

## 「モジュレータープロテアーゼ」カルパインと細胞内膜系との新たな展開

### 1. はじめに

カルパインは活性に  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とする細胞内システインプロテアーゼで、基質の限定分解により様々な細胞機能を調節するモジュレーターとして機能する。即ち、細胞内「モジュレータープロテアーゼ」の代表である。

細胞質内で直接基質と相互作用するため、活性は幾重にも厳重に制御されている。その一つとして、膜系との相互作用は古くから注目されていた。リン脂質がカルパインに直接作用して  $\text{Ca}^{2+}$  要求性を低下させること、活性化したカルパインが細胞膜へ移行すること、多くの膜/膜結合タンパク質が基質となることなど、多くの重要な研究がなされてきた（総説1, 2を参照）。しかし、カルパインが膜で活性化する具体的な分子メカニズムについては、不明な点が多い。

そのような中、ミトコンドリア・小胞体 (ER)・ゴルジ体・多胞性エンドソーム (MVB) など細胞内膜系へのカ

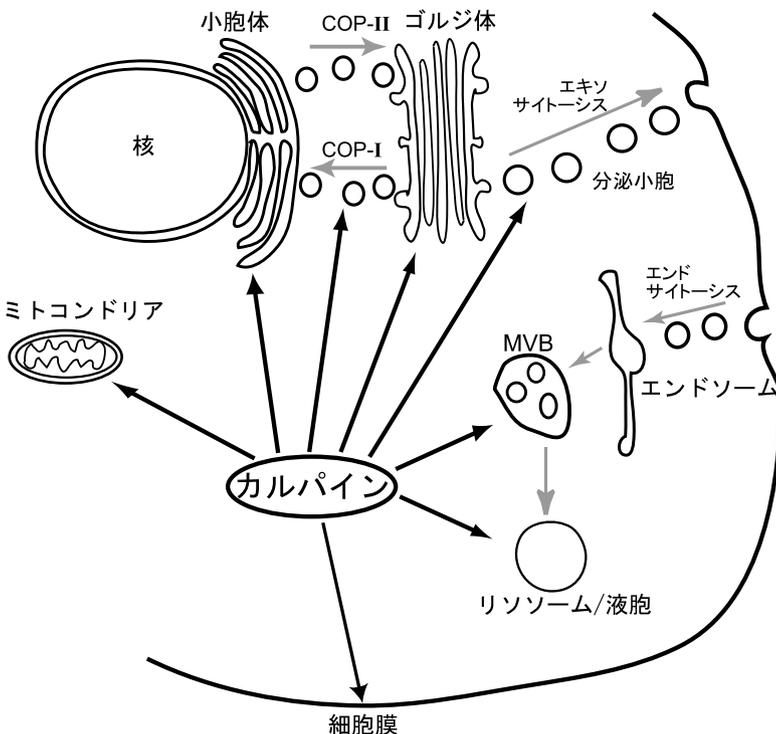


図1 明らかになったカルパインと細胞内膜系との関係

ルパインの局在、及び膜輸送系 (membrane trafficking) 関連分子とカルパインとの相互作用が明らかになってきた (図1)。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシスを司る細胞内膜系が、カルパインにとっても重要であるのは論を待たないが、新たに見出された細胞内膜系を介したカルパイン機能は、難渋する生理機能解明へのプレイクスルーとして期待が寄せられる。本稿では、最近の研究成果を中心に、これらの新展開について紹介する。

### 2. カルパインの構造・機能<sup>1,2)</sup>

カルパインは、既知の全多細胞生物の他、一部の酵母や細菌など単細胞生物にも存在し、多種多様なサブクラスからなるスーパーファミリーを形成する。哺乳類では発現様式の異なる14遺伝子、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では1遺伝子のみが存在する (図2)。活性サブユニットの典型的構造は、N末端の調節ドメイン (I) 及び  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を有する三つのドメイン (プロテアーゼ活性ドメイン (II)、リン脂質・ $\text{Ca}^{2+}$  と相互作用するC2様ドメイン (III)、五つのEF-ハンドモチーフを持つPEFドメイン (IV)) から構成される。C2様又はPEFドメインが重複、或いは他に置換した分子種も存在する。後述する  $\mu$ -及び  $m$ -カルパインの活性サブユニット ( $\mu$ CL/カルパイン1及び  $m$ CL/カルパイン2)、 $n$ CL-2/カルパイン8aは前者に、酵母 *Cpl1/Rim13* とその哺乳類ホモログ *PalBH/カルパイン7* は後者に属す。カルパインのモジュレーター機能の重要性は、 $m$ CL 遺伝子 (*Capn2*) 欠損マウスが胚性致死となること、ヒト *p94* (カルパイン3a) 遺伝子 (*CAPN3*) 変異が肢帯型筋ジストロフィー2A型を引き起こすこと、ヒトカルパイン10遺伝子 (*CAPN10*) 多型が2型糖尿病発症危険度に関与すること、酵母 *CPL1* 欠損でアルカリ・塩耐性不全となることなどから、遺伝学的に明確である。即ち、カルパインの機能不全が病態と密接に関係し、治療・診断面でも注目されている。

近年解明されたカルパインの立体構造などから、カルパインの厳密な活性制御の一部が明らかとなった。カルパインは通常、活性ドメインが開裂した不活性状態で存在するが、活性ドメインへの2分子の  $\text{Ca}^{2+}$  の結合により構造を変化させ、活性中心を形成して活性化する。活性型カルパインは、内在性カルパイン阻害タンパク質カルパスタチンなどによる制御のもと、細胞内のあらゆる

ヒト

[普遍的カルパイン]

カルパイン制御サブユニット-1 (30K-1, CAPNS1)  
カルパイン制御サブユニット-2 (30K-2, CAPNS2)

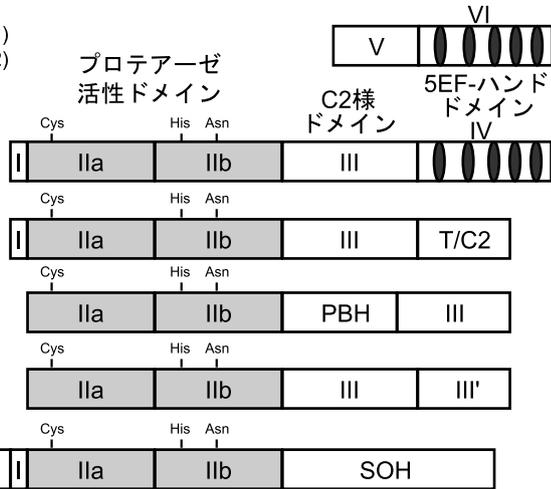
μ-カルパイン活性サブユニット (μCL, CAPN1)  
m-カルパイン活性サブユニット (mCL, CAPN2)  
CAPN13, CAPN14

hTRA-3 (CAPN5)

PalBH (CAPN7)

CAPN10a

SOLH (CAPN15)



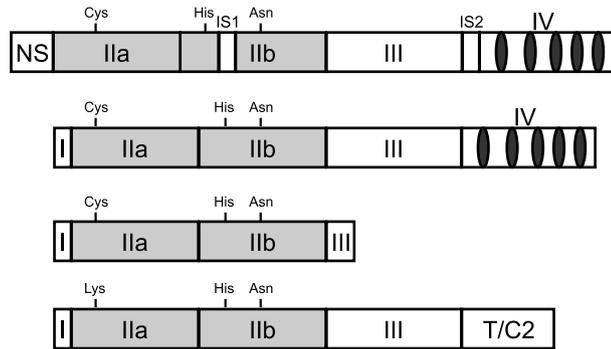
[組織特異的カルパイン]

p94 (CAPN3a)

nCL-2 (CAPN 8a)  
nCL-4 (CAPN 9)  
CAPN11, CAPN12

nCL-2' (CAPN8b)

CAPN6 (CANPX)



酵母 (Saccharomyces cerevisiae)

Cpl1 (Rim13)

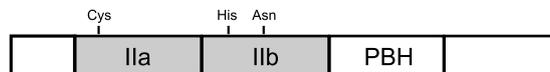


図2 ヒト及び酵母で同定されているカルパイン分子種

μ-, m-カルパインは触媒サブユニット μCL, mCL と制御サブユニット (30K, CAPNS1) とのヘテロ二量体である。ドメインIは活性化の際に自己消化され、Ca<sup>2+</sup>要求性を制御する制御ドメインである。CAPN 3, CAPN 8, CAPN 10 などからは数種のスプライスバリエントが生成するため、a, b, …で区別されるが、ここでは代表的分子種のみを挙げた。カルパイン6の活性中心CysはLysに置換しており、カルパイン14のN/C末端には100残基程の非相同配列が存在する。T/C2: C2ドメインを含むTRA-3 C末端ドメイン相同領域, PBH及びSOH: 各々PalB及びSOLホモログ間で保存されたドメイン。

場で機能すると考えられているが、その時空間的な制御機構は不明確である。

3. オルガネラにおけるカルパインの局在

3-1. ER・ゴルジ体

細胞接着・移動時の細胞骨格の再構成や形態変化にカルパインが関与することから、この時の細胞内局在が検討さ

れた。その結果、グリオーマ細胞のラミニン処理により、PIP<sub>2</sub>生合成量増加に伴い、m-カルパインの擬足及びER・ゴルジ体への移行が観察された<sup>3)</sup>。また、A-549細胞ミクロソーム画分の解析の結果、μ-カルパインはゴルジ体膜に、m-カルパインはER・ゴルジ体膜の両側に存在することが判明した<sup>4)</sup>。m-カルパインには一次配列上のシグナル配列はない。可能性として、構造変化等に伴う内在性シグ

ナル配列形成により内腔へ局在し、ERに標的される基質の切断を行うことが考えられる。重要な点は、カルパインがER・ゴルジ体を介して機能を発揮するだけでなく、少なくとも一部はER・ゴルジ体膜に常在することが明らかにされたことである。

### 3-2. ミトコンドリア

ミトコンドリアにおけるカルパインの存在は、AIF (apoptosis inducing factor) や Bax がカルパインの基質であること、シクロスポリン A 処理により外膜と内膜を結ぶ膜透過性遷移孔を阻害するとカルパイン活性も阻害されることから示唆されていた<sup>5,6)</sup>。SHSY-5Y 細胞の BAPTA-AM 処理により、不活性状態の  $\mu$ -カルパインもミトコンドリアに局在することが示された<sup>7)</sup>。Bax は膜細胞質側で、AIF は膜間腔で切断されることから、ミトコンドリア内のカルパインの存在も示唆された。これらの結果は、カルパインが AIF や Bax の限定分解を介してアポトーシスを調節するという可能性を支持した。

ER は  $\text{Ca}^{2+}$  を貯蔵し、ミトコンドリアでは膜を介したダイナミックな  $\text{Ca}^{2+}$  の流出入が起こることから、これらの細胞内膜系とその近傍は、局所的にカルパインが活性化するのに適した環境と考えられる。よって、カルパインがこれらを足場として機能するというのは合理的であり、様々なカルパイン分子種の膜系での分布に関する今後の解析が興味深い。

## 4. カルパインのメンブレントラフィックへの関与

### 4-1. ER-ゴルジ体-細胞膜間

筆者らは、胃におけるカルパインの機能及び病態との関連の解明を目的に、哺乳類カルパインで唯一胃特異的に発現する nCL-2 の解析を行ったところ、小胞輸送への関与を示唆する結果を得た<sup>8)</sup>。胃は様々な特異的機能を持つ細胞で構成されるが、nCL-2 は胃粘膜の表層粘液細胞 (pit 細胞) に限局的に発現する。pit 細胞の機能は主に粘液分泌による粘膜防御であり、他の胃細胞に比べ極めて短時間のターンオーバーを特徴とする。一方、 $\mu$ -及び m-カルパインは胃粘膜全体に弱く発現することから、nCL-2 が pit 細胞特有の機能に中心的役割を果たすと考えられた。

そこで、nCL-2 相互作用因子の探索を行ったところ、ER-ゴルジ体間の逆輸送を主に担う COP-I 小胞のコートタンパク質 (コートマー) 複合体のサブユニット  $\beta$ -COP を同定した。COS7 細胞発現系を用いて解析を行ったところ、①nCL-2 と内在性  $\beta$ -COP がゴルジ体で共局在する、② $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォア刺激した細胞では  $\beta$ -COP が N 末端ド

メインとリンカー部分との間で 1 箇所限定分解される、③この  $\beta$ -COP 限定分解断片を発現させると細胞質全体に拡散して存在する、ことが明らかとなった。COP-I 小胞コートマーは 7 種存在し、2 種のサブ複合体を形成する。COP-I 小胞の出芽あるいは融合時に、ADP-ribosylation factor-1 (ARF-1) 等の作用によりサブ複合体の会合・解離が起こるが、詳細は不明である。筆者らは、nCL-2 による  $\beta$ -COP 限定分解が COP-I 小胞からコートマー複合体を解離させるというモデル (図 3A) を提唱した。ホルモン分泌顆粒成熟過程において内分泌系細胞のゴルジ体-細胞膜間のコートタンパク質クラスリン・アダプチンが m-カルパインによる限定分解を介して解離するとの報告<sup>9)</sup>もあり、同様のシステムが広く膜輸送系に関与する可能性がある。nCL-2 による COP-I 輸送系制御と pit 細胞特異的機能がどのように結びつくのか、さらに解析する必要がある。

### 4-2. エンドソーム-リソソーム/液胞間

MVB は、積み荷タンパク質 (cargo) をエンドソーム内に取り込む際にエンドソーム膜から小胞が出芽・陥入することで形成される。その際、酵母では Vps ファミリータンパク質から成る ESCRT-I (Vps23, 28, 37), -II (Vps22, 25, 36), -III (Sfn7, Vps2, 20, 24) と呼ばれる 3 種の複合体が重要な役割を果たす。詳しくは総説<sup>10,11)</sup>に譲るが、ユビキチン化された cargo が Vps27 に認識され、エンドソーム膜上で ESCRT-I, -II, Sfn7-Vps20 ESCRT-III サブ複合体の順に受け渡された後、もう一方の ESCRT-III サブ複合体 (Vps2-Vps24) がこれに結合することで、小胞へソートされると考えられている。

酵母カルパイン Cpl1 は、アルカリ環境において、転写因子 Rim101 の C 末端部分を限定分解して活性化させ、アルカリ環境適応に関係する遺伝子の発現を制御する (Cpl1 経路)。その際、機能未知の上流因子 Dfg16, Rim8, 9, 21 の作用により、Cpl1 は、Rim101 の C 末端側結合因子 Rim20 と共に Snf7 ヘリクルートされる。ESCRT-I, -II の各因子、Snf7, Vps20 を欠失させると Rim101 の限定分解が抑制されアルカリ感受性になることから、Cpl1 経路と MVB 経路は ESCRT-I, -II, 及び Snf7, Vps20 を共通の足場とし、エンドソーム膜上において制御されることが明らかとなった<sup>12-14)</sup> (図 3B)。酸性区画であるエンドソームや液胞はアルカリ環境に曝されると機能を損なうため、これらの経路が協力して制御し合うことでうまく外界に適応すると考えられている。

Cpl1 には哺乳類ホモログ PalBH が存在し、Rim, ESCRT 各分子にもホモログが存在して同様の相互作用が



- 1) Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003) *Physiol. Rev.*, **83**, 731–801.
- 2) Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004) *Diabetes*, **53**, S12–S18.
- 3) Hood, J.L., Logan, B.B., Sinai, A.P., Brooks, W.H., & Roszman, T.L. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**, 1200–1212.
- 4) Hood, J.L., Brooks, W.H., & Roszman, T.L. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 43126–43135.
- 5) Gao, G. & Dou, Q.P. (2000) *J. Cell. Biochem.*, **80**, 53–72.
- 6) Polster, B.M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., & Nicholls, D.G. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 6447–6454.
- 7) Garcia, M., Bondada, V., & Geddes, J.W. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1241–1247.
- 8) Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., & Sorimachi, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11214–11224.
- 9) Ohkawa, K., Takada, K., Asakura, T., Hashizume, Y., Okawa, Y., Tashiro, K., Ueda, J., Itoh, Y., & Hibi, N. (2000) *Neuroreport*, **11**, 4007–4011.
- 10) Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerioo, T., & Emr, S.D. (2002) *Dev. Cell*, **3**, 271–282.
- 11) Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., & Emr, S.D. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 413–423.
- 12) Xu, W., Smith, F.J., Subaran, R., & Mitchell, A.P. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5528–5537.
- 13) Hayashi, M., Fukuzawa, T., Sorimachi, H., & Maeda, T. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 9478–9490.
- 14) Boysen, J.H. & Mitchell, A.P. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1344–1353.
- 15) Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T., & Maki, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 39104–39113.
- 16) Katoh, K., Suzuki, H., Terasawa, Y., Mizuno, T., Yasuda, J., Shibata, H., & Maki, M. (2005) *Biochem. J.*, **391**, 677–685.

秦 勝志, 反町 洋之

((財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所  
カルパインプロジェクト)

New biology of calpain in relation with intracellular membrane systems

Shoji Hata and Hiroyuki Sorimachi (Department of Enzymatic Regulation for Cell Functions (Calpain Project), The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science (Rinshoken), 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, Japan)

## リボソームによる異常な翻訳終結の認識と mRNA 品質管理機構

生命現象の基盤となる遺伝子発現の正確性は、細胞の保持する様々な品質管理機構によって保証されている。翻訳の基質となる mRNA の品質はリボソームにより監視され、翻訳終結の異常が引き金となって mRNA の分解が促進される。ナンセンス変異を保持する mRNA は、nonsense-mediated decay (NMD) と呼ばれる特異的分解系によって速やかに分解される。また終止コドンを持たない mRNA (ノンストップ mRNA) も特異的分解系である nonstop mRNA decay (NSD) によって 3' 末端からの分解を受ける。リボソームによる異常な位置での翻訳終結の認識機構と、それに起因する mRNA 分解機構についての最近の研究成果を紹介したい。

### 1. mRNA 分解経路と P-ボディの役割

真核細胞の細胞質における mRNA 分解の主要経路は、mRNA の 3' 末端に存在するポリ(A)鎖の短鎖化によって始まる<sup>1)</sup>。種々のポリ(A)除去酵素(デアデニラーゼ: deadenylase)によってポリ(A)鎖が除去される結果、5' 末端のキャップ構造が除去され、主要なエキソヌクレアーゼである Xrn1p によって、5'→3' 方向の速やかな分解が起こる(図1)。この過程で、ポリ(A)鎖の短鎖化によってデキャッピング(キャップ構造の除去反応)が促進される機構には、幾つかのモデルが提示されてきたが、ポリ(A)鎖の短鎖化により翻訳が抑制され、mRNA が P-ボディに移行し、デキャッピング酵素によりキャップ構造が除去される経路が最も重要であると考えられてきている。この経路に加え、エキソソームによって mRNA の 3' 末端から分解される経路もあり、ここでは ATP 依存ヘリカーゼである Ski 複合体と Ski7 が必須である<sup>2)</sup>(図1)。

P-ボディはプロセシングボディの略であり、デキャッピング酵素である Dcp1-Dcp2 複合体やデキャッピングを促進する因子が細胞質で形成する mRNA-タンパク質凝集体として Parker らによって発見された<sup>3)</sup>。その後の解析から、P-ボディが翻訳抑制と mRNA 分解制御の重要な場であることが、明確になってきた。その後、ヒトをはじめとする他の高等真核生物にも P-ボディとほぼ同様の構造体が発見された。さらに、特定の miRNA によって翻訳抑制される標的 mRNA が、RNA induced silencing complex