

主論文の要約

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)

生命農学研究科 応用分子生命科学専攻 応用生命化学講座 前本佑樹

【序文】 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。哺乳類のゲノム上には 15 種の calpain が存在するが、それらはその特徴によって分類される。その 1 つはドメイン構造による分類である。よく研究が進んでいる calpain-1 や calpain-2 などはシステインプロテアーゼドメイン(CysPc)、C2-like ドメイン (C2L) とカルシウム結合領域である penta-EF-hand ドメイン (PEF) を有するが、PEF ドメインを有するものを典型的 calpain、PEF ドメインを有していないものは非典型的 calpain と分類する。非典型的 calpain はそれぞれ特有のドメインをもち、後述する calpain-7 についても MIT ドメインと呼ばれる相互作用領域をもつ。もう 1 つは組織分布による分類である。組織特異的な発現分布を示す calpain は組織特異的に機能することが知られている。代表的な例は、胃腸特異的な calpain-8、9 や骨格筋特異的な calpain-3 などがあげられる。一方、組織普遍的な calpain は細胞死、シグナル伝達、細胞周期など細胞内の機能に関与することが報告されている。calpain-7 もこのグループに属するため、細胞内の基本的な機能に関わる可能性がある。

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 複合体がそれぞれ単独で結合するよりも、calpain-7 にさらに強固に結合することが培養細胞上清を用いた免疫沈降実験および、*in vitro* の結合解析により明らかになった。単量体 GFP を融合した calpain-7 (mGFP-calpain-7) を培養細胞内に発現させると自己消化が観察される。この現象を利用して、CHMP1B、IST1 過剰発現時の calpain-7 の自己消化活性を調べると、それぞれ単独の過剰発現よりも、IST1、CHMP1B 両者を過剰発現させた場合に mGFP-calpain-7 の自己消化が大幅に亢進した。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 関連因子の網羅的に自己消化解析に供したところ、TSG101、CHMP7、CHMP1A 等が calpain-7 の自己消化を促進することを見出した。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。一方 ALIX Δ C 変異体の立体構造より ALIX Δ C 変異体で欠損されている部位が ALIX 中央部に位置する V ドメインの安定性に寄与する可能性が高く calpain-7 による ALIX Δ C 分解は非生理的なものと考えられる。これらの事実から、calpain-7 が ESCRT により活性化され、ALIX 周辺でプロテアーゼ活性を発揮するモデルが想定される。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 calpain-7 ノックアウト細胞に野生型 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。mGFP 融合 calpain-7 を利用した細胞内局在解析において、野生型 mGFP-calpain-7 と比較して不活性型の mGFP-calpain-7^{C290S} 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 と mGFP-calpain-7^{C290S} が EGFR 陽性エンドソームに局在することを明らかにした。この IST1 の EGF 刺激に応じた EGFR 陽性エンドソームへの局在は本研究によって初めて明らかになった。また IST1 発現抑制時の、mGFP-calpain-7^{C290S} の局在を観察したところ、EGFR 陽性エンドソームへの集積が著しく抑制された。このことから 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。