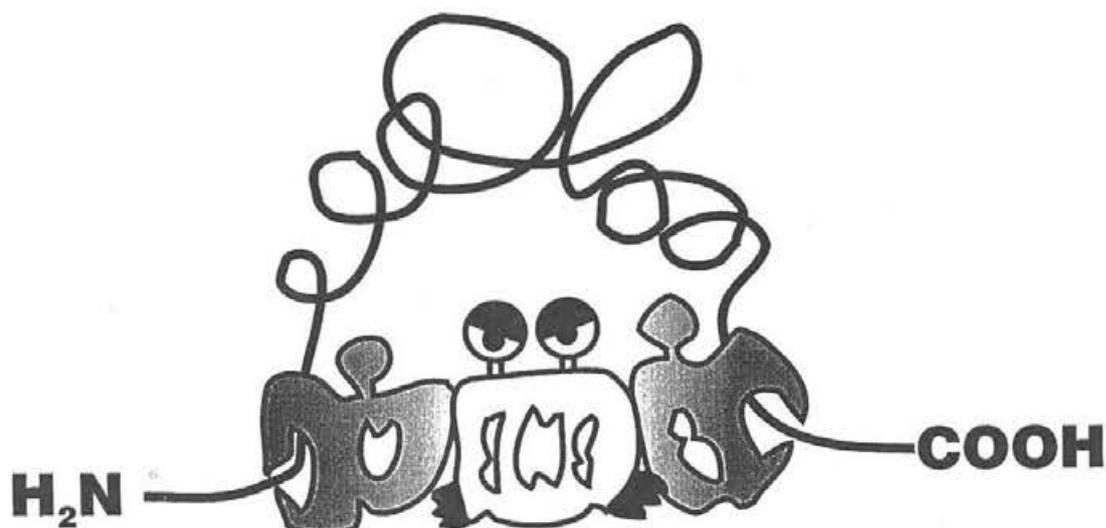


特定領域研究

「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9号（平成11年3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11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 重点ニュース誌“ふろておりしす”発行
 - 3 出版案内
 - 4 学会・集会案内
 - 5 平成10年度班会議開催報告
 - 6 第1回「細胞内蛋白分解」国際シンポジウム
「New Impact of Proteolysis on Biological Science」
 - 7 第3回シンポジウム「プロテオリシス：生理機能と病態の
多面的アプローチ」開催される。
 - 8 第3回「プロテオリシス若手の会」報告
- (4) 学会・集会報告
 - 1 第71回日本生化学会大会シンポジウム
「プロテオリシス研究の最前線 - 細胞機能と生体機能の制御 - 」
 - 2 第15回国際キニン会議 (KININ '98 NARA) に出席して
 - 3 国際シンポジウム「ヒトの病態に關与するプロテアーゼ研究におけ
る最近の進歩」第15回国際キニン学会ポストサテライト
シンポジウム II
 - 4 第21回分子生物学会ワークショップ「蛋白質のプロセッシングと
局在化」
- (5) ミニレビュー
 - 1 オートファジーに必須なユビキチン化様蛋白質結合システム
 - 2 SCF複合体によるI κ B α の分解制御
 - 3 オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) 分解研究の新展開
 - 4 カテプシンEが細胞質で機能する可能性
 - 5 Caspaseの基質蛋白質とアポトーシス
- (6) トピックス
 - 1 外来性抗原プロセッシングプロテアーゼ同定される
 - 2 アルツハイマー病最近のトピック：プレセニリンは
 γ セクレターゼか？
 - 3 シスタチン β はカテプシンのインヒビターか？

- (7) 海外留学中研究者からの最新情報
女性ポスドクのロンドン留学記 (Tim Huntのラボから)
- (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

明けて1999年になりました。今年度もよろしくお願ひ申し上げます。今年の冬は非常に乾燥した日が続き、インフルエンザ、風邪が猛威をふるっております。湿気の多い日本で育った我々は、乾燥に弱い体質になっております。ヨーロッパや中部アメリカにいきますと、すぐに口の中がカラカラになり、気道の具合が悪くなる方は多いと思います。この特有の風土は、研究の進め方やグループ研究のやり方にも良い意味でも悪い意味でも影響を及ぼしていることでしょう。特定領域研究Iは、一つのプロジェクトの推進に大勢の班員が関与するため、研究の進展に応じて機動的に調整し、効果的に研究を進めることが求められておりありますが、ややもすると総花的になり、日本の風土的な悪い面が出る可能性もあります。しかし、特定領域研究I「蛋白分解のニューバイオロジー」は他の研究プロジェクトと異なり、多彩な生命現象の素過程に関与する反応を取り扱っており、いろいろな異なる切り口の研究を包含しているということから、班員もかなり大幅に入れ代わって、このような大きい班組織が比較的うまく機能してきたのではないかと感じております。

さて、早いもので特定領域研究I「蛋白分解のニューバイオロジー」も三年目を終わろうとしております。選択的蛋白分解と蛋白分解のバイオロジーを二本の柱として、これに蛋白分解

の新しい分析方法と病態における蛋白分解の役割を加えて本研究の課題とし、スタート致しました。この3年間の中に、ご存じのようにこの領域の研究は大きく前進いたしました。本研究班でも、従来蛋白分解に無縁だった主としてバイオロジー研究を専門とする方々が多数班員となり、研究班の活性化に大いに役立ちました。その結果、蛋白質の不可逆的な分解による制御と統率は広く生命現象にみられるものだということが次第に定着してきました。本研究班では、細胞内の蛋白分解に重きを置いた関係で、ユビキチン-プロテアソーム系、カルパイン系、リソソーム系などの研究者が多数参加されております。ユビキチン-プロテアソーム系のように、すさまじい発展のみられた領域もありますが、それとてユビキチン様の蛋白質ライゲーションシステムの発見など、これからさらに新しい大きな展開が期待されます。最も古くから知られているリソソーム系は、膜の中に封じ込められていることで研究が遅れていましたが、酵母での分子遺伝学的研究に発して今や細胞生物学的研究に移りつつあります。驚くべきことですが、まだまだ新規の細胞内プロテアーゼが次々と報告され、生理機能までも明らかにされるものも出てきています。勿論、種々のプロテアーゼのKOも進行しており、生体内での機能が明らかになりつつあります。今後、益々、蛋白分解のニューバイオロジー研究は加速することでしょう。しかし課題もあります。本研究班の当初からの重要課題の一つであった蛋白質の寿命の決定という命題についてどこまで

わかったでしょうか。個々の蛋白の寿命の決定に選択的な分解が大きく関わっていることは間違いないことでしょう。しかし、短寿命の蛋白質もあれば長寿命の蛋白質もあります。蛋白分解が亢進した状態ではなく、定常状態での個々の蛋白分解の仕組みはまだわかったとはいえないでしょう。種々の蛋白分解系の相互関連（作用）も注目されなければならないと思います。とくに、病態時には一つの蛋白分解系だけが作動するわけではなく、カスケード的に種々の蛋白分解系が活性化されます。本研究組織を生かした共同研究がどうしても必要となろうと思われ
ます。

本特定領域研究も残すところ1年となりましたので、どこまで研究課題が達成できるかを十分ご考慮していただき、最終年度の研究の向かって一層がんばっていただきたいと存じます。プロテオリシス研究の次なる受け皿づくりに大いに役立つ成果を期待いたしております。よろしくお願い申し上げます。

特定領域研究「細胞内蛋白分解」副領域代表者
木南英紀（順天堂大学医学部生化学第一講座）

(2) 平成11年度特定領域研究班・会議日程

1 平成11年度：夏期ワークショップ

日時：平成11年7月14日（水）～16日（金）

場所：定山溪ビューホテル（北海道札幌郊外）

2 第4回 公開シンポジウム

日時：平成11年12月20日（月）

場所：東京ガーデンパレス

テーマ：仮題「シグナル伝達とプロテオリシス」

3 平成11年度：第1回班会議

日時：平成11年12月21日（火）～22日（水）

場所：東京ガーデンパレス

4 平成11年度：第1回 総括班会議

日時：平成11年7月14日～16日（正確な日時は未定）

場所：定山溪ビューホテル

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

“夏期ワークショップにおけるポスター企画の案内”

本年度のワークショップでは、プロテオリシスを活性化するための特別講演（企画中）・ミニシンポジウム（蛋白分解によるバイオモジュレーター機構）・新班員の紹介の他に、昨年と同様に、ポスター発表を予定しています。

そこで、ポスター演題（約20題）を募集します。「プロテオリシス」に関する自信作であれば、内容は問いません。ポスター発表は班員以外からも募集しますので、振ってお申し込み下さい。但し、原則として本「ぶろておりしす」誌を配布している研究者から募ることとし、一般の学会誌・商業誌等には公募案内を掲載し

ません（班員が口コミで参加を依頼することは推奨）。

班員以外の発表者には、旅費及び滞在費を総括班より支給します（温泉付きです。素晴らしい研究者がおられたら是非誘って下さい）。班員については、自発的な参加以外に「本重点」事務局（研究代表者）より指定する予定であり、指名された班員は原則として発表が義務づけられます（但し、班員及び班員が所属する研究室のメンバーには、総括班からの旅費及び滞在費の支給ができませんので、科研費からの支出等をご検討下さい）。

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

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所長：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所長：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11年度）発行：平成11年6月作成予定

2 重点ニュース誌“ふろておりしす”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: 鈴木紘一、木南英紀、田中啓二)

実験医学 特集 “プロテアーゼと疾患” 1997年11月号 (編集:
鈴木紘一)

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)

蛋白質核酸酵素 特集号 “新しい細胞機能変換システムとしてのユビキチン
ワールド” 1999年5月号 発行予定 (編集: 横沢英良・田中啓二)

4 学会・集会案内

国内学会

- (1) 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)
- (2) 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(世話人: 田中啓二、鈴木紘一)。詳細は掲示板参照のこと。
- (3) 千里ライフサイエンスセミナー: 「細胞内シグナルの制御～ユビキチ
ンとプロテアソーム」平成11年5月17日(月)千里ライフサイエ
ンスセンタービル5階ライフホール(大阪・御堂筋線千里中央駅北口)
(コーディネータ: 田中啓二・山尾文明)。詳細は掲示板参照のこと。

- (4) 第4回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会。
平成11年8月20日(金)～21日(土) ウィルあいち(名古屋市
東区上堅杉街1)(代表世話人 青柳高明)。会詳細は掲示板参照のこと。

国際学会

- (1) "**Proteolytic Processing and Physiological Regulation**" February 25-March 3, 1999, Beckman Center, California, USA (C. Craik et al.)
- (2) Keystone Symposium "**Metalloproteases: Chemistry, Biology and Medicine**" February 25-March 3, 1999, Tamarron, USA (H. Nagase et al.)
- (3) Keystone Symposium "**Protein Folding, Degradation, and Molecular Chaperones**" April 10-16, 1999, Copper Mountain Resort, USA
- (4) 3rd Workshop on "**Proteasomes**", March 24-27, 1999, Clenmont-Ferrand, France (Y. Briand).
- (5) 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)
- (6) CSHL Symposium "**Biology of Proteolysis**" May 5-9, 1999, Cold Spring Harbour, USA
- (7) 平成11年度日本生化学会春季シンポジウム:「**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)ー21日(金)、鳴門(松田佳子他)詳細は掲示板参照のこと。
- (8) "**Second International Serpin Conference**" June 27-July 1, 1999, Queens' College, Cambridge, UK (R. Carrell)
- (9) 5th FASEB Summer Research Conference on "**Ubiquitin and Protein Degradation**" July 31 -August 3, 1999, Saxtons River, Vermont, USA (C. Pickart and G. DeMartino)

- (10) Vth International Symposium on "Proteinase Inhibitors and Biological Control" June 9-13, 1999, Brdo, Slovenia (V. Turk)
- (11) 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 平成10年度「班会議」開催報告

平成10年12月8日(火)～9日(水)に東京ガーデンパレスにて恒例の班会議が開催された。本年度は班員数が多かったために、班会議は2日目の午後まで予定せざるを得なかった。遠い班員の帰路のことを考えると何とか午前中で終わらせたかったのだが、そうすると現状での短い発表時間をさらに切り詰めねばならなかったのでは止むを得なかったのである。しかし、会議日程を3日(前日にシンポジウムを開催するので実質4日)に延長する訳にはゆかなかった。プログラム作成にも毎年難渋していることもあり、来年は何とか新しい工夫をすべき問題と思われる。他班の会議等に参加している班員から良い知恵や企画等があれば、事務局にご一報ください。このように非常に厳しいスケジュールであったにも関わらず、班会議は順調に進行した。とくに新しい研究成果の発表が相次ぎ、班会議としては例年になく活況を呈したと総括してよいように思われた。本特定研究班のテーマである「蛋白質分解のニューバイオロジー」に合致した研究が年毎に多くなり、この特定班を組織した意義が十分に発揮されてきている印象をもった。最終年度にはさらに発展してゆくことへの期待が溢れてきたようである。これらの研究実績を背景に、現在の「蛋白質分解」の特定領域研究班が再編され、2期目の企画へと進展してゆければ、日本の「ぶろておりす」研究にとって望ましいことだと思われた次第である(このような声が多く班員から漏れ聞こえてきた)。班員の皆様の一層の奮起を期待したい。

(事務局：記)

6 第1回「細胞内蛋白分解」国際シンポジウム

「New Impact of Proteolysis on Biological Science」

平成10年11月24日（火曜）午後1時～5時、東京ガーデンパレスで国際シンポジウムが開催された。特定領域研究I「細胞内蛋白分解」では、年度末の班会議の前にシンポジウムを毎年開いているが、国際シンポジウムの開催は初めてであった。「New Impact of Proteolysis on Biological Science」というタイトルで、7題の講演があったが、講演者はすべて外国人という珍しいシンポジウムであった。このシンポジウムの直後の平成10年11月25日から平成10年11月27日まで第13回東京都臨床医学総合研究所国際カンファレンスがあり、この会に外国から多数の著名な研究者が出席した。その中の代表選手に特定領域研究主催の国際シンポジウムでも講演をお願いしたので、外国人だけの講演となった。臨床研国際カンファレンスとは異なるタイトル、内容でお話しするようお願いした。出席者は約90人で、班員以外の方も多数参加して熱心な討論があった。

シンポジウムは鈴木紘一領域代表の開会の挨拶で始まり、以下のようなプログラムで会は進行した。但し、Goldberg氏の講演タイトルは変更された。

W. BODE (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)

Structures of MMPs and their endogenous inhibitors, the TIMPs

D. FINLEY (Harvard Medical School, USA)

Ubiquitination and the cell cycle

M. HOCHSTRASSER (University of Chicago, USA)

Targeting specificity and its regulation in the ubiquitin system

P. M. KLOETZEL (Humboldt-University, Germany)

Immunoproteasomes: alteration of the peptide generation pathway and cooperativity with PA28

G.N. DeMARTINO (University of Texas Southwestern Medical Center, USA)

Regulation of proteasome function

A. L. GOLDBERG (Harvard Medical School, USA)

Mechanism for activation of protein degradation in muscle and disease states

W. BAUMEISTER (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany)

Structural studies on Tricorn protease

ご覧のように、ユビキチンとプロテアソームに関する最近の研究の進歩についての講演が大部分であり、臨床研国際カンファレンスの項でその内容は詳しく紹介されるので、できるだけ簡潔に述べる。

Bode氏はMatrix metalloproteinases (MMPs) の仲間の中からMMP2, MMP3, MMP8の立体構造解析を手がけられてきたが、今回の講演では、清木（東大・医科研）らのグループが発見した膜結合型のMMP、即ち MT-MMP-1の結晶構造解析の結果が中心であった。さらに、TIMP-1とMMP3複合体の結晶構造解析からTIMP-1によるMMPの阻害機構や新しいインヒビターの開発への応用などが討論された。

Finley氏はG1期開始の鍵を握るCln3サイクリンのユビキチン依存性の分解とこれに関与するubc3についての出芽酵母を用いての詳細な解析結果を発表された。リボソーム蛋白質のL29サブユニットがユビキチン化されること、しかもリジン63を介したユビキチン鎖であることに注目し、そのユビキチン化が特にS期で顕著であることを示した。L29が安定な蛋白質であることから、分解を目的としないユビキチン化として新しいユビキチンの機能を予測した。

Hochstrasser氏は酵母接合型を調節するMAT転写因子のユビキチン/プロテアソームによる分解の分子メカニズムについて講演した。Haploidでは $\alpha 1$ は速やかに分解されるが、 α/α diploidでは $\alpha 2$ は $\alpha 1$ とヘテロダイマーを作り安定化される。両分子の相互作用に関与する領域の詳細な解析から、プロテアソームによる分解シグナルの提示とシグナルのマスキングによるMAT量の調節について討論した。

Kloetzel氏は二つの話題を提供した。免疫プロテアソームの活性部位 (LMP2) の改変による抗原提示能の変化をin vivoで解析した。いくつかのペプチドでは抗原のプロセッシングと提示能の低下をもたらしたが、逆にサイトメガロウイルス由来の9-merの提示能は上昇することを示した。p53の273番目のアミノ酸の点突然変異 (R

からHへの変異、腫瘍化におけるホットスポット)はプロテアソームによるエピトープ産生を阻害しすることを合成基質を用いて示し、ガンワクチンのデザインについて討論した。

DeMartino氏はプロテアソームのアクティベーターPA28 (分子量18万)のサブユニット α と β の相補的な機能についての話をした。PA28の α サブユニットのC末のアミノ酸 (Tyr)は20Sプロテアソームと結合し、活性化するのに必要であること、また完全に活性を失った改変 α サブユニットは β サブユニットと会合しても活性化作用はないが、部分的に活性を保有する改変 α サブユニットは β サブユニットと会合すると元のPA28と同じ活性化作用を持つことを示した。

Goldberg氏の講演は大腸菌における蛋白分解ではなく、これも長年手がけられている骨格筋におけるATP依存性の蛋白分解についてであった。絶食、糖尿病、担癌状態、慢性腎不全、敗血症などにおいては、ホルモンやサイトキニン依存的に筋タンパクの分解は促進するが、この亢進した蛋白分解はプロテアソームのインヒビターで強く抑制され、ポリユビキチンされた可溶性蛋白質が蓄積することを主として培養細胞系で観察した。しかも、ユビキチン結合体の増加はN-endo ruleの活性化に依存するという発表であった。因みに、筋構造蛋白は筋原繊維となっているとプロテアソーム系では分解されない。

Baumeister氏の講演は、Tricorn proteaseの構造解析に関するものであったが、詳細はその後Cell誌 (Cell 95:637-648, 1998)に詳しく発表されたので、参照して欲しい。シンポジウムは予定通り5時に終了した。平成11年度にも、国際シンポジウムをできれば企画したいと考えております。その他にも良い企画がありましたらぜひご提案をしていただきたいと存じます。よろしくお願いたします。

(木南英紀：順天堂大学医学部生化学第一講座)

7 第3回シンポジウム「プロテオリシス：生理機能と

病態の多面的アプローチ」開催される。

平成10年を締めくくる班会議に先立って、文部省科学研究費特定領域研究「蛋白分解のニューバイオロジー」第三回シンポジウム「プロテオリシス：生理機能と病態の多面的アプローチ」が平成10年12月7日、東京ガーデンパレスにて執り行われました。今回は、班員の中から5名、国外から1名の招待講演者を呼ぶかたちで行なわれました。

名取俊二先生（東京大学大学院・薬学研究科）は、センチクバエの発生から成虫に変態するまでの間に機能する様々なプロテアーゼとその基質タンパク質についてお話されました。発生初期に機能すると考えられているセンチクバエ・カテプシンLの基質として同定された200kDaタンパク質のcDNAクローニングを行ない一次構造を決定したところ、他のタンパク質とアミノ酸相同性のない29kDaのタンパク質のドメインを繰返しコードしていることが判明しました。現在、その基質タンパク質の機能について検討を加えているとのこと。fat bodyを分解する蛹血球細胞由来のプロテアーゼはキモトリプシン様酵素ですが、cDNAクローニングの結果得られた一次構造はカテプシンBに相同性が高く、基質を認識するアミノ酸を動物由来のカテプシンB様に変異させることにより、カテプシンB様の酵素活性を発揮するようになりました。蛹に存在する抗サルコトキシン1A抗体に反応するトリプシン様プロテアーゼは抗菌作用を持っており、一次構造を解析したところ、抗菌作用とプロテアーゼ作用とは独立に存在していることが明らかになりました。また、異物に反応して放出されるカテプシンL様酵素は、一次構造上、全く関連のない26kDaのタンパク質と連なって生合成されること、そしてこの様なプロテアーゼは昆虫属に広く存在していることなどを話されました。教室全体を挙げて一つの昆虫の発生から成虫にいたるまでの全てのプロテアーゼとその基質を解

明してやろうという意気込みを感じさせる迫力満点の講演でした。

瀬原（藤沢）淳子先生（東京都臨床研）は、個体発生に強く関与していると考えられているディスインテグリン族プロテアーゼについてご講演されました。ディスインテグリン族プロテアーゼのメルトリンはシグナルペプチド-プロペプチドドメイン-メタロプロテアーゼドメイン-ディスインテグリンドメイン-膜貫通ドメイン-細胞質ドメインからなる分子で、これまでに $\alpha\beta\gamma$ の三種類がクローニングされています。 γ は全ての組織でそのmRNAが発現しているのに対して、 α は成体では骨、胎児では筋節に強く発現しており、 β も成体では骨、胎児では後根神経節や神経堤に強く発現していることから、 $\alpha\beta\gamma$ はそれぞれ別々の機能を果たしていることが考えられています。メルトリン α のKOマウスは胎盤の血管形成不全により死亡してしまうことが多いことから、メルトリン α は血管の形成に関与していると考えられることをお話されました。これまで、形態形成に伴う組織の再構築にプロテアーゼが関与していると考えられてきましたが、昆虫での名取先生グループの研究と同様、動物での組織の再構築に関してプロテアーゼの関与を示した素晴らしい講演でした。

深水昭吉先生（筑波大学・応用生物化学）は、アンジオテンシノーゲンKOマウスの脳に寒冷障害を与えると末梢から投与した色素が障害部位に到達すること、更に、末梢から色素を投与する時に同時にアンジオテンシンIIやアンジオテンシンIVを投与すると障害部位に色素が到達しないことから、アンジオテンシノーゲン由来のこれらのペプチドが脳血液関門の形成に強く関与していることを講演されました。末梢での血圧の維持以外に同じプレカーサー由来のペプチドが全く違う機能を果たしていることは、生物の不思議さ、奥深さを十分に感じさせる講演でした。

大隅良典先生（基生研）は、酵母を用いた自食作用の分子機構について話されました。酵母では、形態による観察、生化学的手法を用いた解析および、遺伝学的手法を用いた変異株の分離などが進んでおり、この分野での酵母を用いた研究が良く進んでいる様子がうかがえました。彼らの分離した自食胞形成の変異株の解析から、

この自食作用にはユビキチンとは相同性のないApg12タンパク質がApg5タンパク質の特定のLys残基にイソペプチド結合することが必須であり、動物細胞にもこれらのタンパク質に相当するタンパク質が存在していることが明らかにされました。Apg12タンパク質とApg5タンパク質の結合には、ユビキチン系におけるE1およびE2に相当するタンパク質Apg7タンパク質、Apg10タンパク質が存在していることはユビキチンと同様ですが、Apg12タンパク質はユビキチンと異なり、現在のところApg5タンパク質のみを基質としているようであるとのことでした。動物細胞でこれらのタンパク質に相当するシステムが何を行なっているかが興味を持たれるところです。

山本健二先生（九州大学・歯学部）は、カテプシンDとEの新しい機能についてご講演されました。カテプシンDは既にKOマウスが報告されており、それ由来の細胞を用いた解析から、これまで報告されてきたような外来抗原に対する抗原提示やアミロイドタンパク質のプロセッシングには関与していないこと、しかしながら細胞増殖に必須であること、さらにFas/Apo1により誘導される細胞死に関与していることが明らかにされたことを話されました。一方、カテプシンEは細胞組織特異的なプロセッシングが行なわれることから、組織特異的な機能が有ることが推定されます。特にミクログリアではエンドソームに存在しており、ペプスタチンAで誘導される細胞死がカテプシンDのKOマウス由来のミクログリアでも同様に誘導されることから、この時のペプスタチンAの標的酵素であると推定されること、さらにペプスタチンAで誘導される細胞死がスタウボスポリンにより阻害されることから、カテプシンEが何らかの形で細胞内情報伝達系とリンクしているのではないかというお話でした。これまでは、リソゾームに到達すると全ておしまいというのが常識でしたから、エンソゾームーリソゾーム系が細胞内情報伝達系とリンクしているとすれば、これは新しい研究の発展を予測させる話ではないかと思います。

P.Saftig博士（Goettingen大）が最後に、様々なカテプシンのKOマウスを用いた機能解析についてご講演されました。カテプシンDのKOマウスは、生後24日～

26日で小腸上皮の脱落による栄養障害で死亡すること、胸腺髄質のリンパ球が減少していること、脳でGM2やGM3が増加しているがアミロイドタンパク質のプロセッシングには変化がないこと、全体のタンパク質分解には影響を与えないが、肝臓のリソゾームに異物が蓄積することなどが起こっていることを示されました。カテプシンLのKOマウスでは、育毛周期の異常と上皮の肥厚が起こること、更に胸腺上皮細胞におけるインバリアント鎖の分解異常が起こることが明らかにされました。カテプシンBのKOマウスでは異常が認められないが、カテプシンLとの二重KOマウスは生まれてこないことから、カテプシンLはカテプシンBの機能を相補可能であるが両者は協調して機能していることが示されました。カテプシンKのKOマウスは破骨細胞の機能不全が起こり、ヒトの病気のモデルマウスになること、培養細胞系では破骨細胞のピット数は増加するが深度は低下し、面積も減少していることが明らかにされました。「一つのKOマウスを作製するだけでも大変なのに、どうしてこんなにたくさんのKOマウスが作れるのだろうか？」と聴衆のため息が聞こえてきましたが、本人は、これからは、二重、三重のKOマウスを作ると益々意気盛んな様子でした。

班会議は短時間であまり深い議論をする時間はありませんが、シンポジウムでは一人の演者が長時間を講演するため、より深い議論をする良い機会であると思います。次回のシンポジウム・ワークショップでの講演および議論の深まりに益々期待したいと思います。

(上野 隆・石堂一巳：順天堂大学医学部生化学第一講座)

8 第3回「プロテオリシス若手の会」：報告

1998年11月4日、5日の2日間、第3回“プロテオリシス若手の会“が秋色深まり行く水上温泉で行われました。今回は前回は上回る40名余りの若手ならびに名誉若手の方々の参加がありました。

まず領域代表者の鈴木紘一先生から開会のご挨拶がありました。その中で、この会をオープンで活発な討論の場とするために、お互いを“先生”と呼び合うのは控えてはどうかというご提案がありました。そのご主旨に深く賛同し、本稿でも原則的に先生という言葉を使わないことにいたします。ご無礼の段（あるいは逆に原則の不徹底）、どうかお許し下さい。

基調講演は東京都臨床医学総合研究所の川島誠一先生（さすがに川島さんとは書けませんでしたが）に、“やっぱりえらいプロテアーゼ”と題して、ご自身のお仕事も例に引きつつ広くプロテアーゼ一般について、またその研究上の喜びと苦勞についてお話いただきました。

引き続き参加者全員の簡単な自己紹介があった後、いよいよ発表講演が行われました。発表順にご紹介いたします。

・九州大学・生体防御医学研究所・畠山鎮次さん

“マウスSCF構成分子のクローニング及び解析”

話題のSCF複合体に関する発表をうかがいました。ショウジョウバエの β -catenin ホモログであるarmadilloのユビキチン化・分解を制御していると考えられるSlimbという分子が最近報告されましたが、そのマウスホモログと考えられるFWD1（F-boxとWDリピートと呼ばれる構造モチーフを持っている）を単離し、それがやはり哺乳類細胞で β -cateninの分解を制御していることを示すというまさにタイムリーなお仕事でした。また、 β -cateninの分解とI κ Bの分解とに共通の機構が働いていることが示唆されていましたが、この場合も実際にFWD1に依存してI κ Bのユビキチン化が起こることを示されました。

・東京都臨床研・棚橋伸行さん

“プロテアソームを活性化する蛋白質の精製と機能解析”

なるべく穏和な条件でプロテアソームを精製してくることにより、2つのPA700が20Sの両端に会合した26Sダンベル型プロテアソームと、2つのPA28が20Sの両端に会合したフットボール型プロテアソームに加えて、PA28-20S-PA700という構成を

持つハイブリッド型プロテアソーム粒子が存在することを多面的な証拠を挙げてお話しいただきました。各粒子の機能的な差違に興味が持たれます。

・大阪大学大学院・薬学研究科・中川れい子さん

“転写制御因子GATA-6のcAMPに依存した分解制御の分子機構”

発生や分化に深く関わる転写因子GATA-6がcAMPの上昇にともない消失する機構について研究を進めておられます。まずGATA-6がAキナーゼによるリン酸化を受けてプロテアソームにより分解されるらしいことを示されました。さらにこの分解過程に関わる因子を包括的に同定するために、GATAプロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を組み込んだCHO細胞からcAMP存在下でも薬剤耐性を示す細胞株を選別することで、cAMPに依存したGATA-6の分解が起こらなくなる変異細胞株を複数樹立されました。原因遺伝子の同定が待たれるところです。

・浜松医科大学・生化学第一教室、東京都臨床研・鈴木俊顕さん

“ウシ脳におけるユビキチン・Nedd8・SUMO-1を解離させる酵素群の同定”

ユビキチン及びユビキチン様蛋白質のNedd8、SUMO-1を解離させる酵素群を同定するために、それぞれのC末端に短いペプチドを融合したものを基質として、C末端で正確に切断する活性を指標に精製を行っておられます。ウシ脳の可溶性画分と膜結合画分とからいくつかの活性を高度に精製され、いくつかについてはその基質特異性に関してもお話いただきました。

・東京都臨床研・川島誠一先生（富岡正典さんの代理）

“アポトーシスにおけるcaspaseの役割の形態学的観察による解析”

演者に予定されていた富岡正典さんをご都合でご参加になれなかったため、代理として川島誠一先生がご発表になりました。残念ながら富岡さんは似顔絵のみのご参加でした。ご発表は、リンパ性白血病細胞MOLT-4にプロテアソーム阻害剤であるZLLLalを投与することにより誘発されるアポトーシスが、カスパーゼ阻害剤存在下では通常のアポトーシスとは異なった細胞形態を示し、これがおそらくアポトーシスの中間段階に相当するものであると考えられることをお話くださいました。

・筑波大学・応用生物科学系・九里裕一さん

“細胞外分泌におけるヒトキマーゼプロペプチドの役割”

肥満細胞のセリンプロテアーゼであるキマーゼは、シグナルペプチドに加え2アミノ酸 (Gly-Gly) からなるプロペプチドを持つ前駆体として合成されます。このプロペプチド配列に変異を導入して、分泌効率に及ぼす影響を検討することにより、このプロペプチドがカテプシンCによるプロセッシングのみならず分泌においても重要な役割を持つことを示されました。

・九州大学・歯学部・岡元邦彰さん

“カテプシンDノックアウトマウス”

カテプシンDノックアウトマウスの表現型の詳細な解析についてお話いただきました。回腸の萎縮や脾臓と胸腺におけるリンパ球の破壊などに加え、脳では新たに核の凝縮した像が観察され、オートファジー様の現象である可能性をお示しになりました。

・東京大学大学院・薬学系研究科・飯島亮子さん

“アフリカツメガエルの胚発生に關与するプロテアーゼ”

ツメガエルの胚発生における分泌型プロテアーゼの重要性についてお話いただきました。ツメガエル卵の初期発生にさまざまなプロテアーゼインヒビターを与えたところ、アプロチニンだけが胚発生を顕著に阻害することと、その際、卵黄プラグが形成されず、神経溝が出来なくなるという欠陥が生じることを示されました。このとき標的となっているセリンプロテアーゼの同定に向けての実験についてもお話いただきました。

・順天堂大学・医学部・谷田以誠さん

“APG7-新規E1 like protein”

酵母が栄養飢餓下に置かれたときに顕著に認められるオートファジーの誘導に必要な遺伝子の一つ、Apg7がユビキチン活性化酵素E1様の活性を有する蛋白質をコードしていることをお話いただきました。Apg7にはE1の活性化部位と部分的に相同性

が認められ、保存されたCys残基へのチオエステル結合を介してApg12を基質としたE1様の反応を触媒していることを、遺伝学的ならびに生化学的手法により示されました。

・東京大学・分子細胞生物学研究所・二井勇人さん

“出芽酵母のカルパイン様プロテアーゼCpl1の機能解析”

出芽酵母のアルカリ適応と胞子形成に関わる情報伝達が、カルパイン様プロテアーゼCpl1による転写因子Rim101のプロセッシングと分解の制御により行われているというお話でした。さらにこの経路により制御を受ける標的遺伝子群の同定の試みについてもお話いただきました。

今回は初めての試みとして各講演に指定質問者が置かれていましたが、若い大学院生の方々の真剣な質問によって討論全体が活性化され、限られた講演時間内に充実した討論を持つための良い助けになったのではないかと感じました。領域副代表者の木南英紀先生のご挨拶で発表講演を終わり、その後夕食と交流会に移りました。講演では聞けなかったような突っ込んだ討論がそここで行われていました。もちろん直接研究に関わることに限らず大いに語り、交流を深めることができたのではないのでしょうか。

私自身はこの会には初参加でしたが、若手同士がこのように自由な雰囲気の中で交流を深めるというのはなかなか他で得られない機会であると実感しました。大いに勉強になりましたし、多くの若手研究者の方々と知り合うことが出来ました。直接に研究に還元できるアイデアを得たり、共同研究に発展する結びつきを得たりした方も多いのではないのでしょうか。最後になりましたが、このような素晴らしい会の実現にご尽力いただいた実行委員の方々に厚くお礼申し上げます。

(前田達哉：東大分生研)

(4) 学会・集会報告

1 第71回日本生化学会大会シンポジウム

「プロテオリシス研究の最前線 - 細胞機能と生体機能の制御 - 」

平成10年10月14日(水)、日本生化学会大会シンポジウムとして、小椋(熊本大)と小出(姫路工大)がオーガナイズして、「プロテオリシス研究の最前線 - 細胞機能と生体機能の制御 - 」を開催した。午前と午後の2部において、9演題、4時間半にわたってプロテオリシスの最新的话题を聴くことができた。このシンポジウムは、細胞内・細胞外に拘らず、事務局からの要請もあって、なるべく若手で生物学的に重要なテーマに精力的に取り組んでいる方を演者に選んだ。初日の朝一番からということで、最初のうちは聴衆もやや少なかったが、徐々に増え、最終的には盛会といえるものであった。演者の方々、参加者の方々にお礼申し上げます。

さて、順を追って、簡単に振り返ってみる。まず最初は、Langer (ミュンヘン大)が、ミトコンドリアの品質管理に関わるプロテアーゼ、特にAAA型メタロプロテアーゼの機能について講演した。これは、細菌ではFtsHというプロテアーゼと相同で、膜にアンカーしたATP依存性のプロテアーゼである。ミトコンドリアの場合には、マトリックス側に活性部位を持つm-AAAプロテアーゼと膜間側に活性部位を持つi-AAAプロテアーゼの2種類があり、それぞれ分担して、おもに異常な膜蛋白の分解除去に関わり、膜蛋白の品質管理を行っている。最近、ヒトの遺伝病である遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子の一つがm-AAAプロテアーゼの遺伝子であることが判明し、いっそう注目されてきている。

次に、荻島(九大)が、ミトコンドリアのプロセッシングプロテアーゼが基質の何を認識して正確な箇所切断するのかという機構について、詳細な解析を紹介した。徳永(姫路工大)は、小胞体において異常な蛋白は、細胞質側に逆輸送され、プロテアソームにより分解されること、これに働くとされる膜結合型のプロテア

ソームはサブユニット構成が通常のものとは違うことなどを示した。松崎（京大院）は、ガラクトシアリドーシスで欠損する保護タンパク質がカテプシンAと同一であることを明らかにする目的で、ウシ膵臓からカテプシンAを精製し、酵素化学的、タンパク化学的諸性質について報告した。鎌田（阪大）は、アポトーシスに働くカスパーゼについて、情報伝達の最下流に位置し、アポトーシスの実行に重要な役割を担うカスパーゼ3について講演した。

午後の部は、4演題。まず、馬場（筑波大）が、精子のアクロソーム反応におけるプロテアーゼの役割について、アクロシン欠損マウスの結果など興味深い発表を行った。次に、丸山（鹿児島大）は、血液凝固に関わるセリンプロテアーゼのトロンピンがトロンピン受容体を介して種々の細胞にシグナル伝達をすることを報告した。今回のシンポジウムでは、唯一の細胞外プロテアーゼの講演であった。川原（東大分生研・都臨床研）は、プロテアソームのユビキチンレセプターの多様性について報告し、プロテアソームによる基質識別機構に複数の経路があることを示した。

最後に、田村（マックス・プランク研、ドイツ）は、古細菌から見つかった超巨大プロテアーゼ複合体、トリコーンプロテアーゼの構造と機能について講演した。トリコーンプロテアーゼは、その分子の電顕観察による形態的特徴から名づけられたが、それがさらに集合して直径約55nmの正20面体キャプシド構造を取る。その機能は、プロテアソームや他のATP依存性プロテアーゼによる分解産物ペプチドをさらに短いペプチドへと分解し、最終的にアミノペプチダーゼによってアミノ酸にまで分解される過程を促進するプロテアーゼであると考えられる。トリコーンプロテアーゼはこれまで古細菌にのみ見つかっており、その普遍性については定かでないが、少なくとも出芽酵母には存在しないので、真核細胞では同様の機能を持つ別のプロテアーゼが存在する可能性が高い。

以上、大変広い範囲の「いつもの話」とは少し趣の異なる話題が多かったのではないかと思っている。そう感じていただければ、その意味ではねらい通りであっ

たと思う。あとで、「面白かった。」という御意見もいただきましたが、すなおに受け止めておこう。概ね、内容的にも最先端でレベルの高いものであったと思うが、残念ながら、ややレベルの落ちる演題もあった。オーガナイザーとしては、責任を感じているが、これは、予想以上に公募演題が少なかったことに一因がある。事務局からも、生化学会員の公募演題をできるだけ多く取り上げるようにとの指示があったので、公募枠を十分に用意したのが裏目に出た。その主旨については、班会議でも説明させていただいたつもりであったが、班員からの積極的な応募が無かったのが残念である。今後同様のシンポジウムが別のオーガナイザーによって計画される際は、是非多くの方々の御支援をお願いしたい。

(小椋 光：熊本大・医、小出武比古：姫路工・理)

2 第15回国際キニン会議 (KININ '98 NARA) に出席して

The kallikrein-kinin system from molecular biology to pathophysiologyのテーマのもとに、第15回国際キニン会議(会長 鹿取 信、北里大名誉教授)が10月19日から6日間に亘って奈良県新公会堂で開催された。この会議は1978年(会長 鈴木友二)と1987年(会長 守屋 寛)の2回東京で開かれているので、我が国ではほぼ10年振りである。演題数は211、うちポスター133、口演51、シンポジウムI～V計27、参加者は延べ数で約300名であった。海外22ヶ国からの参加があり、日本から約100名、USA、ドイツ、ブラジルからそれぞれ25～30名。今回は会長による若手研究者への旅費援助の配慮もあって、南アフリカ(5名)やチリ(3名)からの参加もあった。ただ、残念なのは日本を除くアジア(中国、韓国など)からの参加が殆どなかったことである。

さて、会議は特別講演2題とシンポジウム5題(I: Bradykinin receptors, II: Cardiovascular system, III: Renal function and hypertension, IV: Plasma kallikrein-kinin system, V: Bradykinin receptor antagonists)、それに口頭発表、ポスター発表で構成さ

れたが、全て1会場で行われたので、キニン研究の現状が良く理解でき、こうしたプログラム編成は参加者からの好評を得た。

村上和雄教授（筑波大）による"Transgenic and knockout models in renin-angiotensin system"と、W. Muller-Esterl教授（Johannes Gutenberg大、独）の"Structure and function of G protein receptors...new lessons from the kinin receptors"をテーマとした特別講演は、いずれもキニンとその周辺研究の最前線を反映した優れた内容で、出席者に感銘を与えた。特に、Renin-angiotensin系（RAS）に関与する各因子のKO-マウスを作出し、従来言われてきた血圧調節におけるRASの重要性を検証した村上グループの研究、さらに、従来のbradykinin(B)2 receptorに加えて、誘導型B1 receptorの構造と機能について新知見を発表したMuller-Esterlグループの研究成果は圧巻であった。

今回の会議のシンポジウムや一般講演でも、そうしたB1とB2 receptorsに関する報告は多数あり、それらの主な成果を中心に要約すると、

7回膜貫通型のB1とB2 receptorsのcDNA塩基配列や全アミノ酸配列は、ヒトの他ラット、マウス、家兎のもので明らかにされ、B1とB2の配列相同性は約40%である。

B1 receptorのアゴニストは [des-Arg⁹] bradykinin (K_d=5nM)、一方、B2 receptorはbradykinin (K_d=2.9nM) に鋭敏に反応し、[des-Arg⁹] bradykinin の約10,000倍リガンドとして有効であるという。また、B1 receptorはinducible型で、一方のB2 receptorはconstitutive型であり、例えば、血管内皮細胞ではB2は常時発現しているが、B1はある刺激に応答して発現する。いずれのreceptorも、リガンド結合後、細胞内ドメインのSer/Thrがリン酸化される。

B1とB2 receptors共にG-タンパク質共役型の細胞内情報系に関与しており、未だその経路は確立されていないものの、図の経路が提唱されている (J. Biol. Chem., 273 (48), 32016-32022, 1998)。

B2 receptorは殆ど全組織で発現している。Kidneyやheart, uterus, aorta, duodenumでは特に顕著であり、脳ではB1とB2 receptorsのspinal cordでの発現が著しい。

B2 receptorのKO-マウスが作出されたが、B2^{-/-}とB2^{+/-}ともに胚の発生、分化、成長は野生型と差がなく、出産後も順調に成長した。B2^{-/-}の血圧や心拍もほぼ正常、野生型のそれとに差が見られたのは、①B2^{-/-}で左心室が肥大したこと、②炎症部位での多形核白血球の集積がB2^{-/-}では著しく減少したこと、③B2^{-/-}での血管内皮細胞のリポ多糖に対する応答が低下し、かつNOの遊離が減少したことなどである。従って、B2 receptorをKOしても、循環器系はほぼ正常に近く、また受精後の胚の発生、分化、成長にも障害は殆どないという。

従来から、ガラス粉やカオリン、デキストラン硫酸など強い陰電荷をもつ固相表面で、内因系血液凝固因子のXII因子（XII）が血漿プレカリクレイン（PKA）と高分子キニノーゲン（HMWK）の共存下、自己触媒的に活性化されることは知られていたが、こうした固相表面に代わる生体物質が新たに同定された。いずれも血管内皮細胞の膜からHMWKの結合タンパク質として精製されたもので、cytokerlatin 1やgClqR, urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) などである。この内cytokerlatin 1は、Zn²⁺の存在下、内皮細胞上でHMWK-PKA複合体と結合し、XIIの活性化に働く。また、 β -amyloid proteinの凝集体が、Zn²⁺の共存下、XIIの活性化に有効であった。

B1とB2 receptorsの実体が明らかにされたこともあって、新しいキニンアンタゴニストの開発についての報告が幾つか見られた。代表的な拮抗物質のHOE140 (D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-D-Tic-Oic-Arg) を中心にした合成analogsであり、いずれもB2 receptorをターゲットにし、抗急性炎症剤の開発を目指したものである。単にbradykininの構成アミノ酸残基を一部D型に替えたり、アンギオテンシン変換酵素に対する抵抗性をもたせた第一世代のアンタゴニスト、また、bradykininの構成アミノ酸をそれらの合成analogsに替えて、一層exopeptidasesに抵抗性のあるものにした第二世代のアンタゴニスト（HOE140など）、さらにそれらのanalogsを改良して、oralに使えるようにした第三世代のアンタゴニスト（藤沢薬品のFR190997や非ペプチド性のB2 receptor拮抗薬）など、キニン拮抗剤の開

発は綿々と続いている。

以上の如く、今回のキニン国際会議では、却ってのキニン系諸因子の生化学的研究から、それらの細胞、組織レベルでの役割、特にキニンreceptorsを介しての細胞内情報伝達経路の解析やreceptorsのKO-マウスを用いた個体レベルでの研究、脳でのキニン系作用物質の果たす役割など、より高次なレベルへと流れが移りつつあった。再びキニン研究の原点に戻った感が深い。

最後に、本会議において熊本大・前田 浩教授（本特定領域研究の班員）は、同氏の「細菌プロテアーゼによるカリクレイン-キニン系活性化機構の研究」が高く評価され、日本人では初めてF. K. Frey-E. Werle賞が授与されたことをお伝えしたい。また、本会議の開催に大きく貢献された会長の鹿取 信・北里大名誉教授に組織委員の一人として深く感謝したい。なお、本会議のproceedingsは、前回のそれと同様にImmunopharmacology誌（Elsevier社）のspecial issueとして、本年5月頃刊行される予定。また、次回はUSAにおいてAllen P, Kaplan教授（South Carolina大）により開催される予定である。

（岩永貞昭：九州大学名誉教授・総括班メンバー）

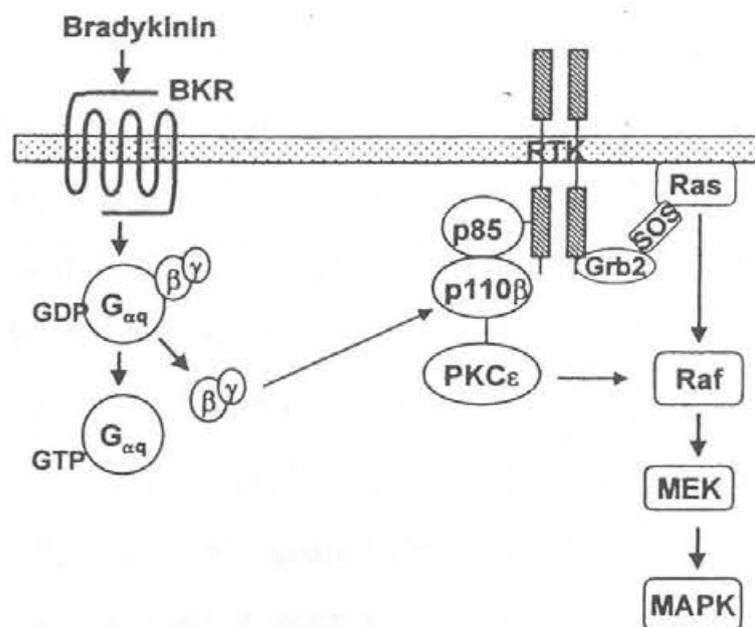


図 B2 receptorを介する細胞内伝達経路（詳しくはJ. Biol. Chem, 273 (48), 32016-32022, 1998を参照して下さい。）

3 国際シンポジウム

「ヒトの病態に關与するプロテアーゼ研究における最近の進歩」

第15回国際キニン学会ポストサテライトシンポジウム II

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

The Post Satellite Symposium II of the 15th International Conference on Kinins

[Kinin '98, Nara]

The 15th International Conference on Kinins (KININ '98 NARA、1998年10月19日～24日、奈良市)に引き続き、2つのサテライトシンポジウムが札幌市と熊本市で開催された。後者は、Hans Fritz(独)、James Travis(米)および熊本大学医学部の小川道雄教授(第二外科)、山本哲郎教授(分子病理)ならびに筆者の5名が組織委員となり、10月27日に催された標記のシンポジウムである。このシンポジウムには熊本のためだけに訪れた演者を含め、海外から12名、国内から8名のシンポジストが参加、講演を行った。

朝9時から夕方6時半まで行われた本シンポジウムは、5つのセッションからなり、それぞれ、カスパーゼとアポトーシス(セッションI)、癌におけるプロテアーゼとプロテアーゼインヒビター(セッションII)、敗血症/SIRSと細菌性プロテアーゼ(セッションIII)、ホットトピックス(セッションIV)そして治療薬としてのプロテアーゼインヒビター(セッションV)に関して熱のこもった討論が繰り広げられた。それぞれのセッションごとに発表された論文の概要を以下にまとめたい。

セッションI「カスパーゼとアポトーシス」

(1) プログラムド・セル・デスにおけるカスパーゼ (Guy Salvesen、The Burnham Institute、USA) : カスパーゼ-8および-9のサイモゲンの活性化とIAP (inhibitors of apoptosis)ファミリーに属する阻害物質によるアポトーシス開始の制御に注目した知見を発表した。

(2) in vivoにおけるアポトーシスのカスパーゼ依存性および非依存性経路 (Keisuke Kuida, Vertex Pharmaceutical Inc., USA) : カスパーゼ-9がカスパーゼ・カスケードの開始においてクリティカルであることを、そのノックアウトマウス胸腺細胞を用いて証明した。

(3) カスパーゼを介したアポトーシスにおける一酸化窒素の役割 (Tutomu Ogura, National Cancer Center Research Institute East, Japan) : 一酸化窒素(NO)が活性中心のシステイン-SHを標的として、カスパーゼ-3の活性を直接阻害することによりアポトーシスを抑制するメカニズムを中心に論じた。

セッションII「癌におけるプロテアーゼとプロテアーゼインヒビター」

(1) ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター・システム：癌の浸潤と転移に対する標的 (Viktor Magdolen, Frauenklinik der Technischen Univ. Munchen, Germany) : ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(uPA)およびその受容体(uPAR)ならびに阻害物質plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)が癌の転移、浸潤に関与しており、癌化学療法のターゲットのひとつとみなされている。演者らはuPA新規阻害剤、抗uPARモノクロナル抗体およびuPAとuPARの相互作用を阻害するペプチドの有効性について論じた。

(2) 癌細胞周囲における細胞外マトリックスの分解 (Motoharu Seiki, Inst. Med. Sci., Tokyo Univ., Japan) : IV型コラーゲンを分解するMT1-MMP (膜型MMPのひとつ)は癌細胞に発現しており、特に、invadopodiaに局在し、癌の浸潤、転移の鍵を握っていると考えられた。また、プロゼラチナーゼAは癌周辺の線維芽細胞で産生され、MT1-MMP、TIMP-2と三量体として癌細胞表面に存在した。

(3) 抗発癌物質としてのBowman-Birkインヒビター (Ann R. Kennedy, University of Pennsylvania, USA) : ダイズ由来のBowman-Birk inhibitor (BBI)は発癌予防に有効であるが、このインヒビターに結合するプロテアーゼ(44k)が単離された。また、BBIを用いた臨床治験にも言及した。

セッションIII「敗血症/SIRSと細菌性プロテアーゼ」

(1) SIRSおよび敗血症におけるライソゾーム・プロテアーゼ阻害の意義 (Heinz Neuhof, Justus-Liebig-University, Germany) : 敗血症、systemic inflammatory reaction syndrome (SIRS)において好中球、単球、肥満細胞などからライソゾーム・プロテアーゼが放出され、これが血管透過性や臓器障害に重要な役割を演じており、プロテアーゼ阻害剤が予防・治療に有効であることが動物実験で示された。

(2) 血管病変および炎症性疾患におけるセリン型エラスターゼ (John C. Cheronis, Cortech Inc., USA) : neutrophil elastase、proteinase-3、endogenous vascular elastase、endothelial cell elastaseの血管病変および炎症性疾患における役割を議論した。

(3) 歯周炎および心血管病変間の生化学的関連 (Jan Potempa, Jagiellonian Univ., Poland) : 歯周炎の主要な原因菌であるPorphyromonas gingivalisはジンジパインRを産生する。ジンジパインRはキニン/カリクレイン系を活性化し、血管透過性を亢進することにより菌の血流への侵入を促す。さらに、第X因子およびプロトロンビンを直接活性化し、また、プロテインCを活性化、これを枯渇させることにより、血管内凝固を引き起こす。

(4) 炎症部位におけるサイトカインネットワークのPorphyromonas gingivalis由来プロテイナーゼによる破綻 (James Travis, Univ. Georgia, USA) : 好中球プロテアーゼおよびジンジパインによるTNF- α およびIL-8の分解を検討したところ、TNF- α は好中球エラスターゼおよびカテプシンGには耐性だが、ジンジパインで分解された。一方、IL-8による好中球の活性化はジンジパインによるIL-8の限定分解で促進された。膜結合性のジンジパインはそのIL-8を分解した。

(5) 歯周病におけるジンジパインの機能の理解に関する最近の進展 (Kenji Yamamoto, Kyushu Univ., Japan) : R-ジンジパイン(RGP)あるいはK-ジンジパイン(KGP)のいずれかを欠損させたP. gingivalisを遺伝子工学的に作製し、これらプロテアーゼの病原因子としての役割を検討したところ、RGPはP. gingivalisによる好中球

の機能低下に、KGPは歯周ポケットの出血に重要であることが明らかになった。

セッションIV「ホットトピックス」

(1) S19リボゾームタンパクのクロスリンクダイマーによって誘導される単球の浸潤のプロテアーゼによる制御 (Tetsuro Yamamoto, Kumamoto Univ., Japan) : アポトーシスの過程で細胞から遊離するS19リボゾームタンパクの二量体(トランスグルタミナーゼによる二量体化)は単球および好中球C5a受容体に対し、それぞれアゴニストおよびアンタゴニスト作用を示した。一方、アポトーシスの後期では細胞からトリプシン様プロテアーゼが遊離し、走化因子を不活化した。

(2) クロストリジウム・コラゲナーゼ (Osamu Matsushita, Kagawa Medical Univ., Japan) : *Clostridium histolyticum*コラゲナーゼのセグメント構造について構造活性相関を検討した結果、S1およびS3はそれぞれ活性領域およびコラーゲン結合領域と考えられた。さらに、コラーゲン結合領域のドラッグ・デリバリー・システムへの応用について発表した。

(3) ヒト肥満細胞トリプターゼ : 結晶構造によって説明された機能 (Christian P. Sommerhoff, Hans Fritz, Ludwig Maximilians Universite Munchen, Germany) : 肥満細胞が関与する種々の疾患のメディエーターと考えられるトリプターゼの結晶構造を解析した。活性中心が四量体の中心孔に向いているため、高分子タンパクや内因性阻害物質がアクセスしづらいこと、ヘパリンが隣接する二分子間に結合して安定化するなど、構造から機能的な特徴が説明できた。

(4) 植物プロテイナーゼ阻害剤による第Xa因子の阻害。ペプチド基質の設計 (Claudio A. M. Sampaio, Escola Paulista de Medicina, Univ. Fed. Sao Paulo, Brazil) : マメ科の *Bauhinia unguolata* 種子由来のKunitz-typeインヒビターの活性中心ペプチドによるfactor Xaの阻害を速度論的に解析、構造活性相関を発表した。

(5) ヒト・リコンビナント・ティッシュ・ファクター・パスウェイ・インヒビターは培養ヒト内皮細胞のアポトーシスを引き起こす (Tutomu Hamuro,

Kaketsuken, Japan) : ヒト・リコンビナント・ティッシュ・ファクター・バスキュラー・インヒビター(hrTFPI)はHUVECsにタンパク合成依存的にアポトーシスを誘導することによりbFGFおよびEGFによる増殖を阻害した。

セッションV「治療薬としてのプロテアーゼインヒビター」

(1) HIVに対するプロテアーゼ阻害剤治療の新たな展開 (Akhteruzzaman Molla, Abbott Laboratories, USA) : エイズ治療薬としてのプロテアーゼ阻害剤について、耐性化などの問題点と2剤併用の有効性、第二世代のHIVプロテアーゼ阻害剤について、より有効な臨床的効果を紹介した。

(2) 骨格筋特異的カルパインp94の筋ジストロフィーにおける役割 (Koichi Suzuki, Inst. Mol. Cell. Biosci., Univ. Tokyo, Japan) : 筋特異的カルパインp94について、筋ジストロフィーに伴うポイントミューテーションの発現型を検討したところ、フォドリン結合能の欠如が病態と強く相関した。p94の不活化が全身性のカルパインの活性を高めて筋萎縮をもたらすと考えられた。

(3) カテプシンが関与する疾患の治療薬としての新しいカテプシン特異的阻害剤の開発 (Nobuhiko Katsunuma, Tokushima Bunri Univ., Japan) : X線結晶解析とコンピューターグラフィックスを用いて、すべてのカテプシン(B, L, S, K, C, H)にそれぞれ特異的な阻害剤をデザイン・合成することに成功した。これらを用いた結果、LとKは骨吸収に、BとSは抗原のプロセッシングとインバリアント鎖の消化に、Sはカスパーゼ-3の活性化に、SおよびLはRXRの分解にそれぞれ関与することが明らかとなった。また、ビタミンB6がカテプシンB、Lを阻害することも見出された。

(4) 敗血症およびSIRSに対するアンチトロンビンIII治療：作用機序の新局面 (Hans Fritz, Ludwig Maximilians Universite Munchen, Germany) : アンチトロンビンIII (AT III) の敗血症およびSIRSに対する臨床的な効果が限られたものであったことに関して、いくつかの理由を挙げ、さらに、AT IIIとヒドロコルチゾンの併用による効果増強の可能性を示唆した。

以上が主な内容であるが、濃厚な内容に加え、参加者数約百名で比較的少人数のため親密なディスカッションができた。また、懇親会やその後の夜の部も含め（こちらは若い人を中心に）大いに盛り上がった。

（前田 浩：熊本大学医学部微生物学教室）

4 第21回日本分子生物学会ワークショップ

「蛋白質のプロセッシングと局在化」

第21回日本分子生物学会が平成10年12月16日から19日の4日間、横浜市内のパシフィコ横浜にて開催された。シンポジウム、ポスター、ワークショップあわせて約3000もの演題が集まり、研究者たちによる活発な討論が繰り広げられた。その幾つかのワークショップのうち本稿は”蛋白質のプロセッシングと局在化”（世話人/座長：田中啓二先生（都臨床研）、市山新先生（浜松医大））のセッションでの発表について報告する。当日、発表会場には多くの聴衆が集まり、立ち見どころか会場に入り切れないほどの大盛況であった。

はじめに九大・伊藤先生は、MPP（ミトコンドリアプロセッシングペプチダーゼ）による基質蛋白質の特異的認識部位ならびにプロセッシング機構について、変異前駆体や合成ペプチドを用いて最新の知見を報告された。ミトコンドリア蛋白質は、N末端に局在化シグナルを含んだ前駆体として合成される。このシグナルによってミトコンドリアに輸送された前駆体蛋白質は、プロテアーゼによるプロセッシングを受け、更に分子シャペロン、ATP依存性プロテアーゼ等の働きによりその機能を果たせる構造をとる。MPPは、このプロセッシング過程において100種類以上のモチーフのない蛋白質を特異的に認識するエンドペプチダーゼであり、これらの規則性の解明は大変興味深いものと思われる。ところで、ペルオキシソームはカタラーゼおよび一群の酸化酵素を含む細胞小器官(オルガネラ)であり、ほとんどの真核生物に広く存在する。このオルガネラの形成異常はZellweger症などの原因となり、ま

たその局在酵素欠損は副腎白質ジストロフィーをはじめ様々な先天性ペルオキシソーム病を発症させることが報告されている。九大・藤木先生は、ペルオキシソーム病因遺伝子およびペルオキシソームの形成機構を解明するために、ペルオキシソーム欠損性CHO細胞の相補性解析をされ、新たな相補性群に属する2種の変異細胞(ZP124とZP126)を分離し、その解析について報告された。さらに浜松医大・小田先生は、SPT(セリン・ピルビン酸アミノ転移酵素)の局在化機構とそのプロセッシングについて報告された。SPTはセリン代謝に関わる酵素で、先天性代謝異常症の1つである原発性高尿酸血症I型(PH-1)の原因蛋白質でもある。このSPTには、ミトコンドリア標的シグナル(MTS)をもつミトコンドリアSPTとペルオキシソームSPTの2つタイプが存在する。前者はMTSによってミトコンドリアの認識、膜通過が可能になり、ミトコンドリアに輸送されたSPTにおいては、その高次構造形成にMTSのプロセッシングが必要であることを示された。

さて、ユビキチンによる膜蛋白質の修飾がプロテアソームの標的になることは、リンパ球ホーミングレセプターをはじめ血小板由来増殖因子レセプター(PDGFR)、EGFレセプターなどにおいて既知の現象である。しかしながら、近年酵母におけるある種の膜蛋白質のユビキチン化がプロテアソームによる分解シグナルでなく、エンドサイトーシスやリソソームへの局在化シグナルとなっているという報告もあり、ユビキチン分子が新たな機能を果たしている可能性が示唆されてきた。今回、千葉大・中津先生は、ユビキチン遺伝子を融合させたインバリアン鎖キメラ蛋白質を用いた系により、ユビキチンに存在するジロイシン配列がエンドサイトーシスの分子機構に関与していることを報告された。今後、更に本システムによってエンドサイトーシスをうけるターゲットの同定とその分子機構の解明が期待される。また、ユビキチンによる修飾反応は、これを解離させる脱ユビキチン化酵素によって可逆的に行われることが知られている。奈良先端大・山本先生は、*Drosophila*の脱ユビキチン化酵素Fat facetsとホモロジーの高いFamについて報告された。Famは低分子量GTP結合蛋白質Rasの標的蛋白質AF-6の結合蛋白質として同定された。脱ユビキチン化

酵素であるFamがAF-6のユビキチン化を阻害することに加え、 β -cateninと結合すること、さらにその局在が細胞間接着部位であることを示し、Famが細胞接着や細胞間認識を制御する可能性を示唆された。

ところで、ここ近年ユビキチン様因子の急速な進展には驚くばかりである。今回のワークショップでも、分裂酵母のSUMO1、NEDD8、出芽酵母のAPG10の3つ修飾因子についての興味深い知見が報告された。SUMO1 (small ubiquitin related modifier-1) の修飾として最も知られているのは、核輸送関連因子RanGAP1への修飾である。SUMO1による修飾をうけたことによって、RanGAP1は核膜孔へ局在化される。さらに最近では、SUMO1がI κ B α のユビキチン結合部位を修飾することによってI κ B α を安定化させ、結果としてNF κ Bの活性を抑制するという報告もあり本システムの重要性を再認識させられた。島根大・田中先生は、分裂酵母のSUMO1ホモログであるPmt3を解析された結果、この修飾経路に関与するE1がRad31とFub2よりなるヘテロ複合体でありE2がHus5であることを明らかにされた。更にPmt3変異株においては、染色体分配の異常やテロメアの伸長に加え、減数分裂と孢子形成過程にも欠損を示すことを見出された。これらの知見よりSUMO1の更なる機能の存在が予想され、今後の展開が楽しみである。ERATO加藤たん白生態・逢坂先生は、ウサギ網状赤血球ライセートの系を用いて、ユビキチン様因子であるNEDD8 ligation systemを解明された。その結果、E1はAPP-BP1とhUba3からなるヘテロダイマーよりなり、E2がhUba12であること、さらにNEDD8により修飾をうけるターゲットがSCF (Skp1-Cul1-F-box) 複合体成分であるcullin family すべてであることを同定された。この酵母から高等動物まで保存された新たな修飾システムの生物学的意義の解明は非常に興味深い。基生研・水島先生は、酵母のオートファジーに必須蛋白質 (Apg) を14個単離、分析された結果、そのうちApg12p、Apg5p、Apg7p、およびApg10pがユビキチン系とよく似た新規の蛋白質システムを構成していることが明らかにされた。Apg12pは、その構造においてユビキチンと相同性を持たないが、ユビキチン様修飾分子としてApg7pとApg10pを介してATP依存的にApg5pと共有結合する。このApg12p

の修飾がオートファジーにおいては必須であり、更にこのシステムが動物細胞にも存在することから、進化的に保存されたシステムであることも言及された。ところで、このSCF複合体が介在するユビキチン化反応において、その基質特異性はF-box蛋白質が担っているようである。九大・高山先生は、マウスのSCF複合体を構成しているSkp1、Cullin1及びF-box蛋白質であるFWD1 (β Trep) とFWD2のcDNAを同定された。さらに、Two hybrid法や昆虫細胞内での共発現系によって、Skp1がFWD1、cullin1と複合体を形成していることを示された。また、FWD1がリン酸化型I κ B α のユビキチン化におけるE3リガーゼ (SCF) 成分であることまでを証明された。おそらく、FWD2を含むSCF複合体構成因子やそのターゲット蛋白質の解明もまた、この分野に大きな貢献をするに違いないと思われる。

以上、今回の研究発表はどれも生物学的に重要な役割を果たしているプロテオリスに関わるもので、非常に活発な分野となってきている。従って、一年後の学会ではどのような展開を見ることが出来るか楽しみである。

(棚橋伸行・堀智子：東京都臨床医学総合研究所・CREST研究員)

(5) ミニレビュー

1. オートファジーに必須なユビキチン化様蛋白質結合システム

オートファジーは真核細胞に普遍的な細胞内の蛋白質分解システムである。ユビキチン-プロテアソーム系が選択的蛋白分解を担っているのに対し、オートファジーは主に非特異的なバルクな分解システムである。その過程は、細胞質の一部を取り囲んだオートファゴソームがリソソーム・液胞と融合するというものである。これは蛋白質の分解のみではなく、オルガネラ、RNA、脂質、糖質の分解にも関わっている。オートファジーは特に栄養飢餓条件下で顕著に誘導される。自己の構成成分を分解して栄養源として再利用していると考えられる。酵母では、オートファジーは細胞の栄養増殖には必要ないが、飢餓条件下での生存維持に必須である。ヒトでは、ホルモンなどによる複雑な制御もうけているらしく、飢餓応答以外にも、細胞内高分子の通常のturnoverなど様々な局面で重要な働きをしていると信じられている。さらに、酵母ではオートファジーは孢子形成にも必須であることから、細胞の分化やリモデリングにも重要であろうと思われる。

オートファジーには、その誘導（飢餓などの栄養状態の認識など）、シグナル伝達、オートファゴソームの形成、リソソームとの融合、分解といった多くのステップがあるが、これまでそのメカニズムは、特に分子レベルでは、ほとんど不明とってよかった。私の所属する研究室では、出芽酵母にも動物細胞と同様のオートファジーの機構があることを見出して以来、酵母をモデル系としてオートファジーの分子機構を探究してきた（1、2）。今回は、その中に共有結合によるユニークな蛋白質修飾システムが存在することを発見したので紹介する。

I. 酵母オートファジーに必須な蛋白質

私たちの研究室では変異株のスクリーニング（3）やtwo-hybrid法などによって、

これまでに16種類のオートファジー不能株(*apg*)を単離してきた。これらはすべて、飢餓条件下での生存率の低下や、胞子形成不能といった共通の表現型をもち、また液胞機能や分泌、エンドサイトーシスには異常はみられず、おそらくオートファゴソーム形成段階以前に特異的な異常をもつものと考えている。現在までに14個のオートファジーに必須な遺伝子が明らかとなっている。それらは*APG6* (*VPS30*と同一)を除いてすべて新規の遺伝子であり、このことは、オートファジーがこれまでの細胞生物学にとっていかに手がつけられていなかったかを如実に物語っている。*Apg1p*は蛋白質キナーゼ(4)であり、*Apg13p*(5)と複合体を、*Apg6p*は*Apg14p*と複合体を形成している(6)。*Apg8p*はオートファゴソームに局在している(桐浴ら、submitted)。そのほかの*Apg*蛋白質もその機能や相互関係が明らかになりつつあり、いまオートファジーの研究はまさに急速に展開しようとしている。

II. 酵母オートファジーに必須な新しい蛋白質結合システム

オートファジーに必須な蛋白質のひとつ*Apg12p*は、既知の蛋白質には相同性のない186アミノ酸からなる蛋白質である。HAエピトープでタギングした*Apg12p*を発現させてウエスタンブロットを行うと、推定された約31kDの他に、はるかに大きい約70kDのバンドも検出された(7)。残念なことに、しばらくの間この「70kDバンド」は私を含め研究室のみんなの関心を集めず、ほとんど「無視」されていた。しかし、いくつかの理由から、突如この「70kDバンド」が注目されるようになった。この「70kDバンド」に特異的に結合する別の蛋白質が見つかったこと(これに関しては本稿では省略する)、「70kDバンド」は*apg5*、*apg7*、*apg10*の3つのオートファジー変異株では全く欠落していたことなどである。急速解析を進めた結果、「70kDバンド」は*Apg12p*と*Apg5p*の1:1結合体であることが判明した(7)。

*Mutagenesis*の実験の結果、この結合は*Apg12p*のC末端のグリシンをひとつ欠くだけでもおこらなくなるため、このグリシン残基を介した結合であると推測された(実際は逆で、C末端がグリシンであることを見たボスの大隅がなんとこのことを

予言したのであった)。ユビキチンがC末端グリシンを介して標的蛋白のリジンに結合することがただちに思い出され、私たちはApg12pのC末端グリシンもApg5pのいずれかのリジン残基にイソペプチド結合しているのではないかと考えた。Apg5pは294アミノ酸からなる蛋白質で、実に19個ものリジンがあった。少し躊躇したが、そのすべてをアルギニンに置換してみることにした。その結果、ほぼ中央の149番目のリジンが特異的にApg12pの結合に必要であることがわかり、Apg12pとここでイソペプチド結合していることが示唆された。また、Apg12pのC末端グリシンを欠いた場合、あるいはApg5pの149番目のリジンを置換した場合、いずれも結合がおこらないと同時にオートファジーの進行も不能となった。よって、Apg5pとApg12pが結合することがオートファジーに必須であると結論された。

さて、*apg7*、*apg10*変異株でもこの結合が全くみられなかったので、それらの遺伝子は結合に必要な酵素群をコードしている可能性が考えられた。そして事実、*APG7*遺伝子はユビキチンE1酵素に部分的に(ATP結合部位と活性中心システインを含む(谷田ら、submitted)) 相同性のある蛋白質をコードしていることが明らかとなった。Apg10pは、アミノ酸配列からは十分な情報が得られなかったが、生化学的実験の結果からE2(あるいはE3)様酵素である可能性を考えている(新谷ら、未発表データ)。Apg5pとApg12pの結合はin vitroでATP依存的に再現された。以上のことから、一連の反応はユビキチン化と非常によく似た修飾システムであると考えられる。

III. ヒトApg12システムの解析

次に私たちは、ESTデータベースの検索と5'RACE法を用いて、ヒトのApg12ホモログ(hApg12)をクローニングした(8)。その全長は140アミノ酸と酵母より小さいが、酵母Apg12pと27%identity, 48% similarityを有している。とくにApg5との結合に必要なC末端領域は相同性が高い。HAでタグgingしたhApg12をCOS細胞で発現させると、酵母と同様にmonomerの他に約65kDの高分子量のバンドが検出された。このバ

ンドはヒトApg5ホモログ(hApg5)との結合体を表していることが判明した(8)。また、この結合は酵母と同様に、hApg12の末端グリシンとhApg5の130番目のリジンとの間のイソペプチド結合であることもわかった。このように、Apg12結合システムはヒトでも保存されていることから、ひろく真核生物に存在する普遍的で重要なものであると考えられる。

hApg5は、実は既にHammondらによって「apoptosis specific protein (ASP)」としてクローニングされている(9)。彼らは、c-junに対するポリクローナル抗体を用いて実験をしている過程で、この抗体に反応する未知の蛋白質(いわゆるnon-spe)がアポトーシスの結果あるいは後期に出現、増加することを偶然見出し、それをクローニングしたところApg5pホモログであった。アポトーシスが細胞自体のturnoverに、オートファジーが細胞内高分子のturnoverに関わっていると考えると、高等真核生物の生体内での恒常性という点で、誘導因子やメカニズムに共通するものがあれば興味深い。あるいはアポトーシスとオートファジーの際に見られるダイナミックな膜現象に共通の分子機構があるのかも知れない。しかし、彼らの見ている蛋白質ASP(おそらくはApg12との結合体)と私たちの結合体とは分子量にかなりの差があること、私たちはアポトーシスによるApg5の発現誘導を追試できなかったこと(さらに、同じカタログ番号の抗c-jun抗体を買ったのに、Apg5には全く反応しなかった)などから、このシステムがアポトーシスに関わっているかどうかは、今後慎重に検討することが必要であると考えている。

IV. 新規の「modifier」Apg12

以上述べてきたような蛋白質結合システムはユビキチンの他、最近SUMO-1、Smt3p、Nedd8、Rub1p、UCRPなどに関しても報告され、ひとつのトピックスになりつつある(ふろておりしす第8号の逢坂文男氏のトピックスを参照されたい)。これらは、すべてユビキチンと相同性をもっている。それに対して、酵母およびヒトのApg12は、ユビキチンとは関連のない初めてのmodifier蛋白である。その他、様々

な点においてApg12は。ユビキチンやユビキチン類似蛋白とは性格を異にする分子である。たとえば、酵母では186アミノ酸、ヒトでは140アミノ酸とユビキチンよりかなり大きいこと、C末端のプロセッシングを必要とせず初めからグリシン末端が露出していること、ユビキチンなどの終末がGly-Glyであるのに、Apg12pは一個のGlyであること、現在わかっている限りでは標的蛋白質がApg5のみであること、などである。このようなことから、Apg12は全く新しいタイプのmodifier蛋白質であるといえる。

V. おわりに

この結合システムがオートファジーのどのステップで働いているかは明らかではない。選択的蛋白質分解を担うユビキチンシステムと良く似たシステムが、バルクな分解系であるオートファジーの中にも存在しているのは単なる偶然であろうか？

この結合は可逆的か（すなわち脱ユビキチン酵素に相当するものはあるか）？ わざわざATPを消費してまで複雑な反応をしないといけない理由は？ 酵母のショ糖密度勾配法のデータでは、Apg12pの細胞内局在が変化することが判明している。これが膜上の出来事なのか、なにか大きな蛋白質複合体が関与しているかは現在不明である。オートファジーがダイナミックな膜動態を伴う現象であることを考えると、このシステムはオートファゴソーム形成などの過程に関与していることが期待されるが、これは今後の課題である。

追記：本稿は、基礎生物学研究所の大隅良典研究室と、帝京科学大学の太田萬里子研究室との共同研究の結果である。 (基礎生物学研究所 水島昇)

文献

- 1) Takeshige, K. et al. : J. Cell. Biol. 119, 310-311 (1992)
- 2) Baba, M. et al. : J. Cell Biol. 124, 903-913 (1994)
- 3) Tsukada, M. and Ohsumi, Y. : FEBS Lett. 333, 169-174 (1993)
- 4) Matsuura, A. et al. : Gene. 192, 245-250 (1997)
- 5) Funakoshi, T. et al. : Gene. 192, 207-213 (1997)
- 6) Kametaka, S. et al. : J. Biol. Chem. 273, 22284-22291 (1998)

- 7) Mizushima, N. et al. : Nature. 395, 395-398(1998)
- 8) Mizushima, N. et al. : J. Biol. Chem. 273, 33889-33892 (1998)
- 9) Hammond, E. M. et al. : FEBS Lett. 425, 391-395 (1998)

2. SCF複合体によるI κ B α の分解制御

はじめに

サイトカインは、免疫系細胞を含む多種の細胞の増殖及び分化を誘導することが知られている。例えば、T細胞におけるインターロイキン2 (IL-2) や、マクロファージにおけるGM-CSFやG-CSFが、これに相当する。また、ある場合は炎症や感染に対抗する急性期反応を誘導することもある。これらの細胞における反応のためには、共通の転写因子NF- κ Bの活性化によるサイトカインなどの分子の発現が重要となる。

NF- κ Bは、1986年に免疫グロブリンの κ 軽鎖遺伝子のエンハンサー領域に結合する転写因子として同定され、免疫系細胞を含むほとんどの細胞系列においても発現している[文献1]。NF- κ Bが標的とする遺伝子は、サイトカイン、接着分子、転写因子などの多岐にわたっていることが報告されている(図1)。

また、NF- κ Bの活性誘導は様々な因子によってもたらされることが知られている(図2)。IL-1や腫瘍壊死因子(TNF)などの刺激により、NF- κ Bに結合し抑制をかけているI κ Bがリン酸化され、それに伴いユビキチン化(Ub化)を受け、それが目印となりプロテアソームによる分解を受け、NF- κ Bの核移行シグナル(NLS)が暴露され、NF- κ Bは核内に移行し、5'-GGGGYNNCCY-3'という配列を認識し転写活性を発揮する[文献2](図3)。

現在、この分野において、分子レベルでI κ Bが如何なる機序でリン酸化され分解されNF- κ Bが活性化されるかという問題が注目されているので、紹介させていただきます。

1. NF- κ B/I κ Bファミリー

NF- κ Bはrelファミリーに属するホモもしくはヘテロダイマーからなる。それぞれ

れのメンバーはrel homology domain (RHD) と呼ばれる300アミノ酸からなる領域を含む。そして、このRHDはDNA結合、2量体形成、及びI κ Bとの結合に参与する(図4)。現在、NF- κ Bを構成する分子としては、哺乳類において、RelA (p65)、RelB、c-Rel、NF- κ B1 (p105/p50)、NF- κ B2 (p100/p52) の5種類が報告されている。また、ダイマーの組み合わせにより、転写活性が存在 (p50/p65、p50/c-rel、p65/p65、p65/c-rel)するだけでなく、抑制的効果を示すものもある (p50/p50、p52/p52)。NF- κ B1 (p105/p50)、NF- κ B2 (p100/p52) に関しては、他のメンバーとは異なった修飾を受ける。p105とp100は前駆体として翻訳され、ユビキチン-プロテアソーム系により分解 (プロセッシング) を受け、それぞれがp50とp52という成熟蛋白となる。適当な刺激がない状態では、NF- κ BはI κ Bと結合し、NLSがマスクされた構造をとり、不活性化型として細胞質に局在し、核内への移行が阻止されている。

I κ Bは、NF- κ Bと同様に、ファミリーを形成し、哺乳類ではI κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ 、I κ B γ 、Bcl-3の5種類が報告されている(図4)。これらの分子はアンキリンリピートと呼ばれる約30アミノ酸からなるドメインが5~7個くり返した構造をとっており、この領域がNF- κ BのRHDと結合し、NF- κ Bの核移行を抑制している。また、N末端近くには分解シグナルに重要なリン酸化部位が存在し、I κ B α 、I κ B β 、Bcl-3においては、C末端に蛋白の寿命に関与すると考えられているPEST配列が存在する。

I κ B α が、特に精力的に研究され、その挙動が多方面から明らかにされている。I κ B α は、37kDaの分子量で、N末端の32及び36番目のセリンのリン酸化が、分解調節に関与していると報告されている。また、蛋白レベルでは、I κ B α はNF- κ Bの抑制を行っているが、逆に、転写レベルでは、NF- κ BはI κ B α を発現させる転写因子として働き、再び、I κ B α が発現されるというautoregulatory feedback loopが形成されている。

I κ B β は、45kDaの分子量で、I κ B α と同じタイプのNF- κ Bダイマーを認識し、抑制する。しかし、I κ B α とは入力される刺激に対する反応の閾値の違いや、分解を含めた発現調節の違いが認められる。上述のように、I κ B α は分解後、再びNF- κ Bの作

用により合成が行われるが、 $I\kappa B\beta$ はNF- κB 活性化シグナルがなくなるまで、発現が低く保たれている。 $I\kappa B\beta$ の発現制御に関しては未だ不明な点が多い。

$I\kappa B\epsilon$ は、yeast two-hybrid法により、p52に結合する分子量45kDaの分子として同定された。しかし、*in vivo*においてp50とp52に対して結合はなく、p65:p65もしくはp65:c-Rel複合体との会合が認められた。現在までのところ、 $I\kappa B\epsilon$ は、IL-8などの特定の遺伝子発現を調節するRel系の抑制分子と考えられている。

Bcl-3は、慢性Bリンパ球性白血病において染色体転座 t(14:19)から同定された $I\kappa B$ ファミリーである、構造的にはアンキリンリピートを7回くり返している。Bcl-3は、他の $I\kappa B$ ファミリーとは異なり、細胞質ではなく核内に局在し、p50もしくはp52のホモダイマーに特異的に結合している。転写抑制的効果を示すp50もしくはp52のホモダイマーに特異的に結合して、その効果を抑制するのではなく、p52:Bcl-3複合体は直接、 κB 部位に結合して転写活性化を起こす。

$I\kappa B\gamma$ は、リンパ球系細胞のみに発現する分子量70kDaの蛋白であり、アミノ酸配列はp105のC末端側と同一であり、p105と同遺伝子であるが、異なったプロモーターによって転写された産物である。この遺伝子産物は未だ不明な部分が多く残されているが、現在までのところ、p50もしくはp52のホモダイマーに特異的に結合し、抑制をかけていることがわかっている。

2. $I\kappa B$ キナーゼ (図5)

近年、 $I\kappa B\alpha$ のユビキチン化及びそれに伴う分解のシグナルに重要と考えられるN末端の32及び36番目のセリンをリン酸化するキナーゼの同定において、壮烈な競争が展開された。以前は、PKC- ζ 、PKA、raf-1、double-stranded RNA-dependent kinase (PKR)、p90-ribosomal S6 protein kinase (p90-RSK) が候補としてあげられていた。しかし、現実的には、 $I\kappa B\alpha$ の32及び36番目のセリンを特異的にリン酸化する活性を頼りに、生化学的手法により同定された。1997年になり、F.S. Lee, らは $I\kappa B$ キナーゼ (IKK) を部分精製し、TNFで刺激した細胞抽出液中に分子量約700kDaの複合体

が、I κ B α の32及び36番目のセリンをリン酸化する活性を持つことを見出した[文献3]。さらにそれは、MEKK1がその上流でおそらく関与していることを報告している。実際には、J. A. DiDonato, らにより、TNFで刺激したHeLa細胞より、野生型のI κ B α のリン酸化はするが、32及び36番目のセリンをスレオニンに置換したI κ B α をリン酸化しないことを指標に、85kDaと87kDaのキナーゼ活性を有する新種の分子 (IKK- α 、IKK- β) を同定した[文献4]。さらに85kDaの分子のcDNA配列を決定し検索すると、以前にTNF受容体の下流に位置するキナーゼであるNIKをbaitとして、yeast two-hybrid法で同定されていた conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase(CHUK) と同一であることが判明した[文献5]。また、F. Mercurio, らも、MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) に対する抗体でMKP-1と共沈する分画から、I κ B α をリン酸化するキナーゼとして85kDaと87kDaの分子 (IKK-1=IKK- α 、IKK-2=IKK- β) を分離し、cDNAを決定した[文献6]。この2つのIKKは、蛋白構造的には、N末端側にキナーゼドメイン、中央に2量体形成のためのロイシンジッパー、C末端側には helix-loop-helixドメインを有するセリン/スレオニンキナーゼとしての構造をとっている (図5)。

HAタグをつけたIKK- α をHeLa細胞に発現させ、抗HA抗体で免疫沈降し、キナーゼ活性を測ると、TNFやIL-1で細胞を刺激した場合に、I κ B α の32及び36番目のセリンを特異的にリン酸化する活性が認められた。基質特異性に関しては、IKK- α 、IKK- β ともにI κ B α の32及び36番目のセリンの両方をリン酸化できるが、IKK- α は弱いながらもI κ B β の19及び23番目のセリンの両方をリン酸化でき、IKK- β はI κ B β の23番目のセリンのみをリン酸化することができる。また、IKKの活性化はprotein phosphatase 2A (PP2A) により抑制され、フォスファターゼ阻害剤により活性化されるので、IKK自体、上流のキナーゼもしくはフォスファターゼにより制御されているらしい。

S. Yamaoka, らは、HTLV-1のTaxでトランスフォームしNF- κ Bの活性化が起こらない細胞株を樹立し、NF- κ Bの活性化を指標に expression cloning を行い、NF- κ B

Essential Modulator (NEMO) という分子を同定した[文献7]。NEMOは、構造的にはロイシンジッパーを有し、ホモダイマーを形成し、さらにIKK- β と結合することができる。一方、D.M. Rothwarf,らは、抗IKK- α 抗体で共沈する分子としてIKK- γ (=NEMO) を同定し、機能的にも、IKK- γ の発現を低下させた場合、NF- κ Bの活性化が抑制されることを見い出している[文献8]。

また、L. Cohen,らは、IL-1で刺激した293細胞から、I κ B α を担体としたアフアニティークロマトグラフィーにより、NIK、IKK- α/β 、I κ B α 、RelAそして新規の分子としてIKK-complex-associated protein (IKAP) を同定した[文献9]。IKAPは、構造的にはN末端側に5回のWD40リピートドメインを有し、NIK、IKK- α/β らと複合体を形成するためのscaffold蛋白の役割を果たしているらしい。実際、IKK複合体はゲル濾過による解析により分子量700~900kDaとされているので、これらの分子以外にもこの複合体にメンバーが存在していることは考えられるが、おそらく中心となるキナーゼ活性を有する分子はIKK- α とIKK- β と思われる。

3. I κ Bユビキチンリガーゼ

IKKの発見によりI κ Bがいかにしてリン酸化されるかの機序は明らかにされつつあるが、次の問題として、リン酸化という目印により、どのようにユビキチン化され分解されるかが、焦点となっている。そのbreak-throughは他の分野の2つの研究報告がヒントとなった。一つめとして、H. Aberle,らやK. Orford,らは、Wnt/Winglessシグナルにおいて重要となる β -cateninがDSG ψ xSというモチーフの2箇所のセリンのリン酸化が β -cateninのユビキチン化、さらにはその分解に重要であり、このモチーフはI κ Bにおいても、その分解に関与する重要な配列部分と、非常に似ていることを報告している[文献10、11]。二つめとして、ショウジョウバエの遺伝学の研究において、F-boxとWD40リピートと有する*slimb*という遺伝子の破壊により、ショウジョウバエの β -cateninホモログであるArmadilloが安定化する表現系が現れた。これらの状況証拠より、もし哺乳類にも*slimb*ホモログが存在した場合、そ

の分子はI κ Bの分解もしくは安定化に関与するのではないかと考え、我々はマウスにおいて相同性を有するcDNAを同定し、F-boxとWD40リピートをもつF-box蛋白ということから、FWD1と名付けた[文献13]。細胞にFWD1、I κ B α 、IKK- β を様々な組み合わせでトランスフェクトし、それらの結合を調べたところ、IKK- β が存在する状況下でFWD1とI κ B α の結合が認められた。さらに、この結合はキナーゼ活性のないIKK- β (K44M) では認められない。また、32及び36番目のセリンをアラニンに変換したI κ B α でも結合は認められない。さらに、FWD1と結合しているI κ B α は32番目のセリンがリン酸化された型であることが判明した。よって、FWD1とI κ B α の結合は、IKKのキナーゼ活性依存的な、32及び36番目のセリンのリン酸化が重要である。IKKのキナーゼ活性の存在下において、FWD1は内因性のI κ B α やそれと複合体を形成しているRelAとも結合していることがわかった。

F-box蛋白としては、まず酵母の遺伝学的研究より、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase:cdk)の抑制分子 (CKI) であるSic1をユビキチン化しプロテアソーム依存性に分解する、SCF複合体の基質受容体としてのCDC4が発見された。SCFとは、その構成要素であるSkp1、Cdc53/Cullin、F-box蛋白からつくられていることから命名された[文献14、15]。実際に、我々がクローニングしたFWD1も、マウスのSkp1やCul-1との複合体形成が認められている。しかし、酵母の研究においては、様々なF-box蛋白と基質の関係が示唆されていたが、哺乳類においては、F-boxとユビキチン化される基質との関係は明らかではなかった。

次に我々は、FWD1が果たしてI κ B α をユビキチン化させるためのkey enzymeとなりうるかを検索した。結合を調べた実験と同様に、細胞にFWD1、I κ B α 、IKK- β を様々な組み合わせでトランスフェクトし、そのI κ B α のユビキチン化の量を調べたところ、IKK- β の存在下でFWD1によるI κ B α のユビキチン化の上昇が起こり、I κ B α の存在量 (発現量) の減少 (おそらく分解の亢進による) が認められた。32及び36番目のセリンをアラニンに変換したI κ B α に対しては、IKK- β とFWD1の双方が存在しても、ユビキチン化の上昇は認められない。また、FWD1のF-boxを欠損させた

cDNA (FWD1ΔF) を共発現させた場合においても、IκBαのユビキチン化の上昇が認められない。さらに、同様の結果は、*in vitro*のユビキチン化のアッセイにおいても観測された。また、IκBαの細胞内における半減期を調べたところ、IKK-βとFWD1の双方を共発現させた場合、早い分解が観測され、FWD1ΔFを共発現させた場合、分解の遅延が認められた。さらに、IKK-βとFWD1の双方が共発現した細胞におけるRelAの細胞内分布を調べたところ、核移行の亢進が認められた。

以上の結果より、IκBαは、IKK-βによりリン酸化された32及び36番目のセリンが目印となり、FWD1をリクルートし、SCF^{FWD1}複合体によりユビキチン化され、プロテアソームによる分解が遂行され、最終的には、NF-κBが核移行することが判明した(図6)。

また、A. Yaron,らはリン酸化IκBαを担体としたアファニティークロマトグラフィーによりpIκBα-E3 receptor subunit (E3RS^{IκBα}) を分離し、リン酸化IκBαに対するユビキチンリガーゼとしての活性を証明している。実際、E3RS^{IκBα}は、我々が同定したFWD1のヒトホモログであった[文献16]。F-boxを欠損させたE3RS^{IκBα}は、NF-κBの活性化を抑制し、ドミナントネガティブな効果を発揮し、実際に生理的な意味での証明をしている。

FWD1の*Xenopus*ホモログであるβTrCP (β-transduin repeat containing protein) は、*S. cerevisiae*のcdc15の温度感受性欠損株を使用し、ラットのcDNA発現ライブラリーの発現によりレスキューされるアッセイにより同定されたので、cdc15に対して抑制的に働く分子の分解に関与しているかもしれないが、現在のところ、不明である[文献17]。

また、最近、ヒトβTrCP/FWD1はHIV1のVpu蛋白に結合する分子として同定され、βTrCP/FWD1は、Vpu自体にではなく、Vpuと結合してCD4の分解に関与することが報告されている。F-boxを欠損させたβTrCPによりCD4の分解の遅延が観測されている[文献18]。

さらに、IκBαの分解制御に関して、SUMO-1というユビキチン様分子による修

飾が、ユビキチン化による分解を抑制していることが報告されている[文献19]。SUMO-1-activating enzymeとUbcH9という酵素により、SUMO-1は、本来I κ B α がユビキチン化される部位である21番目のリジンにイソペプチド結合し、リン酸化によるユビキチン介在性分解に対して、アンタゴニスト的に働くことが示されている。

終わりに

現在、我々は、I κ B α 以外のI κ B β 、I κ B ϵ などの分解制御にもFWD1が関与しているのではないかと考え、実験中であるが、リン酸化やユビキチン化の制御に違いがあることを期待している。また、哺乳類における β -cateninのユビキチン化及び分解に関しても、Wntシグナルに関与する様々な役者たちの制御により、リン酸化が起こり、それに続いて、ユビキチン化が起こることを見い出している。今後、DSG ψ xSというモチーフを有する如何なる分子がFWD1によりユビキチン化されるかが、さらなる課題と考えられる。

文献

1. Sen, R., and Baltimore, D.: Cell 46: 705-716, 1986
2. DiDonato, J.A. et al.: Mol. Cell. Biol. 16: 1295-1304, 1996
3. Lee, F.S. et al.: Cell 88: 213-222, 1997
4. DiDonato, J.A. et al.: Nature 388: 548-554, 1997
5. Regier, C.H. et al.: Cell 90: 373-383, 1997
6. Mercurio, F. et al.: Science 278: 860-866, 1997
7. Yamaoka, S. et al.: Cell 93: 1231-1240, 1998
8. Rothwarf, D.M. et al.: Nature 395: 297-300, 1998
9. Cohen, L. et al.: Nature 395: 292-296, 1998
10. Aberle, H. et al.: EMBO J. 16: 3797-3804, 1997
11. Orford, K. et al.: J. Biol. Chem. 272: 24735-24738, 1997
12. Jiang, J., and Stuhl, G.: Nature 391: 493-496, 1998
13. Hatakeyama, S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1999, in press
14. Skowyra, D. et al.: Cell 91: 209-219, 1997
15. Feldman, R.M.R. et al.: Cell 91: 221-230, 1997
16. Yaron, A. et al.: Nature 396: 590-594, 1998

17. Spevak, W. et al.: Mol. Cell. Biol.:4953-4966, 1993
 18. Margottin, F. et al. Mol. Cell 1: 565-574, 1998
 19. Desterro, J.M.P. et al. Mol. Cell 2: 233-239, 1998

(畠山鎮次 : 九州大学生体防御医学研究所)

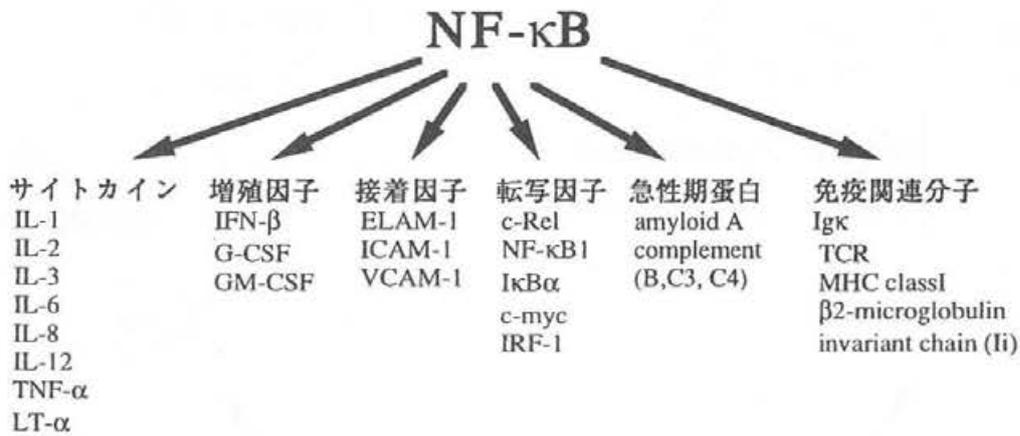


図1. NF-κBが標的とする遺伝子

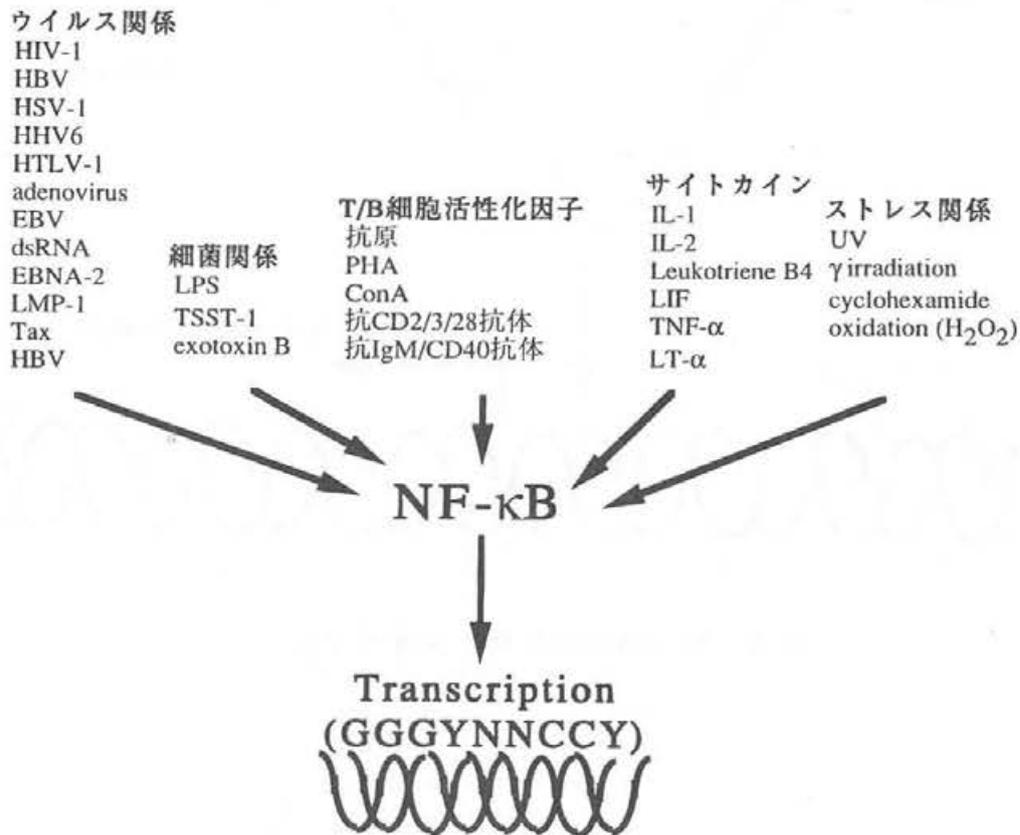


図2. NF-κBを誘導する因子

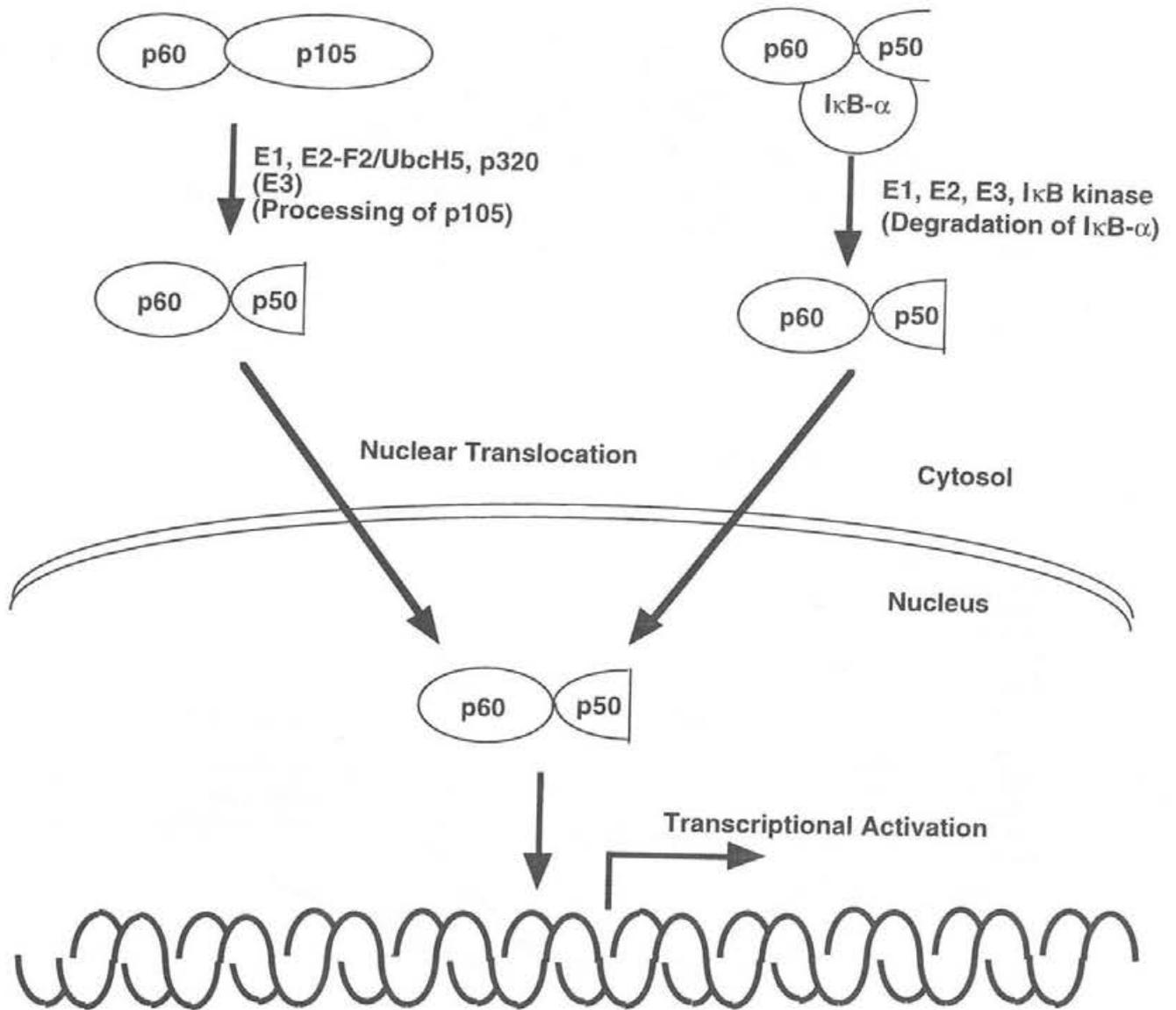


図3 NF-κBの活性化のメカニズム

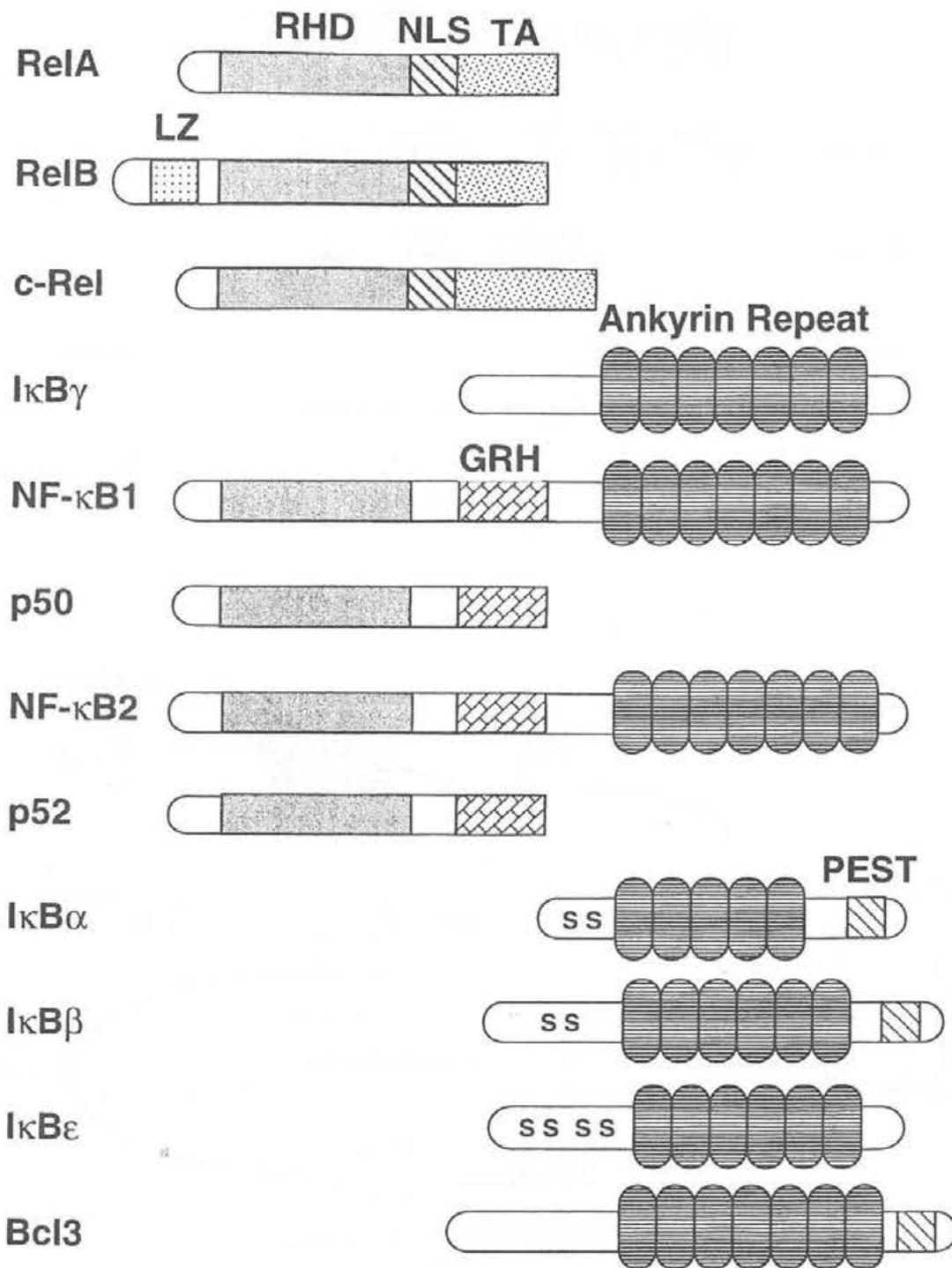


図4 NF-κB/IκB ファミリーの蛋白構造

LZ : leucine zipper
 RHD : Rel homology domain
 NLS : nuclear localization signal
 TA: transactivation domain
 GRH : glycine rich hinge
 PEST : PEST sequence

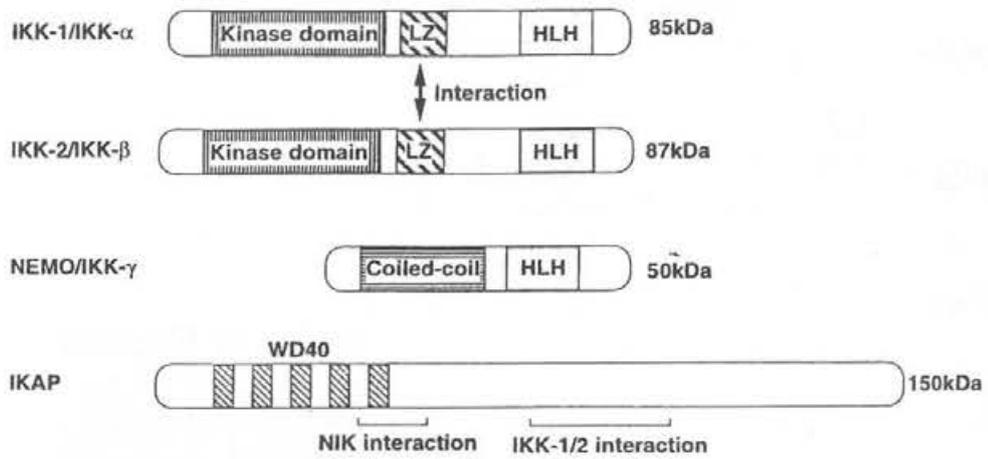


図5 IKK キナーゼ複合体の構成分子

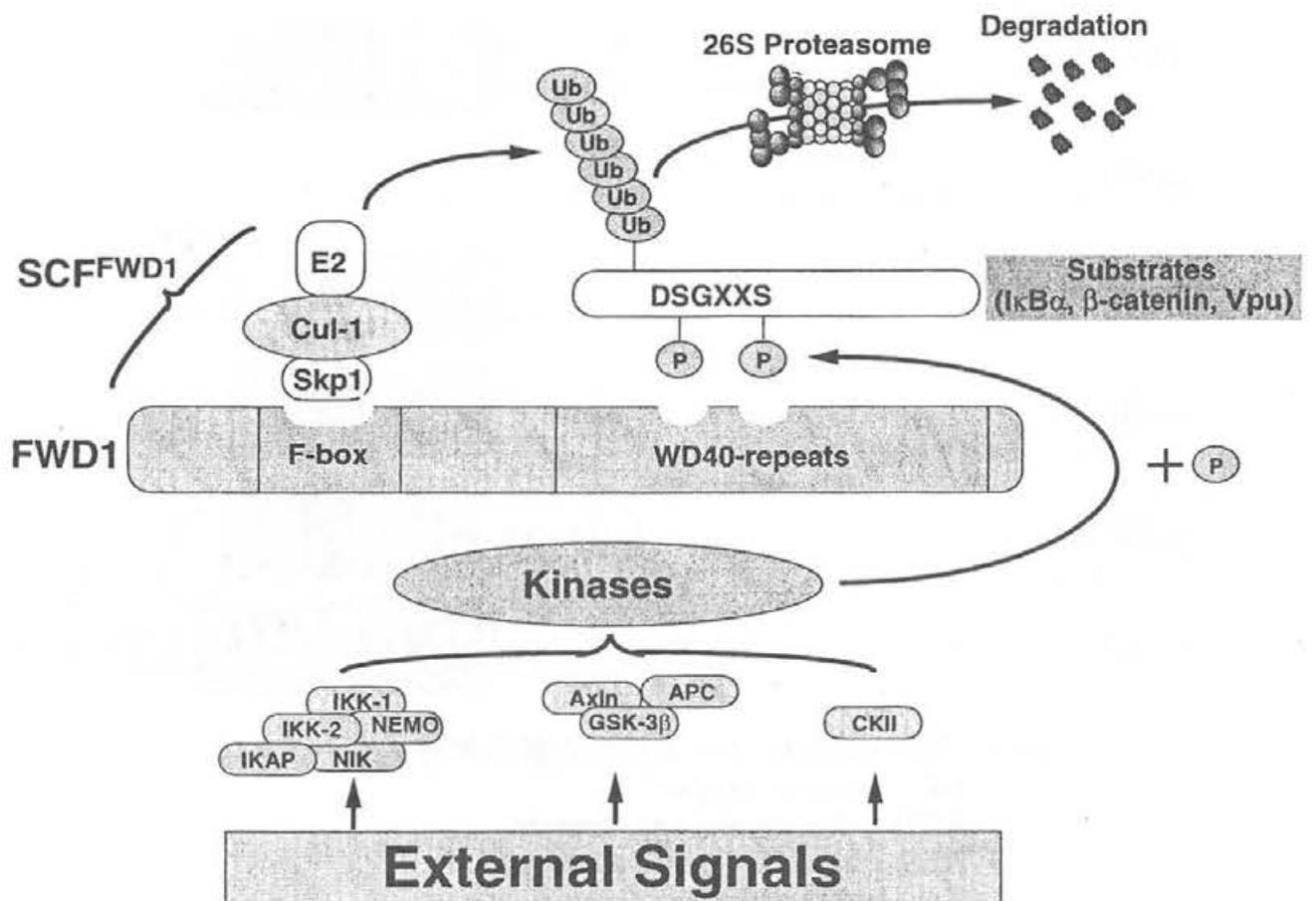


図6 SCFFWD1による基質蛋白の認識とユビキチン化のメカニズム

3. オルニチン脱炭酸酵素（ODC）分解研究の新展開

はじめに

真核細胞はポリアミンがないと増殖できない。一方、ポリアミンが多すぎるとその毒性で細胞は生存できない。従って、増殖刺激に応答して、細胞は一過性に細胞内のポリアミン濃度を上昇させる仕組みを備えている。その中心的な役割を担っているのが、たんぱく質アンチザイムである。ポリアミン生合成系の鍵酵素であり第一段階を触媒するオルニチン脱炭酸酵素（ODC）が迅速に誘導され、細胞内のポリアミンが上昇すると、フィードバック制御が作動して細胞内のポリアミンは減少する。この制御機構は、他に類をみないユニークなものである。第一に特徴的なことは、ポリアミンが直接ODCを阻害するのではなく、ポリアミンは阻害たんぱく質アンチザイムを誘導する点である。アンチザイムは強い親和性で抗原抗体様にODCに結合して活性を阻害する。第二に、アンチザイムと結合したODCは、ユビキチン化を受けることなく26Sプロテアソームによって分解されてしまう点である。第三に、アンチザイムはODCの抑制によってポリアミン生合成をとめるだけでなく、膜の輸送系に作用して細胞外からのポリアミンの取り込みも阻害する点である。第四の特徴は、ポリアミンによるアンチザイムの誘導機構にある。アンチザイムのmRNAは種々の組織に多量に存在している。しかし、普通の翻訳では、全長226個のアミノ酸のうち68個を翻訳したところで終止コドンに出くわしてしまう。この68個のアミノ酸からなるペプチドには、上記のアンチザイムの機能はない。ところが、高い濃度のポリアミンがあると、68個のアミノ酸を読み終えたところで翻訳のフレームが1塩基分先（+1）にずれて、機能を備えた全長のアンチザイムが合成される。オルニチンの脱炭酸によって生じるプトレッシン、これにアミノプロピル基が1個ついたスベルミジン、さらにもう1個ついたスベルミンの3種を通常ポリアミンと総称するが、この中でプトレッシン濃度はODCの変動につれて生理的に大きく変動する。

スベルミジンとスベルミンはmMオーダーの高い濃度で存在するが、大部分が核酸に結合していて、全濃度の変動幅は小さい。しかし、アミノプロピル基を供給するS-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素も増殖刺激により誘導されるので、遊離のスベルミジンとスベルミンの濃度は生理的に大きく変動すると推定される。細胞はフレームシフト機構によって細胞内の遊離のポリアミン濃度をモニターし、ポリアミンの上昇に対応して瞬時にアンチザイムを誘導することによって、ポリアミンの毒性から身を守っていると考えられる。第五の特徴は、アンチザイムによるフィードバック調節をキャンセルする負の調節因子アンチザイムインヒビター (AIIn) の存在である。AIInは触媒活性のないODCファミリー蛋白質であり、ODC以上の親和性でアンチザイムに結合してODCの分解を阻害する。また、アンチザイム・ODC複合体に作用させると、活性ODCを置換して放出させる。増殖刺激に応答してODCに先だって誘導されるAIInは、合成途上の単量体ODCを安定化してODC誘導の立ち上がりを促進する可能性が強い。このように、アンチザイムとAIInの相反的調節によって、ODCと細胞内遊離ポリアミンの急峻な一過性増加が成立すると考えられる。ポリアミンの一過性の増加は、増殖のシグナルとして作用するのかもしれない。この制御機構が重要であることは、ODC過剰発現により細胞が癌化する(1,2)ことや、アンチザイムの過剰発現が細胞増殖の停止あるいはアポトーシス(3)を引き起こすことなどによって示されている。

ここでは、これまでの知見(総説4,5参照)と当研究室の仕事を中心に、ODC分解に関する研究の現状について報告したい。編集部から与えられた仮題は、“ODC分解研究の新展開”であるが、“ODC分解は壁の中”というのが現状である。

1. ODC分解の特徴

ODCが迅速に分解されるためには、アンチザイムと結合することが必要である。

短寿命蛋白としてよく知られているODCの細胞内半減期は、数分から1時間以上にわたって変動する。分解速度(半減期の逆数)は細胞内のアンチザイム/ODC比

と相関し、その関係から、アンチザイムはリサイクルしながらODCの分解を約10倍促進すると見積もられた。精製26Sプロテアソームを用いた場合でも、アンチザイム/ODC比を0から1に増加させるとODC分解は約10倍促進される。アンチザイムが結合したODC（アンチザイム・ODC複合体）の細胞内の半減期は2-5分である。

ODC分解は、エネルギー依存性であるが、ユビキチン非依存性である。

細胞内でも試験管内でも、ODCが迅速に分解されるためにはエネルギーの供給が必須である。しかし、いずれの場合も、ユビキチン化されたODCは見いだされていない。ユビキチン活性化酵素E1の温度感受性細胞で非許容温度下でもODCの分解が阻害されないこと、網状赤血球溶血液によるODC分解はE1を除いても低下しないこと、ユビキチン化系を含まない精製26SプロテアソームによってODCは分解されること等の事実によって、ODC分解はユビキチン非依存性であると結論されている。しかし、アンチザイム非存在下でのODC分解（basal degradation）にはユビキチン化が関与する可能性を否定できないと考える研究者もいる（4）。以上は哺乳動物の細胞での話であるが、出芽酵母にはアンチザイムが存在しないにもかかわらず、酵母の中でマウスODCは26Sプロテアソームによって迅速に分解される（6）。また、ある種のトリパノゾーマのODCは、ODCの分解に必要なC末端領域（以下参照）がないのに、トリパノゾーマでも哺乳類の細胞内でも迅速に分解される（7）。これらのODC分解はユビキチン依存性である可能性がある。

ODCの迅速な分解には、ODCのN末端寄りのアンチザイム結合領域とODCのC末端領域が必須である。

この結論は、短寿命のマウスODCと、アンチザイムの有無にかかわらず安定なトリパノゾーマのODCのアミノ酸配列の比較検討から、Coffinoらによって導かれた。ODCのC末端領域（アミノ酸423-426）にはPEST領域がある。しかし、PEST領域がODCの分解シグナルとして作用する可能性は否定的である。なぜなら、PEST領域外にあるC末端から5個のアミノ酸の欠失、あるいはPEST領域内の1アミノ酸置換（C441→W441、置換後も依然としてPEST領域）によってODCは安定化されるのに

対して、PEST領域のN末端側半分を除いても安定化されないからである。

アンチザイムは、C末端半分があればODCに結合して不活性化し、ポリアミンの取り込みを抑制する。しかし、ODC分解促進のためには、さらに第二フレームのN末端に近い領域が必要である。

Coffino らは、Z1アンチザイム（第2フレームにあうように5'端に人工的に開始コドンが付加した部分長アンチザイムZ1cDNAの翻訳産物、212アミノ酸）のN末端1-97 (NAZ)をODC、サイクリンBやp53などの短寿命蛋白のN末端に融合させるだけで（アンチザイムやユビキチン化なしで）、細胞や網状赤血球溶血液中では蛋白分解の引き金が引かれることを見出した。この結果はアンチザイムやユビキチンの機能を解析する上で大変興味深い知見であるが、不思議なことにNAZはアンチザイムのODC分解促進作用に必須の領域ではない。また、Z1アンチザイムの1-67のアミノ酸配列は、翻訳されないフレームにコードされるartifactであり、本来のアンチザイムには存在しない。

エネルギー依存性、アンチザイム依存性ODC分解を触媒する酵素は26S プロテアソームである。

複数のグループによってなされた抗体や阻害剤あるいは遺伝学的手法を用いた実験から、*in vitro*, *in vivo* 共に主たるODC分解酵素はプロテアソームであるのは確かであろう。しかし、精製26Sプロテアソームは人工の蛍光ペプチドを基質とする高いペプチダーゼ活性を保持しているにもかかわらず、ODC分解活性がきわめて低いことがしばしばあり、高い場合でも精製26SプロテアソームのODC分解活性は細胞粗抽出液中の等量のプロテアソーム活性の約1/30にすぎない。このODC分解の減弱はODC分解に必要な26Sプロテアソームの構成要素が精製の際にはずれたためかもしれない。あるいは、細胞粗抽出液の強いODC分解活性は、いわゆる26Sプロテアソームとは似ていて異なる非ユビキチン化たんぱく質分解専用のプロテアソームによるのかもしれない。最近、酵母の26Sプロテアソームの調節因子19S (PA700) がATPaseを含むbaseと8個のサブユニットからなるlidの2つのsubcomplexに分離され、

20S core によるペプチド分解の活性化には base で足りるが、ユビキチン依存的蛋白分解には lid が必要であることが明らかにされた (8)。高等動物の 26S プロテアソームでも同様であるなら、ODC 分解の減弱は精製によって lid がはずれたためかもしれない。また最近、ラットの プロテアソームには PA700 と 11S をそれぞれ両端にもつ Hybrid 型があり、ODC 分解を触媒することが明らかにされた (9)。Hybrid 型の ODC 分解の比活性は、PA700 を両端にもついわゆる 26S プロテアソームより高いのであろうか？

2. ODC 分解機構の解析

プロテアソームの調節因子 PA700 は、6 種の ATPase サブユニットと約 14 種の non-ATPase サブユニット群から構成されている。non-ATPase サブユニット群の中には、ユビキチン化蛋白と結合するポリユビキチンレセプターやポリユビキチン鎖からユビキチン分子をはずす脱ユビキチン化酵素が存在する。一般に、ユビキチン化された蛋白質はポリユビキチンレセプターで捕捉された後、アンフォールディングされ、狭い入り口を通して 20S プロテアソーム内部の触媒部位に運ばれると推定されている。この一連のプロセスにはエネルギーが必要であると推定されている。しかし、実験的な証拠はない。私たちは ODC の分解の過程を解析しようと試みた。

エネルギー依存的、アンチザイム依存的 ODC の不可逆的失活

ODC がプロテアソームによって分解される前に三次元構造が破壊されるのであれば、活性を失った ODC が検出されるはずである。そこで、ODC をアンチザイムと ATP 存在下で細胞抽出液とインキュベートしてから、アンチザイムによる可逆的な ODC の失活をアンチザイムインヒビターで解除した後、残存 ODC 活性と残存 ODC 蛋白量をしらべた。その結果、ODC 活性の消失は ODC 蛋白の消失より大きいことを見いだした。プロテアソーム阻害剤で ODC の分解を阻害すると、その差はさらに大きくなった。この結果は、ODC が分解の前に不可逆的に失活すること、また、この失活にはプロテアソームのプロテアーゼ活性は不要であることを示している。以後、プロ

テアソーム阻害剤 (*clasto-lactacystin* β -lactone) によってODCの不可逆的な失活過程を失活ODCの分解の過程から分離して解析した。この不可逆的な失活は、エネルギー依存的かつ、アンチザイム依存的であった。電気泳動パターンから、ODCは失活によって分子サイズは変わらないが、アグリゲートまたは大きな分子に会合している可能性が示唆された。また、高次構造を認識する抗ODCモノクローナル抗体で沈降されなくなった。これらの結果から、失活はODC蛋白構造の著しい変化を伴う可能性が示唆された。また、ODCが巨大分子に取り込まれて抗体に近づけない可能性も考えられた。

ODC失活反応を触媒する酵素は26Sプロテアソームである。

細胞抽出液から20Sプロテアソーム抗体でプロテアソームを除去すると、ODCの失活は起こらなくなった。この結果から、プロテアーゼ活性は必要ないが、ODCの失活反応はプロテアソームによって触媒されることが示された。ODCの失活反応を触媒するのはどのようなプロテアソームであろうか？20Sプロテアソームと調節因子PA700はいずれも単独では活性がなかったが、両者から再構成された26Sプロテアソーム、あるいは精製26Sプロテアソームはエネルギー、アンチザイム依存的にODC失活反応を触媒した。興味深い点は、ODCの不活化反応には、プロテアソームのプロテアーゼ活性は必要ないにもかかわらず、触媒ユニットである20Sプロテアソームが必要なことである。この結果は、PA700が20Sプロテアソームを活性化するように、逆に20SプロテアソームがPA700の作用を活性化する可能性を示唆している。Rechsteinerは、26Sプロテアソームの作用機構に、PA700と20Sプロテアソームが解離会合しながら蛋白質を分解する“Ribosome model”と、解離会合せず26Sプロテアソームとして作用する“Solid-state model”の2つの可能性を提唱している(10)。Ribosome modelによれば、遊離のPA700が基質蛋白質に結合した上で、20Sプロテアソームに会合する。上記のPA700単独ではODCを不活化しないという結果は、Solid-state modelの可能性を支持する様に見える。

不活化ODCのプロテアソーム内への取り込みとアンチザイムの作用

不活化反応後、ODCはプロテアソームとともに20Sプロテアソーム抗体で沈降した。ODCとプロテアソームの結合は0.1%のSDSでもはずれない程強固であり、不活化ODCがプロテアソーム内部に取り込まれている可能性が示唆された。ODCの大部分は26Sプロテアソーム画分にあったが、20Sプロテアソーム画分にも明らかに見出された。ODCのプロテアソームへの取り込みは、ODCの不活化と平行した。すなわち、ODCの取り込みも、アンチザイム依存的、ATP依存的であった。さらに、いずれもODCのC末端の構造に依存し、441番目のシステインがアラニンやトリプトファンに置換した安定なODC変異体は、26Sプロテアソームに取り込まれないし、不活化もされなかった。これらの結果は、エネルギー依存的かつ選択的なODCの取り込みとODCの不活化が、ODC分解に不可欠な前過程であることを強く示唆している。

アンチザイムはリサイクルしながら触媒的にODC分解を促進すると示唆されているが、アンチザイム自身は26Sプロテアソーム内に取り込まれるのであろうか？。プロテアソーム内へは入れないはずのゲルに固定化したアンチザイムを作成して調べてみると、ODCの取り込みも分解も促進するので、アンチザイムは26Sプロテアソームの外で作用し、失活したODCはアンチザイムから離れて単独でプロテアソーム内へ運ばれると考えられる。

アンチザイムは、リサイクルしながら分解を促進する点はユビキチンと似ている。しかし、ユビキチンは26Sプロテアソームのポリユビキチンリセプターによって認識され、26Sプロテアソームのイソペプチダーゼによって基質蛋白質から切り出される。従って、遊離のポリユビキチンリセプターやポリユビキチンは、ユビキチン化蛋白質の分解を阻害する。他方、アンチザイムは26Sプロテアソームの外で作用し、過剰のアンチザイムはODC分解を阻害しない。従って、アンチザイムがユビキチンのようなプロテアソームによって直接認識される分解シグナルとして作用するのではなく、アンチザイムはODCに結合してODC分子に内在する分解シグナルを露出させることによってODC分解を促進する可能性が強い。Coffinoらは、ODCの不安定性がODCのC末端領域に依存することを明らかにし、この領域に対する抗体

とODCの反応性がアンチザイムによって増強されることから、アンチザイムはODCのC末端領域を露出する可能性を確かめている(4)。

以上の結果とこれまでの知見から、26Sプロテアソームによるエネルギー依存的、アンチザイム依存的ODC分解過程について、図に示すようなモデルを考えている。活性型であるODC二量体と平衡関係にある不活性なODC単量体にアンチザイム(AZ)が結合すると、ODCのC末端領域が露出し、この領域を26SプロテアソームのPA700を構成するサブユニットが認識し、ATPaseによって供給されるエネルギーを使いながらODCの立体構造を破壊しつつ(不活化)プロテアソームに取り込む。ODCの不活化にはPA700と20Sプロテアソームの両方が必要であるが、それは先に取り込まれたODCが20Sプロテアソーム内部へ輸送されることが次のODCの不活化・取り込みに必要であるためかもしれない。

“プロテアソームの壁の中”にあるODCの姿をみることはできない。中のODCは、アンチザイムとは結合していないのにオルニチンを脱炭酸しないので、不活化されて取り込まれていると考えているが、ひょっとすると中が狭くて二量体になれないのかもしれない。今後、このODCの不活化・取り込み系を発展させて、ODC分解の認識・不活化・取り込み・輸送・分解それぞれの過程を独立に解析したい。

文献

- (1) Auvinen, M. et al. (1992) *Nature* 360, 355-359.
- (2) Moshier, J.A. et al. (1993) *Cancer Res.* 53, 2618-2622.
- (3) Iwata, S. et al. (1999) *Oncogene*,
in press.
- (4) Coffino, P. (1998) In "Ubiquitin and Biology of the Cell" (Plenum Press, New York)
pp.411-428.
- (5) Hayashi, S., Murakami, Y. and Matsufuji, S. (1996) *TIBS* 21, 27-30.
- (6) Mamroud-Kidron and Kahana, C. (1994) *FEBS Lett.* 356, 162-164.
- (7) Svensson, F. et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 397-402.
- (8) Glickman, M.H. et al. (1998) *Cell*, 94, 615-623.
- (9) Tanahashi N. et al. (1999) *Mol. Biol. Rep.*, in press.
- (10) Rechsteiner, M. (1998) In "Ubiquitin and Biology of the Cell" (Plenum Press, New York)
pp.147-189. (村上安子：慈恵医大生化学第一)

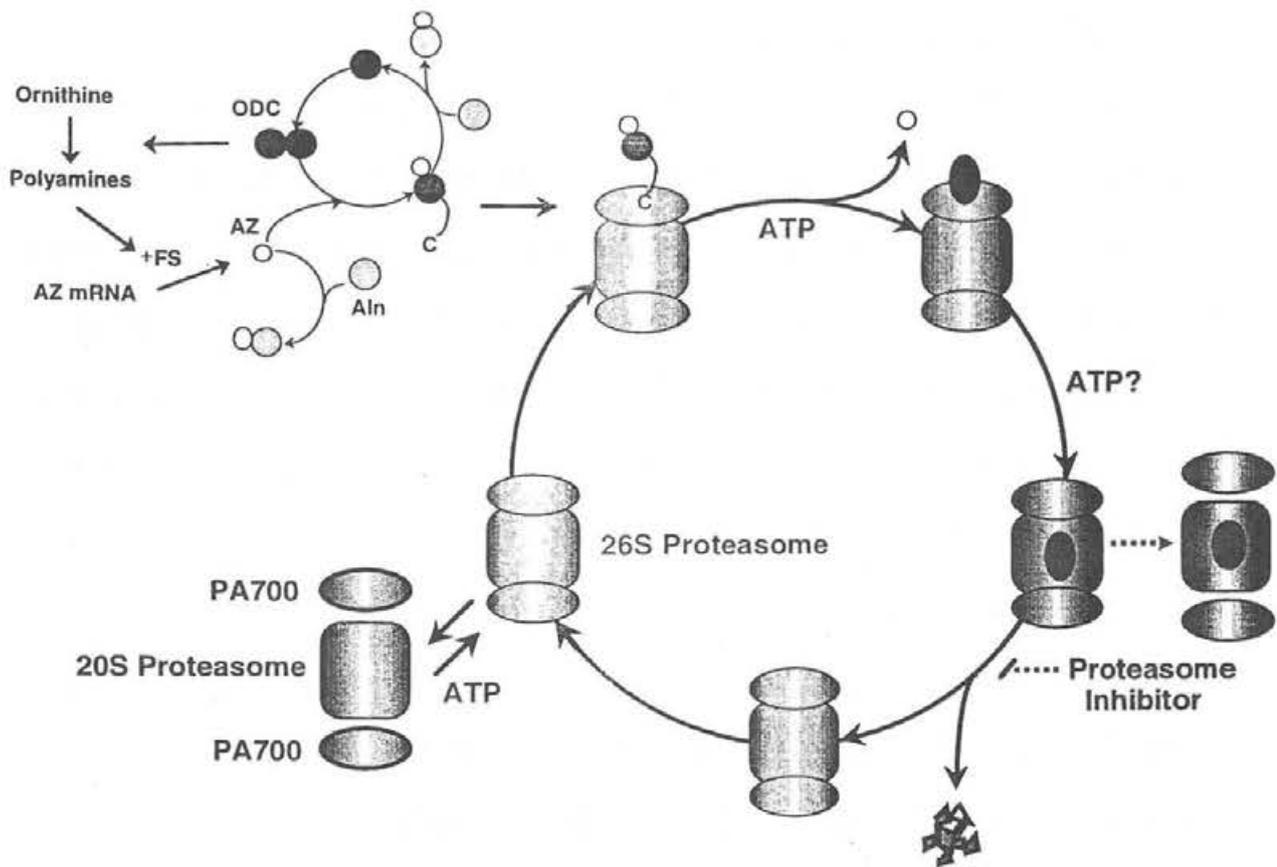


図1 オルニチン脱炭酸酵素の分解機構

4. カテプシンEが細胞質で機能する可能性

”ぷろておりす”第8号に掲載された勝沼先生の巻頭言, ”「温故知新」こそが科学者の進むべき道と信じる”という言葉は, 強く心に響いた. その理由の第一は, この点をないがしろにしていたかという自己反省. 第二に, ”古くから知られている現象”のメカニズムを思わぬ切り口からうまく説明した論文に出くわし, 興奮して間もなかったからである. その論文は, Klaus van Leyen et al. (1998) "A

function for lipoxygenase in programmed organelle degradation" Nature 395:392-395 (1).

Nature誌に掲載され、しかもタイトルにdegradationと書かれているので、すでに読まれた方は多いかもしれない。

この論文では、目のレンズや赤血球分化の最終過程で細胞内の小器官が消失するという、古くから知られている現象のメカニズムを提唱している。細胞内小器官の消失と共に、いろいろな酵素活性の変動がある。15-lipoxygenase (15-LOX) はそのような酵素のうちの一つで、細胞内小器官消失の直前に合成されることが知られていた。その名前に縛られてしまうと、15-LOXは不飽和脂肪酸の酸素添加反応に関与することしか想像できない。しかし、van Leyenらは、15-LOXは細胞内小器官の脂質膜に突き刺さり、小孔を形成し、小器官の内容物を漏出させる作用があることを示した。電子顕微鏡観察で示された小孔の内径は3-10nmで、分子量400kDaくらいのタンパク質は通れる大きさであった。穴があいてしまうと細胞質と小器官内のプロテアーゼの行き来が自由になり、小器官の分解が促進されると推論している。ただし、15-LOXは形質膜には突き刺さらないので、細胞自体が破裂するわけではない。

どうして15-LOXのこんな作用がわかったのだろうか？ とても不思議に思い、たまたまvan Leyenとおなじラボに留学している日本の友人に研究の発端を尋ねてみた。その要点は次のとおりである。Wiedmann研究室でin vitro translation用にウサギの網状赤血球のライセートを調製したときに、副産物として小胞体が多量にとれた。これをたまたま電気泳動してみたところ、イヌ膵臓由来の小胞体には見られない太いタンパク質バンドがくっきりと認められた。あまりにもその量が多いので、N-末のシーケンスをしてもらったところ、15-LOXであった。何で15-LOXがこんなところにあるのか、困ってしまったが、そこは、細胞質から小胞体へのタンパク質輸送の専門家である。小胞体から精製した15-LOXをin vitroのprotein translation-ER translocation系に加えてみた。すると、合成された新生タンパク質の小胞体内腔への輸送が阻害された。試行錯誤の結果、15-LOXと小胞体だけを混ぜると、15-LOXは小胞体膜へ局在し、かわりにBiPが漏れだしてきていることがわかった。BiPは小胞

体内腔の分子シャペロンで、新生タンパク質を小胞体内腔へ引っ張り入れる molecular ratchetとして働いている。15-LOXを作用させると、小胞体内のBiPをはじめとした分子シャペロンが欠乏するため、内腔へのタンパク質輸送が阻害されたのだろうと結論された。こうして、15-LOXは小孔を形成しているという可能性が浮かび上がってきたのである。ここまでの話は、論文では全くふれられていない。

15-LOXが形質膜以外のあらゆる細胞内小器官の膜に作用して小孔を形成すること、さらに目のレンズでも細胞内小器官の消失直前に15-LOXが発現することを示し、彼らは論文にした。ストーリーが斬新なだけに、reviewerとのやりとりは大変厳しかったそうだが、何とか受理されたそうである。最初のいきさつがあまりに単純なので、びっくりしてしまった。ビッグサイエンスを展開できる科学者の一つの条件は、自分の観察したことをきちんと意味付けできる、あるいは意味付けしようとする強い意志を持てることだどつくづく感じる。

赤血球の分化の最終段階で、カルパイン活性やプロテアソーム活性が上昇することは知られていた。小胞体膜に穴があくならば、界面活性剤を添加したときと同様に、細胞質から小器官内に、その逆に小器官内から細胞質にと、全てのプロテアーゼの行き来が可能になる。そうした場合、小器官の消失が加速されることは想像に難くない。ただし、細胞質にあるカルパスタチンやシスタチンなどの制御をどうぐりぬけて分解が可能になるのだろうか？また、細胞膜の裏打ちタンパク質はどのようにプロテオリシスから保護されているのだろうか？Klaus van Leyen et al. (1998)の論文は興味深いですが、これから細かい点で検証されて行かなければならないことは当然である。

赤血球の分化の最終段階で小胞体に穴があくということは、カテプシンEを研究してきたものにとっても朗報であった。赤血球のカテプシンE (EMAP, erythrocyte membrane acid proteinase) は、N-結合型の糖鎖を持つにも関わらず、形質膜の細胞質側に局在している(2)。カテプシンEの前駆体はシグナル配列をもつので、生合成の極めて初期に小胞体に挿入され糖鎖が付加される。そのカテプシンEが細胞質に局

在するためには、分泌経路の細胞内小器官の膜を再通過して細胞質に出ていかなくてはならないが、我々カテプシンE研究者はその機構に関しては十分な説明が出来ていなかった。しかし、15-LOXように細胞内小器官に穴を開けるタンパク質が存在するならば、カテプシンEは細胞質に存在しうる。フレンド白血病細胞をフィブロネクチンコートしたディッシュ上で培養し、DMSOで効率よく赤血球への分化を効率よく誘導したとき、カテプシンEの細胞質内の存在量が一時的に増加するという我々の観察も説明できる(3)。アスパルティックプロテアーゼに対する阻害効果を持つ物質は細胞質にはなく、pH条件さえそろえば活性をもつ。特にカテプシンEは、ATPをはじめとするモノヌクレオチドあるいは、mRNAのようなポリヌクレオチドの存在下では中性付近でも活性を持っている(4)。最近、小胞輸送に関わるコートタンパク質 α -COPのN-末端に由来する生理活性ペプチドXenineの切り出しはカテプシンEによる可能性が報告された(5)。特殊な条件下ではカテプシンEが細胞質に再分配され、そこで働く可能性を考えてもよいのではないだろうか。

文献

- 1) van Leyen, K., Duvoisin, R.M., Engelhardt, H., and Wiedmann, M. (1998) *Nature* 395, 392-395.
- 2) Takeda, M., Ueno, E., Kato, Y., and Yamamoto, K. (1986) *J. Biochem.* 100, 1269-1277.
- 3) Sakai, H., Kato, Y., Yamamoto, K. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 412-417.
- 4) Toma, D.J., Richards, A.D., Japp, R.A., Ueno, E., Yamamoto, K., Samloff, I.M., Dunn, B.M., and Kay, J. (1989) *FEBS Lett.* 243, 145-148.
- 5) Feurle G.E. (1998) *Peptides* 19, 609-615.

(長崎大学歯学部・歯科薬理・坂井英昭)

5. Caspaseの基質蛋白質とアポトーシス

Caspaseがアポトーシスの実行において重要な役割を果たしていることは、もはや疑う余地がないと思われる。勿論、Caspase非依存的なアポトーシスも報告されつつあり興味もたれるが、ここでは言及せず、Caspaseとその基質からアポトーシスを考えてみたい。

アポトーシスは、形態的特徴から定義された細胞死である。つまり、(1)細胞の縮小と断片化(アポトーティック小体の形成)、(2)クロマチンの凝縮、(3)核の形態変化(縮小と断片化)などの特徴を持っている。また、生化学的な特徴としては(1)細胞膜を構成するフォスファチジルセリンの細胞膜外層への露出、(2)ミトコンドリアの脱機能(膜電位の低下とチトクロームcの細胞質への遊離)、(3)DNAのヌクレオソーム単位での断片化、などがある。つまり、Caspaseが何らかの基質を切断することによりこれらの変化が引き起こされると考えられる。これまでに60種類近くの基質が報告されているが、これらのアポトーシスの特徴と結びついた基質は極めて少ない。ここでは全ての基質について解説することはできないが、これまでに同定されたCaspaseの基質をアポトーシスの特徴と結びつけて再考してみたい。

I アポトーシスの形態的特徴との関連が予想される基質

I-1 細胞の形態変化

切断されることにより細胞の形態が大きく変化すると予想されるのが、actin¹⁾, fodrin¹⁾, Gas2¹⁾, gelsolin²⁾³⁾, FAK(focal adhesion kinase)¹⁾, PAK2(p21-activated kinase 2)⁴⁾である。Actin, fodrinは細胞骨格の主要構成蛋白質であり、Gas2, gelsolin, FAK, PAK2は細胞骨格の調節蛋白質である。例えば、gelsolinはCaspase-3に切断されて調節領域が離れることにより、構成的にactin filamentの切断活性を持つようになる。しかし、これら蛋白質の切断により細胞の縮小と断片化まで進行するかどうかは明らかでない。

I-2 核の形態変化

核の形態変化への関与が予想される基質として lamin A, B¹⁾, LBR(lamin B receptor)⁵⁾, NuMA (nuclear mitotic apparatus protein)¹⁾などが考えられる。Laminは核膜の裏打ち蛋白質であり、LBRはlamin Bとヘテロクロマチンをつなぐ分子である。NuMAは核マトリックスを形成する蛋白質であるので、これら蛋白質がCaspaseによって切断されると核が形態変化をお越し、クロマチンの凝縮もひき起こすのかも知れないが、今のところ証明はなされていない。

II アポトーシスの生化学的特徴との関連が予想される基質

II-1 ミトコンドリアの脱機能

アポトーシスにおけるミトコンドリアの重要性が明らかにされつつある。種々の刺激によりアポトーシスが誘導された時、短時間の内にミトコンドリアの脱機能（膜電位の低下とチトクロームcの細胞質への遊離）が引き起こされる。遊離したチトクロームcがApaf-1, ATPと協同でCaspase-9を活性化し、活性化したCaspase-9がCaspase-3を活性化するというモデルが提唱されている。Fas誘導性アポトーシスにおいて、Fas刺激で活性化されたCaspase-8がBid（proapoptotic 活性を持つBcl-2ファミリー蛋白質）を切断し、切断されたBidがすみやかにミトコンドリアに移動し、膜電位の低下とチトクロームcの遊離を引き起こす⁶⁾⁷⁾。 Fas以外の刺激で同様のことが起きるかどうかは不明であり、他の刺激でミトコンドリアの脱機能を引き起こす因子の同定は今後の課題である。

II-2 DNAラダー形成

アポトーシスの特徴づける生化学的変化として、DNAラダー形成があげられる。最近、大阪大学の長田らのグループによりアポトーシス誘導時に活性化されるDNaseが同定され、CAD(caspase-activated DNase)⁸⁾と命名された。正常細胞ではCADはその阻害蛋白質であるICAD/DFP45⁹⁾¹⁰⁾と複合体を形成し不活性型として細胞質に存在しており、アポトーシスの刺激によって活性化されたCaspase-3によってICAD

が切断されCADが遊離して活性化され、核へ移行してDNAの断片化を引き起こすというモデルが提唱された。また、ICADを高発現させDNAラダーが形成されないようにしておいても、アポトーシスとそれに伴う核変性は正常に進行することから、DNAラダー形成そのものはアポトーシスに必須ではないことが明らかにされた。

III その他の基質

リン酸化に関与するタンパク質として、MEKK-1, PAK65, PKC δ , PKC θ , PKC ϵ , PKC ζ , PITSLRE kinase, RPK2(protein kinase C-related kinase2), Mst1, PKN(fatty acid- and Rho-activated serine/threonine kinase), RasGAP, D4-GDIなどがあり、細胞周期に関与するタンパク質としては、Wee1, CDC27, Cip/Waf1, Kip1, Rb, mdm2などがある。これら分子の中には、切断によって構成的に活性化されるものと不活性化されるものがある。いずれにせよ、シグナル伝達や細胞周期制御に乱れが生じ、結果的にアポトーシスに陥るものと考えられる。

また、DNA修復に関与するDNAPKcs(DNA-dependent protein kinase catalytic subunit), PARP(poly ADP-ribose polymerase), mRNAスプライシングに関与するU1-70K, hnRNPC1,C2, DNA複製に関与するDSEB/RF-C400なども、Caspaseの基質として同定されている。これら分子は、Caspaseによる切断によって機能が失われると考えられている。

ユビキチンリガーゼであるNedd4がcaspase-1,3,6,7によって切断されることは、アポトーシスへのプロテアソームによるタンパク質分解システムの関与を示唆するものであるが、未だ不明な点が多い。

IV 今後の課題

これまでに同定されたCaspaseの基質を並べてみると、Caspaseが調和をとりながら効率良くアポトーシスを進行させているように思われる。Caspaseはまず、死ぬべき細胞をまわりの細胞から遮断し、細胞骨格を再構築し、DNA複製、修復、スプ

ライシングを停止させ、DNAを分解し核構造を崩壊させ、細胞を小さく分断してファゴサイトーシスを受けやすいように準備しているようである。しかし、これまでに同定された基質では説明できない現象も数多く残されている。例えば、アポトーティック小体を形成させる因子、クロマチンを凝縮させる因子、核を断片化させる因子、フォスファチジルセリンを細胞膜外層へ露出させる因子などである。今後は、システムティックな基質同定法^{3,11)}を用いて新たなCaspaseの基質を同定すると共に、同定された基質とこれらアポトーシスを特徴づける現象との相関をはっきりさせる作業が必須と思われる。

文献

- 1) Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A.: Trends Biochem. Sci. 22, 299-306 (1997)
- 2) Kothakota, S. et al.: Science 278, 294-298 (1997)
- 3) Kamada, S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8532-8537 (1998)
- 4) Rudel, T. & Bokoch, G. M.: Science 276, 1571-1574 (1997)
- 5) Duband-Goulet, I. et al.: J. Cell Sci. 111, 1441-51 (1998)
- 6) Luo, X. et al.: Cell 94, 481-490 (1998)
- 7) Li, H. et al.: Cell 94, 491-501 (1998)
- 8) Enari, M. et al.: Nature 391, 43-50 (1998)
- 9) Sakahira et al.: Nature 391, 96-99 (1998)
- 10) Liu, X. et al.: Cell 89, 175-184 (1997)
- 11) Cryns, V. L. et al.: J. Biol.Chem. 272, 29449-29453 (1997)

(鎌田真司：大阪バイオメディカル教育研究センター)

(6) トピックス

1. 外来性抗原プロセッシングプロテアーゼ同定される

これまでに、外来性抗原ペプチドの切り出しには、抗原によりE-64で阻害されるパイン型システインプロテアーゼやペプスタチンAにより阻害されるアスパルチックプロテアーゼの関与が示唆されてきた。しかしながら、カテプシンDのKOマウスやカテプシンBのKOマウスでは外来性抗原ペプチドの産生に変化が無い事から、全く異なったプロテアーゼの関与が考えられていた。そんな時、シスタチンCや卵白シスタチンでは阻害されるがE-64では阻害されないパイン型ではないシステインプロテアーゼがこの外来性抗原ペプチドの生成に関与していることが明らかにされた(1)。このプロテアーゼはアスパラギン残基のC末端側を切断する活性をもち、アスパラギン残基が糖鎖の修飾を受けていると切断しない。実際、破傷風毒素を抗原とした時、このプロテアーゼは抗原ペプチドを切り出す事ができる。また、大部分の細胞膜タンパク質や分泌タンパク質はアスパラギン残基に糖鎖の修飾を受けており抗原ペプチドとはならない事実ともよく一致している。また、幼弱な抗原提示能の無い樹状細胞はシスタチンCをエンドサイトーシスで細胞内に取り込んでおり、外来性抗原のプロセッシング活性が抑制されている事実をも説明できる。

このプロテアーゼは、豆類で知られているligumainというシステインプロテアーゼの動物ホモログであり、アスパラギン残基のC末端側を特異的に分解する酵素として精製された(2)。阻害剤に対する感受性からシステインプロテアーゼであると推定された。cDNAクローニングによる一次構造決定の結果、パイン型(Barrettの分類によるとC1族)やカスパーゼ型(同じくC14族)のシステインプロテアーゼではない事が明らかにされた。さらに蛍光抗体法による細胞染色や密

度勾配遠心法による細胞内小器官の分画から、動物細胞ではリソゾームに局在している事が示された(3)。臓器別分布では、心臓や肺では少なく、肝臓、脾臓、精巣、胸腺では中等度の発現が認められ、腎臓、胎盤に強く発現していた。Barrettらは、このプロテアーゼが生理的にはカテプシンB、HやDの一本鎖型成熟酵素から二本鎖型成熟型酵素への変換に関与していると推定している。事実、カテプシンB/legumainの比率の大きな肝臓では、カテプシンは一本鎖型酵素が二本鎖型酵素より多量に存在しているし、この比率の低い腎臓では、カテプシンは二本鎖型がほとんどである事実とよく一致している。これまで、このカテプシンの臓器毎の成熟型酵素の違いに関しては原因が全く不明であり、E-64やペプスタチンAを用いたバルスチエイズ実験でも影響は出なかったことから、これらの阻害剤に感受性の無いプロテアーゼの関与が推定されていた。これで、カテプシンのプロセッシングに関して残されていた問題の一つが解決されたと考えて良いだろう。更に、Barrettらのグループは、legumainのシステイン残基とヒスチジン残基に変異を導入する事により、legumainの活性中心を同定した(4)。彼らによると、活性中心はHis-150とCys-191であるという。この周辺のアミノ酸配列はHis-Gly-spacer-Ala-Cysとなっており、このアミノ酸配列はcaspase(C14族)、clostripain(C11族)、およびgingipain(C25族)で保存されている。これらのシプティンプロテアーゼは認識するアミノ酸に対する特異性が高く、比較的特異性の低いパパイン族システインプロテアーゼとは異なっている。従って、このlegumainやcaspase, clostripain, gingipainは共通の祖先から進化したもので、パパイン族システインプロテアーゼとは全く別の進化をしたものと彼らは述べている。

Barrettといえばプロテアーゼの大御所である。プロテアーゼの分類になれば必ず名前が出てくる人物である。この一連の論文で、彼の研究室が分類ばかりをやっているのではないという事を見事に示した。更に、BarrettらはKOマウスを作製中との事であるので、このlegumainが本当に外来性抗原ペプチドのプロセッシングプロテ

アーゼかどうかははっきりと示されるであろう。一つだけ残念な事は、legumainが樹状細胞などの抗原提示細胞でどの細胞内コンパートメントに局在しているのかが明らかにされていない事である。これまで、外来性抗原ペプチドが産生される細胞内コンパートメントに関しては、様々な論文が出ているが結論は得られていない。彼らは、legumainの樹状細胞での局在の検討、インバリアント鎖プロセッシングへの関与の検討、MHC-IIとの関係の解明等をぜひとも行ってほしい。

文献

- (1) Manoury, M., Hewitt, E.W., Morrice, N., Dando, P.M., Barrett, A.J., and Watts, C. An asparaginyl endopeptidase process a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature*, 396, 695-699. (1998)
- (2) Chen, J-M, Dando, P.M., Rawlings, N.D., Brown, M.A., Young, N.E., Stevens, R.A., Hewitt, E., Watts, C., and Barrett, A.J. Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *J. Biol. Chem.* 272, 8090-8098. (1997)
- (3) Chen, M-J., Dando, P.M., Stevens, R.A.E., Fortunato, M., and Barrett, A.J. Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase. *Biochem. J.* 335, 111-117. (1998)
- (4) Chen, J-M., Rawlings, N.D., Stevens, R.A.E., and Barrett, A.J. Identification of the active site of legumain links it to caspase, clostripain, and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. *FEBS Lett.* 441, 361-365. (1998)

(石堂一巳：順天堂大学医学部生化学第一講座)

2. アルツハイマー病最近のトピック：プレセニリンは

γセクレターゼか？

近年の家族性アルツハイマー病原因遺伝子（APP（βアミロイド前駆体蛋白質）、プレセニリン）変異の解析によって、βアミロイドペプチドがアルツハイマー病発症機構の上流に位置することはほぼ確定したといつてよいだろう。当然ながら、β

アミロイドをAPPから切り出してくるプロテアーゼが注目を受け続けている。このプロテアーゼはセクレターゼと称され、少なくとも3種類 ($\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$) の存在が想定されている。 β は β アミロイドのN末端に対応する部分に、 γ はC末端部分に対応する部分に、そして、 α はK(16)-L(17)に相当する部分に作用する。

これらのプロテアーゼは、臨床応用をふまえた薬理学的作用点となりうる一方で、酵素化学的にも興味深い性質を有するので、多方面からの関心を集めているが、今までのところは完全な同定には至っていない。これらのセクレターゼの中で、今のところ、 γ セクレターゼが最も注目されている。それは、多くの家族性アルツハイマー病の原因遺伝子変異が γ 部位における切断のされ方に影響を与えるからである。しかし、 γ セクレターゼの場合は、基質の切断部位が膜貫通領域に存在すると考えられるため、通常の酵素化学的研究方法による解析・同定が困難である。最近、インヒビター合成およびプレセニリン研究の2つのアプローチによって得られた結果に基づいて、一つの仮説が浮上してきた。

Wolfeら (1) は、APPの γ 切断部位に着目して、新規の γ セクレターゼインヒビターを合成した (図1)。これまでは、カルパインインヒビターとして合成されたジ (またはトリ) ペプチドアルデヒドが γ セクレターゼ阻害活性を有することが知られていたが、これらはカルパインをはじめとするシステインプロテアーゼをより強く阻害するのに対して、Wolfeらの化合物はより選択的に γ セクレターゼ活性を阻害する。ただ、完全に活性を抑制するためには50-100 μ M程の高濃度を要すること、また、低濃度では逆に酵素活性を促進する傾向のあることなどの問題がある。したがって、この化合物自身はあまり実用的ではないと思われるが、新規のプロトタイプ化合物として重要であるだけでなく、 γ セクレターゼが恐らくはアスパラギン酸プロテアーゼあるいはセリンプロテアーゼであることを示唆する (システインプロテアーゼである可能性も若干残っている)。

一方で、プレセニン I を欠損する細胞では、 γ セクレターゼ活性がほぼ完全に消失し、結果的に α または β セクレターゼの産物である APP の C 末端側断片が蓄積することが示された (2)。これは、プレセニンが γ セクレターゼの活性制御に直接的に関与することを示すと同時に、プレセニン自身が γ セクレターゼである可能性も示唆する。しかし、プレセニンの構造には、既知のプロテアーゼに認められる共通配列が見いだされないため、後者の可能性は低いと考えられていた。

このような状況において、Wolfe, Selkoeらは、プレセニン自身が γ セクレターゼ活性を有する新規のアスパラギン酸プロテアーゼではないかという仮説を、98年の北米神経科学学会年会で提唱した。彼らは、合成インヒビターの結果に基づいて、プレセニンがアスパラギン酸プロテアーゼであることを想定し、その膜貫通領域に存在する2つのアスパラギン酸残基 (Asp-257とAsp-385) に着目した。これらはそれぞれ第6、第7の膜貫通領域に存在するので、ちょうどウィルスのダイマータイプのアスパラギン酸プロテアーゼ (3) の場合と同様に、対をなして加水分解の活性中心を形成すると考えたわけである。この仮説を検証するために、Asp-257あるいはAsp-385をAlaに置換した変異体プレセニンを作成したところ、これらを発現する細胞では β アミロイド産生が有意に低下したとのことである。この観測は他の研究グループでも再現されるようであり、上述の仮説を指示するが、別の可能性も否定できない。たとえば、プレセニンが γ セクレターゼ活性を正方向に制御する因子であった場合も、このような現象は生じ得る。ただし、細胞レベルでの β アミロイド産生そのものを低下させるプレセニンの変異はこれが初めてであり、また、いずれのアスパラギン酸残基もプレセニン II や線虫のプレセニンホモログである SEL-12 で保存されていることから、非常に興味深い。また、プロテアーゼ研究の立場からみれば、今まで未知であった新規のタイプのプロテアーゼが同定されたとなれば、非常に大きな発見であると言えよう。

今後、この新しい仮説は詳細に検討されて行くと思われるが、一つ大きな問題点は、正常型プレセニリンを培養細胞に過剰発現させても β アミロイド産生を増加させないことである。これは、基質であるAPPやAPPの β セクレターゼ産物断片を共発現しても同様であるので、明確な説明が必要であろう。また、 γ セクレターゼはアルツハイマー病の予防と治療のための薬理学的作用点として注目を受けているわけであるが、これを阻害することは、APPの α または β セクレターゼ産物であるC末端側断片を蓄積させてしまう危険性がある。このC末側断片は β アミロイドペプチドよりも細胞毒性が強いとの報告(4)もあるので、注意を要すると思われる。ただし、 γ セクレターゼの作用は γ 42の部位での切断(図1)が悪者とされているので、この42位での切断だけを特異的に阻害するインヒビターが開発されれば、画期的な薬剤となるであろう。

文献

- 1) Wolfe, M.S. et al.: A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's γ -secretase activity. *J. Med. Chem.*, 41: 6-9, 1998
- 2) De Strooper, B. et al.: Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391: 387-390, 1998
- 3) Babe, L.M., Craik, C.S.: Viral proteases: evolution of diverse structural motifs to optimize function. *Cell*, 91: 427-430, 1997
- 4) Kim, S.H., Suh, Y.H.: Neurotoxicity of a carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J. Neurochem.*, 67: 1172-1182, 1996

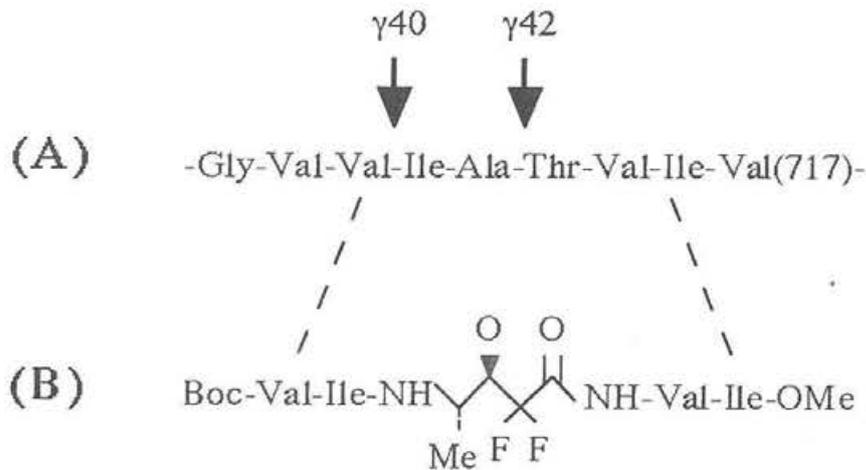
(理研脳科学総合研究センター；西道隆臣)

図の説明

1. 新規 γ セクレターゼ阻害剤

(A) APPの γ セクレターゼによって切断される部分のアミノ酸配列。 $\gamma 40$, $\gamma 42$ はそれぞれ40残基、42残基の β アミロイドペプチドを精製する切断部位を示す。(B) Wolfeらによって合成されたジフルオロケトン型のインヒビター。破線はAPPのアミノ酸配列と対応する部分を示す。

図1



3. シスタチン β はカテプシンのインヒビターか？

シスタチン群はパパイイン群システインプロテアーゼの内在性阻害タンパク質として見出されたタンパク質である。シスタチン群は、細胞質に存在する分子量約一万のI型シスタチン(シスタチン α と β)、分子内S-S結合を持ち細胞外に分泌される分子量約1万2千のII型シスタチン(シスタチンC、S、SA、SN、EW等)とキニノーゲンに代表される高分子量のIII型シスタチンに分類されている。細胞外に分泌されるII型およびIII型シスタチンは、細胞外に分泌されたリソゾーム

のカテプシン群を阻害したり、寄生虫や細菌から分泌されたシステインプロテアーゼを阻害する事により、組織破壊の進行や感染巣の拡大の防止に関与していると考えられてきた。しかしながら、細胞質に存在している I 型シスタチンに関しては、細胞内のリソゾームが崩壊した際に放出されたリソゾームカテプシン群を阻害しているのであろうと想像されているだけであった。さらに、シスタチン α に関しては、表皮の分化に伴って形成されるコーニファイドエンベロープを構成する主要タンパク質の一つであることから、表皮形成後の真菌等に対する感染防御に関与している事も示唆されていた。しかしながら、ほとんどすべての細胞に存在しているシスタチン β に関してはその機能は全く不明であった。

しかしながら、事態は全く予想しないところから切り開かれた。1996年に2つのグループから、あるタイプの進行性筋拘縮性テンカン (EPM1) の原因遺伝子としてシスタチンB (ヒトシスタチン β) が同定されたのである (1, 2)。しかしながら、筆者らのグループが同じEPM1と診断された患者由来の繊維芽細胞を用いたシスタチンB活性やタンパク量、さらにはcDNAの塩基配列の解析を行ったが、正常人由来の繊維芽細胞と全く違いが認められなかった。したがって、EPM1患者のシスタチンB遺伝子異常は、報告した2つのグループのもつ症例でのみ認められる特別なもので、疾患とは無関係なのではないかと考えていた。しかしながら、最近になって、シスタチン β のKOマウスが作製され、ヒトと同様に進行性失調、筋拘縮性テンカンが引き起こされる事が明らかにされた (3)。すなわち、シスタチン β の消失は、ヒトと同様のEPM1様の症状をマウスでも引き起こしたのである。さらに、このKOマウスでは生後2~4ヶ月で小脳の顆粒細胞層でのアポトーシスが引き起こされていた。これまでにシスタチン β がカスパーゼ群を直接阻害するというデータは得られていない。それでは、リソゾームカテプシン群の阻害が消失する事によりアポトーシスが引き起こされたのであろうか？ これまでに、アンチセンスcDNAライブラリーを細胞にトランスフェクションしアポトーシスを抑制するというスクリーニングすることにより、アポトーシスに必要なタンパク

質として、リソゾームに存在するカテプシンDが同定されているが(4)、アスパルチックプロテアーゼでありシスタチン β で阻害されない。また、ビタミンDにより誘導されるアポトーシスに対して耐性の細胞ではカテプシンBが増加しており、その細胞にビタミンD処理をすることによりカテプシンBが減少する事が示されているが、その意味は現在のところ、不明である(5)。1997年12月に開催された「細胞内タンパク分解」のシンポジウムでも、内山安男先生によりリソゾームカテプシン群とアポトーシスの関連が発表されていた。果たして、シスタチン β の消失がリソゾームカテプシン群とカスパーゼの関係に影響を及ぼし、アポトーシスの引き金が引かれるのであろうか？ それとも、今回明らかにされたシスタチン β の消失によるアポトーシスの発生は、プロテアーゼ阻害タンパク質として以外のシスタチン β の機能によるものであろうか？

文献

1. Pennacchio, L.A., et al. Mutation in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonic epilepsy (EPM1). *Science* 271, 1731-1734 (1996)
2. Lalioti, M.D., et al. Identification of mutations in cystatin B, the gene responsible for the Unverricht-Lundborg type Progressive myoclonic epilepsy (EPM1). *Am. J. Hum. Genet.* 60, 342-351 (1997)
3. Pennacchio, L.A., et al. Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nature Genet.* 20, 251-258 (1998)
4. Deiss, L.P., et al. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon- γ , Fas/APO-1 and TNF- α . *EMBO J.* 15, 3861-3870 (1996)
5. Narvaez, C.J., et al. Characterization of a Vitamin D3-resistant MCF-7 cell line. *Endocrinology*, 137, 400-409 (1996)

(石堂一巳：順天堂大学医学部生化学第一講座)

(7) 海外留学中研究者からの最新情報

女性ポストクのロンドン留学記 (Tim Huntのラボから)

クリスマス休暇の直前、日本から“ふろておりしす”が届いた。中に何か一緒に入っている。一原稿を執筆してくださる先生へー(なにこれ・・・)。書くと言った覚えはないが、目次まで入っていて、私の書く題目まで決まっている。(強引・・・) 心の中でそう思った(来年まで放っておこう!)。ホリデーに出かけた。科学者にありがちな姿勢ではある。学会の前、年末、ホリデーの直前、いつもより仕事量が増える。これだけ終わらせて・・・と思う気持ちとは裏腹の結果がでて失意のうちに休みを迎える。が、書き物となると突然悠長になる。もらった瞬間からどのくらい引き延ばしが可能か、考えたりする。かくいう私の前ボスもそうだった。締め切りが1ヶ月以上過ぎた原稿の査読を頼まれたりした(査読の締め切りを守らなくて、不満をぶつけられたものだった)。Timなど、先方から苦情の電話が来てから封筒を開くということもあるらしい。と、まあ原稿が遅れた言い訳はこのくらいにして、本題に入ろうっと。

何を書こう。何をかいてもいいと書いてある。肩の凝らない楽しいエッセイでも良い(文句言いの私に頼むんだから、文句が入っているのは承知のことだろうか?)。題目も一女性ポストクのロンドン留学記一となっている。日常生活を書くといいのかな? 色々考えて、まず前回の筆者のを読み直してみることにした。

“げげーっ!!” 研究所のことを書いてある。ICRFって何人の研究者が勤めてるんだろうか? 知らない・・・。調べようにも、今、一身上の都合というやつで帰国していて、資料がない(しかたない、研究所のことは知っていることでごまかしてしまおう)。現時点でのICRF (Imperial Cancer Research Fund) のDirectorはPaul Nurse、研究所はロンドン市内ホルボーン駅近くにあるLIFとロンドン郊外にある

Clare Hallの2つのユニットからなる。私がいるのはClare Hall、ラボの敷地内ではウサギがかっぼし、鳥達がさえずる。抜群の立地条件。建物も研究所とは思えない作りで（昔は結核の療養所だったらしい）中庭とかがあり、到着したときには“これが研究所？”と驚いたものだった。ポスドクの中には、街にすぐでられるから（主には、パブ（飲み屋さん）とか映画館、コンサート等のイベントにたくさん出かけられるから）、あっち（LIF）の方が良かったと言う人もいるが。私のように一人でできて言葉もろくにしゃべれない者にしてみれば、田舎の方が安心ということもあって、私はここが気に入っている。しかし、着いた当初はいろいろと文化の差に泣かされたものだった。2年前を振り返ってみる。

私の渡英にあまり乗り気でない母の見送りで、私は関西空港を飛び立った。12時間の空の旅を終えてヒースロー空港に着くと、Timと日本人ポスドクのHiroが迎えに来てくれていた。その時の私のTimに対する感想は“げっ！！これ何！”。なんと、この時微笑んだTimには歯がなかった。Timは自分の見た目にこだわらない。ちょうどTimに歯がなかったこの時、ラボのポスドクの家族が遊びに来ていて、Timにも挨拶に来た。彼のおとうさんは地質学の教授で、後日Timに歯がなかったことにショックを受けたと話したという。Timぐらい有名な学者になると、様々な人に会う機会も多い。ふつう、そういう人は見た目にも気を使っているものだ、という固定観念を覆していたからだ。と、ここまで書くとまるで悪口を書いているようであるが、そうではない。Timが如何に気さくな人物であるかを、とうとうと述べているのである。写真をご覧ください。この笑顔でいつも迎えてくれる優しい人である。

イギリスについてから約2ヶ月はラボの宿舎に住んで、その間に家を探していた。他の日本人同様、研究所から一番近い小さな街で探したのだが、これがなかなか見つからない。一人暮らし用のフラットは田舎では少ないのだ。1ヶ月ぐらい待って、不動産屋から電話があった。見に行ってみるとすごくきれい、金額もリーズナブル！ということで、“ここに決めます”と即答。その後、不動産屋はオーナーと連絡を取るといって、一週間なしのつぶて。すると、ラボの秘書さんに電話があっ

て、実はオーナーが（気が変わって）この部屋を売りにだしたいといっているので、六ヶ月だけということにしてもらえないだろうか？ということ。できればイギリス在住中同じところに留まりたいと思っていたので、ショック！！ それでも粘って、とりあえず一年間ということで、やっと契約にこぎつけた。こんな風に生活面を整えるのに、二ヶ月以上かかったらどうか（が、研究所にいる日本人ポスドクに、毎週のように世話になった。みなさん、ありがとうございました）。実験も色々はじめてのことが多くて、1回で済まないということが多々あった。まだ始めたばかりで、それほど不安はなかったのだが、この間Timは出張が多くてあまり話す機会がなく、なんの気なしにPhDの学生に“Timが相手にしてくれん”なることを話すと、彼女がそのことをTimに話したらしくて、さっそくディスカッションのお誘い、プラス日本食のレストランに連れていってくれた。ありがたや。

さて、2年前の回想はこのくらいにして、ラボのメンバーのご紹介をいたしましょう。現在Timのラボには、13人ほどの人々が働いていて、狭い研究室をきゅうきゅういいながら使っている。その内訳はと言うと、職員が3人、ポスドク6人、学生4人といった具合。意外とこじんまりしています。その中で純粋のイギリス人は4人、ドイツ語圏の人が5人、日本人2人。最初は誰の英語も聞き取れなくて、これは笑うしかない！とばかりに、へらへら笑っていた。しばらくすると、外国人の英語にはなまりがあって、英会話のテープで聞くのとはかなり違うことが認識できるようになり、さらには、彼らがゆっくりしゃべっていると聞き取れるようにもなって一安心。が、しかし、今でも本物のイギリス人の話している言葉は全然分からない。アメリカ英語とは、発音というよりストレスの置き方が違うのと、そのせいで聞こえなくなる音があって、今でも彼らと話すときにはただ微笑んでいることが多い、（もちろん1対1で話してくれるときは理解できる、と思っている）。ただ、これほど英語がダメな私でも、ラボの日本人と日本びいきの学生（彼は日本に滞在したことがあって、他の外国人と変わらず、京都が大好き）とイギリスで最初の友達に支えられて、何とか生きながらえている。

ラボはというと、実は私はとても驚いたのだが、夜遅くまでみんな働いている。隣のラボなんて、7時にはほとんどの人がいなくなるのに……。私は外国のラボは一般的に早じまいと思っていたので、愕然。家族持ちのなかには、晩御飯を食べに帰って、また出てきて1時2時までいるというのまでいて、外国人はもっと怠け者と思っていた私はがっかりしたものだ。けれども、ラボの人々は陽気でいい人ばかり。時間を作っては、コンサート（クラシック：ロンドンのいいところは一流のクラシックが日本の一番安いチケットの半額以下で楽しめること）に行ったり、映画に行ったり、もちろん飲みに出かけたり。そして、行くときは必ず誘ってくれる。最初はなじむためになんでもOKしていたが、最近はコンサートと映画だけに行くようにしている（私はお酒とタバコが大嫌いだから、飲み会に行くのは無意味）。一度、コンサートの後、パブで飲んで列車に乗り遅れて、もう一人のポストドクと1時間以上キングスクロスの駅で汽車が来るのを待ったことがあったが、苦痛だった。彼はそれほどおしゃべりな方ではなく、私のつたない英語では何を話しているのやら……。とにかく、間が持たないから、しゃべり続けたが、彼が理解したかどうかは未だもって定かではない。

さて、飲み屋の話が出たついでに、ロンドンの飲食情報について少し書きましよう。イギリス人は食べることに無頓着。したがって、イギリス料理というジャンルは日本の高級レストランでみることはできない。なぜならば、フランス料理のような豪華さがなく、日本料理のような新鮮さもない。はっきり言ってまずい。イギリス料理がまずいだけなら許せもするが、他国籍の料理もイギリス人が作るとどうやったらこの味になるかと思うくらいまずい。ラボのカンティーンなど、あまりのまずさに苦情たらたらで、私が来てから業者が3回ほど変わった。が、雇われるシェフが同じなもので、いくらメニューを変えても味は改善されなかった。3度目にしてやっと、ましなものが食べられるようになった。シェフが変わったのだ（彼はイギリス人ではない）。誤解しないで頂きたいのは、ロンドンのレストランが全てまずいといっているのではない。もちろん中華や、エスニック、イタリアン、フレンチ

といったもので、シェフがその国の人であれば全く問題ない。高いけれど、(ロンドンの飲食費は東京よりも高い)。ロンドンの飲み屋(通称パブ)はというと、なんと11時がラストオーダー。11時少し前に鐘が鳴ってラストオーダーを伝え、その後30分から1時間で閉店。もしもっと飲みたければ、特別な許可のあるところに行かないといけないのだが、一般的のそういった飲み屋は、入店に際して金を取る。従って、貧乏な科学者などは11時で飲むのをやめざるを得ないのである。飲めない私にしてみれば、いつ止めるかとかきもきする必要もないわけで、とてもありがたいシステムだが、ほとんどの人は飲み足りなくて、安く入れるところを探そうとする。不毛である。そんなところは存在しないのだから……。そのせいで汽車に乗り遅れる私の身にもなって欲しい。と、百万回思ったが、誘ってくれなくなると寂しいので、口に出したことはない。

イギリスのこと(主にはカルチャーショック)については、色々面白いことがたくさんあるのだが、はっきり言って書き切れない。もし興味のある人は、ロンドン在住の日本人ポストクのホームページ・分子生物学への誘い(<http://easyweb.easynet.co.uk/~ebihara/jindex.htm>)を訪ねて、英国見聞録を読んでほしい。ここにはイギリスの恐るべき事実が、余すところなく、軽快な文章で書かれている。

ロンドンライフについて批判的なことも書いた?が、私はこの国が意外に気に入っている。滞在が浅いせいもあるが、一番気に入っているのは、夏になると日本の台所を賑わす、黒光りするボディを持つ4センチほどの昆虫、そう、女性の忌み嫌うゴキブリ米太郎が存在しないのである。これはすなわち、ロンドンが北海道より北に位置することによるが、冬場は北海道のように雪が降ったりはしない。冬は暖流の影響で比較的暖かいのである。そして、夏は来ないのである。日本では如何に北海道とはいえ暑いと感じる夏が来る。たぶん、1ヶ月ぐらいは夏らしいはずだ。この国では、夏らしくなってきたそろそろ半袖にしようと思ったら、秋が来るのである。私は持ってきた夏服をタンスから出す機会はなかった。だからといって、

ロンドンに夏服が存在しないかということそうではない。イギリス人は寒さを感じないのだろうか？ 冬でも少し天気がいいと夏服と思われる物体を来ている。SOHOを歩けば、冬でも日本の脂ぎったおやじの好きそうな薄着の姉ちゃんが闊歩している。この点において、男性群に関しては、いくら寒くて雨ばかりでも、ロンドンにポスドクに来る価値はあるかもしれない。

ぐだぐだといらぬことばかり書いた。読者のみなさんも退屈した頃だろう。このへんでTim Huntラボの研究内容について200字程度にまとめて、つまらないエッセイを終わらせたいと思う。

Tim研究室では、みんなが色々なことをやっていて、テーマがバラバラなのである。Timがサイクリンの発見者であることも手伝って、サイクリンA,B1,B2,B3,B4,Eをそれぞれの人が行っている。アプローチもバラエティーに富んでいて、Frog、Human Cell、Yeastといった具合である。変わり種としては、cdc2 related kinase, Orcなどと、テーマが多岐にわたっているが、それ故の問題もある。Timの興味は本当に色々で“不思議だ！”と思ったことがそれぞれのポスドクや学生のテーマになる。ねらい打ちというのではない。それ故にそれぞれのアプローチも違って、同じ様なことをしていても他の人の系を流用できないという難点もある。つまり全部一人でしないといけない。サイクリン分解を主にやっているのは3人、サイクリン-cdc2の基質を探している人が2人、セルサイクルにおけるサイクリンの機能を解析している人が・・・と、もちろんサイクリン全般についてやっているからこれらのミックスという人も少なくないわけで、みんな夜遅くまでがんばっているのである。

私のテーマは？という、どうしてカエルの卵は中期で細胞周期を停止しているのか？というものである。こう書くと、それってmos-MAP kinase でしょうと思われるでしょうが、私が探し求めているのは、もっとも分解系に近いタンパク質。2年の間に、色々なラボからAPCがらみのInhibitorの論文がでる度に、はらはらどきどき。未だ、その物体に触れることすらできないという、苦戦。ラボのポスドクのなかには、そんなものはないという意見まであって、激論となることもあるのだが、

これが現実でないことを祈って、仕事にいそしむ毎日なのである。

さて、芳しくない研究の話で幕を閉じるのもなんだけれど、そろそろ仕事もしないと。女性ポスドクの日常、お楽しみ頂けたでしょうか？ 伝えたかったことの多くを、時間の関係と文章の構成により割愛しました。続きは帰国したときにでも・

。

(ICRF・Clare Hall：鶴身知津子)



(8) 掲示板コーナー

【国内シンポジウムの案内】

第25回 日本医学会総会シンポジウム：「プロテア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

(世話人：田中啓二、鈴木紘一)。

プログラム

「リソソームバイオロジー」	木南 英紀	順天堂大学医学部
「カルパインバイオロジー」	鈴木 紘一	東京大学分子細胞生物学研究所
「ユビキチンバイオロジー」	山尾 文明	国立遺伝学研究所分子遺伝研究系
「プロテアソームバイオロジー」	田中 啓二	東京都臨床医学総合研究所 化学療法研究部門
「ADAMファミリーと形態形成」	瀬原(藤沢) 淳子	東京都臨床医学総合研究所 細胞生物学研究部門

千里ライフサイエンスセミナー：「細胞内シグナルの制御～ユビキチンとプロテアソーム」平成11年5月17日(月)千里ライフサイエンスセンタービル5階ライフホール(大阪・御堂筋線千里中央駅北口)(コーディネータ：田中啓二・山尾文明)。

プログラム

10:00-10:10	はじめに	田中 啓二
10:10-11:00	ユビキチン：新しい蛋白修飾システム	山尾 文明
	国立遺伝学研究所分子遺伝研究系	
11:00-11:50	APCとスピンドル形成チェックポイント	戸所 一雄
	理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター	
11:50-13:00	昼食休憩	
13:00-13:50	p53のユビキチン依存的分解機構	安田 秀世
	東京薬科大学生命科学部教授	
13:50-14:40	SCF複合体によるユビキチン化	中山 敬一
	九州大学生体防御医学研究所	
14:40-15:10	休憩	
15:10-16:00	プロテアソームと受精・発生制御	横沢 英良
	北海道大学大学院薬学研究科教授	
16:00-16:50	プロテアソームの分子細胞生物学	田中 啓二
	東京都臨床医学総合研究所	
16:50-17:00	おわりに	山尾 文明

第4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。

平成11年8月20日(金)～21日(土) ウィルあいち

(名古屋市東区上堅杉街1) (代表世話人 青柳高明)

プログラム

- 基調講演 「マトリックスメタロプロテアーゼ：
基礎破壊因子としての役割と研究の動向」
岡田 保典 (慶応大学医学部病理)
- 教育講演 「アポトーシスとプロテアーゼ」
「アポトーシスの基礎」
田沼 靖一 (東京理科大学薬学部)
「がん治療とアポトーシス」
鶴尾 隆 (東京大学分子細胞生物学研究所)
オーガナイザー： 石浦 章一 (東京大学大学院総合文化研究科)
木南 英紀 (順天堂大学医学部生化学第一)
- ワークショップ「疾患マーカーとしてのプロテアーゼとインヒビター」
オーガナイザー： 小川 道雄 (熊本大学医学部第二外科)
水谷 栄彦 (名古屋大学医学部産婦人科)
- シンポジウム「感染とプロテアーゼ」
オーガナイザー： 山本 健二 (九州大学歯学部薬理学)
木曾 良明 (京都薬科大学薬品化学)
- 口頭講演・ポスター講演

【国際シンポジウムの案内】

平成11年度日本生化学会春季シンポジウム：「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)【詳細はポスター参照】

プログラム

- 基調講演： 勝沼 信彦 (徳島文理大 健康科学研究所)
- セッション1： 生理活性ペプチドとレセプターの活性化
Gary Thomas (USA), Daniel B. Constam (USA), Akihiko Tsuji (Japan)
Lloyd Fricker (USA), Akiyoshi Fukamizu (Japan), Tadashi Yoshimoto (Japan)
- セッション2： 蛋白分解酵素の活性制御機構とその新しい医学応用
Bradley A. Katz (USA), Andreas Bergner (Germany), Lawrence B. Schwalz (USA), Hiroshi Kido (Japan), Akira Matsumori (Japan), Mizuo Miyazaki (Japan)
- ポスターセッション、自由討論
- セッション3： 新しい蛋白分解系とその生理機能
Guy Salvesen (USA), Vito Turk (Slovenia), Bruce Korant (USA),

Yoshinori Ohsumi (Japan), Atsuko Sehara (Japan), Hiroyuki Sorimachi (Japan)

セッション 4 : ユビキチン / プロテアソーム研究の新展開
Takashi Toda (UK), Keith Wilkinson (USA), Yinon Ben-Neriah (Israel),
Keiji Tanaka (Japan), Takehiko Koide (Japan), Kazuhiro Iwai (Japan)

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 (Smith Kline 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)

“ふ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”

「ふろておりしす」でもたびたび紹介させていただいているAAAファミリータンパク質、AAAプロテアーゼのインターネットホームページを開設いたしましたので、お知らせします。AAAタンパク質については、ドイツ、チュービンゲン大学のFrohlichによって、国際版のAAAホームページが作られていますが、その内容はsequenceの比較と系統樹が主体であり、入門的な記述や特に機能に関する記事・図

版が不十分であることなどをカバーするためと、特に日本におけるAAAスーパーファミリータンパク質の研究の発展を願って設置しました。アドレスは：
<http://mukb.medic.kumamoto-u.ac.jp/AAA/aaainfo.html>です。本重点の班員の方々にも多少なりとも関連する情報が盛り込まれておりますので、ご覧いただき、御意見をいただけましたらと思います。ホームページの1ページ目にはAAAスーパーファミリータンパク質のイントロダクションがあり、これはMENUの「代表的AAAタンパク質とその機能」に続きます。「代表的AAAタンパク質とその機能」では、プロテアソーム、メタロプロテアーゼ、膜融合、ヘルオキシソームなどに関わるAAAタンパク質について概説しています。MENUには、このほか、出芽酵母のAAAタンパク質、古細菌 (Archaea) のAAAタンパク質、真正細菌のAAAタンパク質、総説、ミニレビュー、WWWサイト、シンポジウム・ワークショップなどの各ページへのリンクがあります。このうち、ミニレビューではAAAタンパク質に関する様々な話題について短くまとめたものを掲載していきませんが、現在のところ、本誌「ぶろておりしす」に掲載されたミニレビューの中からAAAタンパク質に関連するものを編集担当者の許可を得て転載しております。今後内容につきましては充実していきたいと思っております。

(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
紘一教授が1994年10月に東京で開催した第10回 International Conference on
Intracellular Protein Catabolism (ICOP) 国際会議 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。

(ふろておりしす 事務局)

"Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors" (eds. Katunuma, N., Kido, H.,
Fritz, H., and Travis, J.), 1997, IOS Press. 本書は一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", "Protease and Immunology", "Proteases and
Cancers"の4章から構成されており、最新の研究成果が網羅されている。一読を勧
めたい。

(ふろておりしす 事務局)

「新聞・ニュースから」のコーナー案内

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

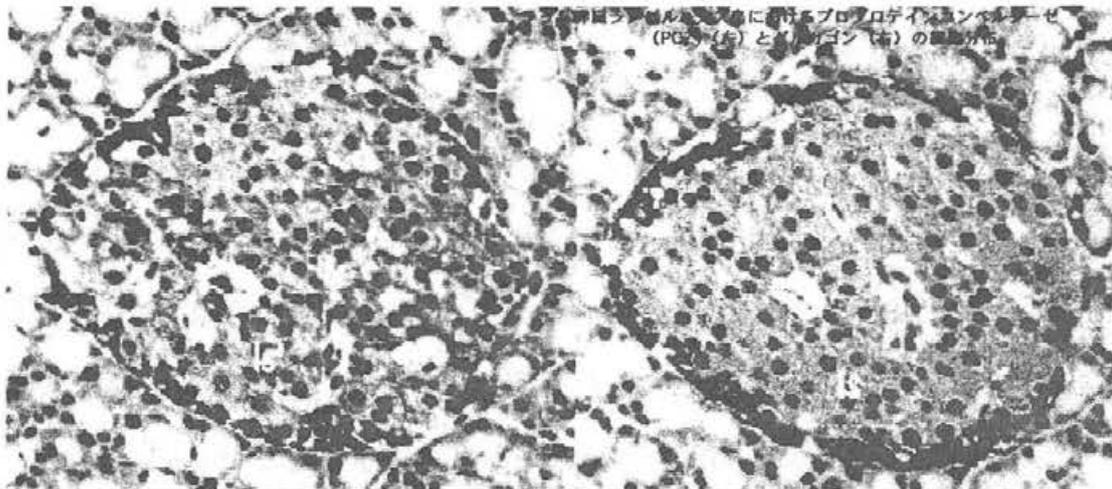
(ふろておりしす 事務局)

第6回日本生化学会
春季シンポジウム
6th CGGH Symposium
May 19-21, 1999

蛋白分解酵素による生物活性の 制御とその医学的応用

会期：1999年 5月19日（水）－5月21日（金）
会場：ルネッサンス・ナルト・リゾート（徳島県鳴門市）
組織委員：松田 佳子（徳島大・工学部） 木戸 博（徳島大・分子酵素センター）
鈴木 紘一（東京大・分生研） 田中 啓二（東京都臨床研）

主催：日本生化学会，CGGHフォーラム 共催：国際協力医学研究振興財団
協賛：日本分子生物学会，日本細胞生物学会，文部省特定領域研究「細胞内蛋白分解（略）」



ポスター演題募集（締め切り3月26日）

基調講演：勝沼 信彦（徳島文理大 健康科学研究所）

セッション1. 生理活性ペプチドとレセプターの活性化

Gary Thomas (USA), Daniel B Constam (USA), Akihiko Tsuji (Japan)
Lloyd Fricker (USA), Akiyoshi Fukamizu (Japan), Tadashi Yoshimoto (Japan)

セッション2. 蛋白分解酵素の活性制御機構とその新しい医学応用

Bradley A Katz (USA), Andreas Bergner (Germany), Lawrence B Schwalz (USA)
Hiroshi Kido (Japan), Akira Matsumori (Japan), Mizuo Miyazaki (Japan)

ポスターセッション, 自由討論

セッション3. 新しい蛋白分解系とその生理機能

Guy Salvesen (USA), Vito Turk (Slovenia), Bruce Korant (USA)
Yoshinori Ohsumi (Japan), Atsuko Sehara (Japan), Hiroyuki Sorimachi (Japan)

セッション4. ユビキチン/プロテアソーム研究の新展開

Takashi Toda (UK), Keith Wilkinson (USA), Yinon Ben-Neriah (Israel)
Keiji Tanaka (Japan), Takehiko Koide (Japan), Kazuhiro Iwai (Japan)

ポスター演題募集

日本生化学会春季シンポジウムは、本年よりゴードンカンファレンス形式で参加者全員が、同じホテルに泊まり込みで、口演またはポスター発表により最新の研究成果を発表しあう、活発な情報交換と研究活性化の場とすることになりました。口演発表は時間的にも演題数を限らざるを得ませんが、ポスター発表はゆとりをもって充分討論できるように用意しておりますので、奮ってご参加下さい。上記セッションと関連の話題を口演演題として選出しますので、多数ご応募下さい。なお、上記のセッションと直接関係のない演題でもプロテアソームに関係するもの（構造、阻害剤、癌、アポトーシス、発生・形態形成、情報伝達、免疫、感染、凝固・線溶系、神経変性疾患等）であれば歓迎いたします。A4サイズの用紙に題、氏名、所属、要旨を生化学会抄録に準じ、縦20cm×横14cmの枠内に10ポイント以上の字で印書してください（英語）。下記住所に郵送またはFAX(+E-mail)で申し込んでください。多数の若い研究者の参加による活発な情報交換の場になることを期待します。

演題申し込み先、問い合わせ先：〒770-8506 徳島市南常三島2-1 徳島大学工学部生物工学科内
第6回CGGHシンポジウム事務局 松田 佳子 TEL 088-656-7523, FAX 088-655-3161
E-mail matsuda@bio.tokushima-u.ac.jp

ホームページ：日本生化学会HP(<http://www.bcasj.or.jp/jb/jbshome/jbs-home.html>)

詳細は、生化学会誌2月号、3月号をご覧ください。

(9) 編集後記

“ぶろておりしす”は、特定領域研究「細胞内蛋白分解」のニュース誌であり、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」という意図も担って編集に取り組んでいます。今回は第9号です。本ニュース誌の発行も今回で、丁度3/4を消化したことになります。起承転結の流れに従えば、最終年度の発行予定誌は完結に向けての道を歩まねばならないことになります。末節を汚さによようにすることが進歩的文化人(?)の務めでもあるのでそのように努力したいのですが、そのためには、班員の皆様のご協力が欠かせませんので、改めて宜しくお願い申し上げます。「閑話休題」1月末にフライブルグを訪れた。独日～セミナーという二日間の短い会議に参加するために、前日夕刻にホテルにつき会議の翌日には、帰国と言う慌ただしい旅であった。フライブルグは、フランクフルトから特急列車で2時間余りに位置し、列車からのライン川の眺めは、素晴らしかった。ところで、この旅では怒りに燃えた。実は、ドイツにおける滞在時間は、延べ日数4日(実質3日)であった。エコノミーの航空運賃が東京ーフランクフルト間で、ナント往復49万円余り(!)であった。滞在日数が短いと格安運賃にならないそうである。同行した友人は、帰りにハイデルベルグに一日立ち寄った。航空運賃は15万円足らずであった。しかも、行きは偶然同じフライトになり、座席は隣同士であった(何も優遇してくれない)。3月末に第3回プロテアソーム会議に参加するためにパリ経由でクレモンフェナンを訪れ、帰りにベルリンの友人を訪問することにした。東京ーバリーベルリンの往復運賃が、9万6千円である。航空運賃の不思議には驚くばかりである。氷点下5℃の真冬のフライブルグ2日間の旅がなんと約50万円、自費ではないとは言え驚愕の値段であった(実はチケットが届くまで、このからくりを知らなかった)。日本政府指定の某旅行会社が、「もう1日滞在すれば安くなりますヨ」と一言助言してくれれば、誰かを訪ねて安く旅行するのであったが。フライブルグでは、由緒正しき街中の小さなホテル「赤い熊」に滞在。「彼のナポレオンがロシア遠征途上で宿泊したホテル」であるとの由。真偽のほどは定かでないが格式だけは上等であった。帰国日の当日早朝、凍てつくフライブルグの街を一人散策した。人影はほとんどない。女学生と思しき若い女性が、石畳の通りを手押し車で新聞配達をしていた。ホテルを見失ったので、訊ねるとホテルまで案内してくれた。これが、唯一の思い出となった(切ない侘びの境地である)。それでは恒例により、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「文字化け」防止のために、e-mail (tanakak@rinshoken.or.jp) でなくdiskでお送り頂ければ幸いです。

(特定ニュース誌“ぶろておりしす”発行事務局：都臨床研 田中・川島)

(10) 発表論文の概要紹介

班員各位の研究進捗状況を把握する目的で随時発行（巻末添付）。いずれもオフセット印刷しますので、1ページ一杯に巧く記載して下さい。但し、図書・総説は除き原著論文に限定します。班員の自信作を数多く集めたいと考えていますので、“ぶろておりしす事務局”に送って下さい。研究成果を班員相互に素早く伝達する必要性からゲラ刷りの段階でも結構ですので、迅速に作成して頂きたいと考えています。本誌は本来、班員相互の情報交換と相互扶助(?)を計ることを基本的な目的に発行していますが、「日本の蛋白質分解研究」の裾野を開拓する主旨からも、班員以外の研究者達にも送付していますし、これまでも班員以外の多数の方々よりミニレビュー等の執筆にご協力頂きました。従って、この「発表論文の概要紹介」の欄についても、班員以外にも広く門戸を解放したいと思っています。この欄への投稿は自分の研究を国内津々浦々に宣伝する絶好の機会ですので、多くの「班員」および「蛋白質分解研究者」からの掲載原稿の提出を強く希望します。

ORIGINAL PAPER

E. Futai · T. Maeda · H. Sorimachi · K. Kitamoto
S. Ishiura · K. Suzuki

The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation

Received: 16 March 1998 / Accepted: 5 October 1998

Abstract *Saccharomyces cerevisiae* has only one putative gene (designated *CPL1*) for a cysteine protease with a protease domain similar to that of calpain. This gene product shows significant sequence similarity to PalBp, a fungal (*Emerizella nidulans*) calpain-like protease that is responsible for adaptation under alkaline conditions, both in the protease domain and the domain following the protease domain. *CPL1* disruptant strains show impaired growth at alkaline pH, but no obvious growth defects under acidic pH conditions. This phenotype is complemented by the wild-type *CPL1* gene, and its protease activity is essential for complementation. Disruption of *CPL1* also causes reduced sporulation efficiency and promotes the degradation of the transcription factor Rim101p, which is involved in the sporulation pathway and has been shown to accumulate in a C-terminally truncated, active form under alkaline conditions. Furthermore, expression of the C-terminally truncated Rim101p suppressed the alkaline sensitivity associated with *CPL1* disruption. These results indicate that a calpain-like cysteine protease, Cpl1p, plays an important role in alkaline adaptation and sporulation processes, via regulation of the turnover and processing of the transcription factor Rim101p.

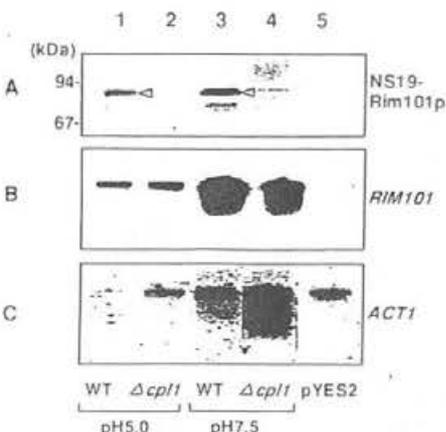
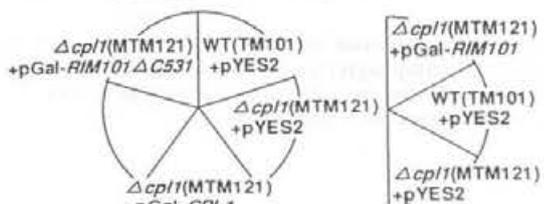
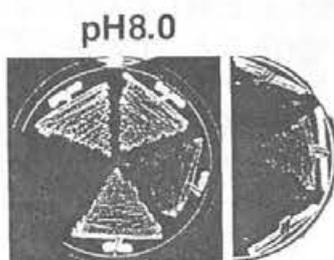


Fig. 5A-C Cpl1p is responsible for degradation of NS19-Rim101p. A NS19-Rim101p was detected by Western analysis using anti-NS19 antisera. pGal-*RIM101* (lanes 1-4) or pYES2 (lane 5) transformants of wild-type (TM100) (lanes 1, 3 and 5) or *CPL1*-disruptant (TM120) (lanes 2 and 4) cells were grown at 30°C in SGal medium at pH 5.0 (lanes 1 and 2) or pH 7.5 (lanes 3 and 4). Arrowheads (86 kDa) indicate induced Rim101p. B, C Northern analysis of galactose-induced *RIM101* mRNA and *ACT1* mRNA. Total RNAs (40 µg) extracted from cells harvested after induction were subjected to Northern analysis using the *RIM101* ORF (B) or *ACT1* exon 2 (C) as a probe

Fig. 7 Suppression of the alkaline sensitivity of *CPL1* disruptants by wild-type and C-terminally truncated RIM101p. Wild-type (TM101) and *CPL1*-disruptant (TM121) cells transformed with pYES2-derived plasmids (pYES2, pGal-*CPL1*, pGal-*RIM101*, or pGal-*RIM101*ΔC531) were grown at 30°C on buffered YPGal plates at pH 8.0. Plates were incubated for 228 h. Plate sections seeded with transformants are diagrammed in the circle



Communicated by H. Ikeda

E. Futai · T. Maeda · H. Sorimachi (✉) · S. Ishiura · K. Suzuki
Laboratory of Molecular Structure and Function,
Department of Molecular Biology,
Institute of Molecular and Cellular Biosciences,
University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku,
Tokyo 113, Japan e-mail: sorimachi@iam.u-tokyo.ac.jp
Tel: +81-3-5689723; Fax: +81-3-8130654

K. Kitamoto
Department of Biotechnology,
University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Fig. 2A, B Alkaline sensitivities of the *CPL1* disruptants. A The haploid *CPL1* disruptants MTM100 and MTM101 were grown at 30°C on buffered YPD plates at pH 5.0, 7.0, 7.5, or 8.0. Plates were incubated for 4 days. Plate sections seeded with wild-type or disruptant cells are diagrammed in the circle. When plates were incubated for over a week, the size of colonies did not change. B Approximately 1×10^7 wild-type or *CPL1* disruptant cells were grown at 30°C in liquid YPD media at pH 5.0 or 7.5. The solid and dotted lines represent wild type [TM100 (open diamonds)] and the *CPL1* disruptants [MTM100 (open squares)], respectively

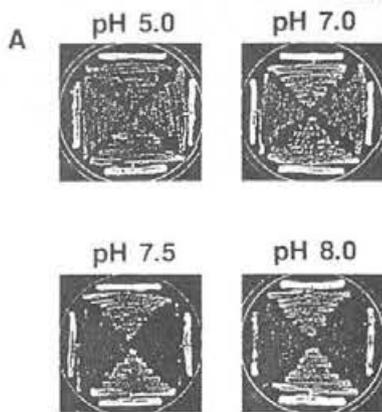
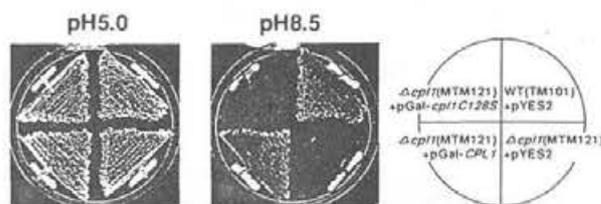


Fig. 3 Complementation of the alkaline sensitivity of *CPL1* disruptants by wild-type and mutant *cpl1* genes. Wild-type (TM101) and *CPL1*-disruptant (TM121) cells transformed with pYES2-derived plasmids (pYES2, pGal-*CPL1*, or pGal-*cpl1*-CS) were grown at 30°C on buffered YPGal plates containing 2% galactose as a carbon source at pH 5.0 or 8.5. Plates at pH 5.0 and pH 8.5 were incubated for 60 h and 228 h, respectively. Plating of the transformants is diagrammed in the circle



出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の全ゲノム中に唯一存在するカルパイン様プロテアーゼ分子 Cpl1p について解析した。

- cpl1* 破壊株を作製した所、致死とはならず、その表現形は、{①アルカリ環境に感受性を示す (Fig.2)。②ホモ破壊株の胞子形成効率が減少する (Table.3)。} となった。これにより、*CPL1* のアルカリ環境への適応及び、胞子形成における機能が示唆された。
- cpl1* 破壊株のアルカリ感受性は、野生型 *CPL1* では相補できるが、活性中心に align された 128 番目の Cys を Ser に変えた変異体 (*cpl1C128S*) では相補できず (Fig.3)、Cpl1p の機能にはプロテアーゼ活性が必要であることを示す結果となった。
- 有糸分裂初期の遺伝子誘導に関与する転写因子 Rim101p の活性化型変異体 (C 末端欠損) により *cpl1* 破壊株のアルカリ環境への感受性は抑圧された事から (Fig.7)、Cpl1p はプロセッシングによる Rim101p の活性化経路に含まれることが示された (Fig.8)。さらに、*cpl1* 破壊株中で Rim101p を発現したところ、野生株と異なり検出されず (Fig.5)、Cpl1p は Rim101p の安定化にも関与することを明らかにした (Fig.8)。

以上より、現在のところ、Fig.8 に示したスキームを考えている。

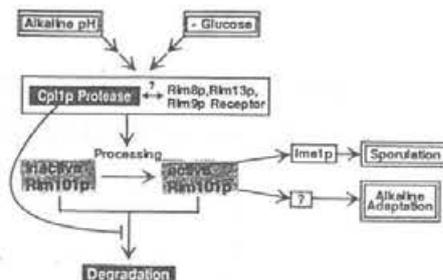


Fig. 8 A model for alkaline adaptation and sporulation control in *S. cerevisiae*. For details see text

Table 3 Sporulation efficiency of *CPL1* disruptants

Strain ^a	Time on sporulation plates	
	5 days	7 days
Wild type (TM201)	28.2 ± 3.2%	31.4 ± 2.4%
<i>Δcpl1</i> (MTM100) × WT (TM101)	23.4 ± 1.3%	34.2 ± 1.3%
WT (TM100) × <i>Δcpl1</i> (MTM100)	30.4 ± 3.8%	33.0 ± 4.1%
<i>Δcpl1</i> (MTM100) × <i>Δcpl1</i> (MTM101)	9.2 ± 3.0%	13.0 ± 2.9%

^a 600 spores were counted for each strain

Identification of Autolysosomes Directly Associated with Proteolysis on the Density Gradients in Isolated Rat Hepatocytes¹

Seiki Niioka,* Makoto Goto,* Teru Ishibashi,[†] and Motoni Kadowaki^{1,2}

*Graduate School of Science and Technology and [†]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University, Ikarashi, Niigata, 950-2181

Received for publication, May 29, 1998

Autophagy-related vacuoles, *i.e.*, autophagosomes (AVi), autolysosomes (AVd) and dense bodies (DB), are intracellular organelles within which macroautophagy and bulk proteolysis set out and progress. Separation of these particles in freshly isolated rat hepatocytes, monitored by β -hexosaminidase, a lysosomal marker enzyme, was established by density gradient centrifugation. Percoll density gradients were modified and improved by adding free polyvinylpyrrolidone (PVP, 0.75%) to 60% Percoll, which made it possible to separate AVd (buoyant peak, $d=1.090$) and DB (dense peak, $d=1.131$) effectively. Addition of graded levels of a regulatory amino acid mixture (Reg AA) to hepatocyte incubation not only suppressed proteolysis, but also lead to a shift of vacuolar profiles on the density gradients from the buoyant to the dense region. Alterations in the vacuolar shift and proteolysis were highly proportional over a full range of regulation by Reg AA. Morphometric analysis of autophagic vacuoles by electron microscopy revealed changes in the aggregate volumes of both AVi and AVd by Reg AA, which enabled us to estimate autophagic subpopulation of the buoyant peak on the gradient profile. All the results demonstrate that AVd shifts on the density gradients in proportion to alterations in proteolysis regulated by amino acids, and thus the gradient profile can be used as a measure of macroautophagy; and in addition that AVd actively involved in proteolysis occupies only a part of the buoyant peak on the gradients.

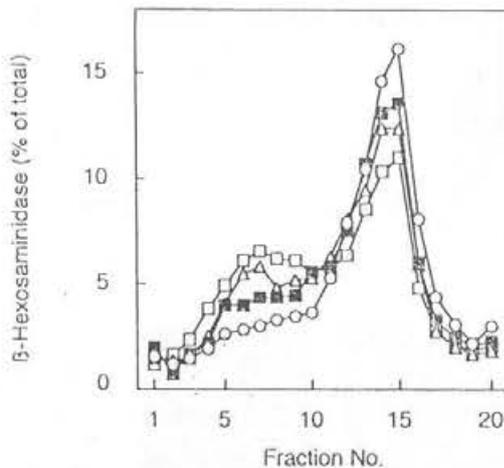


Fig. 6. (A) Effect of graded Reg AA levels on β -hexosaminidase profiles on Percoll-PVP gradients. Freshly isolated hepatocytes were incubated for 60 min with Reg AA at 0 (\circ), 2 (\blacksquare), 4 (\triangle), and 10 \times (\square) level. The M+L fraction was layered on the gradient medium and analysed as described in "EXPERIMENTAL PROCEDURES."

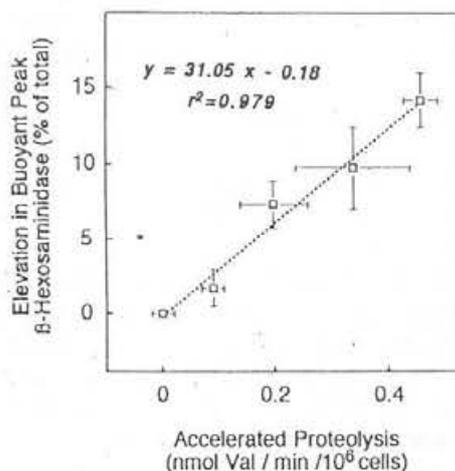


Fig. 7. Correlation between accelerated proteolysis and the gradient shift of autophagic/lysosomal particles. Accelerated proteolysis was calculated from Fig. 5 as the increase above 10 \times level. Gradient shift data were from Fig. 6B.

【要旨】 ラット単離肝細胞に存在するマクロオートファジーの多様な小胞群を分離するためにPercoll-PVP (60%:0.75%) 密度勾配遠心法が工夫され、オートリソソーム画分 (AVd, $d=1.090$) とリソソーム画分 (DB, $d=1.131$) が分離された。生理的調節を担うアミノ酸 (Reg AA) の添加により、タンパク質分解の抑制と密度勾配上のAVdとDBの分布パターンの変化が比例的に起こることが示された (Fig. 7)。また、パターン上のAVdを含む軽いピークの内容を検討するため、Reg AAによる小胞群 (AVi, AVd) の体積変化を電顕で検討したところ、AVdは軽いピーク上の大部分ではなくむしろ一部を占めることが判明した。以上より、アミノ酸によるタンパク質分解の変化に比例してAVdの密度勾配上でのパターンが変化すること、したがってこのパターンはマクロオートファジーの指標になること、そして活発にタンパク質分解に関わっているAVdはこのパターン上の軽いピークの一部であることが示された。

Proteasomes regulate the motility of salmonid fish sperm through modulation of cAMP-dependent phosphorylation of an outer arm dynein light chain

Kazuo Inaba^{1,*}, Sachiko Morisawa² and Masaaki Morisawa¹

¹Misaki Marine Biological Station, Graduate School of Science, University of Tokyo, Miura, Kanagawa 238-02, Japan

²Biological Laboratory, St Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Kanagawa, Japan

*Author for correspondence at present address: Asamushi Marine Biological Station, Tohoku University, Asamushi, Aomori, Aomori 039-35-1, Japan

Accepted 14 January; published on WWW 25 March 1998

SUMMARY

Proteasomes are involved in ATP-dependent regulation of sperm motility in salmonid fish. We have demonstrated here by immunoelectron microscopy that proteasomes are located at the structure of the chum salmon sperm flagellum that attaches at the base of the outer arm dynein and extends toward the plasma membrane. Furthermore, substrates and inhibitors of proteasome inhibit the cAMP-dependent phosphorylation of a 22 kDa axonemal protein in chum salmon sperm. The 22 kDa phosphoprotein was solubilized by treatment of the axoneme with a high salt solution and subsequent sucrose density gradient centrifugation of the extract revealed that it cosedimented with 19 S outer arm dynein, indicating that it is a dynein light chain. These results suggest that proteasomes modulate the activity of outer arm dynein by regulating cAMP-dependent phosphorylation of the 22 kDa dynein light chain.

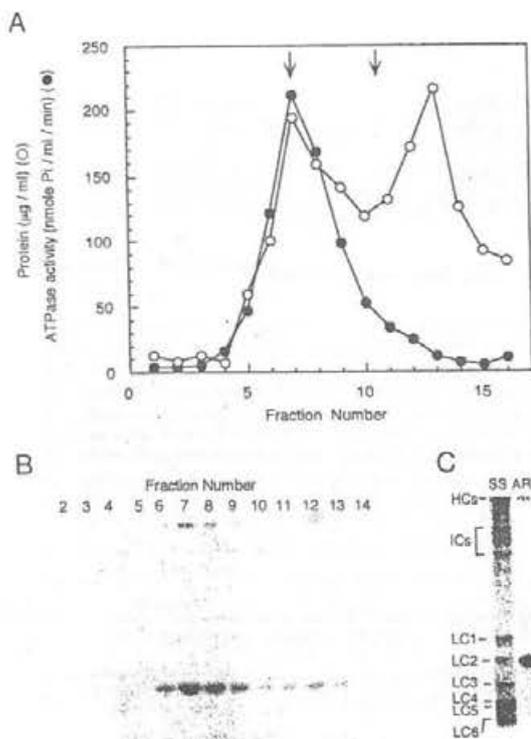


Fig. 3. Sucrose density gradient centrifugation of high salt extract of axonemes. (A) The ³²P-labeled axonemal proteins were extracted with a high salt buffer containing 0.6 M KCl, subsequently separated by 5–20% sucrose density gradient centrifugation and fractions were collected from the bottom of the tube. Open circles and closed circles indicate protein concentration and ATPase activity, respectively. Arrows show the positions of thyroglobulin (19S) and catalase (11.3S). (B) Autoradiogram after 12% SDS-PAGE of each fraction. (C) Silver staining pattern of 19 S outer arm dynein (SS) and corresponding autoradiogram (AR). The arrow shows the 22 kDa dynein light chain.

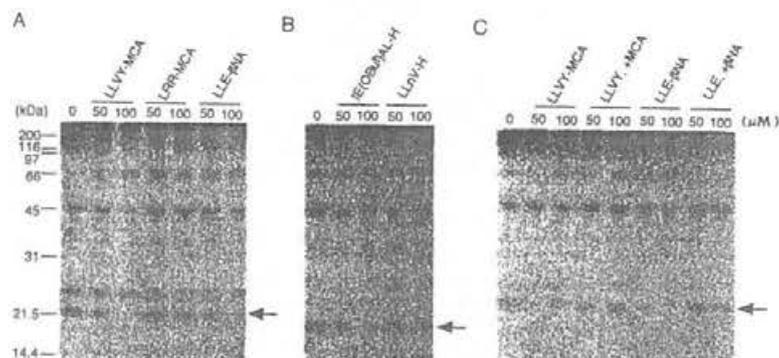


Fig. 1. (A) Effects of synthetic peptide substrates for proteasomes on the phosphorylation of axonemal proteins of chum salmon sperm. An axonemal suspension was mixed with a synthetic substrate for chymotrypsin-like activity of the proteasome, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (LLVY-MCA), a substrate for trypsin-like activity, Boc-Leu-Arg-Arg-MCA (LRR-MCA) or a substrate for peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity, Cbz-Leu-Leu-Glu-βNA (LLE-βNA). Phosphorylation reactions were initiated by adding [³²P]ATP and analyzed by SDS-PAGE (12% gel) followed by autoradiography. (B) Effects of proteasome inhibitors on the phosphorylation of axonemal proteins. The experimental procedure was the same as that in A. Two peptide aldehyde type inhibitors for proteasome, Cbz-Leu-Leu-Norvalinal (LLVY-H) and Cbz-Ile-D-*tert*-butyl-Glu-Ala-Leucinal (IREOBNAL-H), as well as a substrate (LLVY-MCA) (see also A) inhibited the phosphorylation of the 22 kDa polypeptide at 100 μM. (C) Effects of hydrolytic products of proteasome substrates on the phosphorylation of axonemal proteins. The experimental procedure was the same as that in A. Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (LLVY-MCA) or Cbz-Leu-Leu-Glu-βNA (LLE-βNA) inhibited the phosphorylation of the 22 kDa polypeptide (see also A), but neither the hydrolytic products of LLVY-MCA (LLVY + AMC) nor those of LLE-βNA (LLE + βNA) did, suggesting that peptide hydrolytic activity of the proteasome is involved in the regulation of the phosphorylation. The concentration of each compound is shown at the top of the gels (μM). Numbers on the left of the gel in A show the position of molecular mass markers (kDa). Arrows, 22 kDa polypeptide.

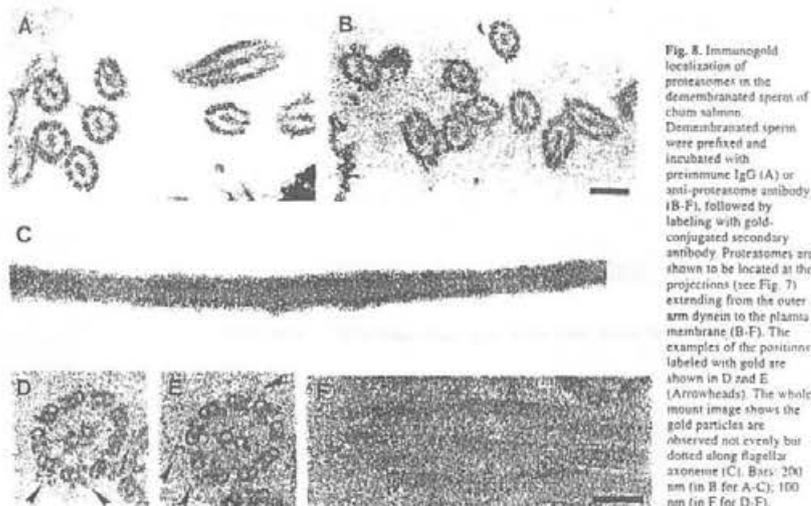


Fig. 8. Immunogold localization of proteasomes in the demembrated sperm of chum salmon. Demembrated sperm were prefixed and incubated with preimmune IgG (A) or anti-proteasome antibody (B-F), followed by labeling with gold-conjugated secondary antibody. Proteasomes are shown to be located at the projections (see Fig. 7) extending from the outer arm dynein to the plasma membrane (B-F). The examples of the positions labeled with gold are shown in D and E (Arrowheads). The whole mount image shows the gold particles are observed not evenly but dotted along flagellar axoneme (C). Bars: 200 nm (in B for A-C); 100 nm (in F for D-F).

サケ科魚類精子の鞭毛運動の調節にはプロテアソームが関与している。今回、プロテアソームの合成基質及び阻害剤により22kDa外腕ダイニン軽鎖(LC2)のcAMP依存的リン酸化が抑制されることを見出した。プロテアソームを阻害すると、精子鞭毛のA-kinase活性が低下することから、プロテアソームはA-kinaseの活性化に関与していると考えられる。一方、免疫電顕によりプロテアソームの局在を調べたところ、鞭毛軸糸の外腕ダイニンの根本付近から細胞膜に向かって伸びている突起に局在することが明らかになった。以上のことから、プロテアソームはA-kinaseを活性化することにより外腕ダイニン軽鎖のリン酸化を誘起し、その結果ダイニンによる微小管滑り運動が活性化され、精子の運動活性化に至ると考えられる。

Identification and Characterization of a Novel Line of *Drosophila* Schneider S2 Cells That Respond to Wingless Signaling*

(Received for publication, April 10, 1998, and in revised form, September 14, 1998)

Shin-ichi Yanagawa†, Jong-Seo Lee, and Akinori Ishimoto

From the Department of Viral Oncology, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

Wingless (Wg) treatment of *Drosophila* wing disc clone 8 cells leads to Armadillo (Arm) protein elevation, and this effect has been used as the basis of *in vitro* assays for Wg protein. Previously analyzed stocks of *Drosophila* Schneider S2 cells could not respond to added Wg, because they lack the Wg receptor, Dfrizzled-2. However, we found that a line of S2 cells obtained from another source express Dfrizzled-2 and Dfrizzled-1. Thus, we designated this cell line as S2R+ (S2 receptor plus). S2R+ cells respond to addition of extracellular Wg by elevating Arm and DE-cadherin protein levels and by hyperphosphorylating Dsh, just as clone 8 cells do. Moreover, overexpression of Wg in S2R+, but not in S2 cells, induced the same changes in Dsh, Arm, and DE-cadherin proteins as induced in clone 8 cells, indicating that these events are common effects of Wg signaling, which occurs in cells expressing functional Wg receptors. In addition, unphosphorylated Dsh protein in S2 cells was phosphorylated as a consequence of expression of Dfrizzled-2 or mouse Frizzled-6, suggesting that basal structures common to various frizzled family proteins trigger this phosphorylation of Dsh. S2R+ cells are as sensitive to Wg as are clone 8 cells but can grow in simpler medium. Therefore, the S2R+ cell line is likely to prove highly useful for *in vitro* analyses of Wg signaling.

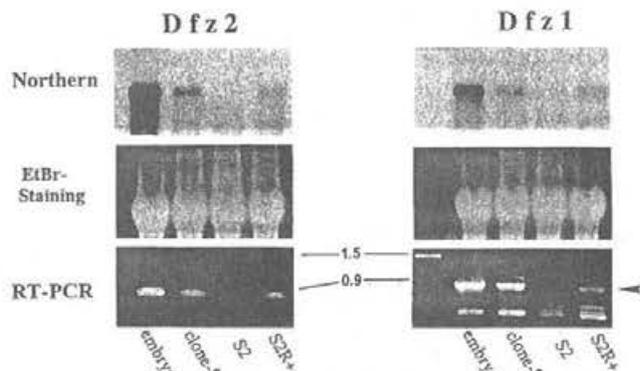


FIG. 3. Expression of *Dfz2* and *Dfz1* mRNA in S2R+ and clone 8 cells and lack of expression in S2 cells. Total RNA from embryos, clone 8, S2, and S2R+ cells was subjected to Northern analysis with *Dfz2*- (upper left panel) and *Dfz1*- (upper right panel)-specific probes. The middle panels are ethidium bromide stainings of the gels showing that the same amount (20 μ g) of total RNA was loaded in each lane. The *Dfz2*- and *Dfz1*-specific cDNA products amplified with RT-PCR are shown in the lower left and lower right panels, respectively. An arrowhead on the right side of the lower right panel indicates the position of the *Dfz1*-specific PCR product. Migration positions of the 1.5- and 0.9-kb DNA size markers are shown in the lower panels.

Drosophila Schneider S2 細胞はWg受容体、Dfz-1, Dfz-2を発現しておらず、Wg刺激に反応しないと報告されてきた。今回、Wg受容体を発現しているS2 細胞亜株を発見し、S2R+と名づけた。この細胞は、Wg感受性の翅原基由来細胞Clone-8と同様に、Wg刺激に反応してArm 蛋白の細胞内蓄積、Dshのリン酸化、DE-cadherinの誘導を起こした。

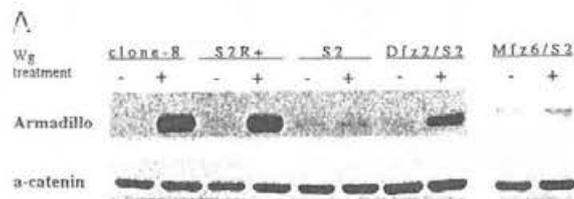


FIG. 1. Comparison of the effects of Wg on Arm protein levels in several *Drosophila* cell lines. A, Wg induced accumulation of Arm protein in several *Drosophila* cell lines. Lysates of cells treated for 180 min with conditioned medium from S2-HS-wg (Wg treatment +) or control S2 (Wg treatment -) cells were subjected to Western blotting with anti-Arm antibody (upper panel). The *Dfz2/S2* cell line is a clone of S2 cells transfected with pMK-*Dfz2*. *Mfz6/S2* is a mixture of stable clones of S2 cells transfected with pMK-*Mfz6*. Because basal levels of *Dfz2* expression are sufficient to make S2 cells Wg-responsive, and further induction of *Dfz2* expression by CuSO_4 leads to a lower response to Wg, *Dfz2/S2* cells not treated with CuSO_4 were used. Although CuSO_4 markedly induced *Mfz6* mRNA expression, neither induced nor uninduced *Mfz6/S2* responded to Wg. Thus, results from uninduced *Mfz6/S2* cells are shown. The lower panel shows a D- α -catenin blot as a loading control.

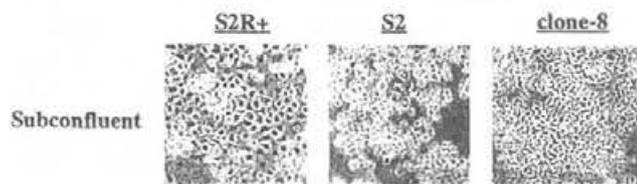


FIG. 2. Differences in morphology of S2R+, S2, and clone 8 cells.

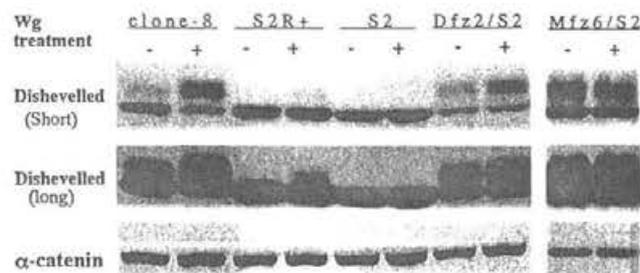


FIG. 4. Wg treatment induced modification of Dsh protein in clone 8, S2R+, and *Dfz2/S2* cells but not in S2 or *Mfz6/S2* cells. Lysates of cells treated for 180 min with conditioned medium from S2-HS-wg (Wg treatment +) or control S2 (Wg treatment -) cells were subjected to Western blotting with anti-Dsh antibody. Upper and middle panels show short and long exposures of the same immunoblot, respectively. As a control for loading, the blot was stripped and incubated with antibody against D- α -catenin (lower panel). Results from *Dfz2/S2* or *Mfz6/S2* cells not induced with CuSO_4 are shown in this figure.

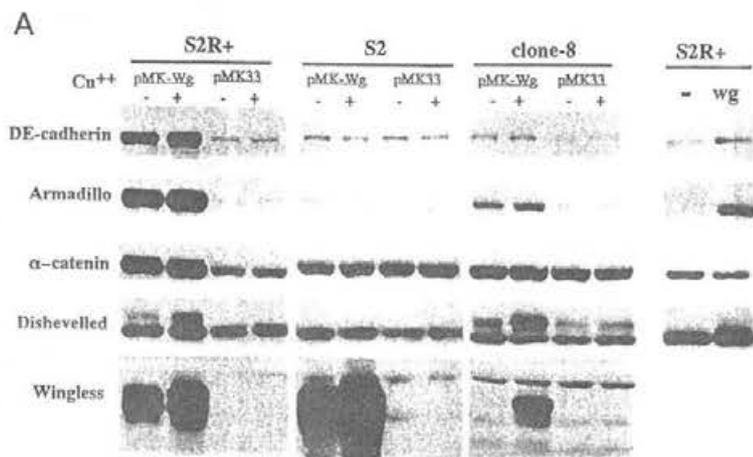


FIG. 5. Wg protein overexpression resulted in the accumulation of Arm and DE-cadherin protein in S2R+ and clone 8 cells but not in S2 cells.

Heat shock regulation in the *ftsH* null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of σ^{32} *in vivo*

Takashi Tatsuta,¹ Toshifumi Tomoyasu,² Bernd Bukau,² Masanari Kitagawa,³ Hirotsada Mori,³ Kiyonobu Karata¹ and Teru Ogura^{1*}

¹Department of Molecular Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 862–0976, Japan.

²Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg, Hermann-Herder-Str., D79104 Freiburg, Germany.

³Research and Education Centre for Genetic Information, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma 630-0101, Japan.

Summary

The heat shock response of *Escherichia coli* is regulated by the cellular level and the activity of σ^{32} , an alternative sigma factor for heat shock promoters. FtsH, a membrane-bound AAA-type metalloprotease, degrades σ^{32} and has a central role in the control of the σ^{32} level. The *ftsH* null mutant was isolated, and establishment of the Δ *ftsH* mutant allowed us to investigate control mechanisms of the stability and the activity of σ^{32} separately *in vivo*. Loss of the FtsH function caused marked stabilization and consequent accumulation of σ^{32} (≈ 20 -fold of the wild type), leading to the impaired downregulation of the level of σ^{32} . Surprisingly, however, Δ *ftsH* cells express heat shock proteins only two- to threefold higher than wild-type cells, and they also show almost normal heat shock response upon temperature upshift. These results indicate the presence of a control mechanism that downregulates the activity of σ^{32} when it is accumulated. Overproduction of DnaK/J reduces the activity of σ^{32} in Δ *ftsH* cells without any detectable changes in the level of σ^{32} , indicating that the DnaK chaperone system is responsible for the activity control of σ^{32} *in vivo*. In addition, CbpA, an analogue of DnaJ, was demonstrated to have overlapping functions with DnaJ in both the activity and the stability control of σ^{32} .

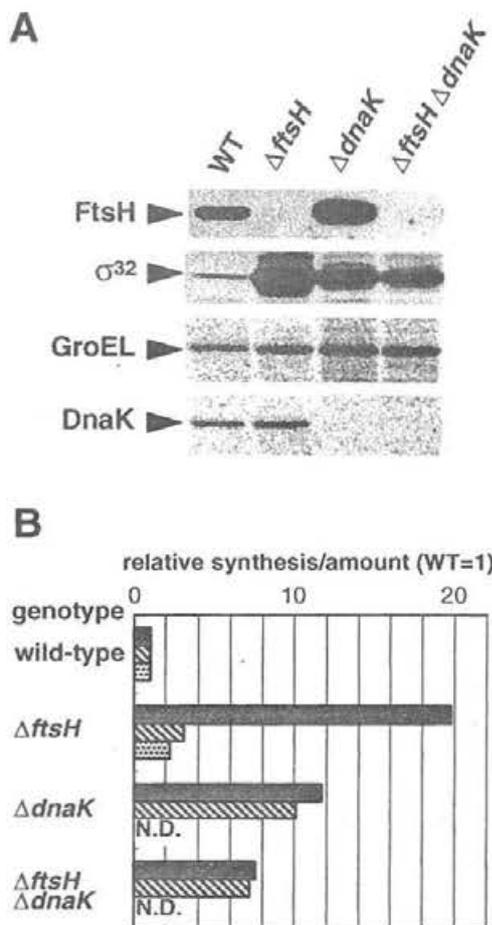


Fig. 3. Comparison of the activity of σ^{32} between Δ *ftsH* and Δ *dnaK* cells.

A. Cellular levels of FtsH and σ^{32} and the synthesis rate of HSPs at 30°C steady state. For the measurement of cellular levels of FtsH and σ^{32} , cells of AR3289 (WT), AR3291 (Δ *ftsH*), AR7071 (Δ *dnaK*) and AR7051 (Δ *ftsH* Δ *dnaK*) were grown in M9 medium supplemented with 18 amino acids (except for Cys and Met) at 30°C and were collected. Total proteins were analysed by Western blotting with anti-FtsH or anti- σ^{32} serum. For the measurement of synthesis rate of DnaK and GroEL, cells of the same culture were pulse-labelled for 1 min and were subjected to immunoprecipitation with anti-DnaK or anti-GroEL antiserum as described in *Experimental procedures*.

B. The summary of quantitative analysis of (A). Filled bars, the cellular content of σ^{32} ; shaded bars, the synthesis rate of GroEL; dotted bars, the synthesis rate of DnaK. All values were normalized to values of wild-type cells. ND, not detected.

【要旨】大腸菌の熱ショック応答は、 σ^{32} の細胞内レベルと活性により制御される。膜結合型AAA型タロプロテアーゼFtsHは、 σ^{32} を分解し、その量の調節を行う。*ftsH*欠変異株の分離により、 σ^{32} の安定性と活性の調節機構を別々に解析することが可能になった。FtsHを欠損すると、 σ^{32} は安定化し、野生株の20倍程蓄積する。しかし、驚いたことに、*ftsH*欠変異株における熱ショック蛋白質の発現は、わずか2~3倍高いだけで、温度シフトに伴う熱ショック応答もほぼ正常である。これは、 σ^{32} が蓄積したときには、その活性を抑制する機構があることを示唆する。*ftsH*欠変異株でDnaK/Jを過剰発現すると、 σ^{32} のレベルを変えることなく、その活性を減少させる。すなわち、DnaKシャペロン系が σ^{32} の活性制御に関わる。さらに、DnaJアナログのCbpAは、 σ^{32} の活性および安定性調節においてDnaJとオーバーラップする活性を持つことを示した。

Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*

Toshifumi Tomoyasu,¹ Teru Ogura,² Takashi Tatsuta² and Bernd Bukau^{1*}

¹Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg, Hermann-Herder-Str. 7, D-79104 Freiburg, Germany.

²Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 862-0976, Japan.

Summary

The expression of heat shock genes in *Escherichia coli* is regulated by the antagonistic action of the transcriptional activator, the σ^{32} subunit of RNA polymerase, and negative modulators. Modulators are the DnaK chaperone system, which inactivates and destabilizes σ^{32} , and the FtsH protease, which is largely responsible for σ^{32} degradation. A yet unproven hypothesis is that the degree of sequestration of the modulators through binding to misfolded proteins determines the level of heat shock gene transcription. This hypothesis was tested by altering the modulator concentration in cells expressing *dnaK*, *dnaJ* and *ftsH* from IPTG and arabinose-controlled promoters. Small increases in levels of DnaK and the DnaJ co-chaperone (<1.5-fold of wild type) resulted in decreased level and activity of σ^{32} at intermediate temperature and faster shut-off of the heat shock response. Small decreases in their levels caused inverse effects and, furthermore, reduced the refolding efficiency of heat-denatured protein and growth at heat shock temperatures. Fewer than 1500 molecules of a substrate of the DnaK system, structurally unstable firefly luciferase, resulted in elevated levels of heat shock proteins and a prolonged shut-off phase of the heat shock response. In contrast, a decrease in FtsH levels increased the σ^{32} levels, but the accumulated σ^{32} was inactive, indicating that sequestration of FtsH alone cannot induce the heat shock response efficiently. DnaK and DnaJ thus constitute the primary stress-sensing and transducing system of the *E. coli* heat shock response, which detects protein misfolding with high sensitivity.

【要旨】大腸菌の熱ショック遺伝子の発現は、転写因子、すなわちRNAポリメラーゼの σ^{32} サブユニットと負のモジュレーターとの相反する機能により制御される。モジュレーターは σ^{32} の不活性化と不安定化に働くDnaKシャペロン系と σ^{32} の分解に関わるFtsHである。今なお証明されていない仮説は、ミスフォールド蛋白のモジュレーターへの結合が熱ショック遺伝子の転写レベルを決定するというものである。*dnaK*、*dnaJ*および*ftsH*をIPTGまたはアラビノース制御プロモーター下で発現し、モジュレーターの細胞内濃度を変えて検証した。その結果、DnaKおよびDnaJのわずかな増加(1.5倍以内)により、 σ^{32} の活性とレベルの低下、熱ショック応答のより早いシャットオフが観察された。逆に、それらのレベルのわずかな減少は、逆の効果をもたらした。一方、FtsHのレベルの減少は、 σ^{32} のレベルの増加をもたらすが、蓄積した σ^{32} は不活性であった。したがって、DnaKとDnaJが蛋白のミスフォールディングを高感度に検出するストレス感知系として働く。

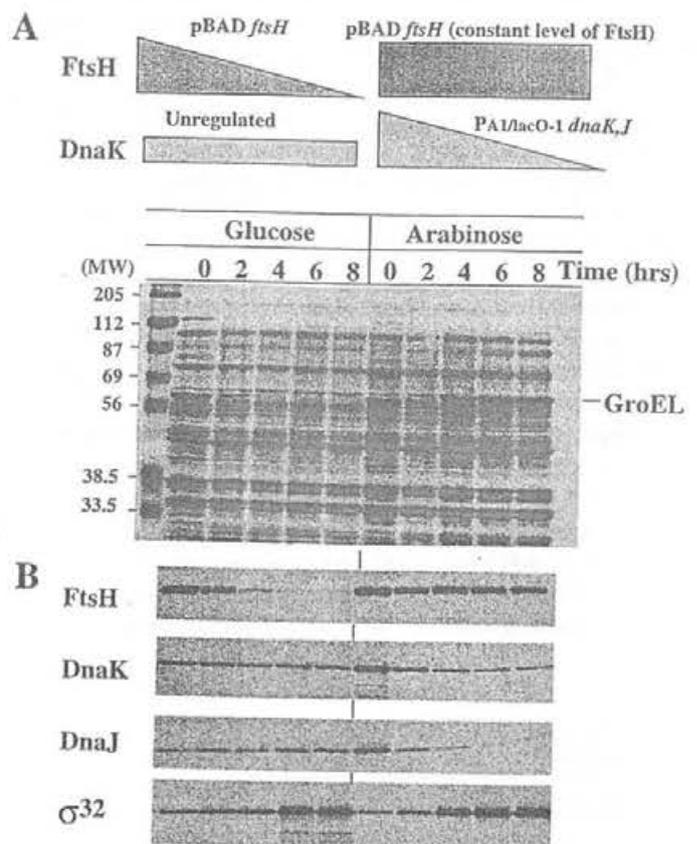


Fig. 6. Deprivation of FtsH, DnaK and DnaJ at 30°C. Cells of strains BB7107 (AR3291 ($\Delta ftsH$ *sfhC*) carrying pBB515(pBAD*ftsH*)) and BB7113 (BB7107 PA1/*lacO-1 dnaK, J lacI^q*) were grown overnight at 30°C in LB medium containing arabinose (0.4%) and IPTG (1 mM). Culture aliquots (1 ml) were washed twice in LB medium and resuspended in 20 ml of medium containing 0.2% glucose (BB7107) or 0.4% arabinose (BB7113) without IPTG. At the indicated times, equal amounts of total proteins were analysed by SDS-PAGE (A), followed by immunoblotting (B) and quantification (C) of the indicated proteins. The values were normalized to values obtained for the BB7107 overnight culture. FtsH values were normalized to values of wild-type strain BB7059. Closed squares, FtsH; open circles, DnaK; closed triangles, DnaJ; open squares, GroEL.

Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*

Teru Ogura,^{1*} Koichi Inoue,^{2†} Takashi Tatsuta,¹ Toshinobu Suzuki,³ Kiyonobu Karata,¹ Katherine Young,⁴ Lin-Hui Su,⁵ Carol A. Fierke,⁵ Jane E. Jackman,⁵ Christian R. H. Raetz,⁵ Jack Coleman,^{6‡} Toshifumi Tomoyasu^{1§} and Hiroshi Matsuzawa⁷

¹Department of Molecular Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 862-0976, Japan.

²Department of Molecular Biology, Faculty of Science, Saitama University, 255 Shimo-Ohkubo, Urawa 338-8570 Japan.

³Faculty of Science, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan.

⁴Department of Microbiology, Merck Research Laboratories, Rahway, NJ 07065, USA.

⁵Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710, USA.

⁶Department of Biochemistry and Molecular Biology, Louisiana State University Medical Center, New Orleans, LA 70112, USA.

⁷Department of Biotechnology, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.

Summary

The suppressor mutation, named *sfhC21*, that allows *Escherichia coli* *ftsH* null mutant cells to survive was found to be an allele of *fabZ* encoding *R*-3-hydroxyacyl-ACP dehydrase, involved in a key step of fatty acid biosynthesis, and appears to upregulate the dehydrase. The *ftsH1*(Ts) mutation increased the amount of lipopolysaccharide at 42°C. This was accompanied by a dramatic increase in the amount of UDP-3-*O*-(*R*-3-hydroxymyristoyl)-*N*-acetylglucosamine deacetylase [the *lpxC* (*envA*) gene product] involved in the committed step of lipid A biosynthesis. Pulse-chase experiments and *in vitro* assays with purified components showed that FtsH, the AAA-type membrane-bound metalloprotease, degrades the deacetylase. Genetic evidence also indicated that the FtsH protease activity for the deacetylase might be affected when acyl-ACP pools were altered. The biosynthesis of phospholipids and the lipid A moiety of lipopolysaccharide, both of which derive their fatty acyl chains from the same *R*-3-hydroxyacyl-ACP pool, is regulated by FtsH.

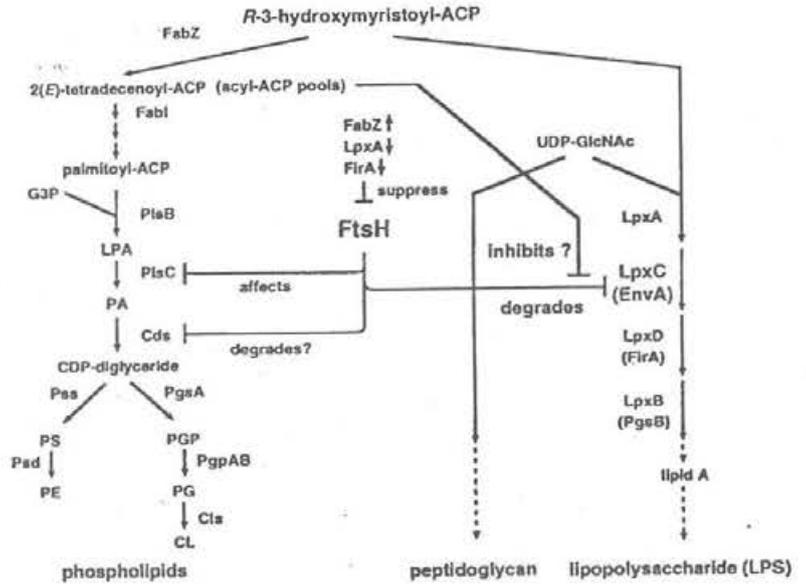


Fig. 2. Schematic representation of biosynthetic pathways of major membrane components. Functions of FtsH in the regulation of biosynthesis of LPS and phospholipids are drawn. T-bars represent negative control (degradation, inhibition or suppression). FtsH degrades LpxC, and this proteolytic activity is modulated by perturbation of the acyl-ACP pools (see the text for details). ACP, acyl carrier protein; UDP-GlcNAc, UDP-*N*-acetylglucosamine; G3P, glycerol-3-phosphate; LPA, lysophosphatidic acid; PA, phosphatidic acid; PGP, phosphatidylglycerol phosphate; PS, phosphatidylserine; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; CL, cardiolipin.

【要旨】大腸菌の *ftsH* 欠損変異による致死を抑制する *sfhC21* 変異は、酸性リン脂質の合成経路に関わる *fabZ* 遺伝子の過剰生が上昇する変異であった。*ftsH1*(Ts) 変異は、高温で LpxC (EnvA) の増加に伴い、リポ多糖を蓄積する。FtsH が LpxC を分解することを、*in vivo*, *in vitro* で明らかにした。この FtsH の LpxC 分解活性は、acyl-ACP プールの変化によって調節を受けるようだ。リン脂質とリポ多糖の lipid A のアシル鎖は、共通の hydroxyacyl-ACP プールに由来し、これらの生合成は、FtsH によって制御される。