Regulation of Coagulation Proteases by Heparin-binding Serpins"
Sriram Krishnaswami	"Macromolecular Substrate Recognition by the Prothrombinase Complex of Coagulation"

Session 4 : Intracellular Signaling

Mark Hochstrasser	"Proteolysis in the Ubiquitin-Proteasome Pathway"
Michael Groll	"Crystal Structure of the 20S Proteasome from Yeast"
Matt Bogoy	"New Reagents for the Study of Proteasome Function"
John Flanagan	"Protein Degradation by Clp: Threading a Camel Through the Eye of a Needle"
Tom McGarry	"The Proteolysis of Geminin Controls DNA Replication"
Hidde Ploegh	"Proteasomal Proteolysis of Misfolded ER Proteins"

Session 5 : Extracellular Signaling

Bonnie Sloane	"Tumor Proteases: Location-Function Relationships"
Lisa Coussens	"Activation of Proteases During Neoplastic Progression"
D.J. Pan	"Kuzbanian, an ADAM Family Metalloprotease that Regulates Notch Signaling in Drosophila and Mouse Development"
Andreas Bergner	"The Crystal Structure of Human Trypsin: An Unusual Serine Proteinase"
Wolfram Bode	"Three-Dimensional Structure of TACE and Observations on Adamalysin-like Metalloproteinases"

Session 6 : Proteolysis In Apoptosis

Nancy Thornberry	"Introduction: Death Proteases"
Vishva Dixit	"Identification of Components of the Death Pathway"
Rob Halenbeck	"Downstream Targets of the Death Pathway"
Guy Salvesen	"Regulation of Cell Death by Protease Inhibitors"
Yuri Lazebnik	"How to Use Proteases to Kill Cancer Cells ?"
David Livingston	"Regulating Apoptosis by Caspase Inhibition"

Session 7 : Factors That Control Proteolytic Activity

Robert Fletterick	"Accommodation and Compromise in Ecotin-Protease Interaction"
Liz Hedstrom	"Structure/Function Studies of Zymogen Activation"
Jon Ellman	"Mechanism-based Combinatorial Chemistry"
Mike Venuti	"Metal Assisted Protease Inhibition"
Eric Quemeneur	"Converting a Prolyl-Isomerase into a Prolyl-Peptidase: A Subtle Balance of Luck and Rationale"

Session 8 : Gene Regulation and Proteolysis

Joe Goldstein	"The SREBP Pathway: Controlling Cholesterol by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor"
Bart de Strooper	"Alzheimer's Disease: from Proteases to Pathogenesis"
Dan Leahy	"The Hedgehog Protein: Controlling Developmental Signaling by Autoproteolysis and Cholesterol Modification"
Nicholas Duesbery	"Proteolytic Inactivation of MAP-Kinase-Kinase by Anthrax Factor"

Business Session

James Travis	"Millstones, Milestones and Unturned Stones in Proteolysis" (徳島大学酵素センター：木戸博)
--------------	---

4 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日両日、名古屋国際会議場にて第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が行われた（世話人は微生物化学研究所の青柳高明先生、事務局は名大・医・産婦の水谷栄彦先生）。シンポジウム、ポスターあわせて99演題が集まり、300人近くの研究者たちによる活発な討論が行われた。この会議は、プロテアーゼインヒビターの臨床応用という大きな柱があるため、生化学会、分子生物学会に見られない演題が多く、しかも産官民共同のため

まえ通り、広い視野からの基礎・臨床を越えた議論が飛び交った。

基調講演は田中（都臨床研）によるプロテアソームの総論で、この複雑な蛋白分解系の問題点をわかりやすく説明していただいた。御本人はユビキチンの話をしたそうだったが、本題がプロテアソームなのでプロテオリシスについて突っこんだ討論が行われた。E3や脱ユビキチン酵素がなぜ多様なのか、ユビキチン類似蛋白質の生理意義に関するまとめは勉強になった。よくわからなかったのは、プロテアソーム阻害剤がアポトーシスを誘導したり、逆に阻害したりする機構で、もちろん個々の説明は納得すべきものであったが、総括的には依然として真相は藪の中という感じであった。ラクタシスチンが血管新生を抑制するデータには感動した。

続いて行われたシンポジウム「循環器系疾患」では、プロテアーゼとインヒビターがヒトの生体の中でいかに多様に働いているかを再認識するような内容であった。藤森（成田赤十字病院）は動脈硬化におけるプロテアーゼの役割をまとめた。内皮に発現するMMPの話よりも、血管内視鏡による心臓冠動脈造影所見に圧倒された。冠動脈に細い内視鏡を入れ、私たちの血管内の動脈硬化の進行具合を直接見るのできるのである。横にいた田中氏が「本当に入れるの？ どこから？」と驚いていた。第一製薬の国忠は、抗凝固作用を目指して抗凝固因子Xa薬剤の話をした。後でも問題になったが、Xaを抑えた方がいいのか、トロンビンを抑えた方がいいのかについては、議論があるようである。キニノゲン欠損ラットの話をした馬嶋（北里大）は、カリクレイン-キニン系が腎臓でのナトリウム排泄の見張り役であることを示した。大阪医大の塩田は、心筋症ハムスターにおけるキマーゼの働きを述べた。面白かったのは、ラット、ラビットのキマーゼは、ヒト・犬・ハムスターのキマーゼとは基質特異性が異なり、アンジオテンシン-Iをアンジオテンシン-IIにしないで不活性断片に変える、という話である。実験動物で結果が違ふのだ。最後の水谷は、妊娠高血圧について問題点を指摘した。正常分娩と帝王切開では、血中アンジオテンシン-IIやブラジキニン量が違うなど、普段聞いたこともない話に聞き入った。これとは別に、胎盤性ロイシンアミノペプチダーゼのクローニングや、これが妊婦血

清で増えるシスチンアミノペプチダーゼ(CAP)やインスリン感受性アミノペプチダーゼと同一のものであり、GLUT4などと挙動を共にするなどという話は、私が十年ほど前にCAPを精製していたこともあって、その後の進歩に驚いた。

続いての口頭講演は、ポスターの中からいくつか選ばれたもので、それぞれ興味深い話が続いた。全部は紹介できないが、私の個人的な好みでいくつか感想を述べたい。ここでもMMPの話がいくつか出たが、どうも製薬会社の特許がからんでいるのか、新しいデータになると奥歯にものがはさまったような言い方が多かった。アシルペプチドヒドロラーゼ阻害剤(Ac-Lcu-CMK)によるアポトーシス誘導(山口、昭和薬大、阻害剤はこの酵素だけを阻害しているのだろうか)、プロカテプシンLが低濃度でガンのprogression factorとして働く(石堂、順天堂大、本当?)、前々から言われているAPP分解酵素の精製(松本、神戸大、この68kDa酵素の本体が知りたい)、Lys-gingipain欠損株の性質(岡元、九州大、Arg-gingipainの方が大切そうだが)、IL-6による筋蛋白質分解促進(辻仲、大阪大、筋肉にどれほどIL-6受容体が出ているのだろうか)、骨格筋カルパインp94の世界で初めての精製(金原、東大、誰かこのp94に効く阻害剤を知りませんか)、そしてアミノグアニジンによる白内障防止(猪股、都老人研、NOSを阻害すると逆に細胞内カルシウムが低下するという声あり)など、多彩な演題と観客との攻防に皆も楽しんだ。

次の日のポスター講演は、会場が広いこともあって、1人6分の説明はわかりやすいという声が多かった。一番楽しんだのは、座長をしていた名市大の佐々木先生ではなかっただろうか。午後のワークショップは、「炎症・免疫」というテーマで6演題が行われた。エラスターゼによるE-キニンの遊離(今村、熊本大)、好酸球の基底膜通過にキマーゼが関与している話(岡田、東北大)、コンピュータによるカテプシン阻害剤のデザイン(勝沼、徳島文理大)、急性すい炎時にサイトカイン産生が見られ、それがエラスターゼ阻害剤で抑えられること(柴田、熊本大)、Fasが効くのは肝障害時(須田、金沢大)、GVHD時(八木田、順天堂大)などの演題が続いた。臨床応用できるプロテアーゼインヒビターが多いことに驚いた。

この会は、企業からの協賛と会員からの会費で運営されている研究会で、これで3回目になる。会場は名古屋に固定されているせいか、暑いことを除けば、いろいろな分野の人たちと議論ができる良い機会である。「ぷろておりしす」読者の皆さんも、一度おでかけになられてはいかがだろうか。来年も、同時期に同じ場所で開催される予定である。

(石浦章一：東大・院・総合・生命)

5 遺伝学会シンポジウム「蛋白質分解による細胞機能の制御」

10月23日より25日まで北海道大学にて開催された第70回日本遺伝学会において、「蛋白質分解による細胞機能の制御」のシンポジウムを筆者と東江昭夫(敬称略、以下同じ)で企画した。近年の分子生物学会の巨大化に伴い、従来の伝統的ではあるが比較的小さなサテライト的な学会の弱小化、ないしは変化を感じている。かつては分子生物学の分野の研究者が席卷した遺伝学会も最近ではその包含する分野ないしは研究者に著しい変化と偏りを生じている。これらの現象は一概にマイナスとは言い難いが、いくつかの学会においてある種の弊害、ないしは問題が生じていることも指摘されてきている。したがって単に旧来の学会への懐古趣味ではなく、このことへの問題提起と分子生物学の遺伝学会への回帰を喚起することを目的の一つとした。そのために分子生物学的に昨今の蛋白質分解への関心の高いことはこれを題材にするに十分な根拠となった。さらに鈴木特定領域の研究成果の流布が目的に含まれたのも当然である。結果として以下の7名のSpeakerによったが、いずれも鈴木特定領域のメンバーあるいはそのグループに関係する方々である。本特定領域をカバーするもっと広い先生方を招聘したかったのだが、いかんせん3時間程度のシンポジウムではそれはかなわなかった。

各演題の細かな内容は特定領域の班会議での発表やポスターなどで報告されたものと重複する部分もあるので簡単に記するにとどめたいが、おおむね以下のよう

な内容で、使用可能な時間制限をいっぱいに使っての3時間半の講演、討論であった。

遺伝学研究所の岸努(演題(以下同じ)「SCFGrr1によるG1サイクリンCln2の選択的かつ時期特異的ユビキチン化」)は出芽酵母の細胞周期に関わるSCFユビキチンリガーゼの遺伝学的解析を行い、SCFと結合するF-Box蛋白質であるGrr1がユビキチン経路に関与し、G1サイクリンのユビキチン化における基質特異性とタイミングを決める分子の実態であることを示す自身の研究経過と結果を展開した。東京薬大の安田秀世(「哺乳類細胞のタンパク質のユビキチン化、sumo-1化の解析」)は、培養細胞でのサイクリン分解系のin vitro系を確立した結果、APCによるサイクリンのユビキチン化を促進する蛋白質でhctドメインを有する因子について報告した。あわせて、p53のユビキチン化におけるMDM2因子の関与、SUMO-1修飾系を見事なin vitro解析系で示した。東大、東江昭夫(「プロテアソームの遺伝学」)は出芽酵母におけるプロテアソーム制御サブユニット群の同定とそれらの間の相互作用の解析に遺伝学的手法を駆使して、その具体的な成果によって遺伝学的解析の有効性を示した。熊本大の小椋光(「エネルギー依存的蛋白質分解に関わるAAAファミリーATPase群」)はプロテアソームの制御ATPase群と自身の大腸菌FtsHに立脚しつつ、AAAファミリーATPase群を概説し、蛋白-蛋白相互作用の制御におけるそれらの役割を論じた。北大、横沢英良(「受精、発生制御と蛋白質分解」)は精子と卵の相互作用(精子の卵黄膜への結合と通過)における精子プロテアソームの機能、卵の細胞分裂過程におけるカルシウムシグナルによるプロテアソームの活性化を論じた。科学技術振興財団加藤プロジェクトの逢坂文男(「ユビキチン様蛋白質Nedd8によるCullin familyの新規修飾機構」)はユビキチン類似の蛋白質Nedd8がやはりユビキチン系と類似のしかしこれとは平行して区別され得る反応系をもって、これまた興味深い機能に関わっていると想像されている一群のCullin蛋白質を修飾することを見事と言うべき精緻なデータで証明した。これは必ずしも蛋白質分解に直結するものではないが、上述のSCFの構成因子のひとつがCullin蛋白質であることから興味を引く。最後に都臨床研の田中啓二(「自己と非自己の免疫識別とプロテアソーム」)は、ガンマ型インタフェロン

の誘導する3種のサブユニットに置換された"免疫プロテアソーム"がその活性化因子 PA28とともに内在性抗原からMHCクラス I リガンドを正確に切り出す機構を、抗原 エピトープ内のプロリン残基がプロテアソームによるランダムな分解を防いでいる として演出してみせた。

小さな学会でのマイナーな分野でのシンポジウムだけに、当初は参加者がいない のではと危惧もしたが、実際には満席とはいかなくとも常時かなりの参加人員であっ た。演者の先生方の研究成果への興味がその第一義なのだが、同時に細胞機能制御 における蛋白質分解の役割にたいする昨今の関心の高まりを反映しているものと思 われる。

(国立遺伝研：山尾文明)

(5) ミニレビュー

1 神経線維腫症2型(NF2)蛋白質のカルパイン分解による新しい腫瘍発生機構

はじめに

神経線維腫症2型(NF2)の病因遺伝子産物マーリンは腫瘍抑制蛋白質であり、多くの髄膜腫・聴神経鞘腫の神経系良性腫瘍で変異を受けている。遺伝性NF2家系では変異と腫瘍発生の相関(浸透度)が極めて高く、この腫瘍発生はマーリンの機能に強く依存していることがわかる。しかし、遺伝子変異が腫瘍の約半数程度にしか検出されないことは、マーリンの機能を不活性化する別の機構があることを予感させる。今回、NF2遺伝子異常のない腫瘍細胞で、カルシウム依存性プロテアーゼ(カルパイン)によるNF2蛋白質の過剰分解による不活性化機構を証明した¹⁾。カルパイン依存性蛋白質分解が直接に腫瘍発生に関わる最初の例と考えられた。

■ 神経線維腫症2型

神経線維腫症2型(neurofibromatosis type 2: NF2)は約4万人にひとりの発生頻度をもつ常染色体優性遺伝病である^{2,3)}。この疾患の特徴としては、髄膜腫・聴神経鞘腫などの神経系良性腫瘍を高率に発生することである。NF2患者に加えて、一般集団に散発性に発生した髄膜腫・神経鞘腫は成人の中枢神経系腫瘍の約30%と大きな部分を占めている。NF2遺伝子はヒト22番染色体(22q12)に位置し、マーリン(merlin)またはシュワノーミン(schwannomin)と呼ばれる595アミノ酸残基の蛋白質をコードしている^{4,5)}。アミノ酸配列から、バンド4.1スーパーファミリーに属するエズリン(ezrin)・ラディキシン(radixin)・モエシン(moesin)などのERM蛋白質群に相同性を持っている。これらのメンバーは、アミノ基末端側の約30 kDaのERM相同領域で細胞膜蛋白質に結合し、カルボキシル基末端側の α -ヘリックスに

富む領域で細胞骨格蛋白質と結び付くと考えられる⁶⁾。竹島らはERM相同領域に対する5つの結合蛋白質 (p165, p145, p125, p85, p70) を見い出している⁷⁾。

NF2遺伝子の変異は約50 - 80%のNF2腫瘍、15-35%の散発性髄膜腫、20-60%の散発性神経鞘腫に見い出されており、他には乳癌・大腸癌・中皮腫などが挙げられる²⁾。これらの遺伝子の変異には、以下のような特徴が知られている。第一に、ナンセンス変異・フレームシフト変異・スプライス変異の頻度が高く、新しく生じた停止コドンのためにアミノ基末端側の半分位の蛋白質が合成される。しかも、このような不完全なマーリン蛋白質は腫瘍組織では全く検出されないことから、生合成の後に速やかに分解されていると考えられる。一方、ミスセンス変異は極めて少ない。第二の特徴は、ほとんどのNF2患者に腫瘍が発生するという高い浸透度であり、髄膜腫・神経鞘腫の発生はマーリンの腫瘍抑制機能の喪失に高度に依存していることを示している。それにも関わらず、約半数の散発性の髄膜腫・神経鞘腫には変異が見い出されていない。しかも、マーリン蛋白質が髄膜腫・神経鞘腫でほとんど検出されないことが数多く報告されている。Stemmer-Rachamimovらは、22例の神経鞘腫の中で12例で、NF2遺伝子の両アレルが不活性化されていないがマーリンが検出されないことを示した⁸⁾。そこで、我々はマーリンの翻訳後調節、特に蛋白質分解がマーリンの不活性化に関連するのではないかという仮説を立てた。

■ カルシウム依存性プロテアーゼ (カルパイン)

マーリンの蛋白質分解機構を調べてみると、カルパインによって特異的に行われることが判明した。カルパインはカルシウム依存性システインプロテアーゼであり、多くのファミリーメンバーの総称である⁹⁻¹¹⁾。ほとんどの組織・細胞で恒常的に発現するものとして μ -カルパインとm-カルパインがあるが、活性化に必要なカルシウム濃度を除いては生化学的に違いは見られない。前者は μ M、後者はmMレベルのカルシウム濃度でin vitroで活性化を受ける。どちらのカルパインも分子量80 kDaと30 kDaのヘテロ2量体であり、30 kDaのサブユニットは共通である。活性部位は

80 kDaのサブユニットに存在するが、両サブユニットともにカルボキシル基末端側にカルモジュリン類似のカルシウム結合領域をもつ。この酵素は細胞内カルシウム濃度が上昇すると細胞膜に結合し、自己消化することで活性化されることが知られている。正常および病的な状態において、カルパインはカルシウム濃度の変動に対する細胞性レセプターとして働いているようである。実際に、カルパインは細胞骨格・細胞膜蛋白質、キナーゼやフォスファターゼなどの酵素、転写因子などの基質を限定分解することで、バイオモデュレーターとして機能すると考えられている。

■ カルパインによるマーリン蛋白質のin vitroでの分解

マーリンの分解機構を調べるために、ヒト初期培養線維芽細胞を各種の特異的なプロテアーゼ阻害剤を用いて24時間処理した。カルボキシル基末端に対する抗マーリン抗体を用いたウエスタンブロット解析では、システインプロテアーゼ阻害剤(E64d)とカルパイン阻害剤(carbobenzoxyl-leucyl-leucinal : Z-LLal¹²⁾の処理で約70kDaの完全長のマーリンが蓄積した。これは、本蛋白質がカルパインによって恒常的に細胞内分解されていることを示唆している。対照的に、プロテアソーム阻害剤(ラクタシスチン、MG132)やライソソーム阻害剤(クロロキン)は影響を与えなかった。

マーリンがカルパインの基質であることを証明するために、in vitro翻訳システムで合成した[³⁵S]メチオニン標識マーリンまたは悪性グリオーマ由来のU-251MG細胞の細胞質(S100)分画の中に含まれるマーリンを、精製したカルパインとともに反応させた。マーリンは μ -カルパインとm-カルパインの両方で、カルシウム濃度および反応時間に依存的に分解された。この分解はZ-LLalによって特異的に阻害された。次に、マーリンのカルボキシル基末端側からの各種欠失体をGST融合蛋白質として大腸菌で合成して、m-カルパインによる分解反応を行った。その結果、マーリンのアミノ基末端側からコドン339までをもつ蛋白質ではカルパイン分解を受けるが、コドン288までしか持たない場合は分解を受けなかった。すなわち、カルパイン分解部

位がコドン288から339の間にあることが判明し、この部分はERM相同領域と α -ヘリックスに富む領域のドメイン間の境界に当たっていた。リコンビナントのマーリン蛋白質をm-カルパインで限定分解して、その分解産物のカルボキシル基末端のアミノ酸シーケンスを施行した¹³⁾。その結果、コドン295とコドン299にあるロイシン残基のアミノ基側で切断されていることが明らかになった。

■ カルパインによるマーリン蛋白質の細胞内分解

マーリンの細胞内分解の解析を有利にするために、アミノ基末端側にHAエピトープを融合したマーリン蛋白質（完全長のマーリンおよびカルパイン切断部位（コドン295-299）を欠失した Δ マーリン）を哺乳細胞発現ベクターを用いてCOS-7細胞で発現させた。細胞内のカルパインを活性化するために、5 μ Mのカルシウムイオノフォア（イオノマイシン）と10mMのカルシウム濃度を含む培養液の中で30分間まで経時的に処理した。HAエピトープに対する抗体を用いたウエスタンブロット解析で、HA-完全長マーリンはイオノフォア処理後15 - 30分で顕著に減少して、それに対応して約35 kDaのカルボキシル基末端側の分解産物を認めた。この分解はZ-LLalによって特異的に阻害された。一方、HA- Δ マーリンがイオノマイシン処理後でも分解を受けなかったことは、欠失した領域が細胞内でもカルパインの切断部位であることを示した。

■ 髄膜腫・聴神経鞘腫におけるマーリン蛋白質の欠如とカルパインの活性化

NF2遺伝子の変異とマーリン蛋白質の解析が24例の髄膜腫・聴神経鞘腫でなされた。内訳は、NF2患者由来の髄膜腫（3例）、散発性の髄膜腫（6例）、NF2患者由来の聴神経鞘腫（13例）、散発性の聴神経鞘腫（2例）であり、陰性対照として悪性グリオーマ細胞を用いた。最初に、in vitroの転写および翻訳システムを用いた蛋白質翻訳停止テスト（protein truncation test）でNF2遺伝子変異を解析した¹⁴⁾。簡単には、腫瘍組織からmRNAを抽出して逆転写反応を行い、T7プロモーターを付けた

NF2 cDNAをPCR増幅した。大腸菌抽出液の中でNF2 mRNAを転写して、ウサギ網状赤血球ライセート中で $[^{35}\text{S}]$ メチオニン標識マーリンを得た。結果として、解析した腫瘍の70.8% (17/24例) に翻訳停止した短いマーリンが見られ、残りの7例 (3例の散発性の髄膜腫、NF2患者由来の髄膜腫 (1例) と聴神経鞘腫 (3例)) では完全長マーリンが合成された。後者の7例ではNF2 mRNAが発現し、そのcDNAシーケンス上もNF2遺伝子変異が認められなかったもので、細胞内では完全長のマーリンが生合成されているものと予想される。しかしながら、ウェスタンブロット解析を行うと、髄膜腫と聴神経鞘腫ではマーリンが全く検出されなかった。対照の悪性グリオーマ細胞はマーリンを発現していた。次に、生理的な細胞内カルシウム濃度で反応する μ -カルパインの活性化状態を調べた。80 kDaの不活性型、78 kDaの中間型、76 kDaの活性化型の3つのフォームがあり、いずれもアミノ基末端側の自己消化によって活性化されることが知られている。この6例の内に4例で、中間型および活性化型 μ -カルパインが認められ、悪性グリオーマ細胞ではカルパインの活性化は全く見られなかった。

■ 散発性髄膜腫における活性化型カルパイン

髄膜腫の腫瘍組織を活性化型 μ -カルパインを特異的に認識する抗体を用いて免疫組織化学染色を施行した。この抗体は不活性型および中間型には交叉反応はないことが判明している¹⁵⁾。活性化型 μ -カルパインが腫瘍細胞およびその初期培養細胞の細胞質に強く染色された。一方、腫瘍組織の中の間質性非腫瘍細胞、グリオーマ組織およびU-251MG細胞では検出されなかった。対照として、U-251MG細胞をイオノマイシンで処理すると、細胞質に活性化型 μ -カルパインが検出された。これらの結果は、腫瘍細胞の中でカルパインシステムが恒常的に活性化されていることを示した。

最後に、腫瘍細胞の中でマーリンが実際にカルパイン分解を受けていることを証明するために、髄膜腫の初期培養細胞と対照の線維芽細胞を経時的にZ-LLalで処

理してカルパインを阻害した。髄膜腫細胞ではマーリンが処理後6時間で速やかに著増したのに対して、線維芽細胞ではほぼ同レベルに増加するのに24時間を必要とした。これは、マーリンがカルパイン分解で不活性化されていることを明示した。

■ マーリンのカルパイン分解の意義

マーリンがカルパインによって分解されることは、多くの細胞骨格関連蛋白質がカルパインの基質であることと一致している。現在のところ、マーリンの正確な蛋白質機能は不明であるが、おそらく細胞死や細胞老化に関わっているものと考えられる。そのため、マーリンが不活性化された細胞は不死化を獲得するのであろう。また、本蛋白質がカルパインで制御されることは、カルシウムシグナル経路の中で機能することも示唆している。共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫細胞染色を行うと、マーリンと μ -カルパインの細胞内局在が比較的一致しているので、細胞内で相互作用は可能であると予想される。カルパイン分解部位はERM相同領域と α -ヘリックスに富む領域のドメイン間の境界に当り、その切断部位のアミノ基側にNISY配列が見られる。インテグリン β 3サブユニットなどの蛋白質では、カルパイン切断部位に近接してNXXYモチーフが見い出されている¹⁶⁾。ERM相同領域を含む約35 kDaの分解産物が認められたが、翻訳停止変異で合成された不完全なマーリンが腫瘍細胞内で全く検出できないことから、マーリンの分解産物は極めて不安定な存在であることがわかる。翻訳停止変異およびカルパインによる過剰分解のいずれにおいても、結果的にマーリンの不活性化に至ると考えられる。このように、マーリンのカルパイン分解はその蛋白質機能の停止を導くと思われる。

カルパインの活性は細胞内おそらくは局所のカルシウム濃度で決められるが、基質側のリン酸化状態がカルパイン分解への感受性に影響するという報告がある。内皮細胞性アクチン結合蛋白質、血小板コタクチン、コネキシン-32、タウ、ニューロフィラメントなどで知られている¹⁷⁾。マーリンがそのセリン残基の恒常的なリン酸化を受けるので、同様にリン酸化でカルパイン分解が調節されているのかも知れ

ない。実際、リン酸化によってマーリンの細胞内局在が変化するような結果も得ている。腫瘍細胞の中でマーリンがカルパインによって選択的に分解されることには、何らかの細胞性因子が関与することが予想される。

髄膜腫と聴神経鞘腫において、NF2遺伝子に変異がない腫瘍でマーリンのカルパイン分解が過剰に活性化されていた。最近、腫瘍発生のプロセスに蛋白分解システム、とりわけユビキチン-プロテアソーム経路が関わっていることが報告された。ヒトパピローマウイルスの感染細胞での腫瘍抑制蛋白質p53や乳癌・大腸癌でのサイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白質p27である¹⁸⁻²⁰)。マーリンのカルパイン分解は、腫瘍発生とカルパイン依存性分解が直接結び付いた例であった。このような蛋白質の過剰分解による不活性化の概念に対して、蛋白分解変異 (proteolysis mutation) という名称を提案した。

NF2に関連した腫瘍は病理学的には良性で比較的ゆっくりと増殖することから、その本態は細胞死の抑制、すなわち不死化の状態にあると考えられる。しかし、臨床医学的には、外科手術が困難であったり再発を繰り返すために重篤な疾患である。我々のデータは、カルシウムブロッカーやカルパイン阻害薬剤がNF2腫瘍の細胞増殖の抑制や再発の防止などの治療目的に応用できる可能性を示唆している。英国で現在まとめられているEmerging Therapeutic Targets (基礎研究から将来の薬剤として応用可能な情報を集約する) のひとつに加えられる予定である。

文献

- 1) Kimura, Y. et al.: The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nature Medicine* 4:915-922, 1998.
- 2) Evans, D.G. et al.: A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. *J. Med. Genet.*, 29:841-846, 1992.
- 3) Martuza, R.L. and Eldridge, R.: Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). *N. Engl. J. Med.*, 318:684-688, 1988.

- 4) Rouleau, G.A. et al.: Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 363:515-521, 1993.
- 5) Trofatter, J.A. et al.: A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72:791-800, 1993.
- 6) Tsukita, S. and Yonemura, S.: ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:70-75, 1997.
- 7) Takeshima, H. et al.: Detection of cellular proteins that interact with the NF2 tumor suppressor gene product. *Oncogene* 9:2135-2144, 1994.
- 8) Stemmer-Rachamimov, O.A. et al.: Universal absence of merlin, but not other ERM family members, in schwannomas. *Am. J. Pathol.* 151:1649-1654, 1997.
- 9) Saido, T.C. et al.: Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 8:814-822, 1994.
- 10) Suzuki, K. et al.: Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376:523-529, 1995.
- 11) Sorimachi, H. et al.: Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328:721-732, 1997.
- 12) Tsubuki, S. et al.: Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J. Biochem.* 119:572-576, 1996.
- 13) Burkhart, W.A. et al.: Electrophoretic transfer of proteins to Teflon tape and membranes for N- and C-terminal sequence analysis. *Anal. Biochem.* 236:364-367, 1996.
- 14) Koga, H. et al.: Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which miss exons in the ERM-homology domain. *Oncogene* (in press, 1998).
- 15) Saido, T.C. et al.: Autolytic transition of μ -calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis forms. *J. Biochem.* 111:81-86, 1992.
- 16) Du, X. et al.: Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. *J. Biol. Chem.* 270: 26146-26151, 1995.
- 17) Elvira, M. et al.: Phosphorylation of connexin-32 by protein kinase C prevents its proteolysis by μ -calpain and m-calpain. *J. Biol. Chem.* 268: 14294-14300, 1993.
- 18) Scheffner, M. et al.: The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75:495-505, 1993.

19) Catzavelos, C. et al.: Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27kip protein:prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Med.* 3:227-230, 1997.

20) Loda, M. et al.: Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med.* 3:231-234, 1997.

(熊本大学 医学部 腫瘍医学講座：中尾光善)

2 Notch 研究の進展

1. Notch受容体の役割

Notchは、ショウジョウバエから哺乳類に至るまで幅広く保存されている1回膜貫通型細胞表面受容体分子であり、発生過程において細胞間相互作用に極めて重要な役割を果たしていることが、ショウジョウバエや線虫の遺伝的解析により知られている。これまでNotch受容体にはショウジョウバエで1種類、線虫で2種類(LIN-12, GLP-1)、哺乳類で4種類(Notch1-4)存在することがわかっており、リガンドとしてはDelta, Serrate (Jagged), LAG-2といった、Notch同様、1回膜貫通型細胞表面蛋白質の存在が報告されている。

リガンドとの結合によりNotchを介してシグナルが伝えられると、細胞の分化は抑制され、未分化な状態が維持される。具体的には、constitutive active formであるNotch細胞内領域を強制発現させると、筋芽細胞のC2C12の筋管形成を抑制する(1)ことや、リガンドの1つDeltaを過剰かつ安定に発現させた細胞とC2C12(C2C12はNotch1-3を内在的に発現している。)を共培養すると、筋管形成が抑制される(2)ことが、我々や他の研究室によって明らかにされてきた。またNotchからのシグナルは、筋形成(myogenesis)以外にもneurogenesis、hematopoiesis、angiogenesis、adipogenesisなど、非常に広範囲にわたって細胞の分化に抑制的に働いて、細胞を未分化な状態にとどめておくことが知られている。

2. Notch受容体のドメイン構造

生物種によってNotch受容体の大きさは異なるが、マウスNotch1は、2531アミノ

酸からなり分子量は約300kDである。Notch受容体はいくつかの特徴的なドメイン構造を持ち、生物学的活性にそれぞれ重要な役割を担っていると考えられている。細胞外領域にはEGF様リピートがあり、この領域がリガンドとの結合部位であると予想されている。EGF様リピートと約20アミノ酸の膜貫通領域の間にはLN (LIN-12/Notch) リピートと呼ばれるシステイン残基に富む領域が存在する。このLNリピートはNotch受容体の活性化を負に制御していることが、ショウジョウバエや線虫を用いた遺伝的解析から明らかになっている。

Notch細胞内領域を単独で細胞に発現させるとconstitutive active phenotypeを示すことから、細胞内領域にNotchシグナルの伝達に重要な役割を担うドメインがあることが予想された。実際、異種間のNotchで高度に保存されたアンキリン(ANK) リピートを細胞に発現させるだけでconstitutive active phenotypeを示すという報告や、ヒトでは、Notch3のANKリピートの変異が、脳卒中や痴呆を引き起こすCADASILという疾患の原因であることが最近突き止められたことから、このドメインがNotchシグナル伝達に極めて重要であることが推測される。また膜貫通領域とANKリピートの間には、Notchシグナル系の下流に位置するDNA結合蛋白質RBP-J (ショウジョウバエSu(H)のmammalian homolog) に直接結合するRAM (RBP-J associated molecule) ドメインと呼ばれる約100アミノ酸の領域が存在する(3)。RAMドメインの種間の保存の度合いはANKリピートに比べ低い、RBP-Jとの結合に必須のアミノ酸は種を越えて保存されている。ANKリピートよりC末側は、種間の保存の度合いが分子の中で最も低く、C末端にはPEST領域が存在する。またANKリピートとPEST領域の間には、ショウジョウバエNotchと哺乳類Notch1でのみ、グルタミン残基に富むOPA領域が存在するが、その機能についてはいまのところわかっていない。

3. Notchシグナル活性化の分子機構

リガンドがNotchに結合するとどのようにシグナルが細胞内に伝わるのかは、長い間不明であった。しかし、この問題もショウジョウバエや線虫を用いた遺伝的解

析の結果、Notchシグナルの下流分子が次々に見つかったことによって大きな発展がもたらされた。特にショウジョウバエでは、Su(H), Hairless, dextex, dishevelled, E(spl) complex, grouchoといったNotchシグナルの下流に位置する分子が数多く同定され、それら分子の中の1つであるSu(H)のmammalian homologが、我々の研究室で同定されたRBP-J（以前はRBP-Jkと呼ばれ、またCBF1と呼ぶこともある。）であることが判明するに至り、我々も偶然、いや運命的に(?) Notch研究に参入することになった。前述したようにNotchはRBP-Jに直接結合するが、膜表面受容体であるNotchと、DNA結合蛋白質であり核内に存在するRBP-Jがどのように細胞の中で相互作用するのかについては、大別して次(1と2)の2つのモデルが提唱されている。

(1) Tethering model (RBP-J/Su(H) translocation model)

これは以前主流をしめていた説であるが、現在は殆ど誰も（初めに提唱した人達も）信じていない。RBP-J/Su(H)は、通常Notch細胞内領域と結合して細胞膜の内側に保持され、Notchがリガンドと結合して細胞内領域に構造変化が生じると、結合がはずれて核に移行するといったような、JAK/STATシグナル系に似た機構である。これはショウジョウバエのNotchとSu(H)を、それぞれ過剰発現して再構成した系をもとに提唱されたものであり(4)、いまとなっては、overexpressionの実験は常にartifactを観察している危険性をはらんでいることのよい例である。

(2) Proteolysis / cleavage model (Notch-RAMIC translocation model)

こちらは現在主流のモデルであり、状況証拠としては、数多くの実験結果がこのモデルを支持している。Notchのnull変異がSu(H)のoverexpression phenotypeではなくSu(H)のnull変異と同じphenotypeを示すこと、内在性のRBP-J/Su(H)が細胞膜付近に見出されないこと、RBP-J/Su(H)は単独では転写活性化能がないこと、ショウジョウバエNotchの細胞内領域にyeastのGAL4 DNA bindingドメインを挿入すると、リガンド(Delta) 依存的にGAL4 binding siteに依存した転写活性化が観察されること(5、6)な

どが挙げられる。我々はGAL4を用いて、実際にマウスNotch 1のANKリピートとPEST領域の間に、転写活性化ドメインが存在することを明らかにした(7)。これらのことと、Notch細胞内領域には核移行シグナルがあること、及びNotch細胞内領域はRBP-Jと複合体を形成したときに、RBP-J binding siteに依存した下流遺伝子の転写を活性化させること(1、7)などから考えて、リガンドと結合することによりNotch細胞内領域はプロテアーゼによる切断をうけて核へ移行し、核内のRBP-J/Su(H)に結合し、下流遺伝子の転写を活性化するというモデルが提唱され、これは、最近明らかになったSREBPの活性化の機構と、類似点が多い。

(4) Notchを切断するプロテアーゼ

現在殆どの人達が(2)のモデルを信じ、それを証明すべく激しい競争が世界で行われている。いまのところ、Notchを切断するプロテアーゼは3種類あると考えられており、Notchシグナル系における役割について以下に述べる。

a. Furin (subtilisin-like convertase)

trans-Golgi networkにおいて、細胞外ドメインのRQRR (マウスNotch1の1651-1654)を切断し、p180(細胞外領域)/p120(細胞内領域)の機能的ヘテロ・ダイマーの、細胞膜表面への発現に必須であると考えられる(8、9)。

b. Kuzbanian

ショウジョウバエの遺伝解析で見つかった変異で(10)、この遺伝子産物はADAM(ディスインテグリン・メタロプロテアーゼ)ファミリーに属する。線虫でも相同遺伝子(SUP-17)が存在し、ショウジョウバエ同様Notchシグナル系の構成分子であることが明らかになっている。当初は機能的ヘテロ・ダイマーの細胞膜表面への発現に必須であると考えられていたが、その役割については今後の解析を待たねばならない。Notch分子のどの部位を切断するのも、まだ決定されていない。

c. 第3のプロテアーゼ

このプロテアーゼの同定が現在のNotch研究の最大のトピックスである。このプ

ロテアーゼの存在は、膜貫通領域も含むNotch細胞内領域のコンストラクト(N^{ΔE}と呼ばれる)でも分化抑制能、及び転写活性化能を示すこと、このN^{ΔE}蛋白質はproteolysisを受け、細胞内領域のみの蛋白質に近い分子量に分解されること(11)から予想された。この分解はMG132によって阻害される為、プロテアソームの関与が示唆されるが、一方ではlactacystinで阻害されないという結果もあり、はっきりした結論はまだ出ていない。また最近N^{ΔE}の切断部位が決定され(12)、ごく微量の切断産物が、細胞膜から核に移行して転写を活性化させることが明らかになり、これまで内在性のNotchの細胞内領域が、リガンド刺激によって核内で検出されなかった理由が説明可能になった。

5. 今後の展望

Kuzbanianはプロテアーゼドメインを細胞外領域にもつことから、世界中(我々も含めて)が探している第3のプロテアーゼは、プロテアーゼドメインを膜貫通領域、或いは細胞内領域にもつようなものであると推測される。また、非常に強力な、ショウジョウバエ・線虫の遺伝解析を駆使しても単離されないことから、第3のプロテアーゼはfurinのように、Notchシグナル系に特異的なものではないのかもしれない。第3のプロテアーゼを同定する手がかりとしては、あまり有力なものはみあたらないが(私だけかもしれないが・・・)、この班で勉強させて頂き、少しでも今後の研究に役立てたいと願う次第である。

文献

1. K. et al. (1997) Development, 124, 4133-4141.
2. K. et al. Submitted.
3. Tamura et al. (1995) Curr. Biol. 5, 1416-1423.
4. Fortini, M.E. and Artavanis-Tsakonas, S. (1994) Cell, 79, 273-282.
5. Struhl, G. and Adachi, A. (1998) Cell, 93, 649-660.
6. Lecourtois, M. and Schweisguth, F. (1998) Curr. Biol. 8, 771-774.
7. K. et al. Submitted.

8. Blaumueller, C. M. et al. (1997) Cell, 90, 281-291.
9. Logeat, F. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8108-8112.
10. Pan, D. and Rubin, G. M. (1997) Cell, 90, 271-280.
11. Kopan, R. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1683-1688.
12. Schroeter, E. H. et al. (1998) Nature, 393, 382-386
13. Chan, Y-M. and Jan, Y. N. (1998) Cell, 94, 423-426.

(京都大学：黒岡尚徳)

3 Wnt/Winglessのシグナル伝達研究の進展

はじめに

動物の初期発生や形態形成過程では、多様な細胞間相互作用が細胞の運命決定や分化の制御に重要な役割を果たしている。Wnt蛋白質はその様な細胞間相互作用を仲介するシグナル分子であり、種を越えて良く保存された大きな遺伝子ファミリーを構成している。最近、DrosophilaやXenopusそしてマウスを用いた遺伝学・分子生物学的解析によりWntシグナル伝達経路の構成員が明らかにされ、さらにこのWnt経路は線虫からヒトに至るまで良く保存されていることも示された¹⁾。また癌抑制遺伝子産物APC蛋白質やカドヘリン結合蛋白質 β -CateninがWnt/Wingless(Wg)のシグナル伝達に必須であることが発見され、Wnt遺伝子研究は発癌との関係においても注目を集めている。

Wnt/Wg経路の主要な構成員である β -カテニン/Armadillo (Arm)は、Wntシグナルの無い状況では、速やかな蛋白分解により、その細胞質内濃度は低く保たれているが、この β -カテニン/Arm蛋白質の特異的分解は、 β -カテニン/Arm蛋白質のN-末端部分に存在するアミノ酸配列の特異的リン酸化により調節されていることが明らかとなった。リン酸化された β -カテニン/Arm蛋白はUbiquitin化され、Proteasomeにより分解される。更にこのリン酸化された β -カテニン/Arm蛋白に作用すると考えられるF-box蛋白Supernumerary limb (Slimb)も見出された。こうした現象の発見によって、Wnt/Wgシグナル伝達経路における特異的蛋白分解の重要性が注目されるに至っ

たのである。

1. Wnt遺伝子ファミリー

1982年Nusseらはマウス乳癌ウイルスによる乳癌の発生にかかわる癌遺伝子としてint-1を発見し²⁾、さらにそのDrosophila相同体が胚の体節構造の形成にかかわっているセグメントポラリティー遺伝子Wingless (Wg) と同一である事を見いだした。McMahonらがマウスのint-1の相同体をクローニングし、またXenopusでも次々に相同体を確認され、これらのint-1相同体遺伝子ファミリーはWgとint-1にちなんでWnt (ウィント) と命名された¹⁾。Wntタンパク質は約40 kDaのN末にシグナル配列を持つ分泌性糖蛋白質である。Cysを多く含み、その22ヶのCysの位置は全てのWntに保存されていることから、Wntは特徴ある強固な高次構造を持っていると考えられる。Wntは各Wntに特異的な発現パターンを示すが、分泌されたWnt蛋白質のほとんどは細胞外基質に結合し、その産生細胞からの距離に応じた濃度勾配を形成して、いわゆる形態形成因子 (Morphogen) として働いているものと考えられている。Wntの生物活性については線虫、DrosophilaやXenopusそしてマウスを用いた個体・細胞レベルでの膨大な量の研究があり、それらの研究から、Wntは動物の初期発生や形態形成過程で多種多様な機能を持っている事が明らかになっている。最も解析の進んでいるのはDrosophilaのWgで、初期胚における分節化、中枢神経発生、翅肢の形態形成、中腸マルピギー管、複眼、心臓の器官形成などの局面で働いていることが発生遺伝学的研究により明らかにされている³⁾。一方マウスWntに関しては、McMahonらにより作製された各種Wnt遺伝子ノックアウトマウスの表現型より、Wnt-1は中脳の形成に、Wnt-7aは肢芽の腹背軸に沿ったパターン形成に、Wnt-3aは前肢より後方の体節中胚葉誘導に、そしてWnt-4が腎臓の形成に働いていることが明らかにされている⁴⁾。またXenopus初期胚の腹側でXWnt-8やWnt-1やWgなどを発現させると2次体軸が形成され、双頭のオタマジャクシが生ずる事から、特定のWntにはオーガナイザーの誘導を行うNieuwkoopセンターとしての活性があるものと考え

られている⁵⁾。

2. Wnt/Wgシグナル伝達経路

図はWnt標的細胞の中でのWnt経路の模式図である⁶⁾。分泌されたWntはその受容体Frizzledに結合し、シグナルをDishevelled (Dsh)に伝達する。FrizzledはN末にシグナル配列をもち、さらに7回膜貫通ドメインを備えた膜タンパク質である⁷⁾。Dshは多機能のシグナル仲介分子で、分子量65-70kDaの主に細胞質に存在するリン酸化蛋白質である⁸⁾。Dshは、分子の中央部に蛋白間相互作用にかかわると考えらPDZドメインを含み、下流のエフェクター分子とFrizzledとの間を仲介しているものと考えられる。次に、活性化されたDshはSer/ThrキナーゼGlycogen synthase kinase 3- β (GSK3- β)の機能を抑制する。GSK3- β は本来 β -カテニン/Armを負に制御しているので、Wntシグナルは β -カテニン/ArmをGSK3- β によるこの負の制御から解除することになる。実際に生じる現象は、Wntシグナルにより β -カテニン/Arm蛋白質の細胞質内のレベルが著しく上昇することである。蓄積した β -カテニン/Armの一部は、HMG boxを持つ核内転写因子Tcf (T cell-specific transcription factor)に結合し⁹⁾、Wntの標的遺伝子群、例えばEngrailed (En)やUltrabithrolax (Ubx), Siamoisの転写の活性化を行うと考えられている。これがWnt/Wgシグナル伝達経路の概略であるが、図1にはそれに加え β -カテニンは α -catenin、Cadherinと複合体を形成しCadherinによる細胞接着の機能も担っている事も示してある。

3. Wntシグナルによる β -カテニン/Arm蛋白質の分解制御の分子機構

この約1年半の間に、Wntシグナルによる β -カテニン/Arm蛋白質の分解制御の分子機構の研究には大きな進展があった。それは図に示すAxin分子の同定とその機能の解析^{10,11,12)}、Ubiquitin、Proteasome系の作用機序の解^{13,14)}、そしてF-box蛋白Supernumerary limb (Slimb)の発見¹⁵⁾が相次いだからである。 β -カテニン/Arm蛋白質のN-末端部分にはGSK3- β による特異的リン酸化の標的になり得るS/TXXXXS/Tの

繰り返し配列 (SYLDSGIHS GXXTXXPSLSG, 太文字は後述する 6 アミノ酸モチーフ) があり、GSK3- β によってリン酸化された β -カテニン/Arm蛋白質はUbiquitin化され、Proteasomeにより分解されると考えられていた。しかし、試験管内では β -カテニン/Arm蛋白質はGSK3- β の良い基質とはならないことも良く知られていた、しかし、Axin分子の登場がこの疑問を解いてくれた。Axin蛋白質は50年ほど前から知られていたマウスの体軸形成異常の遺伝子、Fusedの遺伝子産物として発見された¹⁰⁾。また一方、同じAxin分子がGSK3- β あるいは β -カテニンに結合する蛋白のtwo-hybrid screeningからも見出されたのである^{11,12)}。Axin蛋白質は分子量約100kDaで、N-末端から、癌抑制遺伝子産物APC蛋白質を結合するRGS (regulator of G-protein signaling) ドメイン、GSK3- β 結合領域、 β -カテニン結合領域さらにC-末端部分にDIXドメイン(DshのN-末端部分と相同な領域)を持っている。従って、図に示す様にAxinはWntシグナル伝達経路の構成員を引き寄せるドッキング蛋白であり、GSK3- β による β -カテニン/Arm蛋白質のリン酸化を著しく促進する。またAPC変異を持つ大腸癌細胞株SW480では、正常細胞に比べ細胞質内に β -Cateninが高濃度に蓄積しているが、そこに野生型APCを発現させると、 β -Cateninレベルが著しく低下することから、APCは β -Cateninの分解に働くと考えられていた。大腸癌で発現しているC-末端部分を欠くAPC変異体はAxin蛋白質と結合しないことから、APCの β -Cateninの分解促進の機能にもAxin蛋白質の関与が考えられている¹⁶⁾。結局 Wnt、Frizzled、Dshと伝達されたシグナルは、何らかの機構でGSK3- β の機能を抑制し、そのため β -カテニン/Arm蛋白質はリン酸化を受けず、Ubiquitin/Proteasome蛋白分解系から逃れて、細胞質内に蓄積し、核内転写因子Tcfのcoactivatorとなるものと考えられる。

最近、各種のProteasomeの阻害剤による処理によって細胞質内 β -Cateninの蓄積が生ずる事、 β -カテニン蛋白の上記したGSK3- β のリン酸化配列のSerが β -カテニンのUbiquitin化に必須である事、またそのリン酸化標的アミノ酸配列の中にはIk-Bにも存在するDSG ϕ XSなるモチーフが存在する事が見出された^{13,14)}。従って、 β -カ

テニン/ArmおよびIk-Bは共に蛋白中の特定のアミノ酸配列のリン酸化により分解の引き金が引かれている事が明らかになった。さらに、このIk-Bの特異的リン酸化を行うIk-B kinaseが同定された。従って β -カテニン/Armのリン酸化におけるGSK3- β とIk-B kinase様のkinaseとの相互作用・共同作用の可能性も考えられる。さらにDrosophilaではF-box-WD40 リピートを持つ蛋白Supernumerary limb (Slimb)が見出されており、Slimb変異体ではArmの蓄積が生じる¹⁵⁾。既にSlimbの脊椎動物の相同体は β -TRCP(β -Transducin repeat containing protein)である事も知られており¹⁷⁾、今後、ノックアウトマウスの表現型に興味を持たれる。出芽酵母の細胞周期で働くF-box蛋白CDC4は、SCF Ubiquitin-Ligase 複合体の中で、リン酸化された基質を結合するレセプターとして機能している¹⁸⁾ことを考えると、Slimbもリン酸化された β -カテニン/Armのレセプターとして機能しているものと推測される。

終わりに

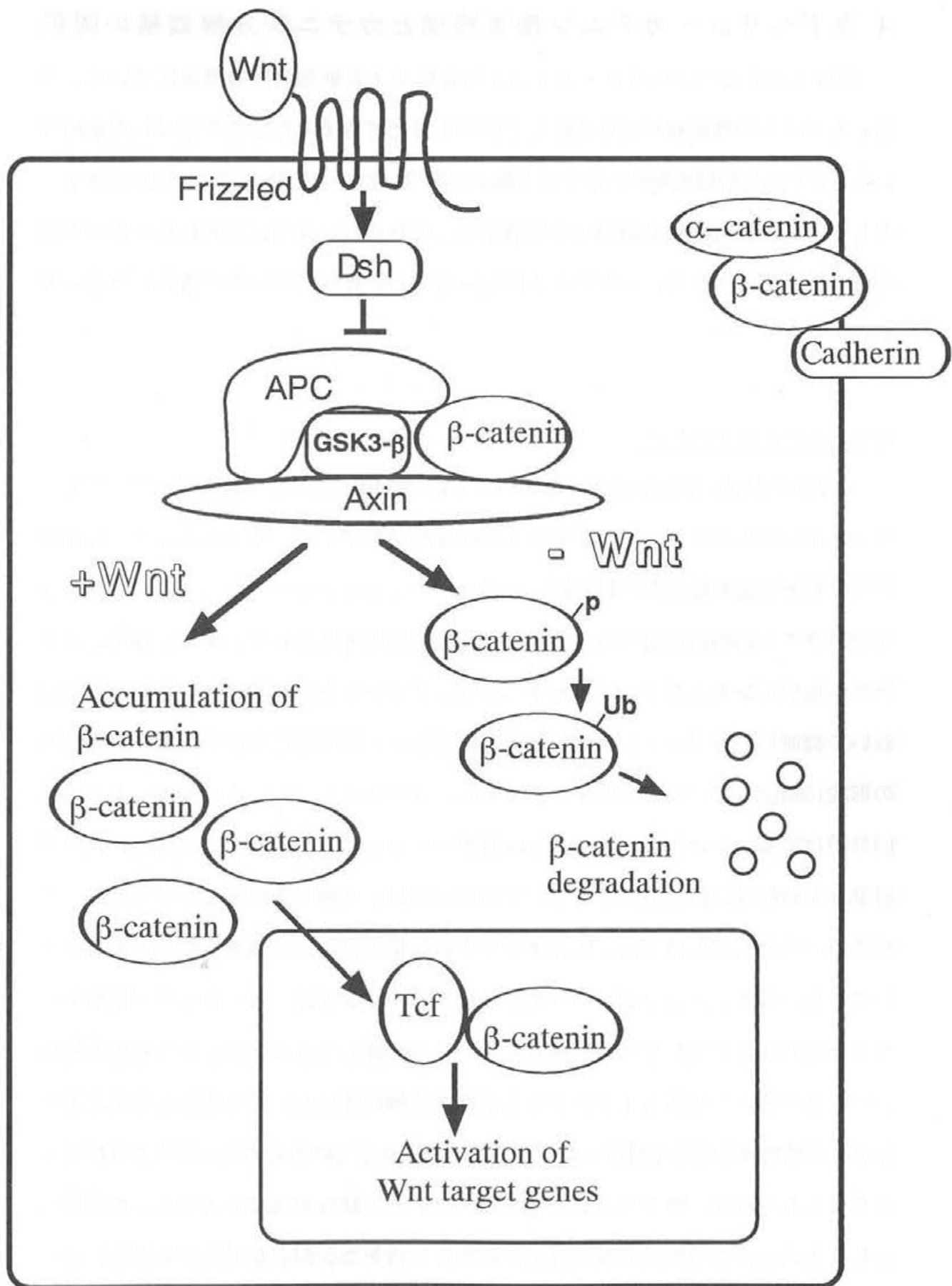
以上、Wnt/Wgシグナル伝達経路について、特に特異的蛋白分解が関与するステップの研究の現状を概説した。本稿ではふれなかったシグナル伝達経路の構成員の性質については、他の総説¹⁹⁾を参照されたい。最近、Wntシグナル伝達異常と発癌との関係が注目されているが、APCや β -Cateninの変異が見出された大腸癌では、結局、 β -Catenin・Tcf4複合体が癌遺伝子c-mycの転写活性化を誘導し、発癌に至った事が報告された²⁰⁾。今後ともこのシグナル伝達経路が様々な生物系や実験手法を用いてより詳細に検討され、近い将来、Wntシグナル伝達異常に伴う遺伝疾患などについても研究が進展するものと期待される。

文献

1. Nusse, R. & Varmus, H. E. : Cell, 69 : 1073-1087, 1992
2. Nusse, R. & Varmus, H. E. : Cell, 31: 99-109, 1982
3. Klingensmith, J. & Nusse, R. : Dev. Biol., 166 : 396-414, 1994
4. 高田慎治 : 蛋白質 核酸 酵素, 40 : 2162-2174, 1995

5. Moon, R.T. : Bioessays, 15 : 91-97, 1993
6. Cadigan K.M. & Nusse, R.: Genes & Dev., 11, 3826-3305, 1997
7. Bhanot,P., et al. : Nature, 382 : 225-230, 1996
8. Yanagawa, S-i.,et al. : Genes Dev., 9 : 1087-1097, 1995
9. Molenaar, M., et al. : Cell, 86 : 391-399, 1996
10. Zeng, L., et al. : Cell, 90, : 181-192, 1997
11. Ikeda, S. ,et al. : EMBO. J. ,17 : 1371-1384, 1998
12. Behrens, J., et al. : Science, 280 : 596-599, 1998
13. Aberle, H., et al. : EMBO. J., 16 : 3797-3804, 1997
14. Orford, K., et al. : J. Biol. Chem., 272 : 24735-24738, 1997
15. Jiang, J. & Struhl, G. : Nature, 391: 493-496, 1998
16. Rubinfeld, B., et al. : Science, 272 : 1023-1026, 1996
17. Spevak, W., et al. : Mol. Cell. Biol., 13 : 4953-4966, 1993
18. Skowyr, D., et al. : Cell , 91: 209-219, 1997
19. 柳川伸一 : 実験医学, 15 : 2006-2012, 1997
20. He, T.-C., et al. : Science, 281: 1509-1512, 1998

(京都大学ウイルス研究所：柳川伸一)



4 カドヘリン・カテニン接着機構とカテニン分解機構の関係

私はこれまでカドヘリン・カテニン複合体による細胞間接着機構について、主に α カテニンの機能解析を中心にして研究を進めてきました。ここでは最近進めている β カテニンの機能解析に必要な実験系の開発について紹介させていただきます。そして、何故細胞間接着機構の研究者が全く関係がないように思われるタンパク質分解の研究班に入れていただくことになったのか、理解していただきたいと思っております。

α カテニンと β カテニン

α カテニンは、細胞接着分子カドヘリンの結合因子として単離されたヴィンキュリンと相同性を示す、分子量102 kDの細胞質因子です。ヴィンキュリンは細胞間及び細胞基質間接着部位に濃縮し、カドヘリンやインテグリンなどの細胞接着分子とアクチン系の細胞骨格系との相互作用に必要と考えられています。最近、 α カテニンもヴィンキュリンと同様カドヘリンとアクチン系の細胞骨格との相互作用において機能し、カドヘリンの細胞接着性の調節や上皮細胞における接着装置複合体の形成に機能していることが示されました。 β カテニン（ショウジョウバエでの相同分子はアルマジロ）も α カテニン同様カドヘリン結合因子として単離された分子量90 kD前後の細胞質因子です。アルマジロは、当初セグメントポラリティー遺伝子の一つとして単離され、Wntシグナルの細胞内伝達に機能すると考えられていました。最近、ショウジョウバエにおいてアルマジロはショウジョウバエカドヘリンと複合体を形成して細胞間接着においても機能しうるということが、また脊椎動物において β カテニンはWntシグナルの細胞内情報伝達においても機能しうるということが示され、動物種を越えて異なった二つの機能を果たしていると考えられるようになってきました。現在、カドヘリン分子C末のカテニン結合領域に β カテニンが直接結合し、さらに β カテニンのN末付近の領域に α カテニンが直接結合することにより

カドヘリン・カテニン複合体が形成されることが明らかにされています。

βカテニンの分解機構

近年、βカテニンタンパク質の分解機構が非常に大きな注目を集めています。これは、βカテニンの安定化が、Wntシグナル伝達機構だけでなく、ヒトの発癌においても重要な役割を果たすことが示されてきたからです。細胞質に存在するβカテニンは通常ユビキチン・プロテアソーム系により速やかに分解されています。この分解には、GSK3βとよばれるWntシグナル伝達系に属する分子によってβカテニンのアミノ末端近くの特定のセリン・スレオニン残基がリン酸化されることが必要です。近年、このリン酸化にはさらにアキシンと呼ばれる新規タンパク質や癌抑制遺伝子であるAPCが関与していることが示されています。Wntシグナル伝達機構を持つ細胞において、Wntのシグナルがその受容体（現在のところフリッツルドと考えられている）を介して細胞内に伝わると、さらにディシェブルドという細胞質因子を介してGSK3βを不活化すると考えられています。その結果βカテニンのリン酸化は抑制され、カドヘリンに結合していないβカテニンも分解されず安定に細胞質に存在することになります。細胞質のβカテニンはさらにLEF-1/TCF（ショウジョウバエのホモログはパンゴリン）と呼ばれるHMGグループに属するDNA結合タンパク質と複合体を作り核に移行し、さまざまな因子の転写を調節することによりWntシグナルが最終的に核に伝えられると考えられています。このように、βカテニンの分解の制御はWntシグナル伝達系において重要な役割を果たしています。さらに、この分解に必要なβカテニンのリン酸化に癌抑制遺伝子APCが関与していることから、βカテニンの分解制御は発癌にも関わっていることが予想されていました。実際、ある種の癌細胞においてはGSK-3βによりリン酸化されるβカテニン内のセリン又はスレオニン残基に変異が生じ、βカテニンが安定に細胞質および核に発現していることも明らかにされています。Wntシグナルを活性化すると細胞の接着性が変化するという報告もいくつか

はなされています。しかし、カドヘリンに結合した β カテニンはWntシグナルがない状況においても安定に存在し、プロテアソーム系による分解から保護されていることから、当初細胞接着における β カテニンの機能を考える時この分子の分解機構はほとんど無視して構わないと考えていました。

カドヘリン・カテニン系の機能解析

我々のグループは、 α カテニンや β カテニンがカドヘリンを介した細胞接着において果たす役割を解明したいと考え、研究を進めています。接着関連分子の機能解析を進めるためには、その分子を発現していない細胞に正常型や変異型分子を導入、しそれぞれの形質転換細胞の表現型を調べることにより、最終的にその分子の機能を明らかにするというのが常道です。実際、これまでカドヘリンを発現していないマウスL細胞に正常なカドヘリンやその変異型分子を発現させることにより、カドヘリンの機能解析が進められました。同様にして、 α カテニンを発現していないヒト癌細胞に正常な α カテニンやその変異型分子を発現させることにより、 α カテニンの機能についても解析が進んできました。しかし残念なことに、 β カテニンの欠損細胞については現在のところ報告がありません。唯一知られているのは分子の一部が欠損した β カテニンを発現しているヒト癌由来の細胞株ですが、これは完全な β カテニン欠損細胞でないうえに細胞の扱いが難しいため、解析には適していません。 β カテニンのES細胞におけるノックアウトについては報告がされていますが、そこから得られる β カテニン欠損胚は非常に初期の時期に致死となります。また、致死以前の胚の内部細胞集塊からの β カテニン欠損細胞株の単離も試みられているらしいのですが、あまり思わしくない結果であることが風の噂として伝わってきています。ちなみに、ショウジョウバエにおいても卵の段階でアルマジロ(β カテニン)を欠損させると卵の形態がむちゃくちゃになり、致死に至ることが報告されています。実際、 β カテニンはある種の細胞の生存そのものに必須なのではないかと個人的には疑っています。このような状況下で β カテニンの接着における役割

を解析するもう一つの方法として我々が α カテニンの機能解析に用いているEカドヘリンと α カテニンの融合タンパク質の系が考えられます。数年前に我々は、 α カテニンをカテニン結合領域を除いたEカドヘリンに結合させた融合タンパク質をEカドヘリンを発現していないL細胞に導入すると、この分子は細胞接着分子として機能できることを明らかにしました。現在もさまざまな領域に欠損を持つ α カテニンを含む融合タンパク質を用いて α カテニンの機能解析を進め、 α カテニン欠損細胞を用いた解析からは得られない多くの情報を得ています。そこでEカドヘリン- β カテニン融合タンパク質を作成し、それをマウスL細胞に発現させることにより β カテニンの機能解析を行うことを考えたわけです。ここで、当初Eカドヘリンを介した細胞接着には関係しないであろうと考えられた β カテニンの分解機構が、大きな問題点として浮かび上がってきました。

変異型 β カテニンによる β カテニン分解機構の抑制

L細胞においては、Eカドヘリンが存在しない場合、ユビキチン系を介して β カテニンが速やかに分解されてしまうことが報告されています。Eカドヘリン- β カテニン融合タンパク質を発現させた場合も、この融合タンパク質はやはり速やかに分解されてしまいました。この分子を用いて β カテニンの細胞接着における機能解析を進めるには、まず β カテニンの分解機構を理解し、それを阻害する必要が生じました。方法としては二つ考えられます。一つは、融合タンパク質その物に変異を加え分解されない形にすること。もう一つは、 β カテニンの分解系を阻害して融合タンパク質を安定化させることです。後者に関してはユビキチン系その物を破壊すれば可能ですがその場合、細胞に与えるダメージが大きすぎるため、実際には使えません。先に述べたように、 β カテニン特異的な分解機構としては、Wntシグナル伝達機構とそれと共役して働いていると考えられるアキシン、APCを介した分解機構があります。これらの β カテニン分解機構を特異的に抑えられることが出来るかどうかについては、この重点領域に入れていただいたおかげで、徐々に解析が

進みつつあります。その結果、ある種の変異型 β カテニンをを用いることにより、正常な β カテニンの分解を特異的に抑える方法が確立しつつあり、Eカドヘリン- β カテニン融合タンパク質を特異的に安定化させる可能性が見えてきました。しかしながら、この方法で融合タンパク質を安定させるだけでは β カテニンの機能解析は進まないことが、これから述べる理由により明らかになりました。

Eカドヘリン-非分解型 β カテニン融合タンパク質

融合タンパク質を安定化させるもう一つの方法である、融合タンパク質その物を分解されない形にすることについては、これまでの分解機構の解析から、より簡単に行うことが可能でした。つまり、分解に必要な GSK-3 β によるリン酸化部位を変異させる、または APC との結合領域を欠損させることにより、容易に融合タンパク質は安定化したのです。ところが、思いもかけない問題点が浮かび上がってきました。まず、GSK-3 β によるリン酸化部位を変異させた融合タンパク質を L 細胞に導入すると、分子は安定に発現し細胞表面にもでてくるのですが、細胞の接触部位に均一に局在するのではなく、多くの小さな凝集体を作ったのです。また、このような融合タンパク質を発現した L 細胞は全く細胞間接着活性を示しませんでした。その細胞を APC 抗体により染めてみたところ、その凝集体の局在は APC の局在と完全に一致しました。つまり、この融合タンパク質は分子内の APC 結合領域を介して APC に捕捉されてしまっていると考えられました。この APC 結合領域はカドヘリンとの結合にも使われている領域ですので、正常なカドヘリン・カテニン複合体においては、APC との結合はカドヘリンによって妨げられていると考えられます。

それならば APC 結合領域を削った融合タンパク質であれば機能するであろうと考えたのですが、ここで別の問題点が明らかになりました。APC 結合領域を欠損した融合タンパク質を L 細胞に発現させた場合、予想どおり分子は安定化しかつ細胞間接触部位に局在しました。しかし、何故かこの融合タンパク質を発現した細

胞は細胞間接着活性を示しませんでした。その原因として考えられたのは、元来 β カテニンと結合すべき α カテニンが結合していないのではないかということでした。そこで α カテニンの発現を調べたところ、驚いたことに、 α カテニンは β カテニンに結合できないのではなく、 α カテニンタンパク質その物が細胞にほとんど発現していないことが分かったのです。ちなみに、先ほどのGSK-3 β 認識部位に変異を持つ融合タンパク質を発現している細胞でも、やはり α カテニンタンパク質はほとんど検出されませんでした。

α カテニンの安定化機構

α カテニンの細胞内での発現にカドヘリンが必要であることは、L細胞にカドヘリンを発現させる実験から示されていました。元々L細胞は多量の α カテニンmRNAを発現しているのですが、タンパク質の発現は少ししか検出されません。そこにカドヘリンを発現させると、カドヘリンの発現量に応じて α カテニンタンパク質の発現量が増えるのです。これについては、 α カテニンは β カテニンと結合することが知られていたので、まず発現したカドヘリンに β カテニンが結合して安定化し、さらにこの安定化した β カテニンに α カテニンが結合して安定化すると考えていました。しかし、先ほど述べたように、Eカドヘリン-非分解型 β カテニン融合タンパク質を発現させても（もちろんこの融合タンパク質には α カテニン結合領域は含まれています）、 α カテニンタンパク質の発現量が増大しないことが示されました。つまり、単に β カテニンが存在するだけでは α カテニンは安定化できないことが示された訳です。実はこのことは、Wntシグナル機構を活性化し β カテニンの発現量が上がっても α カテニンのタンパク量は増大しないことから予測すべきことでした。ここで、これまで解析が進んできた β カテニンの分解機構だけでなく、 α カテニンの安定化についても解析の必要性が生じてきました。

α カテニン分解機構の可能性

α カテニンの安定化においては、 α カテニンの分解を抑制する可能性と、 α カテニントタンパク質の合成を促進している可能性が考えられます。逆に言えば、カドヘリンが存在しない場合には α カテニントタンパク質が合成された後に速やかに分解されている可能性と、 α カテニンのタンパク質合成その物が抑制されている可能性が考えられます。この点については今後の検討が必要ですが、 α カテニン分子内にタンパク質分解に関与すると考えられるP E S T配列が存在することから、おそらくはカドヘリンが存在しないと α カテニンは分解されてしまうのであろうと考えています。その分解機構については今の所全く分かっていません。ただ予備的実験の結果から、 α カテニンの分解にはプロテアソーム系は関与していないであろうことが示唆されています。最初に述べてきたように、 β カテニンの分解機構はW n t シグナル伝達機構および発癌機構に重要な役割を果たしていることが示されています。 α カテニンについては、その分解機構が何らかの生理的な役割を果たしている可能性については、これまでのところ何も示されていません。カドヘリン・ β カテニンと複合体を作らない α カテニンは不要であるから分解されてしまうのか、それとも α カテニンの分解も β カテニンの分解と同様何らかのシグナル伝達に関与しているのか興味をもたれるところです。この点を理解するためには、 α カテニンの分解機構の解析が必要になります。この解析は同時に、 α カテニンを安定に発現させる方法を明らかにすると考えられ、先に示したEカドヘリン- β カテニン融合タンパク質の系と合わせることで、 β カテニンの機能解析にも繋がると考えています。

最後に

以上、 β カテニンの機能解析を進めるために始めた研究が β カテニンの分解機構の研究に進んでいった過程と、混沌とした β カテニンの機能解析の過程で α カテニンの安定化機構という新しい問題点が提起されてきたこと、を理解していただけたのではないかと思います。近年、本特定領域研究に属する多くの班員の方々の研究を

中心に、タンパク質の分解機構についての理解が非常に深まりつつあります。その中で、ここでお話ししたような接着関連因子など分解される側の構造タンパク質からの解析を進めることは、蛋白質分解が生体内で果たす役割をより深く理解する糸口になるのではないかと期待しています。（京大・医・分子細胞情報 永渕昭良）

(6) トピックス

1 ユビキチン様蛋白質NEDD8によるcullin/Cdc53p family

蛋白質群の新しい修飾システム

ユビキチンと構造的に類似した蛋白質群の存在は以前から知られていましたが、ユビキチン-プロテアソーム系の華々しい研究の進展とは対照的に、それらの生物学的意味は殆ど理解されていなく、世間の注目を浴びることも多くはありませんでした。しかしながら、1997年に哺乳動物ユビキチン様蛋白質の一つであるSUMO-1が、RanGAP1の翻訳後修飾を行うことによって核輸送系を制御していること(1)、SUMO-1の出芽酵母ホモログであるSmt3pの修飾システムは、新しいE1様蛋白質(Aos1p/Uba2pヘテロダイマー)とE2様蛋白質(Ubc9p)によって構成されており、従来のユビキチン経路とは全く独立して機能すること(2)、が明らかにされると、ユビキチン様蛋白質が一躍脚光を浴びるようになりました。ユビキチンによる基質蛋白質の修飾は、そのC末端のグリシン残基(Gly76)を介して行われますが、NEDD8、UCRP、fau等の他のユビキチン様蛋白質にもこのグリシン残基は保存されています。そこで、当然湧いてくる疑問が、SUMO-1以外のユビキチン様蛋白質も修飾分子として機能するか、また、真核生物には何種類のユビキチン関連経路が用意されているかということです。

NEDD8修飾システムの発見

筆者らの研究室ではヒト完全長cDNAバンクを作製し(3)、ウサギ網状赤血球ライセート中で翻訳合成後、翻訳産物を一次元、もしくは二次元電気泳動にかけて、分子量と等電点を測定すると共に、新しい翻訳後修飾を探索しておりました。そんな中、ヒト[³⁵S]-NEDD8をウサギ網状赤血球ライセート中で翻訳合成後、SDS-PAGEによって翻訳産物を分離した際に、遊離型のヒト[³⁵S]-NEDD8(分子量8 kDa)に加

えて、分子量100、66、30 kDaのバンドが出現すること、そして更にSDS-PAGE前の還元剤処理によって、66、30 kDaの二本のバンドは消失することを見い出しました。現在、ユビキチン経路のE1、E2、及び一部のE3は、ユビキチンとチオエステル結合（還元剤感受性）を形成し、基質蛋白質はユビキチンとイソペプチド結合（還元剤非感受性）を形成することが明らかとなっています。従って、この実験結果から、NEDD8はユビキチンの様な修飾分子として機能することと、NEDD8に対するE1、E2様蛋白質と基質蛋白質（つまりNEDD8修飾システム）の存在が予見されました。そこで筆者らは、このNEDD8修飾システムを明らかにするために、GST-NEDD8アフィニティークロマトグラフィーを行い、ウサギ網状赤血球ライセートからNEDD8と結合する蛋白質群の精製を試みました。アフィニティークラムからの溶出は還元剤（DTT）と還元型グルタチオン（リガンドが溶出）の二段階で行い、NEDD8と還元剤感受性の結合を形成する蛋白質と、還元剤非感受性の結合を形成する蛋白質を別々に溶出しました。精製された蛋白質の部分アミノ酸配列を決定して、その情報をもとにヒトcDNAライブラリーからスクリーニングを行なった結果、以下に示すNEDD8修飾システムの構成因子を同定することに成功しました。

(i) NEDD8活性化酵素（E1様蛋白質）：APP-BP1とhUba3のヘテロダイマーであり、各々はE1のN末端とC末端領域に高い相同性を持っていました。APP-BP1は既知の蛋白質であり、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の一つであるアミロイド前駆体蛋白質（ β APP）の細胞内ドメインと相互作用する蛋白質として単離されています（4）。hUba3はDNAデータバンク中の酵母Uba3pと高い相同性を示しました。APP-BP1/hUba3ヘテロダイマー中のhUba3が、NEDD8とDTT感受性の結合を形成しました。(ii) NEDD8結合酵素（E2様蛋白質）：出芽酵母E2ファミリーの中のUbc12pと高いホモロジーを持っており（hUbc12と命名）、NEDD8とDTT感受性の結合を形成しました。(iii) cullin-4A：cullin/Cdc53pファミリー（後述）の一員であるcullin-4AのC末端領域がNEDD8とDTT非感受性の結合を形成し、その結合様式からcullin-4AはNEDD8の基質蛋白質であることが示唆されました。また、一分子のNEDD8の付加が

cullin-4Aに対して起こり、ユビキチンのような多重鎖の形成はウサギ網状赤血球ライセート中では観察されませんでした。(i)、(ii)、(iii)の因子は全てユビキチン、SUMO-1とは結合しなく、NEDD8に特異的であり、その結合にはNEDD8のC末端のグリシン残基（ユビキチンのGly76に相当）が必須でした。

以上の実験結果とユビキチン経路との類似性から考えて、NEDD8がAPP-BP1/hUba3ヘテロダイマー（E1様蛋白質）によって活性化されて、hUbc12（E2様蛋白質）を経て基質蛋白質であるcullin-4Aに転移される新しいユビキチン関連経路の存在が強く示唆されました。

真核生物に普遍的であるNEDD8修飾システム

筆者らは哺乳動物の系を使ってNEDD8修飾システムの存在を明らかにしましたが（5）、出芽酵母についてもユビキチン様蛋白質Rub1pが新しいE1様蛋白質、E2様蛋白質を経てCdc53p（cullinホモログ）を修飾することが報告され（6、7）、驚くことにRub1pのE1、E2様蛋白質はNEDD8のそれらのホモログでありました。また、以前から植物（*Arabidopsis*）でも、Auxin（植物ホルモン）に応答しなく正常な発育ができない変異株の原因遺伝子としてAXR1（APP-BP1ホモログ）が単離されていましたが、AXR1蛋白質は植物Uba3pホモログと共に、植物Rub1pホモログの活性化に関与していることが報告されました（8）。NEDD8とRub1pは高い相同性を持っており（59%同一アミノ酸）、NEDD8/Rub1p修飾システムは、哺乳動物、植物、酵母と広く保存され、真核生物に普遍的なシステムだと考えられます。

これらのことから、真核生物には、ユビキチン、SUMO-1/Smt3p、NEDD8/Rub1pといった修飾分子のために、少なくとも3種類の独立したユビキチン関連経路が存在していることが明らかとなりました。また、最近水野らによって、ユビキチンと相同性を持たない蛋白質が修飾分子として機能し、ユビキチン経路に類似した独自の修飾システムを持つことが示されて（9）、これら修飾分子の多様性が注目されています。

NEDD8修飾システムの基質であるcullin/Cdc53p family蛋白質群

筆者らは、NEDD8修飾システムの基質蛋白質としてcullin-4Aを同定しましたが、現在、ヒトでは少なくとも6種類（CUL-1、-2、-3、-4A、-4B、-5）、出芽酵母では3種類（CUL-A/cdc53、-B、-C）のcullinが存在することが、DNAデータベースでの検索結果から明らかとなっています。cullinにおける機能解析は出芽酵母Cdc53p（ヒトではcullin-1に相当）で最も進んでおり、Cdc53pは、Skp1p、Cdc34p (E2)、F-box蛋白質（Cdc4p、Grr1p、Met30p等）と複合体を形成して、ユビキチン系のE3として機能することが明らかとなっています。このE3複合体はSCFと呼ばれ、CDKインヒビター（Sic1p）、preRC (prereplicative complex) の形成に関与しているCdc6p、酵母G1サイクリン（Cln1p、-2p）等を選択的に認識して、蛋白分解による細胞周期進行制御を行っています（10）。ヒトcullin-2においても、ElonginB、ElonginC、pVHL（癌抑制遺伝子産物）と複合体を形成していることが報告されており、pVHLは細胞周期からの離脱に関与していることが示唆されています（10）。他のcullinsに関してはその機能は不明ですが、最近cullin-4Aに関しては乳癌細胞で高頻度に遺伝子増幅もしくは過剰発現がおこっていることが報告されて、腫瘍形成にその機能が深く関わっていることが示唆されています（11）。このようにcullinsは細胞周期進行を中心に幅広い現象を制御していると推測されますが、筆者らの研究グループは次にcullin-4A以外のcullinsもNEDD8による修飾を受けるかどうかを検討しました。その結果、ウサギ網状赤血球ライセート中では、ヒトcullin-1、-2、-3、-4B、-5がいずれもNEDD8による特異的な修飾を受けることが明らかとなりました（投稿中）。従って、NEDD8修飾システムは、恐らくcullinsの活性調節を通じて、多様な現象を制御していることが推測されます。

NEDD8修飾システムの重要性

NEDD8による基質蛋白質の修飾は、真核生物にとってどの程度の重要性を持っているのでしょうか？ハムスターの温度感受性変異株ts41は、非許容温度下ではM期

に入ることなく、S期を繰り返すという表現型を示しますが(12)、この温度感受性は、NEDD8活性化酵素であるAPP-BP1遺伝子の変異によるものであると言われています(13)。また、分裂酵母のhUba3ホモログは生存に必須な遺伝子でした(筆者ら未発表データ)。植物においては、先述したようにAPP-BP1ホモログ(AXR1)遺伝子の変異株は植物ホルモンAuxinに応答しなく、正常な発育ができなくなります(8)。このようなNEDD8活性化酵素(APP-BP1/hUba3ヘテロダイマー)の変異株の表現型は、cullins等の基質蛋白質がNEDD8による修飾を受けなくなった結果、基質蛋白質の機能が十分果たせなくなったために生じたと推測され、NEDD8による修飾の重要性が伺えます。

おわりに

NEDD8/Rub1p修飾システムは、その構成因子が明らかとなったばかりであります。将来、基質に対するNEDD8化の分子レベルでの効果や、NEDD8化が何のシグナルを感知して、どのようなタイミングで起こるかが明らかになって行くと思われます。現在ユビキチン経路は、E3や基質蛋白質におこるリン酸化によって調節を受けていることが知られていますが、今後NEDD8によるcullinの修飾はユビキチン経路の新しい制御機構としても、更に注目を浴びていくだろうと思われます。

“本研究は東京都臨床医学総合研究所の川崎博史先生(現・横浜市立大学木原生物学研究所)、田中啓二先生との共同で行なわれました。”

文献

- (1) Mahajan,R., Delphin,C., Guan,T., Gerace,L. and Melchior,F. (1997) Cell 88: 97-107.
- (2) Johnson,E.S., Schwienhorst,I., Dohmen,R.J. and Blobel,G. (1997) EMBO J. 16: 5509-5519.
- (3) Kato,S., Sekine,S., Oh,S.W., Kim,N.S., Umezawa,Y., Abe,N.,Yokoyama-Kobayashi, M. and Aoki,T. (1994) Gene 150:243-50
- (4) Chow,N., Korenberg,J.R., Chen,X.-N. and Neve,R.L. (1996) J. Biol. Chem. 271: 11339-11346.

- (5) Osaka,F., Kawasaki,H., Aida,N.,Saeki,M., Chiba,T., Kawashima,S., Tanaka,K. and Kato, S (1998) *Genes & Dev.* 12: 2263-2268
- (6) Lammer,D., Mathias,N., Laplaza,J.M., Jiang,W., Liu,Y., Callis,J., Goebel,M. and Estelle,M. (1998) *Genes & Dev.* 12: 914-926.
- (7) Liakopoulos,D., Doenges,G., Matuschewski,K. and Jentsch,S. (1998) *EMBO J.* 17: 2208-2214.
- (8) Pozo,J.C., Timphe,C., Tan,S.,Callis,J. and Estelle,M. (1998) *Science* 280:1760-1763
- (9) Mizushima,N., Noda,T., Yoshimori,T., Tanaka,Y., Ishii,T., George,M.D., Klionsky,D.J., Ohsumi,M. and Ohsumi,Y. (1998) *Nature.* 395: 395-398
- (10) Patton,E.E., Willems,A.R. and Tyers,M.(1998) *Trends. Genet.* 14:236-243
- (11) Chen,L.C., Manjeshwar,S., Lu,Y., Moore,D., Ljung,B.M., Kuo,W.L., Dairkee,S.H., Wernick,M., Collins,C. and Smith,H.S. (1998) *Cancer Res.* 58: 3677-3683
- (12) Handeli,S. and Weintraub,H. (1992). *Cell* 71: 599-611
- (13) Hochstrasser,M. (1998) *Genes & Dev.* 12: 901-907

(ERATO加藤たん白生態プロジェクト：逢坂文男)

(7) 海外留学中研究者からの最新情報

ウィーンでサイエンス〜” Kimとはこうしたもの”

日本の一年がNHKの紅白歌合戦でくれるように、ウィーンではヨハン・シュトラウスのオペレッタ「こうもり」が音楽の都の一年を締めくくる。国立オペラ座では9月から6月のシーズン中は日替わりで毎日オペラやバレエが上演され、中でもモーツァルトのオペラは人気が高く、「フィガロの結婚」「cosi fan tutte」「ドン・ジョバンニ」「魔笛」等には一流の歌手が揃えられる。さらに、ウィーン・フィルハーモニー・オーケストラの本拠地である楽友協会ではClaudio Abbado、Lorin Maazel、Riccardo Mutiら著名な指揮者の下で定期的にコンサートが催され、クラシック音楽のファンならずともその演奏の質と音響効果に圧倒される。1782年にモーツァルトとコンスタンツェが結婚式を挙げたシュテファン寺院はオーストリア最大のゴシック寺院で、ウィーンの特徴として街の中心に位置している。現在IMPの所長を務めるKim Nasmythは、シュテファン寺院から徒歩二分のところに居を構えている。英国出身の彼においては、ロンドンのLeicester squareでは石油でも掘り当てない限りその周辺に住むことは不可能であったろうが、ウィーンでの彼のサイエンスにおける数々の重大な発見は、彼をしてバルコニーからシュテファン寺院の塔を間近に見る生活を可能にしたようである。

そのKimが運営するIMP (Research Institute of Molecular Pathology) は、ドイツの製薬会社Boehringer Ingelheimによってウィーンの市街地に設立された基礎研究が目的の研究所で、現在約130人(テクニシャン25人、PhDの学生37人、ポスドク31人)によって構成されている。研究者に比べてスタッフの数が多く、研究のサポート体制がしっかりしており、運営のための年間予算が約15mドルとかなり潤沢であることから見ても、研究環境という意味ではEMBLやICRFなどの他のヨーロッ

パの有名な研究所と比べても遜色はないように思われる。

研究グループは現在12からなり、研究材料もヒトの培養細胞、マウス、チキン、カエル、ハエ、線虫、酵母と多岐にわたり、それぞれの生物種の特徴を生かした研究がなされている (<http://www.imp.univie.ac.at>)。私がポスドクとして所属するKimの研究室では最も単純な酵母を実験材料として用い、最も複雑な‘我々自身’のことは知ることを目的に研究を行っている。現在のラボのメンバーはKimを含め16人（ポスドク9人、学生5人、テクニシャン1人）、合計12カ国から集まっていて、英語を母国語とするのはKimとアメリカ人のポスドク1人だけなので、ラボでのコミュニケーションの手段としてEnglish、American English、Broken Englishの3種類が使われている。ラボの中ではそれぞれのテーマが少しずつ重なっていて、同じ部屋で実験しているのでお互いに議論しあい、刺激されることが多い。Kim自身ラボのメンバーの一つ一つの実験を把握しており、時には技術的なことまでアドバイスしているほどなので、彼が議論の中心にすることが少なくないし、それはIMPの所長になってからも変わらないようである。

Kimは一度掘り当てた油田に長く興味を持つことなく、常に次の油田を探しているようである。CDKインヒビターSic1の蛋白質分解がCdc34に制御されていることを遺伝的に示した後、彼の興味はHOの転写因子へと移り、娘細胞特異的に局在するAsh1蛋白質を発見してからはサイクリンの蛋白質分解へ、更にAPCを発見後の現在は染色体分離の分子機構へと移っている。従って現在行われている研究テーマは主に（1）ASH1mRNAの細胞内局在を決定する因子の同定、（2）APC活性制御の解明、（3）染色体分離の分子機構の解明に分けられるが、古いテーマほどそのテーマで働く人数が減少し、Sic1及びSFCについて働くものは3年前に絶えていない。このようにKimの研究対象への興味は多岐にわたっているが、研究へのスタンスは一貫している。まず、生物普遍的な現象にこだわり、酵母特異的な（"yeasty"）ことには興味を持たない。研究課題に取り組む前に、常にそれが生命現象において重要かを考える。サイクリンの分解が細胞周期の進行に重要でなければ、サイクリンが

ユビキチン化により分解されようとそれに関わる酵素を同定しようとはしなかったであろう。生命現象に重要であっても、問題を解決する手段として偶然性に左右されるようなアプローチはしないし（yeastのTwo-hybridスクリーニングは彼の嫌うアプローチの一つ）、アプローチの方法が見つからなければ、特にその問題にこだわることはない。また、変異株を用いるのは野生型の蛋白質の機能を類推する手段に留め、変異株の表現型自体の解析はしない。論文として発表された結果でも、正確な実験結果に基づいた論理的な解釈がなされていなければ、必ずよりよい方法を用いて実験を繰り返し、自らの仮説と整合性があるかを調べる、等々。

Kimが発表する論文の評価に比して、Kim自身の人柄に関して（特にアメリカで）あまり好意的な評判はないようである。おそらくそれは、彼のサイエンスに取り組む正直すぎる面—他者の不正確な実験やそれに基づいた曖昧な解釈に対する容赦のない批判—に起因するところが大いと思われる。しかしながら、Kimのサイエンスに対する厳しい姿勢は常に自分のラボのメンバーにも向けられているものであり、彼は我々の書く論文の最も厳しいレフェリーである。また、ラボのメンバー自身もKimの批判をおおむね歓迎しているようで、ラボセミナーでも自分がスピーカーでない限りそれを楽しんでいる風でもある。

最後にKimと格闘した末に得た筆者の研究成果を簡単に紹介しておく。細胞が効率よくサイクリン依存性のセリン/スレオニンキナーゼ（CDK）を負に制御する分子機構として、サイクリンのユビキチン化による蛋白質分解が1991年にMichael Glotzer（彼は現在IMPのグループリーダーの1人）らにより発見され、そのユビキチン化に関する遺伝子がスイス人のStefan Iriniger（彼は筆者のスキー友達であり、彼がドイツにポジションを持ってからもよく一緒にスキーに出かけている）らによってクローニングされた。有糸分裂後期においてM期サイクリンのユビキチン化を促進すると考えられる蛋白質複合体（Anaphase Promoting Complex, APC）は、同時に分裂中期においてはPds1蛋白質のユビキチン化に伴う染色体分離に関与していることが、Orna Cohen-Fix（米、カーネギ研究所）らによって証明されている。筆

者は、博士研究員としてKimのグループに加わり、どのようにして同じ蛋白質複合体 (APC) が異なった基質 (Pds1、M期サイクリン) を識別し細胞周期の異なった時期にそのユビキチン化を引き起こすのかという問題に取り組んだ。筆者はPds1蛋白質の分解にはAPCの他に異なる因子Cdc20蛋白質 (WDリピート蛋白質) が必須であり、M期サイクリンのユビキチン化にはCdc5蛋白質 (Poloキナーゼ) が必須であることを明らかにし、APCの基質特異性がその共因子によって制御されていること示した。さらに、Cdc20蛋白質とCdc5蛋白質は、APCの制御因子であるだけでなく、それ自身が基質であることを発見し、APCの活性制御を考える上で新たなコンセプトを提供した。Cdc20蛋白質はAPCと直接結合しPds1蛋白質分解及び染色体分離に重要であることは、cdc20変異株が染色体分離に欠損がありM期中期で増殖を停止することで明らかである。それでは何故cdc20変異株は、分裂酵母のcut変異株のような表現型を示さないのでしょうか？出芽酵母では細胞質分裂はCDKによって負に制御されていると考えられていて、cdc20変異株がM期サイクリンの分解にも欠損を持つことがその理由である。APC-Cdc20複合体自身が直接M期サイクリンの分解を行わないことはAngerika Amon (米、ホワイトヘッド研究所) らによって示されているので、一つの可能性として、APC-Cdc20複合体がM期サイクリンの分解を負に制御する因子を基質として持つことが考えられる。Pds1蛋白質は、APC-Cdc20複合体の基質であることから、その候補と考えられるが、cdc20 pds1二重変異株は細胞周期のM期後期で増殖を停止し、依然としてM期サイクリンの分解は行われないことが分かった。現在我々は、cdc20 pds1二重変異株の復帰変異株を取得することで、M期サイクリンの分解の負の制御に関わるAPC-Cdc20複合体の新たな基質を得ることを目指している。そのような因子の同定はまた、なぜ細胞が常に染色体分離の後に細胞質分解を行うのかを分子レベルで解明することへとつながると期待している。

(IMP、ウィーン、オーストリア：白山昌樹)

(8) 掲示板コーナー

【シンポジウムの案内：1】

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（オーガナイザー：田中啓二）

Final Program

**Keynote lecture*

----- Wednesday, November 25

- 9:45-10:00 **Opening Remark**
M. UI (Director, Rinshoken, Japan)
- 10:00-10:50 **Plenary Lecture** (Chairperson: K. Suzuki)
R. HUBER (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
Structure and function of the archael and the yeast 20S proteasome and of *E. coli* HslV
- 10:50-11:25 **Special Lectures** (Chairperson: A. Varshavsky)
A. HERSHKO (Technion-Israel Institute of Technology, Israel)
The ubiquitin system and its role in the degradation of mitotic cyclins*
- 11:25-12:00 S. OMURA (The Kitasato Institute, Japan)
Lactacystin, a specific inhibitor of proteasome*
- 12:00-12:35 W. BAUMEISTER (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
Recent advances in understanding 26S proteasome structure*
- 12:35-14:00 Lunch

Session-1: Mechanism and Functions of the Ubiquitin System
(Chairpersons: A. L. Goldberg & H. Yokosawa)

- 14:00-14:35 A. VARSHAVSKY (California Institute of Technology, USA)
The N-end rule pathway in yeast and mice*
- 14:35-15:10 A. CIECHANOVER (Technion-Israel Institute of Technology, Israel)
Degradation of transcriptional activators by the ubiquitin proteolytic system*
- 15:10-15:35 A. PAUSE (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is part of a complex that resembles SCF ubiquitin ligases both in its protein composition and modification
- 15:35-16:00 Coffee Break
- 16:00-16:35 R. KEMLER (Max-Planck Institute of Immunobiology, Germany)
 β -Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*
- 16:35-17:10 J. H. SCHWARTZ (Columbia University, USA)
The role of proteasomes in memory*
- 17:10-17:35 Y. OHSUMI (National Institute for Basic Biology, Japan)
Novel protein conjugation system essential for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*
- 18:30-20:30 **Reception**

----- Thursday, November 26

Session-2 : Cell Cycle and the Ubiquitin Pathway

(Chairpersons: A. Hershko & A. Toh-e)

- 9:15- 9:50 T. HUNT (ICRF Clare Hall Laboratories, UK)
The role of destruction boxes for programmed proteolysis in the cell cycle*
- 9:50-10:25 K. NASMYTH (Research Institute of Molecular Pathology, Austria)
Separating sister chromatids*
- 10:25-11:00 M. YANAGIDA (Kyoto University, Japan)
Proteolysis and mitotic anaphase*
- 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 interacts with UBCH10 and has a HECT-like domain
- 11:45-12:05 K. TODOKORO (Tsukuba Life Science Center, RIKEN, Japan)
Substrate- and time-specific regulation of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC) activity by the regulatory factors, FZY, FZR and MAD2, and by the phosphorylation of these factors and APC
- 12:05-12:25 F. YAMAO (National Institute of Genetics, Japan)
Ubiquitin pathways for cyclin destruction in yeasts
- 12:25-14:00 Lunch

Session-3 : Structural and Functional Features of Proteasomes

(Chairpersons: W. Baumeister & S. Kawashima)

- 14:00-14:25 M. HOCHSTRASSER (University of Chicago, USA)
A hierarchy of 20S proteasome active sites and propeptides: Unequal contributions to protein degradation and proteasome biogenesis
- 14:25-14:50 G. N. DEMARTINO (Univ. of Texas Southwestern Medical Center, USA)
Regulatory proteins of the proteasome
- 14:50-15:15 S. WILK (Mount Sinai School of Medicine, USA)
Small molecule modulators of the PA28 (11S REG)-proteasome interaction
- 15:15-15:40 K. B. HENDIL (Univ. Copenhagen, Denmark)
Structure of the 26S proteasome probed with antibodies
- 15:40-16:10 Coffee Break
- 16:10-16:35 C. GORBEA (University of Utah, USA)
Assembly of the 19S regulatory complex of the 26S protease
- 16:35-17:00 D. FINLEY (Harvard Medical School, USA)
Subcomplexes of the proteasome regulatory particle
- 17:00-17:25 A. TOH-E (University of Tokyo, Japan)
Genetic dissection of the regulatory complex of the yeast 26S proteasome
- 17:25-17:50 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

(Chairpersons: A. Ciechanover & E. Kominami)

- 9:15- 9:50 A. L. GOLDBERG (Harvard Medical School, USA)
Functions of the proteasome in protein degradation and antigen presentation*
- 9:50-10:15 P.-M. KLOETZEL (Humboldt University, Germany)
Rules and roles of proteasomal antigen processing activity ???
- 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)
Interferon- 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

(Chairpersons: A. Ciechanover & E. Kominami)

- 11:20-11:55 D. H. WOLF (University of Stuttgart, Germany)
Function of the ubiquitin-proteasome system in the quality control process of the endoplasmic reticulum*
- 11:55-12:15 T. KOIDE (Himeji Institute of Technology, Japan)
Intracellular degradation of aberrant proteins by proteasome through quality control in the endoplasmic reticulum
- 12:15-12:50 F. U. HARTL (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
Protein folding in the cell: The role of molecular chaperones*

12:50-13:10 Y. MINAMI (Oita Medical University, Japan)
The proteasome activator PA28 is required for Hsp90-dependent protein refolding in association with Hsc70 and Hsp40

13:10-14:30 Lunch

Session-6 : Topics in Advanced Proteolysis Research

(Chairpersons: D. H. Wolf & K. Tanaka)

14:30-14:55 W. BODE (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)
Trypsin, 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

15:15-15:40 C. H. CHUNG (Seoul National University, Korea)
Uncoupling of ATP cleavage from the proteolytic activity of the HslVU protease

15:40-16:00 T. OGURA (Kumamoto University, Japan)
Cellular activities controlled by the bacterial AAA protease, FtsH

16:00-16:20 Coffee Break

16:20-16:40 H. SAWADA (Hokkaido University, Japan)
Role of extracellular ubiquitin-proteasome system in *Ascidian* sperm-egg interaction

16:40-17:00 S. KAWASHIMA (Rinshoken, Japan)
Inhibition of proteasome activity leads cells to differentiation and/or apoptosis

17:00-17:20 A. FUJISAWA-SEHARA (Rinshoken, Japan)
Roles of metalloprotease-disintegrins (ADAMs) in morphogenesis

17:20-17:40 H. SORIMACHI (University of Tokyo, Japan)
Physiological function of calpain and its homologues

17:40-18:00 E. KOMINAMI (Juntendo University School of Medicine, Japan)
Mechanism and regulation of proteolysis by endosomal-lysosomal system

18:00-18:05 **Closing Address**

Y. Suzuki (Vice Director, Rinshoken, Japan)

Office of the RINSHOKEN Conference

Keiji Tanaka

TEL : +81-(0)3-3823-2101 (ext. 5351)

FAX : +81-(0)3-3823-2237

E-mail : tanakak@rinshoken.or.jp

www : <http://www.rinshoken.or.jp/conf/ric98/conf-jp.htm>

【シンポジウムの案内：2】

Third International Meeting on AAA Proteins and Their Cellular Functions

期日：1999年4月16日～19日

場所：The Salk Institute, La Jolla, California, USA

オーガナイザー：Martin Latterich (The Salk Institute), Suresh Subramani (UC San Diego)

予定演者：W. Baumeister (Munich), P. Bouloc (Orsay), M. Duguet (Orsay), S. Emr (San Diego), H. Feldmann (Munich), D. Finley (Boston), P. Freemont (London), K.-U. Frohlich (Tubingen), C. Gorbea (Utah), G. Hogenauer (Graz), K. Ito (Kyoto), S. Johnston (Dallas), W. Kunau (Bochum), T. Langer (Munich), M. Latterich (La Jolla), A. Lupas (SmithKline Beecham Pharm.), D. McKearin (Dallas), W. Neupert (Munich), R. Newman (London), T. Ogura (Kumamoto), W. Schumann (Bayreuth), C. Slaughter (Dallas), S. Subramani (San Diego), C. Suzuki (New Jersey), P. Thorsness (Laramie), G. Warren (London)

“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、御意見をいただけたらと思います。ホームページの1ページ目にはAAAスーパーファミリータンパク質のイントロダクションがあり、これはMENUの「代表的AAAタンパク質とその機能」に続きます。「代表的AAAタンパク質とその機能」では、プロテアソーム、メタロプロテアーゼ、膜融合、ペルオキシソームなどに関わるAAAタンパク質について概説しています。MENUには、このほか、出芽酵母のAAAタンパク質、古細菌 (Archaea) のAAAタンパク質、真正細菌のAAAタンパク質、総説、ミニレビュー、WWWサイト、シンポジウム・ワークショップなどの各ページへのリンクがあります。このうち、ミニレビューではAAAタンパク質に関する様々な話題について短くまとめたものを掲載していきますが、現在のところ、本誌「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。

(小椋 光：熊本大学・医)

IPS (International Proteolysis Society) 設立！

ICOP (International Committee on Proteolysis) 国際蛋白質分解委員会が発展的に解消してIPSになることが決定。1999年9月に第1回国際会議を開催すると共に、会長・運営委員などを会議参加者で決定する。それまでの臨時代表は、Dr. B. Sloanが務める。IPSの詳細はインターネット参照のこと：<http://www.protease.org>

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。

(ぶろておりしす 事務局)

「新聞・ニュースから」のコーナー案内

本重点ニュースでは「新聞・ニュースから」のコーナーを設けますので、新聞・ニュース等において本重点研究班班員の記事が目にとまりましたら、自薦でも他薦でも結構ですので事務局にお知らせ下さい。ご存知のように研究成果を国民に還元することは重要であります。研究概要を国民に広く知って頂くためには、研究成果が新聞・ニュースなどのマスメディアに報じられることは、文部省において強く推奨されているところであり、また研究評価としても高く位置づけられています。従って、本重点班員の活躍の指標ともなりますので積極的に新聞・ニュースに登場することが期待されます。

(ぶろておりしす 事務局)

タンパク質分解

細胞の「自食作用」解明

岡崎の研究グループ 関連遺伝子も特定



大隅良典教授



水島昇研究員

細胞を構成するタンパク質を、その細胞自身が分解する「自食作用(オートファジー)」の仕組みの解明と、この作用にかかわる遺伝子の特定に、岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所の大隅良典教授と、水島昇・日本学術振興会特別研究員らの研究グループが成功。研究成果を二十四日

発行の英科学誌「ネイチャー」に発表する。細胞生物学の新領域をひらく発見として注目され、自食作用と細胞の発生や分化とのかわりの解明や医療分野への応用が期待される。細胞が外界から異物を取り込んで分解する「ヘテロファジー」に対し、自己の

構成成分を分解する過程が「オートファジー」。大隅教授らは、人間の細胞とよく似た働きをする酵母細胞を使い、栄養源を絶った時に細胞内で起きる変化を観察した。栄養飢餓状態に陥ると、酵母細胞内では膜が発生したタンパク質を取り囲み液胞

の中に運び入れる。この中で酵素でタンパク質を分解。分解してできた産物を生命維持のために利用し細胞が死から免れることが分かった。これら一連の自食作用の進行には十四個の遺伝子が必要であることを突き止め、うち十二個は分子量を特定し

世界的に注目される。安藤泰宏・帝京科学大教授(細胞生化学)の話。生命の永続性に関する新たな発見で、非常に重要。これまで全く知られていなかったシステムと遺伝子が分かったことで、一つの大きな研究分野が生まれる可能性もある。世界的に注目される発見だ。



前田 浩
熊本大医教授

熊本大学医学部微生物学教室の前田浩・教授は、十月二十三日奈良市で開催された第十五回国際キニン学会で、日本人としては初めて、ドイツ

キニン系の研究業績を評価 独財団の初めて日本人へ贈賞

科学新聞
平成10年
10月30日
第2725号

科学新聞社ホームページ

<http://www.sci-news.co.jp>

情報提供・記事へのご意見は下記まで

E-mail: hensyu@magical3.egg.or.jp

のフレイ・ウー・財団(SC Foundation)のHenrichsen Memorial Gold Medalを受賞した。同財団のPromotion Prizeはテキサス大学ヘルス・サイエンス・センターのL. M. F. Leeb-Lundberg教授が受賞した。同財団は、一九八八年、ドイツ

シ・ワッペン市のHenrichsen Memorialの浄財を基金として、カリクレイン・キニン系とその関連分野の研究振興を目的として設立された。カリクレイン・キニン系とは、生体内で疼痛や炎症時の浮腫を引き起こすシステムで、最近では血圧維持にも関与することが知られている。前田教授の授賞理由は、細菌感染におけるプロテアーゼとキニン系に関する研究。細菌の感染局所において、この疼痛物質のキニンが生成することを発見したこと、それに関連した研究業績が評価された。

(8) 編集後記

“ぷろておりしす”は、特定領域研究「細胞内蛋白分解」のニュース誌であり、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」と言う意図も担って編集に取り組んでいます。今回は第8号です。従来の重点研究、即ち特定領域研究(A)は、減少の一途を辿り、ミニ重点とも言うべき特定領域研究(B)が大幅に増加する運命にあるらしい。実際、平成10年度の科研申請においては、特定領域研究(B)に150を超える応募があったとのことである。特定領域研究(B)は、十数名の小さな計画班員のみで構成されるので、組織するのが手頃であることが応募が大幅に増加した要因になったと思われる。しかし、問題点も少なくない。例えば、特定領域研究(B)には公募がない。このことは、日本の科学研究の将来を考えると、問題無しとは言えないかも知れない。と言うのは、この制度が定着すると、一つには実績中心主義が横行し必然的に若い野性的な研究者の支援に障害をきたすことに繋がる。若い柔軟な可能性に夢を託す研究の路を閉ざして、科学に未来があるであろうか？昨今の生命科学研究には「金」がかかるのは事実である。文明の成熟は「時」と「金」を無尽蔵に浪費した結果として成し遂げられるものであり、さしづめ生命科学は正に成熟した文明の落とし子みたいなものである。実際、開発途上国に生命科学などが発展した例はない。言い換えれば、独創性を育むには、可成りの金を溝に捨てる覚悟が要るということである。管理型社会を投影した特定領域研究(B)の世界が蔓延するのに抵抗する手段はないものでしょうか？本誌も特定領域研究(A)が採択されているからこそ、その存在基盤が保証されているのである。研究費の制限の故に、犬も歩けば棒に当たる式の手法がサイエンスの常道として蔓延すれば、科学未来は暗いものとなろう。何よりも、有望な若い研究者の育成に齟齬をきたしはしないかとの危惧に襲われる。“実力者”は、特定領域研究(A)の継続に“政治力”を発揮すべきではないであろうか？特定領域研究(B)の充実に異議を唱える訳ではないが、特定領域研究(A)の没落を真摯に憂いたい。これは、本誌の継続性に勤しむ編集子のみの嘆きであろうか？さて、最後に恒例により、投稿を呼びかけます。日本語の原稿は細明朝体、英語の原稿はTimesで作成し、e-mail

(tanakak@rinshoken.or.jp) かdiskでお送り下さい。「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“ぷろておりしす”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。

Postischemic Reperfusion Induces α -Fodrin Proteolysis by m-Calpain in the Synaptosome and Nucleus in Rat Brain

Shiro Fukuda, *Kazuki Harada, †Mitoshi Kunimatsu, Takefumi Sakabe, and *Ken-ichi Yoshida

Departments of Anesthesiology-Resuscitology and *Legal Medicine, Yamaguchi University School of Medicine, Yamaguchi; and †Department of Biochemistry, Nagoya City University School of Medicine, Aichi, Japan

Abstract: A membrane cytoskeletal protein, fodrin, is a substrate for a Ca^{2+} -dependent protease, calpain. It remains unknown whether μ -calpain or m-calpain is involved in the proteolysis of either α - or β -fodrin and in what subcellular localization during ischemia and reperfusion of the brain. To address these issues, we examined the distribution of fodrin and calpain and the activities of calpain and calpastatin (endogenous calpain inhibitor) in the same subcellular fractions. Rat forebrain was subjected to ischemia by a combination of occlusion of both carotid arteries and systemic hypotension, whereas reperfusion was induced by releasing the occlusion. Immunoblotting, activity measurement, and casein zymography did not detect the presence of μ -calpain or a significant change of m-calpain level after ischemia or reperfusion. However, casein zymography revealed a unique Ca^{2+} -dependent protease that was eluted with both 0.18 and 0.40 M NaCl from a DEAE-cellulose column. α - and β -fodrin and m-calpain were found to be rich in the synaptosomal, nuclear, and cytosolic subfractions by immunoblotting analysis. Reperfusion (60 min) following ischemia (30 min) induced selective proteolysis of α -fodrin, which was inhibited by a calpain inhibitor, acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (400 μM , 1 ml, i.v.). The μ -calpain-specific fragment of β -fodrin was not generated during ischemia-reperfusion, supporting the possibility of the involvement of m-calpain rather than μ -calpain in the α -fodrin proteolysis. **Key Words:** Calpain—Fodrin—Ischemia—Reperfusion—Rat brain. *J. Neurochem.* 70, 2526–2532 (1998).

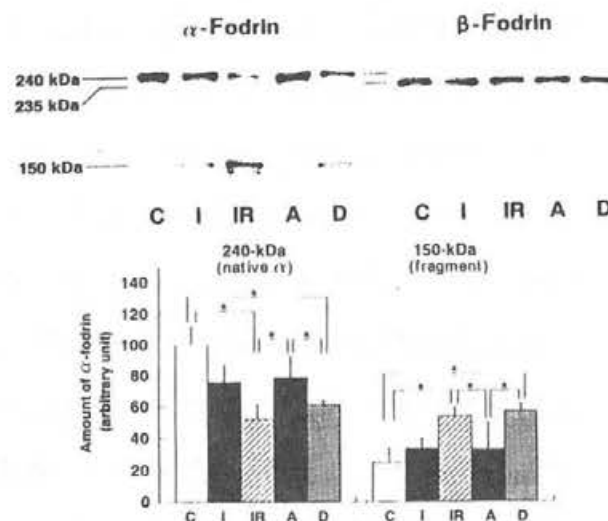


FIG. 4. Proteolysis of fodrin during ischemia and reperfusion and its inhibition by a calpain inhibitor. The brains were subjected to sham perfusion (control; C), 30 min of ischemia (I), 30 min of ischemia followed by 60 min of reperfusion (IR), or ischemia-reperfusion in the presence of ALLNaL (A; 400 μM in 1.0 ml of 2% DMSO i.v.) or its solvent, DMSO (D; 2% DMSO in 1.0 ml i.v.). The homogenates from the brains were immunoblotted with either anti- α -fodrin or anti- β -fodrin antibody and are shown in the representative immunoblots (upper panel) and were quantified (lower panel). The level of the 240-kDa native molecule of α -fodrin was significantly reduced, whereas the content of its 150-kDa fragment was increased after postischemic reperfusion. Data are mean $\pm$ SE (bars) values. * $p < 0.05$ versus control. β -Fodrin content was not changed.

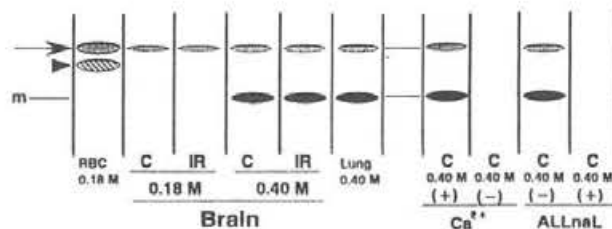


Fig. 2. Casein zymography of the rat brain soluble fraction (shema). Caseinolytic activity appears as dark bands, indicated by arrow (slow protease), arrowhead (putative μ -calpain) and m- (m-calpain).

- 1) ラット前脳虚血（頸動脈結紮+低血圧30分）再灌流（60分）モデルにおいて、 α フォドリンが著明に分解されるが、 β フォドリンは、心臓と異なり分解されない。
- 2) μ -カルパインの存在は、カゼイン分解活性、カゼインザイモグラフィーとも検出不可能であったが、m-カルパイン活性は高く、虚血再灌流により変化していなかったことより、可逆的活性化（限定分解等でない）と思われる。

- 3) μ , m-カルパインと異なるカルパイン様プロテアーゼが、ザイモグラフィーで検出された。
- 4) α ・ β -フォドリン、m-カルパインは、シナプトソーム、核及び細胞質分画に多い。

Stabilization of p53 by Adenovirus E1A Occurs through Its Amino-terminal Region by Modification of the Ubiquitin-Proteasome Pathway*

(Received for publication, December 2, 1997, and in revised form, April 20, 1998)

Takuma Nakajima[§], Kenichi Morita[‡], Haruki Tsunoda[‡], Shinobu Imajoh-Ohmi[§], Hirofumi Tanaka[§], Hideyo Yasuda[§], and Kinichiro Oda[‡]

From the [‡]Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo, Noda 278, Japan, [§]Institute of Medical Science, Tokyo University, 4-6-1 Shirogane, Minato-ku 108, Japan, and [§]School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

The human epidermoid carcinoma-derived cell line MA1, established by introduction of the adenovirus E1A 12 S cDNA linked to the hormone-inducible promoter, elicits apoptosis after induction of E1A_{12S} in response to dexamethasone. E1A expression caused accumulation of wild type p53 more than 10-fold within 24 h after dexamethasone treatment. The cell lines that express E1A mutants containing a deletion either in the amino terminus or the conserved region 1 were unable to accumulate p53. p53 accumulated was degraded efficiently *in vitro* in the S100-0 extract (S100-0) prepared from MA1 cells in an ATP and ubiquitin-dependent manner, but not in S100-24 prepared after treatment with dexamethasone for 24 h. The p53 polyubiquitination activity in S100-0 was calcium-dependent and reduced greatly in S100-24. Ubiquitin affinity chromatography revealed that p53 ubiquitination activity in eluates thought to contain ubiquitin-conjugating enzymes decreased greatly in S100-24 as compared with S100-0. The accumulation of p53 was accompanied by the increase in the level of Mdm2, which has been shown to degrade p53 through binding to it. The high p53 level, however, was maintained until the late stage of the apoptotic process. These results indicate that the stabilization of p53 by E1A occurs through modification of a ubiquitin-specific enzyme(s) in the ubiquitin-proteasome pathway.

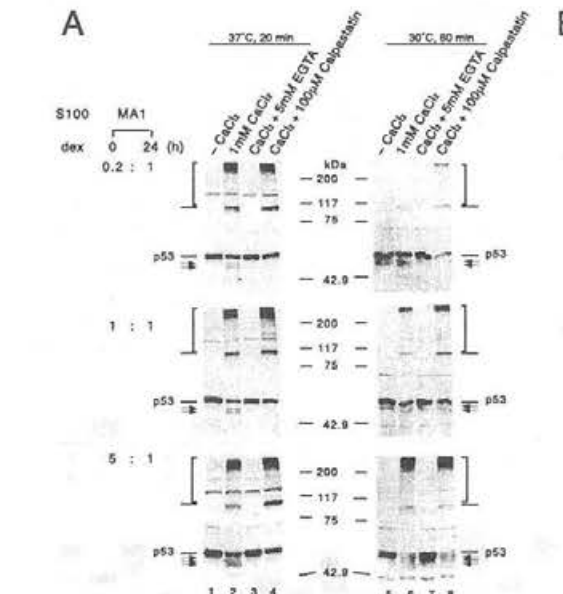


Fig. 4. Calcium-dependent formation of the high molecular weight form of p53 in MA1, B12, and T5 cell extracts. Aliquots of 25 μg of protein in MA1 S100-24 containing accumulated p53 were incubated with 0.2-5-fold amounts of protein in MA1 S100-0 at 37 °C for 20 min or at 30 °C for 80 min in the presence and absence of 1 mM CaCl₂. Inhibitors of calpain, EGTA, and calpastatin peptide were added to lanes 3 and 4, respectively. Aliquots of the mixture containing 7.5 μg of protein from MA1 S100-24 were electrophoresed, and p53 was analyzed by Western blotting using anti-p53 antibody (FL-393) and HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody. *B*, the same amounts of MA1 S100-24 were incubated with 5-fold amounts of protein in either B12 S100-48 or T5 S100-48 prepared from B12 and T5 cells treated with dexamethasone (dex) for 48 h at 30 °C for 80 min. p53 was similarly analyzed.

デキサメタゾン (dex) 誘導性にアデノウイルス E1A 12S cDNA 産物を発現するヒト上皮がん細胞 KB 由来 MA1 細胞株では、E1A 発現後がん抑制蛋白野生型 p53 が安定化して蓄積し、アポトーシスが誘導される。p53 の安定化は DNA 損傷等によっても誘導され、その機構は ATM 遺伝子産物や p19^{Arf} 等により制御されていると推定されるが、E1A により誘導される p53 安定化機構の詳細は不明であった。

本研究では、p53 の安定化に関わ

る E1A の機能ドメインが N 末端側 86 アミノ酸の領域に存在するアポトーシス誘導領域 (Fig. 1A) に一致することを示した。また、p53 分解機構 (カルパイン系とユビキチン系) のうち、ユビキチン系の機能抑制によって p53 の安定化が起こること、このユビキチン系は Ca²⁺ によって活性化されるユニークな特性を持つこと (Fig. 4, 5)、Ca²⁺ 依存性 p53 ユビキチン化因子は ATP 存在下で Ubiquitin-Sepharose に吸着し、10mM DTT で溶出すること、この因子が E1A 発現誘導細胞では非誘導細胞に比べ減少していることが分かった。Ca²⁺ 依存性に活性化されるユビキチン結合酵素 (E2) が E1A 発現により減少すると推定される。一方、p53 の安定化後 Mdm2 の発現が誘導されても p53 の分解が起こらないことから、E1A により Mdm2 の機能が抑制されている。Ca²⁺ 依存的ユビキチン化機構と Mdm2 の関与の詳細に関しては今後検討したい。

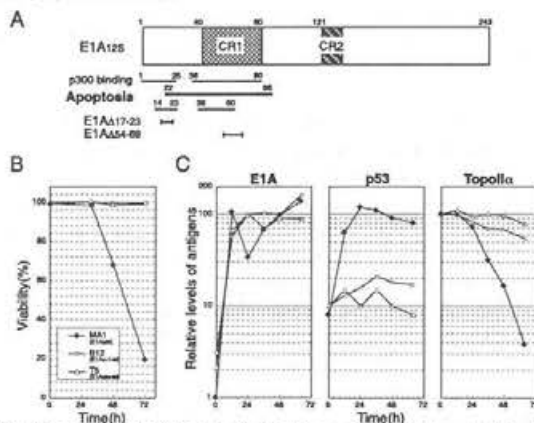


Fig. 5. The E1A amino terminus and CR1 responsible for induction of apoptosis is required for stabilization of p53 and degradation of topoisomerase IIα. A, functional domains of E1A_{12S}. The amino terminus (amino acids 1-40) and CR1 are required for binding to p53. The domains required for induction of apoptosis, defined by White et al. (22) and Myer et al. (24), are shown by the thick lines below the map of E1A_{12S}. The mutant cDNAs, E1A_{12S}(Δ1-23) and E1A_{12S}(Δ54-69), containing a deletion from codon 17 to 23 and from codon 54 to 69 are shown at the bottom. *B*, inability of E1A mutants to induce apoptosis. Sparse cultures of MA1, B12, and T5 cells were treated with 1 μM dex and harvested at the times indicated. The latter two cells express E1A_{12S}(Δ1-23) and E1A_{12S}(Δ54-69), respectively, in response to dexamethasone. Cell viability was determined by trypan blue exclusion and expressed as the percentage of the total cell number. *C*, inability of E1A_{12S}(Δ1-23) and E1A_{12S}(Δ54-69) to stabilize p53 and to induce degradation of topoisomerase IIα. The S100 extracts were prepared from MA1, B12, and T5 cells after treatment with dexamethasone. Aliquots of 50 μg of protein/lane were electrophoresed, and E1A, p53, and topoisomerase IIα were quantified by Western blotting. The levels of these proteins are shown as relative values.

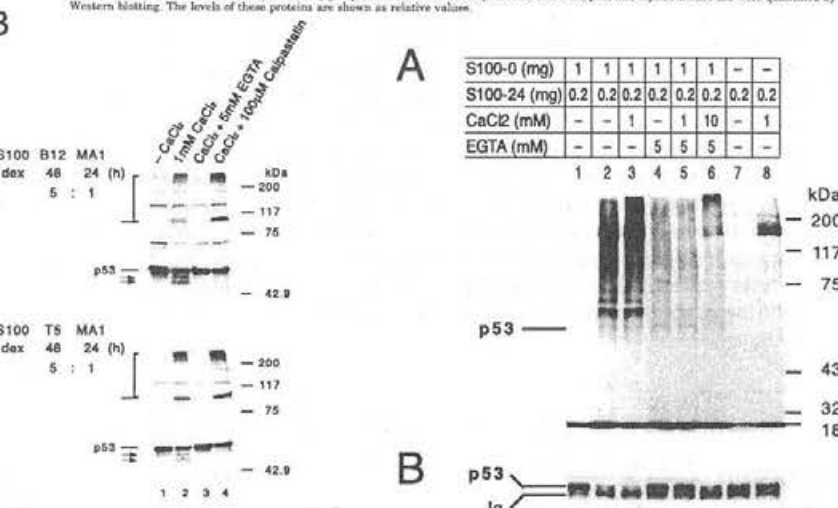


Fig. 6. Calcium-dependent polyubiquitination of p53 in MA1 S100 extract. Aliquots of 0.2 mg of protein in S100-24 were incubated with 1 mg of protein in S100-0 and 0.2 μg of biotinylated ubiquitin at 30 °C for 30 min in the presence and absence of CaCl₂ and EGTA as indicated above each lane. In lanes 7 and 8, S100-24 alone was similarly incubated. After the reaction, p53 was immunoprecipitated with 1 μl each of the anti-p53 monoclonal antibodies pAb421 and Bp53-12 and 2.5 μl of protein A-Sepharose FF beads. The precipitates were analyzed by Western blotting. *A*, polyubiquitinated p53 was detected with HRP-conjugated streptavidin. *B*, unprocessed p53 was detected with anti-p53 polyclonal antibody FL-393 and HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody.

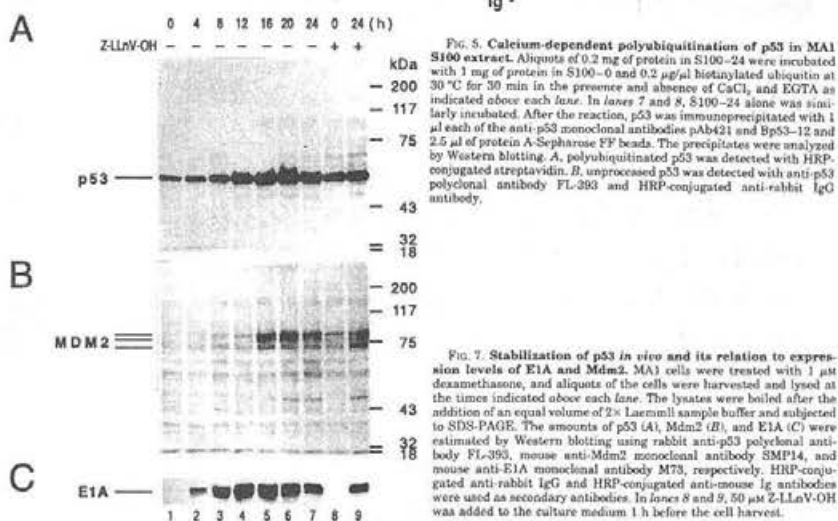


Fig. 7. Stabilization of p53 *in vivo* and its relation to expression levels of E1A and Mdm2. MA1 cells were treated with 1 μM dexamethasone, and aliquots of the cells were harvested and lysed at the times indicated above each lane. The lysates were boiled after the addition of an equal volume of 2× Laemmli sample buffer and subjected to SDS-PAGE. The amounts of p53 (A), Mdm2 (B), and E1A (C) were estimated by Western blotting using rabbit anti-p53 polyclonal antibody FL-393, mouse anti-Mdm2 monoclonal antibody SMP14, and mouse anti-E1A monoclonal antibody M73, respectively. HRP-conjugated anti-rabbit IgG and HRP-conjugated anti-mouse IgG antibodies were used as secondary antibodies. In lanes 8 and 9, 50 μM Z-LL-V-OH was added to the culture medium 1 h before the cell harvest.

A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: Cloning of the antiapoptotic gene gelsolin

SHINJI KAMADA*, HAJIME KUSANO*, HISAKAZU FUJITA†, MAKOTO OHTSU†, RICHARD CHIKARA KOYA†, NOBORU KUZUMAKI†, AND YOSHIHIDE TSUJIMOTO*‡

*Department of Medical Genetics, Biomedical Research Center, Osaka University Medical School, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871; and †Division of Gene Regulation, Cancer Institute, Hokkaido University School of Medicine, N15 W7 Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8638, Japan

Edited by H. Robert Horvitz, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, and approved May 27, 1998 (received for review February 25, 1998)

ABSTRACT Caspase-mediated proteolysis is a critical and central element of the apoptotic process; therefore, it is important to identify the downstream molecular targets of caspases. We established a method for cloning the genes of caspase substrates by two major modifications of the yeast two-hybrid system: (i) both large and small subunits of active caspases were expressed in yeast under *ADH1* promoters and the small subunit was fused to the LexA DNA-binding domain; and (ii) a point mutation was introduced that substituted serine for the active site cysteine and thereby prevented proteolytic cleavage of the substrates, possibly stabilizing the enzyme-substrate complexes in yeast. After screening a mouse embryo cDNA expression library by using the bait plasmid for caspase-3, we obtained 13 clones that encoded proteins binding to caspase-3, and showed that 10 clones including gelsolin, an actin-regulatory protein implicated in apoptosis, were cleaved by recombinant caspase-3 *in vitro*. Using the same bait, we also isolated human gelsolin cDNA from a human thymus cDNA expression library. We showed that human gelsolin was cleaved during Fas-mediated apoptosis *in vivo* and that the caspase-3 cleavage site of human gelsolin was at D³⁵² of DQTD³⁵²G, findings consistent with previous observations on murine gelsolin. In addition, we ascribed the antiapoptotic activity of gelsolin (which we previously reported) to prevention of a step leading to cytochrome *c* release from the mitochondria into the cytosol. Our results indicate that this cloning method is useful for identification of the substrates of caspases and possibly also of other enzymes.

アポトーシスの実行に重要な役割を果たしている caspases の基質蛋白質を同定するために、yeast two-hybrid 法に改良を加えた。Caspases は切断されて作られた大小2つのサブユニットが四量体となって活性型酵素となるため、本法では両サブユニットを別々のプロモーター制御下において発現させ、小サブユニットを LexA DNA 結合領域と融合させた。さらに yeast 内での酵素-基質複合体の安定性を確保するために、基質蛋白質が分解されないように酵素の活性中心に点突然変異を導入した。以上のプラスミドを bait としてヒト胸腺及びマウス胎児ライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲルソリンを含む複数のクローンを得た。いずれのクローン由来蛋白質も *in vitro* で活性型 caspase-3 により切断され、ゲルソリンの切断部位には caspase-3 の良い基質となる DxxD 配列が存在していた。このことは、本法の有用性を示している。

尚、本法は Science 誌で紹介され(Science 281: 1822-1823, 1998)、“Two-Hybridzyme”と命名された。

"bait" vector



"prey" vector

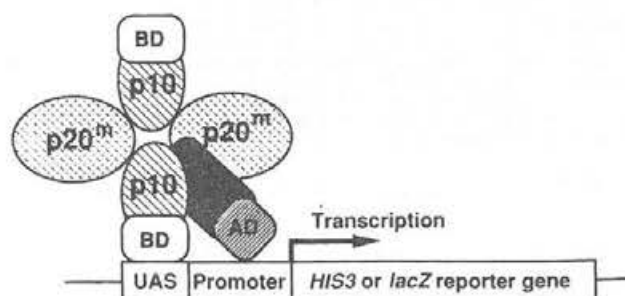
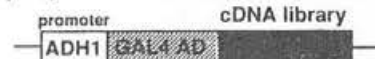


FIG. 1. Diagram of the method of cloning genes of caspase targets using the modified yeast two-hybrid system. The bait vector contained sequences for both the large (p20) and small (p10) subunits of active caspase-1, which were expressed separately in yeast under *ADH1* promoters, and the small subunit was fused to the LexA DNA-binding domain. A point mutation was introduced into the active site cysteine to prevent proteolytic cleavage of the substrates. When the bait and prey vectors were cotransfected into yeast a stable enzyme-substrate complex was formed in yeast.

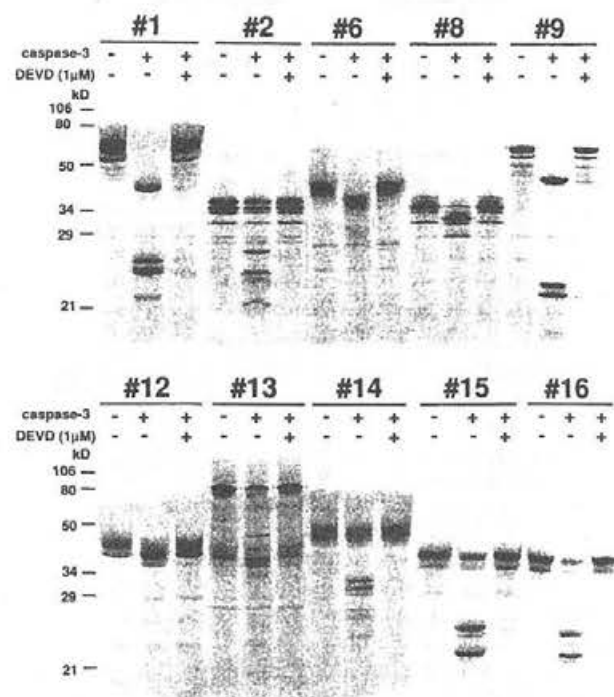


FIG. 2. *In vitro* cleavage of candidate proteins by recombinant active caspase-3. [³⁵S]Methionine-labeled proteins from 10 positive clones and 0.6 μg of purified recombinant caspase-3 were incubated with or without 1 μM Ac-DEVD-CHO for 2 hr, and the reaction