

- Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., & Nabeshima, Y. (1997) *Nature*, **390**, 45–51.
- 4) Kurosu, H. & Kuro-o, M. (2009) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **199**, 72–78.
- 5) Nabeshima, Y. (2009) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.*, **85**, 125–141.
- 6) Tohyama, O., Imura, A., Iwano, A., Freund, J.N., Henrissat, B., Fujimori, T., & Nabeshima, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 9777–9784.
- 7) Cha, S.K., Ortega, B., Kurosu, H., Rosenblatt, K.P., Kuro-o, M., & Huang, C. L. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9805–9810.
- 8) Hayashi, Y., Horibata, Y., Sakaguchi, K., Okino, N., & Ito, M. (2005) *Anal. Biochem.*, **345**, 181–186.
- 9) Hayashi, Y., Okino, N., Kakuta, Y., Shikanai, T., Tani, M., Narimatsu, H., & Ito, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 30889–30900.
- 10) Noguchi, J., Hayashi, Y., Baba, Y., Okino, N., Kimura, M., Ito, M., & Kakuta, Y. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **374**, 549–552.
- 11) Dvir, H., Harel, M., McCarthy, A.A., Toker, L., Silman, I., Futerman, A.H., & Sussman, J.L. (2003) *EMBO Rep.*, **4**, 704–709.
- 12) Alattia, J.R., Shaw, J.E., Yip, C.M., & Prive, G.G. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 17394–17399.
- 13) Atrian, S., Lopez-Vinas, E., Gomez-Puertas, P., Chabas, A., Vilageliu, L., & Grinberg, D. (2008) *Proteins*, **70**, 882–891.
- 14) Yildiz, Y., Matern, H., Thompson, B., Allegood, J.C., Warren, R.L., Ramirez, D.M., Hammer, R.E., Hamra, F.K., Matern, S., & Russell, D.W. (2006) *J. Clin. Invest.*, **116**, 2985–2994.
- 15) Pelled, D., Trajkovic-Bodenec, S., Lloyd-Evans, E., Sidransky, E., Schiffmann, R., & Futerman, A.H. (2005) *Neurobiol. Dis.*, **18**, 83–88.
- 16) Beutler, E., Beutler, L., & West, C. (2004) *J. Lab. Clin. Med.*, **144**, 65–68.
- 17) Kitatani, K., Sheldon K., Anelli, V., Jenkins, R.W., Sun, Y., Grabowski, G.A., Obeid, L.M., & Hannun, Y.A. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 12979–12988.

林 康広<sup>1</sup>, 沖野 望<sup>1</sup>, 伊東 信<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門,

<sup>2</sup>九州大学バイオアーキテクチャーセンター  
生物機能デザイン部門

A novel metabolic pathway of glucosylceramide that involves Klotho-related protein KLRP

Yasuhiro Hayashi<sup>1</sup>, Nozomu Okino<sup>1</sup>, and Makoto Ito<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University; <sup>2</sup>Bio-Architecture Center, Kyushu University, 6–10–1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan)

## ブレオマイシン水解酵素の新たな役割

### 1. はじめに

ブレオマイシン水解酵素 (bleomycin hydrolase ; BH) は、梅沢らが単離した抗腫瘍性糖ペプチドのブレオマイシン (bleomycin ; BLM) のアミド結合を水解して薬効を失わせる酵素として発見された。本酵素は生物界に普遍的に分布し、主要組織適合抗原クラス I 分子によって提示される抗原ペプチドのプロセッシング<sup>1)</sup>、ホモシステインチオラクトンの代謝<sup>2)</sup>、アルツハイマー病の病因であるアミロイドβペプチドの分解<sup>3)</sup>等の細胞内タンパク質代謝への関与が推定されている。一方、BH ノックアウトマウスの解析<sup>4)</sup>では、胎生致死ではないが約 36% が新生児期に原因不明で死亡し、生存した新生児マウスには角化症の一種である魚鱗癬に類似した皮膚症状や尾に炎症や壊死が認められた。これらの結果は、BH が皮膚において重要な機能を担っている可能性を強く示唆している。本稿では、表皮の天然保湿因子 (natural moisturizing factor ; NMF) であるアミノ酸の生成経路で鍵酵素として機能する BH の新たな役割について概説したい。

### 2. BH とはどんな酵素か

我々は、BH の構造と機能に興味を持ちラットの遺伝子の解析と発見、内在性基質の探索、ELISA 法によるラット組織中の濃度測定や疾患との関連等の研究を行ってきた<sup>3,10–12)</sup>。BH はパパイナファミリーに属し、細胞質に存在する分子量約 280kDa の中性システインプロテアーゼであり、アミノ酸残基数 455 から成る同一のサブユニット 6 個が会合したホモ六量体構造の酵素である。ヒト BH 遺伝子は 17 番染色体の 17q11.1–11.2 に位置しており、12 のエキソンから成る<sup>5)</sup>。その 5'-フランキンゲ領域の配列には、TATA ボックスや CCAAT ボックスのような転写因子結合配列がなく、高 GC 含量であるなど、ハウスキーピング遺伝子の特徴を有している。また、BH 遺伝子の一塩基多型 A1450G は C 末端の 443 番目の Ile が Val となるミスセンス変異で、その G/G ホモ接合体は非アポ E4 型弧発性アルツハイマー病患者で有意に多く見られるという報告がある<sup>6)</sup>。

ヒトおよび酵母 BH の構造は、X 線結晶解析の結果より

中心部に孔が開いたリング状であり、活性中心が孔の内部に存在する。さらに、構造的特徴が20Sプロテアソームと非常に良く類似しており、self-compartmentalizing enzymeファミリーの一つに分類されている<sup>7)</sup>。BHは*in vitro*でプロリンを除くアミノ酸のβ-ナフチルアミド誘導体や様々なペプチドを分解するアミノペプチダーゼ活性を有する<sup>8)</sup>。また、一部のペプチド基質においてはエンドペプチダーゼ活性<sup>3,9)</sup>、酵母BHのGal6ではカルボキシペプチダーゼ活性やペプチドリガーゼ活性も報告されている<sup>9)</sup>。

BHは全ての組織に普遍的に存在し、特に、皮膚に最も高濃度に含まれ、免疫組織化学染色でラット皮膚の毛包と表皮顆粒層が強く染色される。また、一部の皮膚がんや前がん病変部位ではBHの染色が減少することから、BLMが分解されることなく病変部に作用できるものと考えてい

る。したがって、BHが高濃度に存在する皮膚組織では、BLMの代謝以外にも生理的に重要なタンパク質のプロセシングに機能している可能性が強く示唆される。

### 3. 表皮NMFアミノ酸の産生におけるBHの新たな役割

#### (1) フィラグリンは表皮NMFアミノ酸の源である

皮膚のNMFアミノ酸は角質細胞内にあり、水溶性の成分で吸湿性がきわめて高く、一度水分をとらるとなかなか離さない性質を持っている。特に、角質層の柔軟性を保持するのに大きな役割を担っている。NMFの組成は、40%がアミノ酸、12%がヒスチジン誘導体のピロリドンカルボン酸であり、それらの多くは脱イミノ化フィラグリン分子に由来する。フィラグリンは、表皮の分化やバリア機能の維持に重要なタンパク質で、表皮細胞の分化過程で

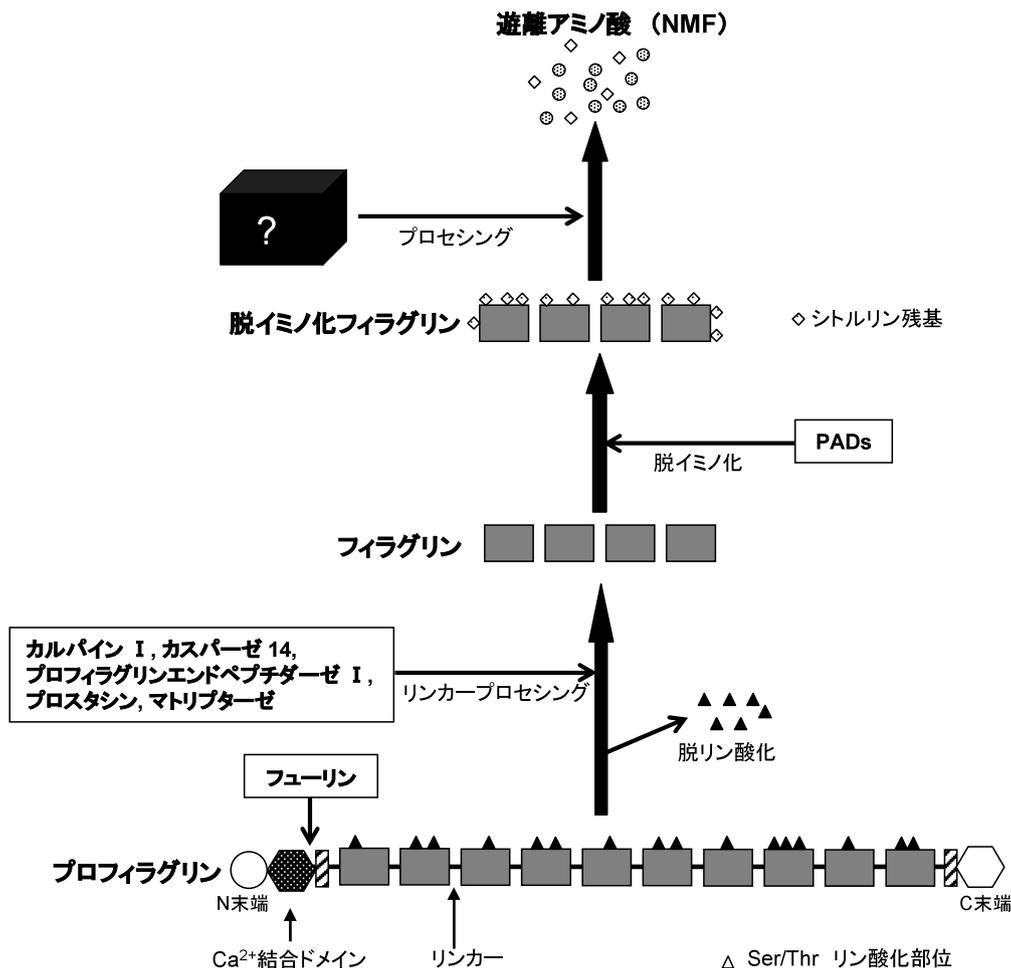


図1 推定されているプロフィラグリンからNMFアミノ酸の産生機構  
ブラックボックスはこれまで不明であった分解過程を示す。

合成される前駆体の高分子量プロフィラグリンに由来する。合成後のプロフィラグリンは、フィラグリン単量体がリンカー部分で10~12個つながった繰り返し構造をしており、高度にリン酸化されている。それは表皮細胞の分化に伴い、脱リン酸化され、個々のフィラグリン単量体へとプロセシングされる<sup>13)</sup>。それらはさらにペプチジルアルギニンデアミナーゼ (peptidylarginine deiminases ; PADs) によって脱イミノ化された後、NMFとして機能するアミノ酸にまで完全分解されて、表皮に潤いを与える (図1)。この過程においてPADによる脱イミノ化は、タンパク質やペプチド中のアルギニン残基をシトルリン残基へと変換し、アルギニン残基の強い陽性荷電を消失させることで、タンパク質の立体構造や分子間相互作用をダイナミックに変化させる<sup>14)</sup>。この翻訳後修飾反応が、表皮細胞の最終分化の過程でフィラグリンをアミノ酸まで分解するのに重要であると推定されている。

プロフィラグリンからフィラグリンへのプロセシングに関わる候補酵素については、既にいくつかの報告がある (図1)<sup>13,15)</sup>。代表的なものに、フィラグリンのN末端S-100タンパク質を遊離するフェーリン、フィラグリン単量体間のリンカー部分の切断に関与するカルパインIやプロフィラグリンエンドペプチダーゼIが同定されている。また近年では、ノックアウトマウスを用いた解析から、マトリプターゼ/MT-SP1、プロスタシン/チャンネル活性化セリンプロテアーゼ1/Prss8、カスパーゼ14等もプロフィラグリンからフィラグリンへのプロセシングに関与すると推定

されている。一方、脱イミノ化されたフィラグリンの分解過程に関しては、これまで全く不明であった。

## (2) 脱イミノ化フィラグリンの最終分解機構におけるBHの役割

我々は、脱イミノ化フィラグリンをペプチドへと限定分解するプロテアーゼの探索を行った結果、プロフィラグリンのリンカー部分の分解に関わるカルパインIとカスパーゼ14 (図1) が非常に効率良く分解することを見出した。しかし、それらの反応生成物の質量分析の結果、脱イミノ化フィラグリンはカルパインIにより多くの小さなフラグメントまで分解されるが、カスパーゼ14によっては限定分解であった<sup>8)</sup>。次に、これらの酵素によって分解された脱イミノ化フィラグリンのペプチド混合物からシトルリンを遊離できるシトルリンアミノペプチダーゼ (citrulline aminopeptidase ; CAP) 活性を持つ酵素の探索を行った。そして、シトルリン-MCA 基質を用いた二層蛍光ザイモグラフィ法によって、新生児ラット皮膚抽出液中に中性pH付近で単一の強いバンドを示す酵素を検出した。そのCAP活性を指標としてCAPを精製し、精製酵素のトリプシン消化ペプチドのN末端アミノ酸配列解析を行った結果、それは、BHのアミノ酸配列に完全に一致することがわかった。これらの結果は、BHが表皮においてCAP活性を持つ主要な酵素であり、脱イミノ化フィラグリンの分解ペプチドからシトルリン遊離に直接関与していることを強く示唆した。このことはまた、免疫組織化学染色では、BHがフィラグリンと顆粒層に共存していたことや<sup>8)</sup>、BH

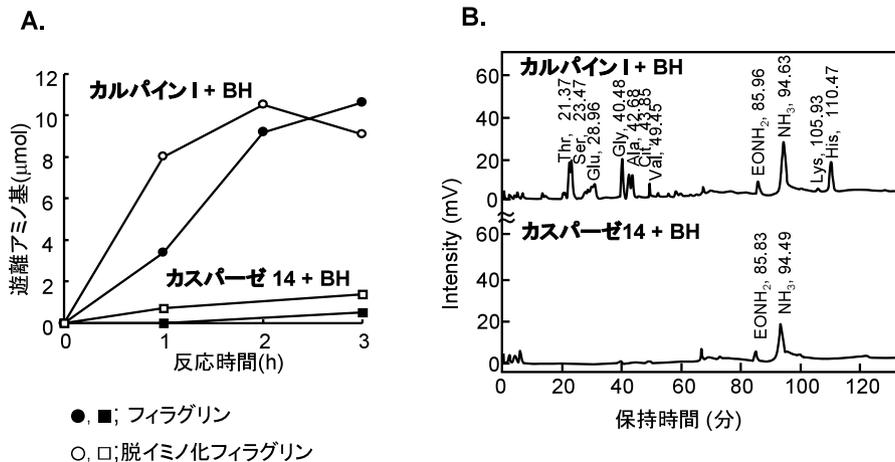


図2 脱イミノ化フィラグリンをカルパインIまたはカスパーゼ14で分解したペプチド産物からBHによって遊離したアミノ酸の検出

- (A) フルオレサミンを用いたポストラベル法による遊離アミノ酸の検出。  
 (B) アミノ酸分析法による検出。

が脱イミノ化フィラグリンを直接分解できないことから支持された。

実際に、カルパイン I により分解された脱イミノ化フィラグリンのペプチド混合物に BH を加えると、経時的にシトルリンを含む種々のアミノ酸が遊離した。一方、カスパーゼ 14 により分解されたペプチド混合液からはアミノ酸がほとんど遊離されなかった (図 2)。このように、CAP 活性は脱イミノ化フィラグリ由来のペプチドからシトルリンを遊離するのに必須であることから、BH は表皮 NMF であるアミノ酸を生成するための鍵酵素であると考えられる (図 3)<sup>8,15)</sup>。

#### 4. おわりに

BH はハウスキーピング遺伝子の特徴を有し、全ての組織に普遍的に発現している。本稿で示したように、BH は

正常表皮における脱イミノ化フィラグリから NMF アミノ酸の生成に重要であることなど、生体の恒常性を維持するために重要な数々の生理機能を担っており非常に興味深い。近年、フィラグリンの遺伝子変異が NMF 産生低下や表皮のバリア破壊を引き起こし、尋常性魚鱗癬やアトピー性皮膚炎の病因の一つになりうると考えられている<sup>13,15)</sup>。フィラグリ分解の鍵酵素である BH は正常な表皮バリア形成に関与し、上記のような皮膚疾患の発症メカニズムにも関係している可能性がある。現在、我々はそれらを含め BH の真の生理機能を明らかにするために研究を進めている。

#### 謝辞

PAD およびフィラグリン発現ベクターを供与いただきました茨城大学農学部の高原英成教授、皮膚の免疫組織化

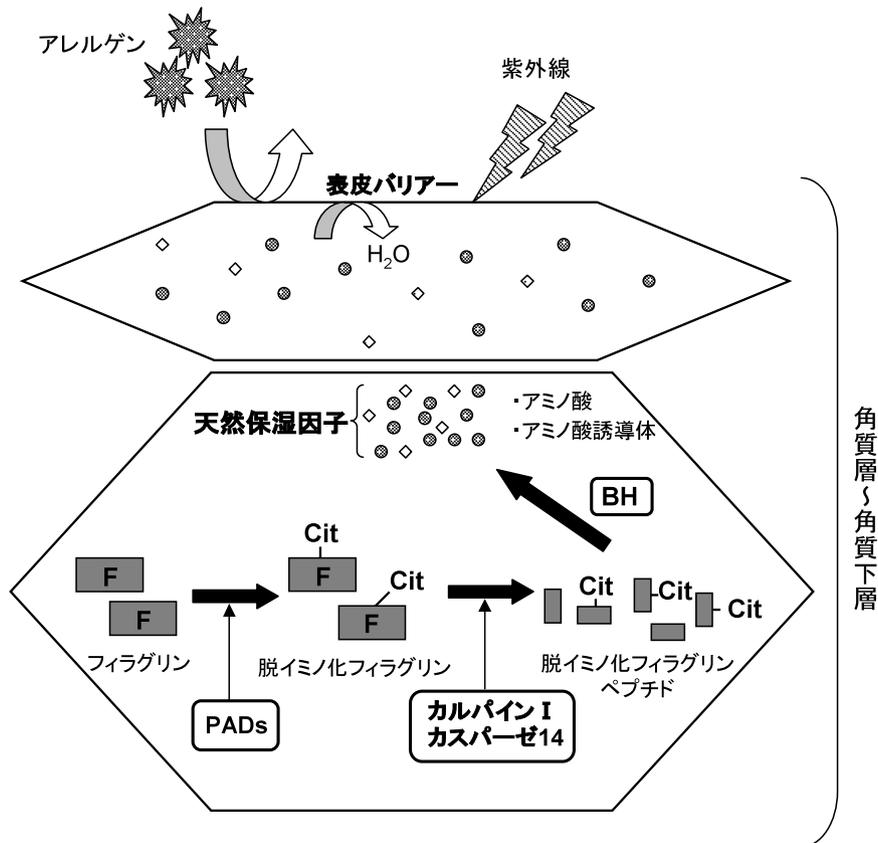


図 3 表皮細胞におけるフィラグリンの分解と NMF アミノ酸の産生機構のモデル  
表皮細胞の分化に伴い、フィラグリン (F) が PAD によって脱イミノ化され、シトルリン残基 (Cit) が生成する。それらは、カルパイン I とカスパーゼ 14 による分解を受けてペプチドとなった後、BH が作用して角質層で NMF として機能するアミノ酸とその誘導体となる。(文献 15 の図を一部改変)

学およびアミノ酸組成解析にご助力をいただきました(株)資生堂リサーチセンターの日比野利彦博士, 野村淳子氏, 東京医科大学大学院生の山本真実先生に感謝致します。また, 本研究の機会を与えて下さいました北里大学大学院医療系研究科生体制御生化学研究室内の石原和彦教授に深謝申し上げます。

- 1) Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schröter, C., Thompson, M.W., Hersh, L.B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., & Schild, H. (2000) *Nat. Immunol.*, **1**, 413-418.
- 2) Zimny, J., Sikora, M., Guranowski, A., & Jakubowski, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 22485-22492.
- 3) Kajiya, A., Kaji, H., Isobe, T., & Takeda, A. (2006) *Protein Pept. Lett.*, **13**, 119-123.
- 4) Schwartz, D.R., Homanics, G.E., Hoyt, D.G., Klein, E., Abernethy, J., & Lazo, J.S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 4680-4685.
- 5) Ferrando, A.A., Pendás, A.M., Llano, E., Velasco, G., Lidereau, R., & López-Otín, C. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 33298-33304.
- 6) Montoya, S.E., Ferrell, R.E., & Lazo, J.S. (1997) *Cancer Res.*, **57**, 4191-4195.
- 7) O'Farrell, P.A., Gonzalez, F., Zheng, W., Johnston, S.A., & Joshua-Tor, L. (1999) *Structure*, **7**, 619-627.
- 8) Kamata, Y., Taniguchi, A., Yamamoto, M., Nomura, J., Ishihara, K., Takahara, H., Hibino, T., & Takeda, A. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 12829-12836.
- 9) Zheng, W., Johnston, S.A., & Joshua-Tor, L. (1998) *Cell*, **93**, 103-109.
- 10) Kamata, Y., Itoh, Y., Kajiya, A., Karasawa, S., Sakatani, C., Takekoshi, S., Osamura, R.Y., & Takeda, A. (2007) *J. Biochem.*, **141**, 69-76.
- 11) Takeda, A., Higuchi, D., Yamamoto, T., Nakamura, Y., Masuda, Y., Hirabayashi, T., & Nakaya, K. (1996) *J. Biochem.*, **119**, 29-36.
- 12) Takeda, A., Nonaka, M., Ishikawa, A., & Higuchi, D. (1999) *Arch. Dermatol. Res.*, **291**, 238-240.
- 13) McGrath, J.A. & Uitto, J. (2008) *Trends Mol. Med.*, **14**, 20-27.
- 14) Méchin, M.C., Sebbag, M., Arnaud, J., Nachat, R., Foulquier, C., Adoue, V., Coudane, F., Duplan, H., Schmitt, A.M., Chavanas, S., Guerrin, M., Serre, G., & Simon, M. (2007) *Int. J. Cosmet. Sci.*, **29**, 147-168.
- 15) Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., & McLean, W.H. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 1285-1294.

鎌田 弥生<sup>1</sup>, 武田 篤<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>北里大学大学院医療系研究科生体制御生化学研究室)

(<sup>2</sup>相模女子大学大学院栄養科学研究科生化学研究室)

New physiological function of neutral cysteine protease bleomycin hydrolase

Yayoi Kamata (Department of Regulation Biochemistry, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, Kanagawa 228-8555, Japan) and Atsushi Takeda (Laboratory of Biochemistry, Graduate School of Nutritional Sciences, Sagami Women's University, 2-1-1 Bunkyo, Sagami-hara, Kanagawa 228-8533, Japan)

## PIKK ファミリータンパク質に結合する Tel2

### 1. はじめに

生物は, 常に様々なストレスと戦いながら生きている。細胞には, 個々のストレスに対して速やかに応答し, 適切に対処して生命を守るしくみが備わっている。すなわち, 個々のストレスに応じたシグナル伝達経路を発達させている。本稿では, 様々なストレスシグナル伝達や生命現象に関わっていることが知られていた PIKK (phosphoinositide 3-kinase-related kinase) ファミリータンパク質と Tel2/Clk-2/Rad-5 ファミリータンパク質が相互作用することによる「意外な」タンパク質ネットワークについて述べる。

### 2. PIKK ファミリータンパク質群は様々なシグナル伝達の中核である

PIKK ファミリータンパク質は, 酵母からヒトまで広く保存されており, 生命維持に必要とされる様々なシグナル伝達において中核的な役割を果たしている<sup>1)</sup>。PIKK ファミリーは, 五つのサブファミリーからなる。例えば, ATM および ATR (ataxia-telangiectasia mutated および ATM and Rad3-related) タンパク質は, DNA 損傷や DNA 複製阻害などの DNA 異常を感知し, それらの異常がなくなるまで一時的に細胞周期を停止させる DNA 損傷チェックポイントあるいは DNA 複製チェックポイントを活性化する。また, TOR/FRAP (target of rapamycin or FKBP-rapamycin-associated protein) タンパク質は, 増殖因子や栄養源に応じたタンパク質合成, 増殖, 分化, 細胞骨格制御などを行う。TRRAP タンパク質 (transformation/transcription domain-