

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¹, 武田 篤²

(¹北里大学大学院医療系研究科生体制御生化学研究室)

(²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¹⁾。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-

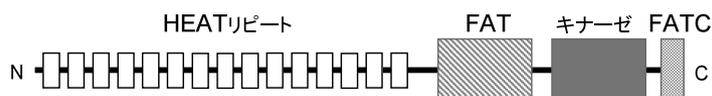


図1 PIKKファミリータンパク質の共通ドメイン構造

associated protein) は、様々な HAT (histone acetyltransferase) 複合体の共通サブユニットであり、HAT 複合体をクロマチン上へリクルートすることによって、様々な刺激に応じた遺伝子発現制御を行う。TRRAP は、DNA 修復や DNA 複製などにも関与していることが知られている。DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) タンパク質は、nonhomologous end-joining (非相同末端結合) による二本鎖 DNA 損傷部位の修復を行う。SMG-1 (suppressor of morphological effect on genitalia-1) タンパク質は、nonsense-mediated mRNA decay (ナンセンス変異をもつ mRNA が細胞内で選択的に分解される機構) に関与している。

PIKK タンパク質は、その名 (PI3K-related kinase) の通り、PI3K (phosphoinositide 3-kinase) の触媒サブユニットと相同性の高いキナーゼドメインを持つ。TRRAP 以外の PIKK タンパク質は、脂質ではなく、アミノ酸であるセリンあるいはスレオニン残基をリン酸化することが知られている。TRRAP ではキナーゼドメインのリン酸化触媒に必要なアミノ酸残基が欠落しているため、TRRAP はリン酸化触媒活性を持たない。PIKK ファミリータンパク質は、キナーゼドメイン以外に FAT (FRAP, ATM and TRRAP), FATC (FRAP, ATM and TRRAP, C-terminus) というドメイン構造を共有している (図1)²⁾。PIKK の N 末端側の長い領域は、一次配列上の相同性は高くないが、HEAT (huntingtin, elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A, and TOR1) ドメインが 40 個以上連なっている³⁾。これらの共通ドメインの機能については、あまり解析が進んでいない。

3. Tel2 ファミリータンパク質は様々な生命現象に関与する

PIKK と同様に、Tel2/Clk-2/Rad-5 ファミリータンパク質も酵母からヒトまで広く保存されており、様々な生命現象に関与していることが知られている⁴⁾。このファミリータンパク質間のアミノ酸配列の相同性は比較的低いが、ほぼ全長にわたって α ヘリックス構造を持つことが予想されている。ヒトでは、DNA 複製チェックポイントや細胞増殖に必要とされる。線虫では、DNA 損傷および複製

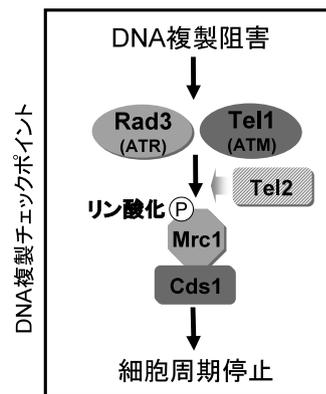


図2 DNA複製チェックポイントにおける分裂酵母Tel2の機能

チェックポイント、DNA 修復、発生や寿命などに関与している。出芽酵母では、染色体末端のテロメア DNA 制御や細胞増殖に必要である。しかし、Tel2 という一つのタンパク質がどのようにして多面的な機能を遂行するのかについては、長い間不明なままであった。

そこで我々は、様々な生命現象の未知なるリンクを探る目的で、分裂酵母における Tel2 の解析を行った⁵⁾。tel2⁺ 遺伝子を欠損させると致死になったことから、分裂酵母の Tel2 は他の生物の場合と同様に、細胞増殖に必須であることがわかった。さらに tel2⁺ 発現抑制株では、DNA 複製阻害条件下における Mrc1 (高等生物 Caspase のホモログであり、Rad3 (ATR ホモログ)/Tel1 (ATM ホモログ) とそれらのターゲット因子 Cds1 をつなぐアダプタータンパク質) のリン酸化 (アダプターとしての活性化) が著しく阻害されていた。従って、Tel2 は DNA 複製チェックポイント経路における Rad3/Tel1 による Mrc1 の活性化に必要であることが明らかになった (図2)。これと同様のことが他の生物においても最近明らかにされている。線虫の Clk-2/Rad-5 (Tel2) は、DNA 損傷/複製チェックポイント経路において ATL-1 (ATR ホモログ) の下流で機能する⁶⁾。ヒトの CLK2 (Tel2) は、ATR と相互作用して DNA 複製チェックポイントの活性化や複製フォークの安定化を促進することが示唆されている⁷⁾。

4. Tel2はすべてのPIKKファミリータンパク質群と相互作用する

分裂酵母におけるDNA複製チェックポイント遺伝子(*rad3⁺*, *tel1⁺*, *mrc1⁺*など)の欠損株は、通常の培養条件では生育可能である。従って、分裂酵母Tel2は線虫のClk-2/Rad-5と同様に、DNA複製チェックポイントの活性化以外の機能も併せ持っていることが推測された。そこで我々は、Tel2と相互作用する因子について解析した。細胞抽出液からTel2タンパク質を免疫沈降し、その免疫沈降物を質量分析によって網羅的に解析したところ、Tel2と特異的に相互作用すると考えられる因子として、分裂酵母のすべてのPIKKファミリータンパク質が検出された⁸⁾。分裂酵母には、ATM/ATRファミリータンパク質であるRad3およびTel1、TORファミリータンパク質であるTor1およびTor2、TRRAPファミリータンパク質であるTra1およびTra2(両者とも未解析)が存在する。Rad3/Tel1は、他の生物と同様にDNA損傷/複製チェックポイントの活性化に必要であり、染色体末端のテロメアDNAの維持にも寄与する。Tor1/Tor2は、栄養源の認識と細胞増殖をリンクする重要な役割を果たしている⁹⁾。PIKKに加えて、Tel2相互作用因子として新規タンパク質Tti1(Tel two-interacting protein 1)およびTti2が検出された⁸⁾。また、Tor1あるいはTor2と相互作用する因子を質量分析によって同様に解析したところ、いずれの場合においてもTel2やTOR複合体サブユニットは検出されたが、他のPIKKタンパク質は検出されなかった⁸⁾。以上のことから、Tel2はすべてのPIKKおよびTti1、Tti2と相互作用することが明らかになった(図3)。

我々の発見と同時期に、ほ乳類細胞においてもTel2がすべてのPIKKと相互作用することが報告された¹⁰⁾。さら

に、出芽酵母のTel2がTel1(ATMホモログ)と相互作用し、Tel1の活性化に寄与していることが報告された¹¹⁾。これらのことから、Tel2とPIKKで構成されるタンパク質相互作用ネットワークは、酵母からヒトまで広く真核生物において保存されていることが明らかになった。また、ほ乳類細胞において、Tel2はPIKKとは相互作用するが、PI3Kとは相互作用しないことが示唆された¹⁰⁾。

5. Tel2-PIKKタンパク質ネットワークの生理学的意義

それでは、Tel2はすべてのPIKKと相互作用することによってどのような機能を果たしているのでしょうか？これまでの解析から、Tel2の発現を抑制したり、Tel2機能に異常が生じたりすると、少なくとも一部のPIKKの機能が失われることがわかっている。従って、Tel2はPIKKの機能を正に制御する因子であると考えられる。そうならば、分裂酵母の*tel2*遺伝子破壊株の致死性は、*tor2*遺伝子破壊株の致死性によって説明できるかもしれない¹²⁾。また、線虫における*clk-2*変異株の寿命異常は、*let-363*(*Ce-Tor*)発現抑制株の寿命異常で説明できるかもしれない¹³⁾。

マウス細胞において、Tel2の発現を欠失させるとPIKKの発現が徐々に減少することから、Tel2がPIKKタンパク質の安定性に寄与しているというモデルが提唱された⁸⁾。一方、出芽酵母では、*tel2-1*変異株においてTel2とTel1およびMec1(ATRホモログ)双方との相互作用が見られなくなるにも関わらず、DNA損傷応答におけるMec1の機能にはほとんど異常が生じない¹⁴⁾。さらに分裂酵母では、*tel2⁺*発現抑制株においてDNA複製チェックポイント経路におけるRad3/Tel1からMrc1へのシグナル伝達には異常が生じるが、DNA損傷応答におけるRad3/Tel1からChk1(DNA損傷チェックポイント因子)へのシグナル伝

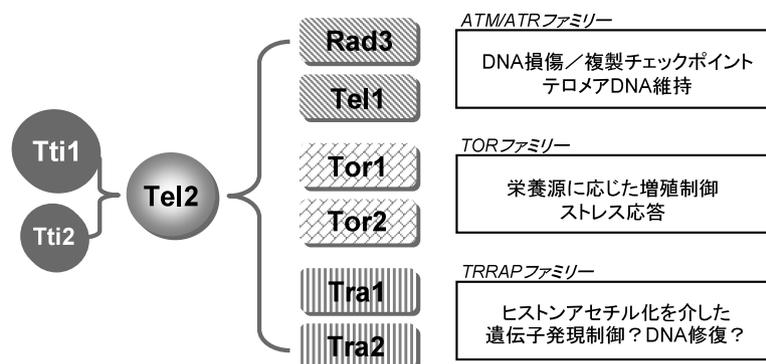


図3 分裂酵母におけるTel2-PIKK相互作用

達はほぼ正常である⁵⁾。これらのことから、Tel2がすべてのPIKKのグローバルな制御因子というわけではなく、それぞれのPIKKに対して異なる制御を行うのではないかと考えられる。その制御の様式は、種によって異なる可能性が考えられ、進化の過程で変化してきたのかもしれない。

6. 今後の展望

これまで、PIKKファミリータンパク質は非常によく似た立体構造を持つにも関わらず、異なるサブファミリーのPIKKは独立に機能すると考えられてきた。しかし、Tel2がすべてのPIKKと相互作用するという発見により、異なるサブファミリーのPIKKが何らかの形でリンクしている可能性が浮上してきた。Tel2が様々なシグナル伝達の中核であるPIKKを統括することには、生物にとってどのような利点があるのだろうか。最近、分裂酵母のTor1がDNA複製阻害に対する応答やテロメアDNA長制御に関わっていることが明らかにされた¹⁵⁾。これは、Tor1の機能がRad3/Tel1の機能と関連している可能性を示唆している。染色体DNAに傷害が起こった際には、増殖を直ちに停止させる必要があり、Rad3/Tel1による細胞周期チェックポイント以外にTor1による増殖制御がそれに関与しているのかもしれない。今後のさらなる解析が期待される。

今のところ、Tel2とPIKKとの結合様式については不明な点が多く残されている。出芽酵母のTel2は、Tel1のFATドメイン付近と相互作用することが明らかにされているが、ほ乳類のTel2は、*in vitro*でATMやmTOR (mammalian TOR)のN末端側のHEATリピート領域の一部と相互作用することが明らかになっており、これについても今後の解析が待たれる^{10,11)}。また、Tel2ではなくTti1あるいはTti2が直接PIKKと結合する可能性も残されており、これまで未知であったPIKKの共通ドメインの機能解明につながるが大いに期待される。

Tel2の機能は徐々に明らかにされてきたが、具体的な分子機能については不明な点が多く残されている。一つの

可能性としては、Tel2がスカフォールドタンパク質のように振る舞うことによって、PIKKが下流のシグナル伝達因子をキャッチしやすくなっているのかもしれない。Tel2が常に安定にPIKKに結合しているのか、あるいはシグナル刺激に応じて結合状態を変化させるのかなど、興味深い問題が山積みである。

- 1) Abraham, R.T. (2004) *DNA Repair*, 3, 883-887.
- 2) Bosotti, R.B., Isacchi, A., & Sonhammer, E.L.L. (2000) *Trends Biochem. Sci.*, 25, 225-227.
- 3) Perry, J. & Kleckner, N. (2003) *Cell*, 112, 151-155.
- 4) Rothman, J.H. (2002) *Curr. Biol.*, 12, R239-R241.
- 5) Shikata, M., Ishikawa, F., & Kanoh, J. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 5346-5355.
- 6) Garcia-Muse, T. & Boulton, S.J. (2005) *EMBO J.*, 24, 4345-4355.
- 7) Collis, S.J., Barber, L.J., Clark, A.J., Martin, J.S., Ward, J.D., & Boulton, S.J. (2007) *Nat. Cell Biol.*, 9, 391-401.
- 8) Hayashi, T., Hatanaka, M., Nagao, K., Nakaseko, Y., Kanoh, J., Kokubu, A., Ebe, M., & Yanagida, M. (2007) *Genes Cells*, 12, 1357-1370.
- 9) Kanoh, J. & Yanagida, M. (2007) *Genes Cells*, 12, 1301-1304.
- 10) Takai, H., Wang, R.C., Takai, K.K., Yang, H., & de Lange, T. (2007) *Cell*, 131, 1248-1259.
- 11) Anderson, C.M., Korkin, D., Smith, D.L., Makovets, S., Seidel, J.J., Sali, A., & Blackburn, E.H. (2008) *Genes Dev.*, 22, 854-859.
- 12) Weisman, R. & Choder, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 7027-7032.
- 13) Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L., & Muller, F. (2003) *Nature*, 426, 620.
- 14) Anderson, C.M. & Blackburn, E.H. (2008) *Cell Cycle*, 7, 3695-3698.
- 15) Schonbrun, M., Laor, D., Lopez-Maury, L., Bahler, J., Kupiec, M., & Weisman, R. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, 29, 4584-4594.

加納 純子

(大阪大学蛋白質研究所)

Tel2, a common partner of PIKK family proteins
Junko Kanoh (Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)