

論文内容の要旨

論文題目 μ -カルパイン相互作用蛋白質の探索と解析

氏名 木村映一

カルパインは中性付近の pH で Ca^{2+} 依存的に活性を示すシステインプロテアーゼである。今日ではヒトにおいて 14 種類のカルパインホモログの存在が知られており、細胞内で基質を限定分解することにより、分化、増殖、細胞移動、アポトーシスなど様々な細胞機能に関与していると考えられている。カルパインホモログの中でも組織不偏的に発現している μ -カルパインと m -カルパインは、分子量約 80 kDa の触媒サブユニット(大サブユニット)と、約 30 kDa の制御サブユニット(30K)の 2 つのサブユニットから構成されている。カルパインの *in vitro* での基質は数多く報告されているが、*in vivo* での機能については不明な点が多い。我々は本研究において、カルパインの *in vivo* での機能について新たな知見を得るため、 μ -カルパインに相互作用するタンパク質を探索し、その相互作用タンパク質と μ -カルパインとの関係を解析した。

(カルパイン相互作用タンパク質のスクリーニング)

カルパインに相互作用するタンパク質のスクリーニングには、*in vivo* での環境においてタンパク質間の相互作用を検出できる、酵母ツーハイブリッド系またはスリーハイブリッド系を用いた。まず、 μ -カルパイン大サブユニットに相互作用するタンパク質をスクリーニングした結果、相互作用することがあらかじめわか

っている 30K を同定することができた。しかし、30K 以外の相互作用タンパク質は同定されなかった。続いて、 μ -カルパイン及び m -カルパインヘテロダイマーに相互作用するタンパク質をスリーハイブリッド系を用いて探索したが、相互作用タンパク質は同定されなかった。ツーハイブリッド系及びスリーハイブリッド系では、酵母の核内においてタンパク質間の相互作用を検出しているが、 Ca^{2+} 濃度の低い酵母の核内においては、カルパインは活性化した状態をとっていないと考えられる。上記のスクリーニングの結果は、カルパインが不活性な状態では他のタンパク質とは相互作用していないことを示唆していると考えられた。

そこで活性化状態の μ -カルパインに相互作用するタンパク質を同定するために、 μ -カルパイン大サブユニットを 4 つのドメインに分けて相互作用タンパク質のスクリーニングを行なった。ドメインに分けてスクリーニングを行なうことにより、カルパインが Ca^{2+} によって活性化した際に現れてくる部位に相互作用するタンパク質が同定されることが期待された。スクリーニングの結果、自己消化で切断を受けるドメイン I に相互作用するタンパク質として、FHL2/SLIM3、FHL3/SLIM2、Mi-2 の 3 種類のタンパク質が同定された。触媒活性をもつドメイン II、C2 様 Ca^{2+} 結合構造をもつドメイン III に相互作用するタンパク質は同定されなかった。5 つの EF ハンド構造をもつドメイン IV に相互作用するタンパク質としては、30K の他に、hnRNP K、hnRNP R、mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75(以下 mortalin と記す)の 3 種類のタンパク質が同定された。

(ドメインIV相互作用タンパク質の解析)

これらの相互作用タンパク質のうち、ドメインIVに相互作用する 3 種類のタンパク質に着目し、 μ -カルパインの基質であるかを調べた。COS 細胞に μ -カルパインと hnRNP K、hnRNP R、mortalin それぞれのタンパク質を共発現させ、その細胞破砕液に Ca^{2+} を加えることにより、これらのタンパク質が μ -カルパインの基質であるかを検討した。その結果 hnRNP K、hnRNP R は基質となるが、mortalin は基質とはならなかった。hnRNP K は hnRNP R に比べてよい基質であったため、hnRNP K についてさらに解析を進めた。

hnRNP K は μ -カルパインのドメインIVに相互作用するタンパク質として同定されたが、hnRNP K が他のカルパインホモログの 5 つの EF ハンドをもつドメインと相互作用するかを調べた。hnRNP K は m -カルパインのドメインIV、p94 のドメインIV、30K のドメインVIには相互作用しなかったことから、ツーハイブリ

ッド系においては hnRNP K の相互作用は μ -カルパイン特異的であることが明らかとなった。しかし COS 細胞の細胞破碎液に Ca^{2+} を加えた実験系においては、hnRNP K は μ -カルパインと同様に m-カルパインによっても限定分解されることから、条件によっては hnRNP K は m-カルパインとも相互作用することが示唆された。

またツーハイブリッド系を用いて、 μ -カルパインに相互作用する hnRNP K の領域を解析した。スクリーニングで得られた μ -カルパインと強く相互作用する hnRNP K はアミノ酸残基 161 番目から C 末端側 464 番目までのクローン(K-161)だった。この K-161 を短くしたいくつかのクローンと、 μ -カルパインのドメイン IV との相互作用を調べた結果、KH2 ドメインを削った 232 番目から C 末端側までのクローン(K Δ 8)では μ -カルパインとの相互作用が弱くなることが明らかとなった。また、C 末端側 38 残基を欠いたクローンでは相互作用がみられないことから、相互作用には KH2 ドメインと C 末端側の 2 箇所の領域が重要であることが明らかとなった。hnRNP K には、D 型スプライスバリエントである K-161 とは C 末端側 6 残基が異なる B 型スプライスバリエントが存在する。B 型と D 型において μ -カルパインに対する相互作用の差異を調べたが、両者は同じ性質を示した。

(μ -カルパインによる hnRNP K の制御)

精製した μ -カルパインと hnRNP K を用い、*in vitro*における解析を行なった。2 つのタンパク質を混合した後に終濃度が 5 mM となるように Ca^{2+} を加えて、hnRNP K の μ -カルパインによる分解の経時変化を調べた。そうしたところ、測定条件下においては hnRNP K は 2 分足らずで分解され、*in vitro*において hnRNP K は μ -カルパインのよい基質となることが明らかとなった。

hnRNP K と μ -カルパインが実際に *in vivo*でも相互作用している可能性を調べるため、 μ -カルパインと hnRNP K を COS 細胞に発現させ、細胞内局在を免疫蛍光染色によって調べた。 μ -カルパインは細胞質に局在しており、hnRNP K が単独で発現している細胞では、hnRNP K は核に局在していた。しかし、 μ -カルパインと hnRNP K が共発現している細胞では、hnRNP K は核だけでなく、細胞質にまで局在している細胞が存在した。hnRNP K が単独で発現している細胞ではこのような現象はみられないことから、この現象は核と細胞質の間をシャトリングしている hnRNP K が、細胞質において μ -カルパインと相互作用し、その結果細胞質に留まる hnRNP K の割合が多くなったために観察されたのもだと考えられた。このことから hnRNP K と μ -カルパインは細胞質において相互作用し得るこ

とが示された。

hnRNP Kが *in vivo* においても μ -カルパインの基質となるかを調べるため、カルシウム特異的イオノフォアである A23187 で COS 細胞を刺激し、hnRNP K の分解を調べた。プロテアーゼ活性をもたない CS 変異型 μ -カルパインと hnRNP K を共発現させた場合では、A23187 で 12 時間刺激しても分解はみられなかったが、野生型 μ -カルパインと hnRNP K を共発現させた場合には約 40 kDa の hnRNP K の分解産物が検出され、*in vivo* においても hnRNP K は μ -カルパインの基質となることが明らかとなった。A23187 刺激による hnRNP K の分解の経時変化を詳しく調べたところ、刺激 30 分後からは約 30 kDa の分解産物が、6 時間後からは約 40 kDa の分解産物が現れることがわかった。30 kDa の分解産物の C 末端側は、 μ -カルパインと強く相互作用する K-161 より少し短い断片であり、40 kDa の分解産物の C 末端側は、 μ -カルパインと弱く相互作用する K Δ 8 より少し短い断片であることが分子量から推定された。この結果より、hnRNP K の分解には Ca^{2+} 刺激に応じた 2 通りの分解があり、それぞれの分解様式により、分解産物と μ -カルパインが強くあるいは、弱く相互作用していることが示唆された。

(考察)

本研究において、 μ -カルパインをドメインに分けて相互作用タンパク質のスクリーニングを行うことにより、活性化状態の μ -カルパインに相互作用する可能性がある 6 種類のタンパク質を同定することができた。その中の 1 つである hnRNP K について解析を行ったところ、hnRNP K は μ -カルパインと相互作用して基質となることが明らかとなった。さらに hnRNP K は、 Ca^{2+} シグナルによって *in vivo* で μ -カルパインに分解されることにより、 μ -カルパインと強く相互作用することが示唆された。hnRNP K は様々なタンパク質と相互作用し、*in vivo* でのタンパク質間の相互作用を仲介する土台タンパク質であることが報告されている。これまで μ -カルパインが *in vivo* においてどのように基質を選択しているかについては全く知見がなかったが、hnRNP K を土台とすることによって、 μ -カルパインが hnRNP K の相互作用タンパク質を選択的に分解するという基質選択機構が本研究によって示唆された。