

ることにより、特定の Rab に対する GAP の同定も行われた^{15,16)}。例えば、筆者らは Rab27A がメラノソーム輸送に必須であることに着目し、メラノソームの輸送阻害を指標にして Rab27A-GAP の同定に成功している。近い将来、本稿で取り上げた Rab と Rab-GAP の網羅的解析ツールを組み合わせることで、未だ Rab の関与が示唆されていない生命現象（膜輸送）の分子基盤の解明にも取り組んでいきたい。

謝辞

本稿で紹介した Rab27 エフェクターの解析および Rab panel の作成に尽力してくれた研究室のメンバーおよび共同研究者の皆様に感謝致します。

- 1) Zerial, M. & McBride, H. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 107-117.
- 2) Pereira-Leal, J.B. & Seabra, M.C. (2001) *J. Mol. Biol.*, **313**, 889-901.
- 3) Fukuda, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 15373-15380.
- 4) Heo, W.D. & Meyer, T. (2003) *Cell*, **113**, 315-328.
- 5) Haas, A.K., Fuchs, E., Kopajtich, R., & Barr, F.A. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 887-893.
- 6) Fukuda, M. (2005) *J. Biochem.*, **137**, 9-16.
- 7) Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C., & Lambright, D.G. (2005) *Nature*, **436**, 415-419.
- 8) Tsuboi, T. & Fukuda, M. (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 2196-2203.
- 9) Itoh, T., Satoh, M., Kanno, E., & Fukuda, M. (2006) *Genes Cells*, **11**, 1023-1037.
- 10) Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., & de Saint Basile, G. (2000) *Nat. Genet.*, **25**, 173-176.
- 11) Tolmachova, T., Anders, R., Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., Huxley, C., & Seabra, M.C. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 332-344.
- 12) Kuroda, T.S. & Fukuda, M. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1195-1203.
- 13) Tsuboi, T. & Fukuda, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 39253-39259.
- 14) Tsuboi, T. & Fukuda, M. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 2101-2112.
- 15) Itoh, T. & Fukuda, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 31823-31831.
- 16) Fuchs, E., Haas, A.K., Spooner, R.A., Yoshimura, S., Lord, J. M., & Barr, F.A. (2007) *J. Cell Biol.*, **177**, 1133-1143.

福田 光則

(東北大学大学院生命科学研究所生命機能科学専攻
膜輸送機構解析分野)

Specificity and diversity of Rab family GTPases in membrane traffic

Mitsunori Fukuda (Laboratory of Membrane Trafficking

Mechanisms, Department of Developmental Biology and Neurosciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Aobayama, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan)

ADAM ファミリータンパク質のドメイン構造

1. はじめに

各種サイトカイン・増殖因子は膜貫通領域を持つ前駆体として細胞表面に発現された後、細胞外プロテアーゼによる切断により活性化され、細胞間のシグナル伝達を担う。ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリータンパク質はこのような細胞表層でのプロテオリシスに関与する分子として知られ、また他方で細胞外環境でのタンパク質間相互作用にも寄与し、発生・分化の過程や様々な病態への関与が示唆されている一群のタンパク質である。哺乳類 ADAM の多くは分子 C 末端側に膜貫通領域を持つ I 型膜タンパク質で、亜鉛イオンを触媒部位に持つプロテアーゼドメイン、血小板凝集阻害物質ディスインテグリンと相似のドメインなど細胞外に特徴的なドメインを持つモジュラータンパク質である。興味深いことにマムシやハブなどの出血性のヘビ毒には膜型 ADAM の細胞外ドメイン部に相当するタンパク質が数多く存在し、これらは出血による主要な致死因子（出血因子）として知られている。最近、筆者らはヘビ毒由来のこれら哺乳類 ADAM ホモログの X 線結晶構造解析に成功した^{1,2)}。本稿では ADAM ファミリーに共通したドメイン構造について紹介する。

2. ADAM ファミリータンパク質

1992 年に受精の膜融合に関わる分子として最初の哺乳類由来 ADAM, ファーティリンが報告された³⁾。精子先端の細胞膜に発現するこの分子の中には RGD 配列は含まれないものの、ハブなどの出血性ヘビ毒に見出されたディスインテグリンと非常に相同性の高い領域が含まれ、インテグリンを介した精子-卵間相互作用の可能性に興味を持たれた（特徴的な突き出たループ部に RGD 配列を持つディスインテグリンは血小板上の主要なフィブリノーゲン受容体であるインテグリン α Ib β 3 に結合し、インテグリンへのフィブリノーゲン結合を阻害することで血小板凝集を阻

害すると考えられている)。その後、筋管形成に関わる分子としてファティリンと非常に良く似たドメイン構造を持つメルトリンが報告された⁴⁾。これらの分子群について当初想定された膜融合への直接関与は証明されていないが、細胞間相互作用に関わる新規タンパク質分子としてのADAMが特徴付けられた。1997年にはTNF- α 切断酵素(TACE)としてADAM17が報告され^{5,6)}、ADAMは各種の増殖因子前駆体やその受容体等の膜タンパク質細胞外ドメイン(エクストドメイン)を切断遊離(シェディング)する酵素として注目されるようになった。現在までに線虫からヒトに至る多細胞生物および分裂酵母で30種を超えるADAM遺伝子が発見され、その内ヒトでは20種の存在が分かっている⁷⁾。他方、ヘビ毒出血因子は1990年前後から様々な種由来のものについて一次構造の決定が相次いでなされた^{8,9)}。触媒部にコラゲナーゼやサーモリシン等、他の亜鉛エンドペプチダーゼと類似の亜鉛配位配列を持つが、それ以外の部分に配列の相同性が見られない。哺乳類ADAM遺伝子の相次ぐクローニングにより、これらヘビ毒のメタロプロテアーゼが哺乳類ADAMと共通の新規の亜鉛エンドペプチダーゼファミリーを形成することが明らかになった。ファミリーの分子群については両者の由来に基づいてreprolysinあるいはadamalysin、また後述のドメイン構造に由来してMDCタンパク質などとも呼ばれるが、ここでは広く用いられているADAMを用いる。ADAMの亜型として分子内にトロンボスポンジンI型モチーフを持つADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif)ファミリーが知られるが、メタロプロテアーゼドメイン以降の分子C末端側のアミノ酸配列の相同性が低く、現状ではADAMと同等のドメイン構造を持つかが明確ではない。したがって、本稿ではADAMTSについては取り扱わない。

3. ADAMのドメイン構造

ADAMは分子N末端より①プロ(P)ドメイン、②メタロプロテアーゼ(M)ドメイン、③ディスインテグリン(D)ドメイン、④システインリッチ(C)ドメインを共通して持ち、膜結合型では⑤EGF様ドメイン、⑥膜貫通領域、⑦細胞内ドメインが続く(図1)。Pドメインは分子成熟に必要なシャペロンの役割とプロテアーゼを不活性に保つ機能を持つが、分泌過程でMドメインとの境界で切断・除去され、ADAMは活性化される。Mドメインは約200アミノ酸から成り、亜鉛イオンに配位する三つのヒスチジンと活性基として機能するグルタミン酸を含む配列

(HEXXHXXGXXHD)、Metターンと呼ばれる触媒基を基部から支える保存されたメチオニン残基を持つ。不思議なことにヒトを含め約半数の膜結合ADAMでは実はこの配列が変化しプロテアーゼ活性が消失していると考えられるが、これらプロテアーゼ活性を消失したADAMがどのように機能しているかはほとんど分かっていない。Mドメインの下流には約90アミノ酸から成るディスインテグリン様のDドメインが存在する。Dドメインの下流にはシステインに富んだ約100アミノ酸のCドメインが存在するが、既知の配列との相同性がなく、その機能はほとんど知られていない。多くの膜結合型ADAMは約60アミノ酸から成るEGF様のドメインを介して膜貫通領域へと続くが、ヘビ毒ホモログではMDCドメインのみの可溶型で毒腺中に存在する。膜貫通型の分子C末端の細胞内ドメインは配列の保存性が極めて低く、長さも様々であるが、プロリンに富んだSH3結合モチーフやリン酸化部位が存在し、シグナル伝達を介したプロテアーゼ活性の制御が示唆されている。

4. VAPの結晶構造解析

我々は北米産ガラガラヘビ(*Crotalus atrox*)毒よりADAMホモログであるVAP1およびVAP2を精製・結晶化し、X線構造解析を行った^{1,2)}。VAP1はMドメイン同士がジスルフィド結合した二量体であり、VAP2は単量体であるが、基本構造はほとんど同一である。VAPの諸性質についてここでは述べないので原著を参考にして頂きたい¹⁰⁾。VAPは膜結合型ADAMのMDCドメイン相当部分を含み、ヒトの各膜型ADAMとおおよそ40%程度のアミノ酸同一性を持つ。

5. C字型MDCドメイン構造

VAPのX線結晶構造解析から、ADAM分子はM、D、CドメインがアルファベットのC字型に配置した構造を持つことが明らかになった(図2A)。Mドメイン部はヒトADAM33のMドメイン¹¹⁾と基質結合ポケット周辺の若干の違いを除くと主鎖レベルではほぼ同一の構造を持つ。Znイオンを中心とする触媒部はC字型の一端に位置している。D、Cドメイン部分は得られた複数の異なるパッキングの結晶構造の比較から構造的なコアとなる領域とその間の可動部の存在が明らかになり、腕の関節構造に対応させて、ショルダー(D_s)、アーム(D_a)、リスト(C_w)およびハンド(C_h)とサブドメインを定義した。D_s部はMドメイン触媒部の正反対の位置から突き出て、その根元の付

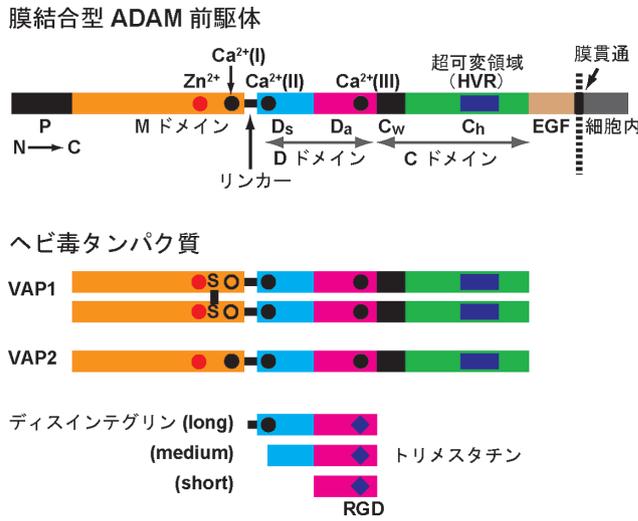


図1 ADAMファミリータンパク質のドメイン構成
各サブドメインを色分けして示す。亜鉛イオンおよびカルシウムイオン結合領域をそれぞれ赤丸、黒丸で示す。VAP1は例外的に202番目のグルタミン酸がリジンに置き換わっており、カルシウムイオン(I)の位置をリジンのアミノ基が占めている。

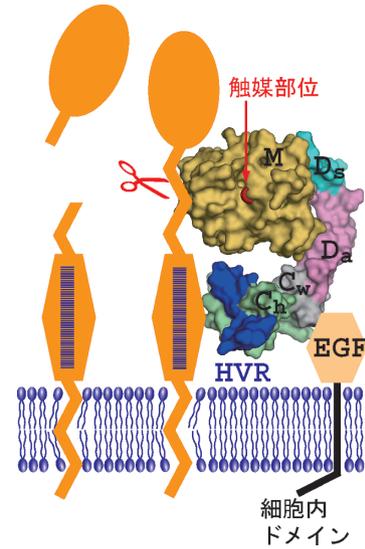


図3 膜結合型ADAMによるエクストドメインシェーディングのモデル
HVRがシェーディングを受ける基質の切断部位以外の領域と結合することで基質認識を行う可能性を模式的に示す。

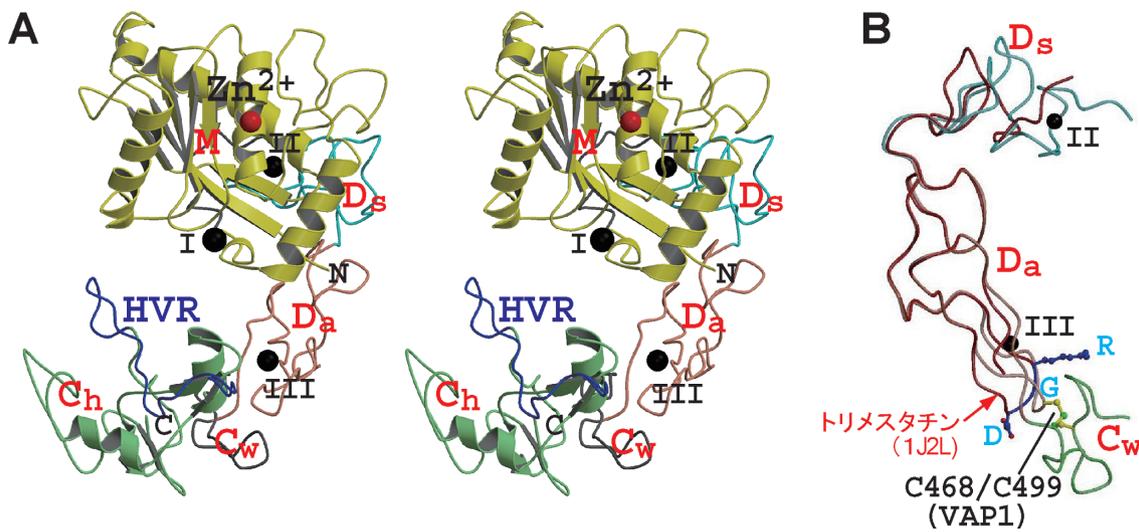


図2 VAP1の結晶構造
A, MDCドメイン構造のステレオ図。VAP1二量体の内的一方を取り出し、糖鎖とADAM間で保存されていないN末端領域を除き、Lys202のアミノ基の位置にカルシウムイオン(I)を置いた図を示す。各サブドメインは図1に対応して色付けし、NおよびC末端位置を示す。B, VAP1のD_s/D_a/C_w部とディスインテグリン、トリメスタチン(1J2L)との重ね合わせ。トリメスタチン(赤)のインテグリン結合部位RGD配列(青)、およびADAM間で保存されたD_s/C_w間のジスルフィド結合を示す。

け根に保存されたカルシウムイオン結合部位 (I) が存在する。D₁ および D₂ 部分はほとんど二次構造を持たず、多数のジスルフィド結合とカルシウムイオンの結合 (結合部位 II および III) により構造形成されており、それらに関わるアミノ酸残基およびその間隔は ADAM 間で非常に高く保存されている。D₂ 部分はディスインテグリン、トリメスタチン¹²⁾ と類似の構造を持つ (図 2B)。前述のようにディスインテグリンは突き出したディスインテグリン (D) ループの RGD 配列を介してインテグリンと結合すると考えられる。一方、ほぼ全ての ADAM において D ループに RGD 配列がなく、代わりに ADAM 間で保存されたシステイン残基を含む。構造解析によりこのシステイン残基は続く C₁ ドメイン内のシステイン残基とジスルフィド結合を形成し、D ループ部分全体も C₁ と相互作用していた (図 2B)。これらのことから ADAM の D ループは直接インテグリンのリガンドとして働く可能性は低いと考えられた。これまで多くの研究が ADAM とインテグリンの相互作用に着目しそれを支持する結果が得られていたことから、ADAM の D ループが直接インテグリンと結合するとの認識が浸透しているが、ADAM とインテグリンの相互作用については再検討が必要であると思われる。

6. 超可変領域 (HVR)

C ドメインについては立体構造においても他のタンパク質との相同性が見出せないことから新規な構造モチーフと考えられた。C ドメインが D ドメインと共役してタンパク質間相互作用に関与するという報告がいくつかあるが、その作用規序は全く不明である。MDC ドメイン部は全体として C 字型を示し、その一端に M ドメインの触媒部位が位置することを述べたが、もう一方の端に C ドメインの一部が位置し、その部分について結晶構造から興味深い点が多くなった。C 字型の末端部に位置する領域は ADAM 間で最も配列が可変で長さも多様な領域であり、我々は超可変領域、HVR (hyper-variable-region) と名づけた。HVR は C₁ の末端部分で比較的平坦な面の中央部を横切り、C 字型の分子構造により M ドメイン触媒部と対面する。詳しくは原著^{1,2)}を参考して頂きたいが、HVR は構造解析を行った全ての結晶において結晶中での隣分子とのパッキングに大きく関わり、その構造はインデューズドフィットによって形成された可能性が高く、逆に溶液中ではフレキシブルなループを形成すると考えられる。先に報告された ADAM10 の DC ドメイン部の結晶構造¹³⁾ と VAP の構造との比較ではアミノ酸レベルの相同性がほとんどな

いに関わらず C ドメイン部も共通の骨格を持つことが明らかになったが、HVR の構造は大きく異なっていた¹⁾。我々は触媒部位と対面した立体配置やタンパク質間相互作用に適した構造的特長から、HVR が異なる ADAM が異なる基質を結合・認識する部位である可能性 (図 3) を提案したが、その実験的な検証は今後の大きな課題となっている。

7. おわりに

ADAM は様々な膜タンパク質のエクトドメインシェディングに関わるが、生理的にどの ADAM がどの基質をどのように見分け切断するか、その分子メカニズムはほとんど不明である。いくつかの基質分子では切断配列が決定されているが、それらには共通配列が認められず、切断配列とは別の基質特異性を決める要因の存在が示唆されている。不活性 M ドメインを有する ADAM の存在について触れたが、活性型 M ドメインを持つ ADAM においても翻訳後のプロセッシングにより P ドメインのみならず M ドメインや D ドメインを欠いた多様な分子種が細胞膜上に存在して機能していることが示され、シェダーゼ以外の ADAM の機能、特にタンパク質間相互作用分子としての機能にも興味を持たれる。ヘビ毒ホモログの結晶構造より得た新しい知見により今後 ADAM 研究が進展することを期待したい。

- 1) Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., & Araki, S. (2006) *EMBO J.*, 25, 2388-2396.
- 2) Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., & Takeda, S. (2007) *FEBS Lett.*, 581, 2416-2422.
- 3) Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., & White, J.M. (1992) *Nature*, 356, 248-252.
- 4) Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y., & Fujisawa-Sehara, A. (1995) *Nature*, 377, 652-656.
- 5) Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., & Cerretti, D.P. (1997) *Nature*, 385, 729-733.
- 6) Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahl, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Warner, J., Willard, D., & Becherer, J.D. (1997) *Nature*, 385, 733-736.
- 7) Seals, D.F. & Courtneidge, S.A. (2003) *Genes Dev.*, 17, 7-30.
- 8) Takeya, H., Miyata, T., Nishino, N., Omori-Satoh, T., &

- Iwanaga, S. (1993) *Methods Enzymol.*, **223**, 365–378.
- 9) Fox, J.W. & Serrano, S.M. (2005) *Toxicon*, **45**, 969–985.
- 10) Masuda, S., Hayashi, H., & Araki, S. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **253**, 36–41.
- 11) Orth, P., Reichert, P., Wang, W., Prosise, W.W., Yarosh-Tomaine, T., Hammond, G., Ingram, R.N., Xiao, L., Mirza, U. A., Zou, J., Strickland, C., Taremi, S.S., Le, H.V., & Madison, V. (2004) *J. Mol. Biol.*, **335**, 129–137.
- 12) Fujii, Y., Okuda, D., Fujimoto, Z., Horii, K., Morita, T., & Mizuno, H. (2003) *J. Mol. Biol.*, **332**, 1115–1122.
- 13) Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P., Himanen, J.P., Lackmann, M., & Nikolov, D.B. (2005) *Cell*, **123**, 291–304.

武田 壮一

(国立循環器病センター研究所心臓生理部)

Domain structure of ADAM family proteins
Soichi Takeda (Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

小胞体ストレス (ER ストレス) シグナリングの膵臓β細胞における役割

はじめに

小胞体は分泌型タンパク質の生合成に重要な細胞内小器官である。新規に産生された分泌型タンパク質は小胞体内で正しい立体構造に折りたたまれて、初めてその生理学的な機能を果たすことができる。この過程は「フォールディング」と呼ばれる。膵β細胞で産生され分泌されるインスリンは、β細胞の小胞体でフォールディングを受ける主要なタンパク質である。小胞体におけるフォールディングは、様々な環境要因や遺伝要因によって妨げられる可能性がある。その結果、異常な構造のタンパク質が蓄積し、小胞体内の恒常性が損なわれることは、小胞体ストレス (ER ストレス) と定義されている¹⁾。近年、小胞体ストレスが、糖尿病におけるβ細胞の機能障害、細胞死に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。しかしながら、小胞体ストレスシグナリングのβ細胞における役割が進むにつれ、このシグナリングが実際はβ細胞の正常な機能維持に重要な役割を果たしており、病的にシグナルの活性化度が高まった時に初めて、β細胞死、機能障害が起きることが明らかになってきた。本稿では、β細胞における小胞体ストレスシグナリングの生理学的、病理学的な役割

について概説する。

1. 小胞体ストレスシグナリング (ER stress signaling)

小胞体はフォールディングを行うシステムを有すると同時に、フォールディングの異常を監視し、異常タンパク質を取り除くシステムもあわせ持っている。この小胞体ストレスに適応するシステムは「unfolded protein response (UPR)」と呼ばれる。UPRは三つの要素から成り立っている。(1)フォールディングに必要な遺伝子の転写を上げること、(2)タンパク質合成を抑制すること、(3)異常タンパク質を分解すること、の三つである。これらの適応反応は、小胞体に存在するキナーゼ IRE1 (inositol requiring 1), PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) によって主に制御されている。また、それに加えて、ATF6, OASIS, CREBH といった小胞体内に存在する分子が、IRE1, PERK によって制御されるシグナリングを強化していると考えられている。それでは、β細胞における小胞体ストレスシグナリングの生理学的な役割はどのようなものであろう。

2. 小胞体ストレスシグナリングのβ細胞における生理学的な役割

膵β細胞は、インスリンの合成、分泌に特化した細胞であり、血糖値を制御するのに重要な役割を果たしている。食後高血糖時には、血糖値を低下させるためにβ細胞はインスリンを分泌するが、それと同時に細胞内でのインスリン合成も活性化される。小胞体は、このインスリン合成において重要な役割を果たしている。インスリンの前駆体であるプレプロインスリンがまず細胞質で翻訳合成され、それとほぼ同時に、このプレプロインスリンは小胞体内に運びこまれる。この際に、プレプロインスリンは、プロインスリンへと変わる。小胞体内で、プロインスリンは正しい立体構造へと折りたたまれる。未熟な立体構造をしていたプロインスリンは、三つのS-S結合が正しく形作られ、正しい立体構造を獲得することで、成熟したプロインスリンに生まれ変わる。正しい形に折りたたまれたプロインスリンはさらにゴルジ体を経て分泌顆粒へと送られ、高血糖時に細胞外へと分泌される。ヒトの血糖値を正常な値に保つため、β細胞内でのインスリン合成は非常に精密に制御されているが、小胞体ストレスシグナリングは、インスリン合成の制御において重要な役割を果たしている。小胞体ストレスに対する適応反応である UPR における最も重要な二つの酵素 IRE1 および PERK は、膵ランゲルハ