

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 Biochemical Studies on Calpain-7 in the ESCRT System
(ESCRT システムにおけるカルパイン 7 に関する生化学的研究)

氏名 前本 佑樹

論文内容の要旨

Calpain は細胞内システインプロテアーゼであり、細胞内の様々な生理機能に重要である。米国の The Jackson Laboratory での網羅的なノックアウトマウスの解析によると calpain-7 のノックアウトマウスは出生後致死である。したがって calpain-7 は生体内で基本的かつ必須の役割を果たしている可能性が高いが、calpain-7 の生理機能研究の報告はほとんどない。calpain-7 は ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) タンパク質との結合に寄与する MIT (microtubule-interacting and trafficking) ドメインをもつ。ESCRT はエンドサイトーシス経路において、多胞性エンドソーム (MVB, multivesicular body) 形成や細胞表面レセプターの選択的輸送に関与する一群のタンパク質複合体である。MIT ドメインを有するタンパク質である AAA-Type ATPase の VPS4 などは ESCRT と結合することにより働く。そのため calpain-7 も ESCRT と同様に小胞輸送経路での機能が考えられた。本研究は calpain-7 の活性化機構と生理機能の解明を目的として行った。

【1】ESCRT タンパク質との相互作用様式

calpain-7 は MIT ドメインを介して、ESCRT タンパク質の CHMP1B、IST1 と結合し、IST1-CHMP1B 複合体がさらに強固に結合することを見出した。また IST1 とは、すでに MIT ドメインと結合するとの報告がある MIM (MIT-interacting motif) を介して結合したが、CHMP1B との結合は MIM ではない新規結合領域を介することを見出した。

【2】calpain-7 の酵素活性と基質認識

calpain-7 は MIT ドメインを介して種々の ESCRT 関連因子と結合することから、ESCRT タンパク質による calpain-7 の活性化が想定された。多くの calpain は活性化とともに自己消化反応が起こるが、ESCRT 関連因子の TSG101、CHMP7、CHMP1A 等が calpain-7 の自己消化を促進することを世界で初めて見出した。近年 ESCRT 関連因子 ALIX が TSG101 の結合によりコンホメーション変化し、エンドソーム膜に移

行することが報告された。そこで ALIX と calpain-7 の関係について調べたところ、人工的にオープンコンホメーションとなる ALIX Δ C 変異体 (1-660 a.a.) は calpain-7 依存的に限定分解された。また calpain-7 の自己消化が促進される条件において ALIX Δ C の分解量も増加した。以上により、calpain-7 は ALIX 周辺でプロテアーゼ活性を発揮することが明らかになった。calpain-7 の基質認識機構について調べるため、calpain-1、-2 などの細胞内在性阻害タンパク質である calpastatin を ALIX の Bro1 ドメインに融合した人工タンパク質を作製した。この人工タンパク質は calpain-7 の自己消化を阻害するのではなく、calpain-7 により限定分解を受けた。その切断配列は他の calpain が切断する配列とは大きく異なるため、calpain-7 は高度な基質特異性をもつと考えられる。

【3】CHMP1A のリン酸化部位同定

calpain-7 活性化因子の一つである CHMP1A は SDS-PAGE により 2 本のバンドが検出され、それらはともに核、細胞質に局在した。CHMP1A の複数のバンドの原因はリン酸化であり、そのリン酸化部位を同定した。しかし CHMP1A リン酸化部位変異による局在の変化は観察できなかった。calpain-7 の活性化能にも変化がなかったため、現時点でリン酸化の意義については不明であるが、何らかの未知の機能が考えられた。

【4】EGFR 下方制御に対する calpain-7 の影響

EGFR (epidermal growth factor receptor) は細胞の増殖シグナル等を受容するチロシンリン酸化酵素受容体である。細胞外の EGF の濃度が高まると過度なシグナル伝達の抑制のため、EGFR はエンドサイトーシスされ、リソソーム分解に供される。ESCRT は分解の目印としてユビキチンが付加された EGFR を認識し選択的にリソソームへと輸送する。過去の報告では ESCRT 構成因子の TSG101 などの発現抑制により、EGFR の下方制御が抑制されることが明らかになっている。そこで EGFR の下方制御に対する calpain-7 の影響を検討したところ、calpain-7 ノックアウト細胞ではコントロール細胞と比較して顕著に EGFR の分解が遅延した。この分解遅延は野生型 calpain-7 を再び発現させることで回復したが、calpain-7 の活性中心変異体 (calpain-7^{C290S}) を発現させても回復しなかったため、calpain-7 のプロテアーゼ活性が重要であることがわかった。GFP 融合 calpain-7 を利用した細胞内局在解析において、野生型 calpain-7 と比較して不活性型 calpain-7 が EGFR 陽性エンドソームにより集積することが明らかとなった。また calpain-7 と強く結合する ESCRT-III 関連因子 IST1 の発現抑制により、EGFR 陽性エンドソームへの集積が抑えられることから、EGF 刺激に伴う calpain-7 の局在変化に IST1 が重要であることが示唆された。