

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 前 本 佑 樹

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)

### 論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	牧	正 敏
委 員	名古屋大学教授	吉 村	徹
委 員	名古屋大学准教授	柴 田	秀 樹
委 員	名古屋大学講師	花 房	洋
委 員	名古屋大学助教	高 原	照 直

## 論文審査の結果の要旨

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関与している。遺伝子構造の異なる calpain はヒトゲノムに 15 同定されており、タンパク質のドメイン構造や発現様式が異なり、それぞれ特異的機能を果たしていると考えられている。網羅的ノックアウトマウス解析の報告は calpain-7 の機能不全によって出生後致死となることを示しているが、その原因は不明である。calpain-7 は他の典型的 calpain が有する  $\text{Ca}^{2+}$ -結合性 PEF (penta-EF-hand) ドメインをもたないが、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り、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ものである。

**【1】 ESCRT タンパク質との相互作用様式**

前本佑樹は、calpain-7 が MIT ドメインを介して、ESCRT タンパク質の CHMP1B、IST1 と結合すること、および calpain-7/IST1/CHMP1B が 3 者複合体を形成することにより 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、すでに MIT ドメインと相互作用するとの報告がある MIM (MIT-interacting motif) を介して IST1 と結合したが、CHMP1B との結合は MIM ではなく他の領域を介して行われ、MIT ドメインの新たな結合様式の存在を示した。

**【2】 calpain-7 の酵素活性と基質認識**

前本は、ESCRT 関連因子の TSG101、CHMP7、CHMP1A 等が calpain-7 の限定的自己消化を促進することを明らかにした。さらに、ESCRT の補助因子である ALIX の C 末端領域を欠損させると人工的にオープンコンホメーションとなることが報告されているが、ALIX  $\Delta$  C 変異体 (1-660 a.a.) が calpain-7 依存的に限定分解されることを世界で初めて見出した。自己消化活性と非生理的基質限定分解活性に対して ESCRT 因子群は異なる促進 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。これまで calpain-7 の酵素反応測定系がなく、構造-機能相関を解析する手段がなかったが、非生理基質の作出は将来的にさらなる生化学的解析、阻害剤の開発などに貢献すると期待される。

### 【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 のリン酸化状態は calpain-7 の活性化能には影響を与えなかった。

### 【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（下方制御、ダウンレギュレーション）のため、EGFR はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、リソソーム分解に供される。分解の目印としてユビキチンが付加された EGFR を ESCRT が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。そこで前本は、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 ノックアウトマウス由来の胚性線維芽細胞 (Capn7<sup>-/-</sup> MEF) 細胞ではコントロール Capn7<sup>+/+</sup> MEF 細胞と比較して顕著に EGFR の分解が遅延していることを見出した。この分解遅延は野生型ヒト calpain-7 を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<sup>C290S</sup>) 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。

以上、前本は calpain-7 がエンドソーム経路において ESCRT システムを介して機能していることを明らかにし、審査委員会は、本論文が博士(農学)の学位授与に十分な価値があると判断し、合格と判定した。