

論文の内容の要旨

論文題目 カルパインの活性化に伴う構造変化とその生理的意義

氏名 中川 和博

カルパインは細胞質内に存在する Ca^{2+} 要求性システインプロテアーゼであり、特定の基質タンパク質の限定分解を通じ、細胞の機能、性質を調節するモジュレーター分子である。しかしその詳細は明確でなく、カルパイン分子種として最も報告の数が多い m-、 μ -カルパインについても、最重要点である生理的基質や活性化機構についての知見が乏しい。

in vitro においてカルパインは多くの分子を基質とするが、その基質特異性のメカニズムに関しては不明で、生理的基質に関してほとんど知見がない。*in vivo* においてカルパインが多くの分子を同時に基質にすることは、細胞にとって危険であると思われ、基質を選別する機構が存在するはずである。

活性化機構に関しては、これまで多くの報告が存在し、統一的理解には至ってはいないものの、良く議論されてきた。しかし、基質選別機構に関してはほとんど報告がなく、本研究ではカルパイン基質選別機構を明らかとすることを目的とした。

m-、 μ -カルパインは活性サブユニット(80K; mCL, μ CL)と調節サブユニット(30K)のヘテロダイマーから成る。80K は自己消化を受けるドメイン I、システインプロテアーゼ領域であるドメイン II、 C_2 ドメイン様構造をしたドメイン III、5つの EF-hand モチーフを有するドメイン IV から成り、30K は Gly に富んだ疎水性領域であるドメイン V、ドメイン IV と相同な 5EF-hand 領域であるドメイン VI から成る(図 1)。

カルパインが *in vitro* で基質を切断するためには、m-カルパインで数百 μM 、 μ -カルパインで数十 μM レベルの Ca^{2+} 濃度を必要とする。これらの濃度は生体内の Ca^{2+} 濃度に比べる

と高すぎるため、カルパインの活性化機構の少なくとも一段階目は、その Ca^{2+} 要求性を低下させるメカニズムであると考えられている。

これまで、 Ca^{2+} 要求性を低下させる活性化機構として、80K N 末端の自己消化や両サブユニットの解離等が提案された。しかし、それらが活性化に必要な点との報告も存在し、活性化との関係は未だ明確でない。

本研究では、カルパイン活性化に対して自己消化等の必要性が異なっていたのは、用いた基質が報告により異なっていたためである可能性を考えた。つまり、基質によって自己消化の要求性が異なるというモデルを考えたわけである。そこで本研究では、自己消化や解離といった構造変化は、カルパイン活性化機構に関わっているというよりは、むしろ基質選択に関わっているという作業仮説をもとに研究を進めた。

具体的には、自己消化やサブユニット解離といった構造変化の、カルパイン活性化への必要性を明らかとし、それら構造変化によってプロテアーゼとしての性質が変化するか検討を行った。

サブユニット解離に関しては、活性中心の変異により活性を失った変異体 m-カルパインが、サブユニットに解離しないという報告も存在し、どういった条件下で解離が起こるのか明らかでなかったため、まずサブユニット解離が起こる条件を検討した。

カルパイン構造変化と、カルパイン活性化機構、また基質選別機構の関係が明らかにならないなか、私たちは共同研究から m-カルパインの Ca^{2+} 非存在下での結晶構造を明らかとした。この m-カルパインの立体構造から、m-カルパインが Ca^{2+} 非存在下で活性が存在しないのは、活性中心が形成されていないためであることが示された。活性ドメインが 2 つのサブドメインに分かれており、活性中心を形成する Cys と Asn、His が離れていることが明らかとなった。 Ca^{2+} 存在下では 2 つのサブドメインが接近し、活性中心を形成すると考えられる。

また、自己消化を受ける mCL N 末端(ドメイン D)は、活性中心を覆っているプロドメインとも考えられていたが、そのような位置にはなく 30K と相互作用していることが明らかとなった。ドメイン I が 30K と相互作用しているということは、自己消化によるドメイン I の切断が、30K とのヘテロダイマー形成に影響を与えることが予想された。ドメイン I の自己消化がサブユニット解離に関係していることが予想されたわけである。

ドメイン I と 30K との相互作用の詳細をみると、Lys7L(mCL の残基をこのように表記) と 30K EF-2 のループ領域に存在する Asp154S(30K の残基をこのように表記)、また、Arg12L と 30K EF-5 の α -ヘリックス中の Glu260S が、それぞれ塩橋を形成していた。m-カルパインの場合、ドメイン I の自己消化は第一段階として Ala9L と Lys10L との間で起こり、第二段階として Gly19L と Ser20L との間で起こることから、第一段階の自己消化により Lys7L と 30K EF-2 との塩橋を失い、第二段階の自己消化によって Arg12L と 30K EF-5 との塩橋を失うこととなる。そこで、実際にドメイン I の自己消化がヘテロダイマー形成、つまりサブユニット解離に影響を与えるかどうかを明らかとするため、自己消化型

と同様にドメイン I 末端を削った自己消化型変異体 mCL: Δ 9、mCL: Δ 19 を作成した。更に、上述した塩橋がドメイン I と 30K との相互作用に重要であるかどうかを解析するために、30K との塩橋を形成しているアミノ酸残基 Lys7L、Arg12L を電荷のないアミノ酸 Leu に置換した、相互作用部位変異体 mCL:K7L、mCL:R12L、mCL:K7L:R12L も作成した。

まず、活性中心を変異させた不活性型変異体 mC105S について、サブユニットに解離するか検討したところ、mC105S は Ca²⁺存在下でも解離しないことが確認された。そこで、ドメイン I の自己消化が、サブユニット解離に必要であるか明らかとするため、自己消化型変異体の不活性型二重変異体を用いて解析を行った。その結果、mC105S: Δ 9 は安定にヘテロダイマーを形成し、Ca²⁺存在下においてもサブユニットに解離しないことが明らかとなった。一方、mC105S: Δ 19 は Ca²⁺依存的なサブユニット解離は検出されなかったが、Ca²⁺非存在下においても安定にヘテロダイマーを形成できなかった。また、mC105S:K7L は mC105S: Δ 9 と同じ結果、mC105S:K7L:R12L は mC105S: Δ 19 と同じ結果が得られた。以上の結果から、ドメイン I と 30K の間の 2 つの塩橋が、これらドメインの相互作用、更にはヘテロダイマー形成に重要であることが明らかとなった。mC105S:R12L を用いた場合は興味深い結果が得られ、mC105S:R12L は Ca²⁺依存的にサブユニットに解離した。mC105S:R12L では、Lys7L と 30K EF-2 との塩橋が残っているが、EF-2 に Ca²⁺が結合することによって、Lys7L と 30K EF-2 との塩橋が破壊されると考えられる。mC105S:R12L は、Ca²⁺存在下では 2 つの塩橋を失うため、安定にヘテロダイマーを形成できなくなり、サブユニットに解離したと考えられる。一方、EF-5 には Ca²⁺が結合しないため、mC105S:K7L は Ca²⁺存在下においても安定にヘテロダイマーを形成したと考えられる。以上の結果から、m-カルパインはドメイン I が 19 アミノ酸まで自己消化し、2 つの塩橋が失われるとサブユニットに解離することが明らかとなった。

次に、m-カルパインのドメイン I 変異体の、プロテアーゼ活性発現に必要な Ca²⁺要求性を解析した。その結果、Lys7L と 30K EF-2 との塩橋が失われた全ての変異体で、Ca²⁺要求性が低下していた。しかし、Ca²⁺依存的にサブユニットに解離する変異体 mR12L の Ca²⁺要求性は、野生型 m-カルパインと完全に一致した。以上の結果からサブユニット解離は、カルパイン活性化には必要ないことが明らかとなった。

更に、ドメイン I の自己消化や、それに続くサブユニット解離によって、基質への反応性が変化するか明らかとするため、自己消化型変異体や、自己消化部位に変異を導入し切断を抑えた変異体を用いて解析した。その結果、ドメイン I の各段階の自己消化や、続くサブユニット解離によって、特定の基質に対する反応性が変化的ことが明らかとなった。また、ドメイン I の 2 段階の自己消化を共に抑えた変異体においても自己消化活性が存在し、ドメイン I の自己消化もカルパイン活性発現には必ずしも必要ないことが明らかとなった。以上の結果から、ドメイン I の自己消化やサブユニット解離といった構造変化は、活性発現に必要なく、これらはむしろ特定の基質への反応性を変化させる事が示された。

カルパインは、自己消化やサブユニット解離等の構造変化だけでなく、酸化によっても活

性制御を受けることが明らかとなった。還元剤非存在下でカルパインを精製すると、酸化により特定の基質への活性を失うが、自己消化活性は保持していた。細胞内でカルパインを酸化し得るものとして一酸化窒素(NO)が考えられたが、還元剤存在下でNOを加えても、酸化条件下のカルパインと同じ性質を示した。また、NO存在下では、カルパインによるフォドリン切断は影響を受けないが、PKCの分解は抑制された。以上の結果から、カルパインはNOにより影響を受け、基質が制限されることが示された。

本研究により、自己消化、サブユニット解離、酸化による構造変化は、カルパイン基質選別機構の一端を担っていることが明らかとなった。*in vivo*においても、カルパインには複数の活性化状態が存在し、これらの構造変化によって基質を選択していると考えられる。

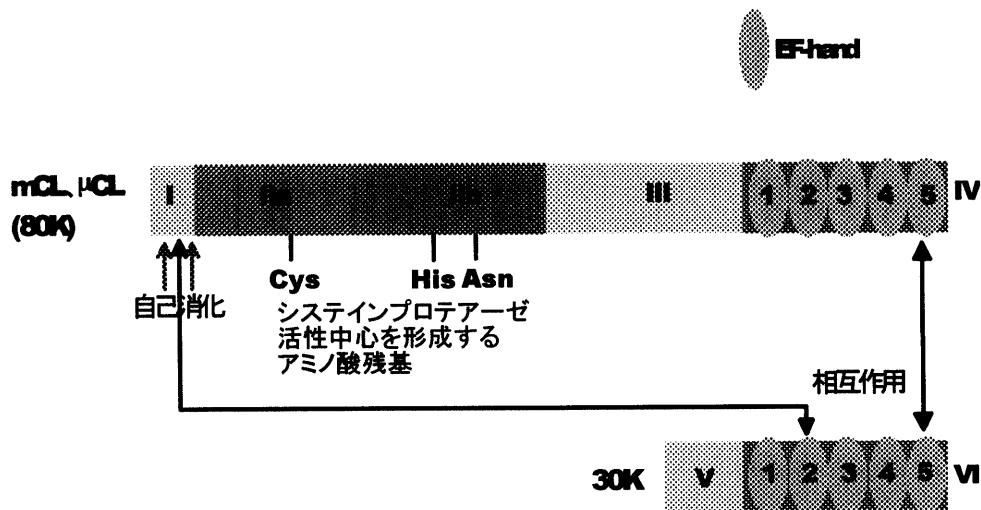


図1 m-, μ-カルパインのドメイン構造