V. 結果及び討論

[1] p94の発見と構造決定

<1> ヒトp94のcDNAクローンの単離と同定

ニワトリm-カルパイン大サブユニットのcDNAをプローブとして用いて、ヒトの骨格筋cDNAライブラリーから、ヒトのm-, μ-カルパイン大サブユニットをクローニングする目的でスクリーニングを行った。この時に得られたクローンのうちの一つ(pHM231と名付けた)は、ニワトリm-カルパイン大サブユニットのcDNAに low stringent な条件(2×SSC／0.1％SDS中で65℃にて洗浄)ではハイブリダイズするが、high stringent な条件(0.1×SSC／0.1％SDS中で65℃にて洗浄)ではハイブリダイズしないものが存在した。後に同定されたヒトm-, μ-カルパイン大サブユニットのcDNAを用いてハイブリダイゼーションを行った場合も同一の結果を与えた。すなわち、このcDNAはm-, μ-カルパイン大サブユニットのどちらにも一致しないが相同性を持つことが予想されるタンパク質をコードするものであると考えられた。この pHM231 のcDNA断片をプローブにして、同じライブラリー(4×10^4)を再びスクリーニングしたところ、pHM562 と名付けたクローンが得られ、これら2つのクローンを用いて構造解析を行った。

その結果、2つのクローンは図Ⅴ-1に示したように、1.4 kbp の重なりを持ち、全体として、3.0 kbp の範囲に及ぶことが明かとなった。これらのクローンのヌクレオチド配列を決定したところ、両方向を通じてただ一つの十分に長いオープンリーディングフレームが存在した。このオープンリーディングフレームは全部で778個のアミノ酸残基をコードしており、その配列はウサギm-, μ-カルパイン大サブユニットのどちらとも高い相同性が認められたが、どちらとも明らかに異なるものであった(図Ⅴ-3参照)。そこでこのコードされるタンパク質を(後述する結果も含めて)p94と名付けた。しかし、残念ながらここで用いた2つのクローンは、オープンリーディングフレームのN-端部分の配列と開始メチオニンコドンとを欠落していた。

<2> ラットp94のcDNAクローンの単離と同定

<1>で得たクローンは開始コドンと考えられるATGを含んでいなかったため、まずp94の全長を含むクローンの単離を試みた。ヒトのcDNAライブラリーが入手しにくかったこと、以後の(タンパクレベルでの)実験がヒトではやりにくいこと、異種動物でもp94が保存されているかどうか確認したかったことなどの理由から、「実験方法」で述べたようにラット骨格筋のpolyARNAからλgt10ベクターライブラリーを作成し、図Ⅴ-1に示したヒトp94のcDNA断片(pHM562の挿入断片)をプローブにしてスクリーニングした。独立した約5×10^5個のプラークの中から20個のクローンが陽性クローンとして単離された。そのうちのいくつかのcDNA挿入断片をpUC18ベクターにサブクローニングしてそのヌクレオチド配列を両末端から決定したところ、大部分の断片はその片側にpolyAの配列を持っており、mRNAの3'-末端であることを示していた。その反対側(cDNA断片の5'-端であると考えられる)からは、ヒトp94cDNA断片の塩基配列と相同性の高い配列が見いだされた。これらの中で最長のクローンであったλRNC-1とλRNC-14とは、図Ⅴ-2に示したようにその5'-端付近に、ヒト

（図Ⅴ-1）　ヒトp94cDNAの制限酵素地図とシークエンスストラテジー

白箱は結果的にアミノ酸をコードする領域と判明した部分、それに続く黒線は非翻訳領域と判明した部分、その下部の太線はヌクレオチド配列分析に用いた2種の独立したクローンを表す。また、矢印は、ヌクレオチド配列分析を行った始点と向きと長さとを示しており、垂直な黒線は主な制限酵素部位の位置を表している（X: XbaI、P: PstI、H: HindⅢ、E: EcoRI、S: SalI）。

（図Ⅴ-2）　ラットp94cDNAの制限酵素地図とシークエンスストラテジー

白箱は結果的にアミノ酸をコードする領域と判明した部分、それに続く左右の黒線は非翻訳領域と判明した部分、その下部の太線はヌクレオチド配列分析に用いた2種の独立したクローンを表す。また、矢印は、ヌクレオチド配列分析を行った始点と向きと長さとを示しており、垂直な黒線は主な制限酵素部位の位置を表している（M: *Sma*I、B: *Bam*HI、P: *Pst*I、H: *Hin*dⅢ、E: *Eco*RI、K: *Kpn*I、S: *Sal*I）。上部に描いた二本の線は（図Ⅴ-8）、（図Ⅴ-11）で用いたプローブの位置を表している。

p94の最長オープンリーディングフレームにコードされるアミノ酸配列と相同性の高い配列をコードすると考えられるヌクレオチド配列が存在し、かつそのオープンリーディングフレームはさらに5'-方向に延びており、その上流には開始ATGコドン及びインフレームの終止コドンが存在した。よって、これらのクローンはp94の全長を含んでいると考えられたため、以下詳細に解析した。

<3> ラットp94のmRNAの構造

<2>で得た2つの独立なクローンの制限酵素地図は、完全に一致した(図Ⅴ-2)。そこでこれらのクローンを、図Ⅴ-2に矢印で示したように全長にわたってヌクレオチド配列を決定した。このcDNAの最長のオープンリーディングフレームは、図Ⅴ-3に示したように1から2,466までの位置に存在していた。-51～-49の位置にインフレームの終止コドン(図Ⅴ-3の四角で囲ったTAG)が存在することから、翻訳開始コドンは1～3の位置のATGであることが確定した。このATGの周囲の配列は、基本的にKozakのルール[(1)(2)]に合致している。-103から-101の位置にもATGが存在しているが(図Ⅴ-3の四角で囲ったATG)、ここから始まるオープンリーディングフレームは、24アミノ酸残基のみをコードしているため、このATGは機能していないと考えられる。ウサギカルバイン小サブユニットやウサギカルパスタチンでも同様に機能しているATGの上流にさらにATGが存在するが、これらの例では機能していないことが判明している[(3)(4)]ので、p94もその一例であろうと考えられた。

<4> ラット及びヒトp94の構造

ラットp94cDNAにコードされると考えられるタンパク質(p94)は、821アミノ酸残基より構成され、計算される分子量は94,084 Daであった。図Ⅴ-3にはラットp94のmRNA及びコードされると考えられるタンパク質の配列と同時に、ヒトp94のものも重ねて示した。一見してわかるように、ヒトとラットのp94は、ヌクレオチド配列もそこにコードされると考えられるアミノ酸配列も、互いに非常によく保存されていた。ヒトとラットp94のアミノ酸配列と比較すると、ヒトのcDNAはp94の全長を含んでいないためそのコードタンパク質はN-端の43アミノ酸残基が欠けているが(図Ⅴ-3のラットp94ヌクレオチド残基の第129位からヒトp94のcDNAは始まっていた)、残りの部分では94%という高い相同性を示した(「総合討論」の表Ⅵ-Ⅱ参照)。この値は、m-またはμ-カルバイン大サブユニットのアミノ酸配列のヒトーウサギ間での相同性の値(それぞれ93%及び96%－「総合討論」の表Ⅵ-Ⅲ, Ⅳ参照)と同程度に高い値であるといえる。

ラットp94は他のタイプのカルバイン大サブユニットと強い相同性を示した(図Ⅴ-4、「総合討論」の表Ⅵ-Ⅰ)。よってp94も他のカルバイン大サブユニットと同様に4つのドメインに分割することができる。即ち、図Ⅴ-4に示したように1－98位がドメインⅠ(98残基)、99－400位がドメインⅡ(302残基)、401－653位がドメインⅢ(253残基)、654－821位がドメインⅣ(168残基)となる。

p94のドメインⅠはm-, μ-カルバイン大サブユニットよりも20～30残基長く、相同性もほとんどない。特にN-末端の60残基は、m-, μ-カルバイン大サブユニットはもとより、データベース(NBRF：National Biomedical Research Foundation Data Bank; release 29)に存在するすべてのアミノ酸配列とも有為な相

（図V-3）　ラット及びヒトのp94cDNAのヌクレオチド配列とそこにコードされると考えられるアミノ酸配列

ヌクレオチドの番号はラットcDNAの開始メチオニンコドンのA残基を1としてあり、そこより5'側の部分は負の数で表した。黒い矢印でヒトのcDNAの始まりと終わりを示した（ラットcDNAの130～2466位に当たる）が、ヒトの配列はラットと異なる部分のみを記した。インフレームの終止コドン（TAGとTGA）は黒枠で囲い太字で示した。1～3位に存在して機能していると考えられるATGと-103～-101位に存在して機能はしていないと考えられるATGも黒枠で囲った。ポリA付加シグナルと考えられる配列、AATAAAには下線を引いて示した。

（図Ⅴ-4）　ラットp94とカルパインサブユニットとのアミノ酸配列の比較

番号は、1が、ラットp94、2が、ヒトm-型、3がヒトμ-型、4がニワトリm-型、5が、ヒト小サブユニットのアミノ酸配列を示した。番号はラットp94を基準にしている。ラットp94のアミノ酸残基と一致するものは点で置換して表した。ラットp94と他のサブユニットとで相同性が全く存在しなくなる部分（IS1とIS2領域）は、反転で示した。＊印を上部に記した130、334、358番目のシステイン、ヒスチジン、アスパラギンは活性中心を形成すると考えられる残基である。カルパイン大サブユニットの4つのドメインの境界（p94を中心に考えたため過去の報告(8)を多少変更してある）は黒三角で示した。ドメインⅣに存在する4つのE-Fハンド構造は二重下線で示した。

同性を持たなかった。この配列は、特に前半にプロリン残基が多いことが特徴的である。以下、これをNSと呼ぶことにする。

ドメインⅡはm-, μ-カルバイン大サブユニットのドメインⅡと高い相同性を示した(ヒトm型、ヒトm-型、ニワトリm-型、及びニワトリm-型とそれぞれ、65%、65%、64%及び66%：詳しくは「総合討論」及び表Ⅵ-Ⅰ参照)。m-, μ-カルバイン大サブユニットでは、活性中心を形成していると考えられているシステイン, ヒスチジン, アスパラギンに相当する各残基(図Ⅴ-4に＊印で示した)もp94に存在し、これら3つのアミノ酸残基の周辺のアミノ酸配列は、p94とm-, μ-カルバイン大サブユニットとの間の相同性が特に高くなっている(連続して10残基以上一致している部分もある－図Ⅴ-4)。また、ドメインⅡのC-端付近に存在する複数のトリプトファン残基も、m-, μ-カルバイン大サブユニットとp94とで共通する特徴であるが、これは、カルバインに限らずパパインやカテプシンB, H, Lなどのシステインプロテアーゼ全般の特徴でもある(それぞれ、相当する位置に2～6のトリプトファン残基を持っている)。以上の結果より、p94も他のカルバインと同様にシステインプロテアーゼの活性を有すると推定される。しかしながら、m-, μ-カルバイン大サブユニットとはまったく相同性を持たない62残基の配列が、p94のドメインⅡの268位から329位に存在する(m-, μ-タイプでは、14残基のアミノ酸に置換している)。この配列(以下IS1と呼ぶ)も、データベース(NBRF)に存在するすべてのアミノ酸配列と有為な相同性を持たなかった。

ドメインⅢもm-, μ-カルバイン大サブユニットのものと相同性はあるが、ドメインⅠ, Ⅱと比較すると低いようである。さらにp94のドメインⅢのC-端には、77残基からなる特異的な配列(以下IS2と呼ぶ)が存在し、m-, μ-カルバイン大サブユニットの相当する部分の30残基と置換する形となっている。この配列もNS, IS1同様に、データベース(NBRF)に存在するすべてのアミノ酸配列と有為な相同性を持たなかった(但し、有意性に疑問があるが一部のアミノ酸配列が相同性を示しており、これについては、「総合討論」で述べた)。また、配列上で目につくことはIS2のN-端付近に存在する連続したリジン残基とそれに前後するプロリン残基である。この配列は過去に報告[5]-[7]があるように核移行シグナルである可能性がある。この点については、後に詳述する。

m-, μ-カルバイン大サブユニットと同様にp94のドメインⅣも4つのE-Fハンド構造を持っている。そのカルモジュリンとの相同性を示すE-Fハンドスコアー(カルモジュリンは4つのドメインとも16(＝満点)である)は、N-端側から各々13, 11, 10, 11であり、m-, μ-カルバインサブユニットのものと同程度の値を示している(「総合討論」及び「総合討論」の表Ⅵ-Ⅴ参照)。また、p94のドメインⅣは、ヒト大サブユニットに対してよりもヒト小サブユニットに対しての方が幾分相同性が高いようで、特にC-末端では、p94とヒト小サブユニットとで連続して8残基が一致しており(図Ⅴ-4)、進化的考察を加える上でも興味深い(詳しくは「総合討論」を参照)。以上の知見をまとめて模式図にすると図Ⅴ-5の様になる。すなわち、p94もm-, μ-型大サブユニットと同様に4つのドメインに区切られるが、ドメインⅠ, Ⅱ, Ⅲには図の位置に特異な配列が存在しているわけである。また、ドメインⅣ, Ⅳ'はp94、m-, μ-型大サブユニット、小サブユニットの全てを通じて相同性が存在している部分である。以上、ラット, ヒトp94の構造について簡単に考察してきたが、さらに詳細な検討を「総合討論」で行った。

(図V-5)　**p94と他のカルパインサブユニットとの構造の比較模式図**

NS、IS1、IS2、及びドメインⅠ～Ⅳについては、本文を参照。ドメインⅡに示した*Cys*、*His*はそれぞれのサブユニットで活性中心であると考えられる残基である。各サブユニットをつなぐ細線、細点線はその位置が相互に対応することを意味する。

<5> ニワトリp94cDNAの単離と構造解析

新しく発見されたp94がニワトリにも保存されて存在するかどうかを調べるために、ニワトリ胸筋のcDNAライブラリーを作成し、ラットp94のcDNAをプローブとして用いてスクリーニングを行った。その結果、数種のクローンがこのcDNAにハイブリダイズするクローンとして得られてきたが、最終的には図Ⅴ-6に示したλCM-1及びλCM-5と名付けた2つの独立したクローンについて詳しい解析を行った。このクローンにも、一つの長いオープンリーディングフレームが見いだされ(図Ⅴ-7)、その上流にはインフレームの終止コドンが見いだされた(図Ⅴ-7の5'非翻訳領域に存在する反転させたTAGコドン)。このオープンリーディングフレームにコードされると考えられるアミノ酸配列は、ラットp94と全体で78%という高い相同性を持ち、ラットp94で見られた特異的な配列、NS, IS1, IS2も保存されていた。よって、この分子は、ヒト, ラットp94の、ニワトリにおけるカウンターパートであると結論された。ラットp94と同様に5'-非翻訳領域に、機能はしていないと考えられるATGコドン(図Ⅴ-7の5'-非翻訳領域に存在する下線を引いた2つのATG)が見いだされた。

[2] p94のmRNAの発現分布

種々の器官におけるp94のmRNAの発現を、cDNA断片をプローブとしてRNAブロット解析を行って検討した。その結果p94のmRNAは約3.5 kbの長さを持っており、得られたcDNAクローンがpolyAを考えに含めるとほぼ全長を含んでいる事を示した。そして、mRNAは骨格筋組織(舌及び筋肉－図Ⅴ-8A、レーン11, 12)でのみ発現しており、心筋及び平滑筋やその他の器官(図Ⅴ-8A、レーン1～10)では発現していないことが判明した。これは、m-, μ-カルパインサブユニットは、ほぼすべての組織で発現していること[3][8][9]と比較して特徴的である。図Ⅴ-8Bには参考のため、ラットカルパイン小サブユニットの種々の器官におけるmRNAの発現分布を示した。ラットでは、p94以外にカルパインのサブユニットのクローニングが行われていなかったので、主に以下の実験における対象として用いるために、カルパイン小サブユニットのcDNAの単離を行った。ウサギ小サブユニットのcDNA[9]をプローブとし、<2>で用いたものと同一のラット骨格筋cDNAライブラリーから単離した最長のクローンλR30-20は図Ⅴ-9に示すような構造をとっており、図Ⅴ-10に示したようにN-端の4残基のみ欠いていたものの、ウサギ及びヒト小サブユニットの配列と高い相同性を持っていた。そして予想されたように、ラット小サブユニットのmRNA量の変動はあるが解析を行ったすべての器官で発現しており、これは現在までに発表されている結果[9]と一致する。

同一かつ同数のラット骨格筋cDNAライブラリーのスクリーニングの結果はp94の陽性クローンが20個同定されたのに対し小サブユニットのクローンは4個しか得られなかった。m-, μ-型大サブユニットのクローンは直接スクリーニングしてはいないが、既にウサギにおいて大サブユニットのmRNAの量はの合計がほぼ小サブユニットのmRNAの量に等しい事が報告されている[9]。よって、このノーザンブロット解析からも推察される事だが、p94の骨格筋におけるmRNAの量はm-, μ-型大サブユニットのそれと比較して一桁ほど量が多いという事が結論できる。

また、ここではデータを示さないが、培養細胞の数種(COS細胞、L8細胞、3Y1細胞、NIH3T3細胞、GH4C1細胞、GH3細胞)についてp94の発現を調べたが、ここに挙げた全ての細胞ではp94のmRNAを検出できなかった。

（図Ⅴ-6）　ニワトリp94cDNAの制限酵素地図とシークエンスストラテジー

白箱は結果的にアミノ酸をコードする領域と判明した部分、それに続く左右の黒線は非翻訳領域と判明した部分、その下部の太線はヌクレオチド配列分析に用いた2種の独立したクローンを表す。また、矢印は、ヌクレオチド配列分析を行った始点と向きと長さとを示しており、垂直な黒線は主な制限酵素部位の位置を表している（P: *Pst*I、H: *Hin*dIII、E: *Eco*RI、K: *Kpn*I、C: *Hin*cII）。

TACAAGTGTAACTAGGAGATTTCAACAAAAAGGGGCAACAGCAACTTCCCCTTTTCTCCAATTTCCTTCCAGCGTGCGAGATCTTGCTTTCTTTCAACACTTGCTGTAAGGCCACTTCTC - 1

AGGCGTCCGCCATAAATGCAGCGGTGGCTCAGCAGACAGCTGCCGGGTCAGTTCCCAGCACTACCAGCACTACCACTGAAGGTACAGGGGGAGGCACAGGAGGGATTTATTCTGCCATT 120
H P S A I N A A V A Q Q T A A G S V P S T T S T T T E G T G G G T G G I Y S A I 40

ATAAGTCGCAACCAGCCCATTATCAAAGTAAAGGAAAAGACCTATGAAGAGCTTCACAAGAAGTGCCTGGAGGAGAACATTCTCTATGAGGATCCTGATTTTCCACCTAATGAGACTTCC 240
I S R N Q P I I K V K E K T Y E E L H K K C L E E N I L Y E D P D F P P N E T S 80

CTCTTCTACAGCCAGAAAGTCCCCATCAAGTTTGAATGGAAAAGACCACGTGAAATCTGTGAGAATCCACGATTTATTATGGGCGGAGCCACAGAACAGATATCTGCCAAGGAGAATTA 360
L F Y S Q K V P I K F E W K R P R E I C E N P R F I I G G A N R T D I C Q G E L 120

GGCGATTGCTGGTTCCTGGCTGCCATTGCTTGCCTGACACTGAATAAAAACTGCTTTGCAGAGTCATACCTCATGACCAGTCCTTCATACAGAACTATGCTGGCATCTTTCACTTCCAG 480
G D C W F L A A I A C L T L N K K L L C R V I P H D Q S F I Q N Y A G I F H F Q 160

TTTTGGCGCTACGGAGACTGGGTGGATGTCATCATTGATGACTGCCTACCCACATACAACAACCAGCTGGTCTTCACCAAATCCTCCCAGCGCAATGAGTTCTGGAGTGCTCTCCTGGAA 600
F W R Y G D W V D V I I D D C L P T Y N N Q L V F T K S S Q R N E F W S A L E 200

AAGGCCTATGCAAAACTCCATGGATCCTATGAAGCTTTGAAAGGAGGCAACACCACAGAGGCCATGGAGGACTTCACTGGAGGGGTGATAGAGTTCTATGAGATAAAGGATGCTCCTAAA 720
K A Y A K L H G S Y E A L K G G N T T E A M E D F T G G V I E F Y E I K D A P K 240

GATATCTATAAAATCATGAAACATGCCATTGCCAGAGGATCCCTCATGGCCAGCTCCATTGATGACAACCTAGGCTTTCACTACGGAGCAGCTCCTCGAAGTGACATTGGAGAACTGATT 840
D I Y K I M K H A I A R G S L M A S S I D D N L G F H Y G A A P R S D I G E L I 280

GCTCGAATGGTGAAGAACCTAGAAAATGCACAGATGACTTACTCCACTGTGGACTACCAGGGGACGGATGAAAGGCCAGCCTGGACCATAATGCCAATGCAGTATGAAACCCGGATGTCT 960
A R M V K N L E N A Q M T Y S T V D Y Q G T D E R P A W T I M P M Q Y E T R M S 320

TGTGGCTGGTCAAAGGTCACGCATACTCTGTCACAGCTGTGGAAGAGACAACATATAAAGGGAAAAGATGCGTCTGGTAAGGCTGAGAAACCCGTGGGGACAGGTGGAATGGAATGGA 1080
C G L V K G H A Y S V T A V E E T T Y K G E K M R L V R L R N P W G Q V E W N G 360

CCTTGGAGTGATAAATCAGAAGAGTGGAACTTCATTGATGAAGAAGAGAAATCCGCCTGCAACACAAGATTGCAGAAGATGGGGAATTCTGGATATCATTTGAAGATTTTCATGAGGCAT 1200
P W S D K S E E W N F I D E E E K I R L Q H K I A E D G E F W I S F E D F M R H 400

TTCACAAAACTTGAGATCTGTAACCTCACACCTGATACTCTGGAAGCTGATAAGCTTCAGACCTGGACTGTGTCAGTCAACGAAGGACGCTGGGTGAGAGGCTGCTCAGCTGGAGGGTGC 1320
F T K L E I C N L T P D T L E A D K L Q T W T V S V N E G R W V R G C S A G G C 440

CGCAATTATCCAGATACATTTTGGACCAATCCCCAGTATCGCCTGAAGCTCCTAGAGGAAGATGATGATCCTGAAGATGAAGAGGTTATCTGCAGCTTCCTGGTAGCACTGATGCAGAAA 1440
R N Y P D T F W T N P Q Y R L K L L E E D D D P E D E E V I C S F L V A L M Q K 480

AACAGGAGGAAAGAAGCCAAGCTGGGAGCCAACCTCTACACCATTGGCTTTGCCATCTATGAGGTACCCAAAGAGATGCACGGTACTAAGCACCACTTGCAAAAGGATTTTTTCCTCTAC 1560
N R R K E R K L G A N L Y T I G F A I Y E V P K E M H G T K H H L Q K D F F L Y 520

AATGCTTCCAAAGCTAGAAGTAAGACCTATATAAACATGCGAGAAATCTCTGAGCGCTTCCGGCTGCCTCCCAGCGAGTACGTTATCATCCCATCCACATACGAACCCCACCAGGAGGGA 1680
N A S K A R S K T Y I N M R E I S E R F R L P P S E Y V I I P S T Y E P H Q E G 560

GAATTCATCCTGAGGGTTTTCTCAGAGAAAAGAAGTCTTTCAGAGGAGGTTGAAAACATGATTGAGGCAGATCGCGCATCGAAGAAGAAAAAAGGCAAGCCTATCATCTTTGTTTCTGAC 1800
E F I L R V F S E K R S L S E E V E N M I E A D R A S K K K K G K P I I F V S D 600

AGAGCAAACAGCAACAAGGAGCTGACAACAGACGAAGATGCTGGCAAAGATGGTGAAAAAACCCACGTAGATCGAGAAAAAGCGATTCTTCAGCAAAAAGCTCGTGAGAAGAGTGAAGAG 1920
R A N S N K E L T T D E D A G K D G E K T H V D R E K A I L Q Q K A R E K S E E 640

GAAACTCAGTTCAGGAATATTTTCCGACAGATTGCAGGGGATGACATGGAGATATGCCGGGAAGAACTCAGGAATGTTCTCAACAAGGTTGTTAAAAAACATAAGGACCTAAAGACAGAA 2040
E T Q F R N I F R Q I A G D D M E I C R E E L R N V L N N V V K K H K D L K T E 680

GGATTTGAACTAGAATCCTCGCGCAGCATGATCGCTTTGATGGATACAGACGCGCTCAGGGAAGATCAACTTTGATGAGTTCCGCACCCTCTGGGACAAGATCAAAAGCTGGCAGAAAATC 2160
G F E L E S S R S M I A L M D T D G S G K I N F D E F R H L W D K I K S W Q K I 720

TTCAAGCATTACGATGCAGACCATTCAGGAACCATTAACAGCTATGAGATGCGCAATGCAGTCAAGATGCAGGGTTTCGGCTGAACAACCAGCTCTACGACATCATCACGATGCGCTAT 2280
F K H Y D A D H S G T I N S Y E M R N A V K D A G F R L N N Q L Y D I I T M R Y 760

GCTGACAAGAACATGAACATCGACTTTGACAGCTTCATCTGCTGCTTCGTGAGACTGGATGCTATGTTCAGGGCATTCCATGCCTTCGATAAAGATGGAGATGGAATCATAAAGCTCAAC 2400
A D K N M N I D F D S F I C C F V R L D A M F R A F H A F D K D G D G I I K L N 800

GTCCTGGAGTGGCTGCAGCTCACCATGTACGCCTAACCCCAGAGCCTTCATCAAGGACCTGCTCCAGATTGCTGTTTTAAGTAATGAACTCAATCCATCCCCAATTACAAATGAGCATTC 2520
V L E W L Q L T M Y A 811

TACAAGATACATGCTTCGCTCGCCGAGATAAAATGTGCTTGAAGGATAGAGAGCCAGCCCGTGCTTCCAGCAAGCAAACCAGTGCTCATTCCCTGTACCTACTTCCATAGTGTCTTCAGG 2640

ACATTTACTTTCACAGTGAAGATTAATTTATTGATGACTGCATTTAGGTTTTTCTGCATGTTAAAGACACAGAGCACACATCGTTTCTCTGTTTATACTGACACTTGGAAGCGCCATCCC 2760

TAAATCAGTGTGGGTCAGGCAAAGCTGGGTCTGGATCTGACTGTGGAAGTCAGAGGTGTCTCCTACCACCTTGTAATTAGTCATTAACTCCGTTCTGATGTTGCTACTATCATTTCA 2880

GCCTTTTCGTACTGTTGACTATTTCATTGAGATTGTGCTAATTACATTAATATTATGAGTCATGACCATGTCATTACAGCTGTAGCTTTGGTTCCCTGCTGTGCTGGAAAGTGGGCACC 3000

AGACACAGCAGACTGCAGTGTCTGGTATGCCTTGGCCTGGTGCCTCAGCAGAAGCAGCAGAACTAAGCTACTTGCTCTCCTTTTTAGTATCTCCAATGCTACCATACTTAGACATAGGAT 3120

GGTTTTAGAGTGTTGGTTTTTTGTTGTCTGTTTGCTTGTTTTATTTTTTTTTTTAATTGTAACTGCATTCTCTGTAACATTGAGAAAGTGGTTTTCCACTTTCAAGGAAGCTGGGCGCCG 3240

GAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTATG 3350

(図V-7)　　ニワトリのp94cDNAのヌクレオチド配列とそこにコードされると考えられるアミノ酸配列(前頁)

ヌクレオチドの番号は開始メチオニンコドンのA残基を1としてあり、そこより5'側の部分は負の数で表した。インフレームの終止コドン（TAGとTAA）は下線付中抜き文字で示した。1～3位に存在する機能していると考えられるATGは2重下線で、その上流に存在はするが機能していないと考えられるATGは下線をつけて示した。

（図V-8）　RNAブロット解析によるラットp94及びカルパイン小サブユニットmRNAの発現分布

A: ラットp94, **B**: ラットカルパイン小サブユニット。数字は以下の臓器を表す。1: 胃、2: 小腸、3: 脾臓、4: 胸腺、5: 睾丸、6: 脳、7: 腎臓、8: 肝臓、9: 肺、10: 心臓、11: 舌、12: 骨格筋。また、リボゾームRNAの位置を矢印で示した（28S, 18S）。

```
  1  GAATTCGTTCTTGAAGGGCGGCGGTGGCGGTGGGGGAGGCGGGGGTCTGGGCGGGGGCCTGGGCAATGTGCTCGGAGGCCTGATCAGCGG
  1  N  S  F  L  K  G  G  G  G  G  G  G  G  G  L  G  G  G  L  G  N  V  L  G  G  L  I  S  G

 91  AGCTGCTGGAGGCGGCCGGCGGTGGAGGCGGCGGTGGCGGCATGGGACTGGGAGGAGGTGGCGGAGGCGGTGGAACAGCCATGCGTATCCT
 31  A  A  G  G  G  G  G  G  G  G  G  G  G  M  G  L  G  G  G  G  G  G  G  G  T  A  M  R  I  L

181  GGGCGGAGTCATTAGCGCCATCAGCGAGGCTGCTGCGCAGTACAACCCGGAGCCCCCGCCCCCACGTAGCCATTACTCTAATATTGAGGC
 61  G  G  V  I  S  A  I  S  E  A  A  A  Q  Y  N  P  E  P  P  P  P  R  S  H  Y  S  N  I  E  A

271  CAACGAGAGTGAAGAGGAACGTCAGTTCAGGAAACTTTTTGTCCAGCTGGCTGGAGACGACATGGAGGTCAGCGCTACAGAACTCATGAA
 91  N  E  S  E  E  E  R  Q  F  R  K  L  F  V  Q  L  A  G  D  D  M  E  V  S  A  T  E  L  M  N

361  TATCCTCAACAAGGTCGTGACCCGACACCCAGATCTGAAAACTGATGGGTTCGGCATTGACACTTGTCGGAGCATGGTGGCTGTTATGGA
121  I  L  N  K  V  V  T  R  H  P  D  L  K  T  D  G  F  G  I  D  T  C  R  S  M  V  A  V  M  D

451  TAGTGACACCACAGGTAAGCTGGGCTTTGAGGAGTTCAAGTACCTGTGGAACAACATTAAAAAGTGGCAGGGTATATACAAACGCTTTGA
151  S  D  T  T  G  K  L  G  F  E  E  F  K  Y  L  W  N  N  I  K  K  W  Q  G  I  Y  K  R  F  D

541  TACTGACCGATCAGGGACCATTGGTAGCAATGAACTCCCAGGGGCCTTTGAGGCAGCAGGATTCCACCTGAATCAGCATATCTACAGCAT
181  T  D  R  S  G  T  I  G  S  N  E  L  P  G  A  F  E  A  A  G  F  H  L  N  Q  H  I  Y  S  M

631  GATCATCCGCCGCTACTCGGACGAGACCGGGAACATGGATTTCGATAACTTCATCAGCTGCTTGGTCAGGCTGGATGCCATGTTCCGTGC
211  I  I  R  R  Y  S  D  E  T  G  N  M  D  F  D  N  F  I  S  C  L  V  R  L  D  A  M  F  R  A

721  TTTCAGATCTCTTGACAAAAATGGCACTGGACAGATCCAAGTGAACATCCAGGAGTGGTTGCAGCTGACTATGTATTCCTGAGTGGAAGT
241  F  R  S  L  D  K  N  G  T  G  Q  I  Q  V  N  I  Q  E  W  L  Q  L  T  M  Y  S

811  CACAGACCTGCCGCCTCACTGCTCACTGTGGAGCCTTGAACCTGATCCTGTCTGCAGCCACGTTTTTACGGTCATGTCCTGCTACCCAGA

901  GGCCTTCCTTTTCCCTATGCTGGTACCCAGCTTCCCAGTCGGCAGCCAGAGCTCAACGTGCCCCAGCTTGCTGCACCCTGAGTTCCCCTG

991  GCTCTGAGACAAGCTAGCTTGCTCTGCCGAAGTGTCACCCCACCCCCAGTCACACCCAGTCCGCACCCTCTGTGACCTCCATCCTGTCTG

1081 TGTGCCAAGCCTAGCACTCCTATTGCTTCCATGTCCCAAGGGCCCTGTCTCAGTTCTGGGAGGATCACGCCTGTCCCTACACACCTTGTT

1171 ACACACTCACACAGTTACCTCCCAGGCAGCCAAATAAACTCCAGGCCATCCAGTGCCACACACCCTAGTGCCTATGCCTGCACTGTTTTC
                                                                                  Δ
1261 CCCCTGCACAGCTGTCGGGCCCAAGAGGAAATAAACTCTCCATTCGCTGCTTAAAAAAAAAAAAAAAA
```

（図V-9）　ラットカルバイン小サブユニットのcDNAのヌクレオチド配列とそこにコードされると考えられるアミノ酸配列

ヌクレオチドの番号はラットcDNAの最初のG残基を1とした。インフレームの終止コドン（TGA）は反転文字で示した。白三角は、クローンλR30-1、-4でポリAが付加していた位置を示す。この2種類のポリA付加に対応すると考えられるポリA付加シグナル配列、AATAAAは斜体太字で示した。

```
                                                                                                                  Domain V
            1                   20                  40                  60                  80                  100
Human       MFLVNSFLKG GGGGGGGGGGLGGGLGNVLGGLISGA-GGGGGGGGGG--G GGGGGGGGTAMRILGGVISAISEAAAQYNPEPPPPRTHYSNIEANESEEVRQ
Rabbit      MFLVNSFLK-GGGGGGGGGGLGGGLGNVLGGLISGA-GGGGGGGGGG---GGGA GGGGTAMRILGGVISAISEAAAQYNPEPPPPRTHYSNIEANESEEVRQ
Porcine     MFLVNSFLKG GGGGGGGGGGLGGGLGNVLGGLISGA-GGGGGGGGGG----GGGGGGGTAMRILGGVISAISEAAAQYNPEPPPPRTHYSNIEANESEEVRQ
Bovine      MFLVNSFLK-GGGGGGGGGGLGGGLGNVLGGLISGA-GGGGGGGGGG------GGGGGTAMRILGGVISAISEAAAQYNPEPVPPRTHYSNIEANESEEVRQ
Rat             NSFLK-GGGGGGGGGGLGGGLGNVLGGLISGAA GGGGGGGGGGMGL GGGGGGGTAMRILGGVISAISEAAAQYNPEPPPPRS HYSNIEANESEE RQ

Domain IV'
                    120                 140                 160                 180                 200
FRRLFAQLAGDDMEVSATELMNILNKVVTRHPDLKTDGFGIDTCRSMVAVMDSDTTGKLGFEEFKYLWNNIKRWQAIYKQFDT DRSGTICSSELPGAFEAAGFHLNEHLYNM
FRRLFAQLAGDDMEVSATELMNILNKVVTRHPDLKTDGFGL DTCRSMVAVMDSDTTGKLGFEEFKYLWNNIKKWQAIYKQFDVDRSGTICS ELPGAFEAAGFHLNEHLYNM
FRRLFAQLAGDDMEVSATELMNILNKVVTRHPDLKTDGFGIDTCRSMVAVMDSDTTGKLGFEEFKYLWNNIKKWQAIYKQFDVDRSGTIGSSELPGAFEAAGFHLNEHLYSM
FRRLFAQLAGDDMEVSATELMNILNKVVTRHPDLKTDGFGIDTCRSMVAVMDSDTTGKLGFEEFKYLWNNIKKWQA YKQFDVDRSGTIGSSELPGAFEAAGF LNEHLYNM
FRKLF QLS GDDMEVSATELMNILNKVVTRHPDLKTDGFGIDTCRSMVAVMDSDTTGKLGFEEFKYLWNNIKKWQG IYK FDT DRSGTIGSW ELPGAFEAAGFHLNQ H YSM
                                                                                I                   II

    220                 240                 260
IIRRYSDES GNMDFDNFISCLVRLDAMFRAFKSLDKDGTGQIQVNIQEWLQLTMYS                                    Human
IIRRYSDEA GNMDFDNFISCLVRLDAMFRAFKSLDKDGTGQIQVNIQEWLQLTMYS                                    Rabbit
IIRRYSDEGGNMDFDNFISCLVRLDAMFRAFKSLDKDGTGQIQVNIQEWLQLTMYS                                    Porcine
IIRRYSDEGGNMDFDNFISCLVRLDAMFRAFKSLDKDGTGQIQVNIQEWLQLTMYS                                    Bovine
IIRRYSDET GNMDFDNFISCLVRLDAMFRAFF SLDKV GTGQIQVNIQEWLQLTMYS                                  Rat
        III                 IV
```

（図V-10）　ヒト、ウサギ、ブタ、ウシ、ラットのカルバイン小サブユニットのアミノ酸配列の比較

アミノ酸残基番号は、ヒトの配列を基準としている。ハイフンは欠失を、斜体細字は他の4種の配列と異なっている事を示す。下向きの白三角は自己消化の際に最終的に切断される部位を示す。図中の二重下線とⅠ～Ⅳは4つのE-Fハンド構造の位置を表している。

[3] p94遺伝子構造の解析

ラットp94の遺伝子の構成についての知見を得るため、ラットの遺伝子DNAを *Eco*RI、*Hind*Ⅲ、*Bam*HI で切断し、遺伝子DNAサザンブロットブロット解析を行った(図Ⅴ-11)。プローブにはすべての翻訳領域と非翻訳領域の大部分を含むもの(図Ⅴ-2参照)を用いたため、どの制限酵素消化物においても複数のバンドが検出された。3種の制限酵素消化物でのバンドの長さを総合すると、少なくともラットp94の遺伝子は30 kbp 以上の長さを有していると考えられる。これはヒトカルパイン小サブユニットの遺伝子[10](11 kbp)及びニワトリm-カルパイン大サブユニットの遺伝子[11](10 kbp)よりもかなり長いものとなっている。図Ⅴ-12に示したものは図Ⅴ-11のバックグラウンドを低くしたもの(A)、高くしたもの(B)及びシグナルを色で表したもの(C)である。バイオイメージアナライザーはこのようにバックグラウンドを自由に変える事ができるため図Ⅴ-11のように最もシグナルが見やすい状態に調整する事ができる。また、シグナルを色で表す事によってどのバンドが強いシグナルなのかを一目で同定する事ができる。これらより、各レーン(1, 2, 3)において主要なバンドは3～5本前後である事がわかる。おそらくこれらのバンドはエキソン部分を多く含む断片に対応していると考えられる。

[4] p94のタンパク質レベルでの解析

<1> 骨格筋におけるスクリーニング

<1>-(a)　ラットp94に対するポリクローナル抗体の作成とその同定

p94をタンパクレベルで検出するために、ラットp94のN-末端部分(アミノ酸残基番号2～19)及びIS2の一部分(585～604)に対する抗ペプチド抗体を作成した。これらの抗体は、以下、α-pNS及びα-pIS2と呼び、既に東京都臨床医学総合研究所西道隆臣博士によって作成されていたα-IS1、α-P94[12]とともに用いた。

<2>で詳しく述べるが、p94を発現させた大腸菌の超音波破砕物の沈澱画分をポジティブコントロールに、ベクター(pUC18)のみを発現させたものをネガティブコントロールに用いてこれらの抗体の反応性を調べた結果、図Ⅴ-13に示したように、ポジティブコントロールにのみ強く反応し(レーン 2, 3)、ネガティブコントロールには全く反応していない(レーン1)事からα-pNS, α-pIS2ともに十分な抗体価を有し特異性も高いことが判明した。一方α-pIS1の抗体価はα-pNS, α-pIS2 よりも低くいが十分な特異性を持つこと(図Ⅴ-14のα-pIS1)、またα-p94 は抗体価も特異性も低いがp94と反応はする事(図Ⅴ-14のα-p94)が判明した。また、ヒトm-カルパインに対する抗体(以下α-Calpain と呼ぶ。この抗体は国立精神神経センター神経研究所の杉田秀夫所長から寄与して頂いたもので、ヒトm-カルパイン大サブユニット及び小サブユニットの両者に反応するものである[13])もp94のバンドにクロスリアクトしている事が判明した(図Ⅴ-14のα-Calpain)。

<1>-(b)　ラット骨格筋の分画とp94のスクリーニング

（図Ⅴ-11）　ラットp94の遺伝子DNAサザンブロット解析

レーン番号は次の制限酵素で消化した事を表している。1: *Eco*RI、2: *Bam*HI、3: *Hin*dⅢ。また、右側の数字はマーカーによるDNAの長さを表している。なお、このデータは、バイオイメージアナライザーで解析し、ピクトログラフィーで出力したものである。

（図Ⅴ-12）　ラットp94の遺伝子DNAサザンブロット解析（出力変換例）

図Ⅴ-11で示したデータを、バイオイメージアナライザーの上で、シグナルしきい値を変化させ、バックグラウンドの濃さを変化させたもの（A：薄、B：濃）と、シグナルの強度を色で表したもの（C）。Cでは、シグナルの強度の順に赤、橙、黄、緑、水、青色で表現されている。

(図V-13)　大腸菌で発現したp94(A)に対するa-pNS (B), a-pIS2 (C)の反応性

AはベクターであるpTV118N(レーン1)または*plac*-P94(レーン2)で形質転換した大腸菌の超音波破砕物をSDS-PAGEにかけたものをCBBで染色したもの。これをα-pNS(B)及びα-pIS2(C)を用いてウェスタンブロットを行った結果を示した。B, Cのレーン1、2はそれぞれ、Aのレーン1, 2に対応する。レーン3はレーン2のタンパク質を50倍に希釈して流したものである。黒鏃は各抗体に反応した特異的なバンドを示している。

（図Ⅴ-14）　大腸菌で発現したp94に対するα-Calpain, α-pIS1, α-P94の反応性

pIS1、pIS2、p94、cont はそれぞれ、本文中の p*lac*-pIS1、p*lac*-pIS2、p*lac*-P94、pTV118N を発現させた大腸菌の超音波破砕物の超遠心沈澱である。CBBはクマシーブリリアントブルーで染色したものであり、発現したタンパクに対応するバンドに黒三角印を付けてある。その右の3つのカラムは、順にα-P94, α-pIS1, α-Calpain を用いてウェスタンブロット解析をしたものである。黒鏃は各抗体に反応した特異的なバンドを示している。

ラット骨格筋を「実験方法」に従って分画し、各々の画分を、[11]で作成した3つの抗体を用いて、ウェスタンブロットによりp94のスクリーニングを行った。比較として抗ヒトm-カルパイン抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

まず、α-Calpain によるウェスタンブロットでは、図Ⅴ-15Bに示すようにm-カルパインは可溶性画分(画分1)に大部分と不溶性画分(画分5)に微量とが検出され、SR画分(画分2)、ミオシン画分(画分3)、アクチン画分(画分4)には全く検出されなかった。またクマシーブリリアントブルー染色の結果(図Ⅴ-15A)からも各画分は独特のパターンを持っており、特に分画3、4(レーン<3>, <4>)にはそれぞれミオシン、アクチンと考えられるタンパク質が主に存在している事が判明した。これらの結果から分画は成功していることが確認された。そして、α-pNSを用いたときには不溶性画分(画分5)の約105kDaの位置に微かなバンドが検出されたが(図Ⅴ-15D及び図Ⅴ-16のα-pNSの黒鏃)、α-pIS2, α-P94では94kDaの位置付近に抗体特異的なバンドは検出されず(図Ⅴ-15C, E, F)、もちろんα-pNSで検出された105kDaのバンドにも反応しなかった。α-pNSで検出された105kDaのバンドは、α-pNSの抗原に用いたペプチド(pNS)で吸収したα-pNSでは検出されないため(図Ⅴ-16のα-pNS＋pNSの黒鏃)、pNSに特異的なバンドであることは明らかであるが、α-pIS2, α-P94で検出されないこと及び分子量が少し異なることからp94ではないと考えられた。抗体は最低数個のアミノ酸残基だけでもエピトープと成り得るため、特にペプチド抗体やモノクローナル抗体の場合には、全く関係ないタンパク質に交差反応する場合がある。今回もこの一例であると考えられた。

骨格筋の可溶性画分(画分1)は、さらにイオン交換カラムクロマトグラフィ(DEAE-5PWのFPLC;Ⅱを参照)によって分画し(図Ⅴ-17)、各画分においてα-pNSを用いたウェスタンブロットによりp94の検出を試みた(図Ⅴ-18, 図Ⅴ-19)。図Ⅴ-16に見られたバンドと考えられるものが図Ⅴ-18のレーン21～32で再び認められるが、図Ⅴ-19でα-pIS2とは全く反応しておらず、他に特異的なバンドも検出できなかった。なお、80 kDa 付近に見られる両抗体に共通の強いバンドは、一次抗体を入れなくても認められたことから、二次抗体由来の非特異的なシグナルであることが明らかになった(データは直接示していないが、図Ⅴ-16でペプチド pNS によってこのバンドが吸収されていないことからも同様のことが示される)。

<2> 大腸菌による発現

骨格筋においてp94を見いだす事ができなかったためその原因の究明と、p94のタンパクレベルでの解析を行うために、まずラットp94のcDNAを*lac*オペロンのプロモーターの下流に組み込んで大腸菌で発現させた。比較のためにヒトm-, μ-カルパイン大サブユニット[14][15]及びラット小サブユニットのcDNA([2])も同様にして発現させてみた(プラスミドの構築に関しては、「実験方法」を参照)。

p*lac*-p94(ラットp94全長)、p*lac*-μ(ヒトμ-カルパイン大サブユニット全長)、pDG30K(ウサギ小サブユニットのN-端のグリシンに富む領域を欠いたもの[16])は大腸菌MM294において非常によく発現し、その超音波破砕物の沈澱画分にはっきりとCBB染色で染まるバンドとして検出された。一方、p*lac*-m(ヒトm-カルパイン大サブユニット全長)、p*lac*-30K(ラットカルパイン小サブユニット全長)は、CBB染色では判然としなかったが、抗ヒトm-カルパイン抗体を用い

（図V-15）　ラット骨格筋画分の各抗体によるウェスタンブロット

A: クマシーブリリアントブルー染色、**B**: α-calpain、**C, D**: α-pNS、**E, F**: α-IS2。C, DあるいはE, Fは各々独立したウサギに同一の抗原を免疫して得られた抗体によるものである。レーン1~5は「実験方法」で示した骨格筋の分画法に従って分画した各画分（①～⑤）を表す。また、レーン＋ は、p*lac*-P94を大腸菌で発現させたものを流したレーンである。

（図V-16）　ラット骨格筋の各画分のα-pNSによるウェスタンブロット

右の2つのカラムはそれぞれ、α-pNS及びα-pNSに合成ペプチドpNSを20mg/mlの濃度になるように加え、氷中で1時間以上保温したものを用いてウェスタンブロットしたものである。黒鏃は、pNS に吸収されるバンドを示している（但し、このバンドはα-pIS2 とは一切反応しない）。他の図中の記号などは図V-15を参照。

（図Ⅴ-17）　ラット骨格筋可溶性画分のDEAE-5PWによる分画

縦軸は溶出液の280 nm の吸光度及び溶出緩衝液中の塩化ナトリウム濃度（M）、横軸は塩化ナトリウムの濃度勾配をかけ始めた時点を0とした溶出量（ml）を表す。図中、実線は溶出液の280 nmの吸光度を、点線は溶出緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を示している。

（図Ⅴ-18）　ラット骨格筋可溶性画分をイオン交換カラムによって分離した各分画のウェスタンブロットによるp94の検索（1）

図Ⅴ-17で分画した各画分を「実験方法」で示したように濃縮し、α-pNSを用いてウェスタンブロット解析を行った。

（図Ⅴ-19）　ラット骨格筋可溶性画分をイオン交換カラムによって分離した各分画のウェスタンブロットによるp94の検索（2）

図Ⅴ-17で分画した各画分を「実験方法」で示したように濃縮し、α-pIS2を用いてウェスタンブロット解析を行った。

たウエスタンブロットで、量は少ないながらも発現していることが確認された。また、p*lac*-p94/30K(ラットp94＋ラット小サブユニット)、p*lac*-m/30K(ヒトm-カルパイン大サブユニット＋ラット小サブユニット)、p*lac*-μ/30K(ヒトμ-カルパイン大サブユニット＋小サブユニット)では、2つのタンパク質の間で発現量の多少はあるものの、両タンパク質とも発現していることが確認された。(図Ⅴ-20及び図Ⅴ-14参照。但し、すべてのデータは示していない。)

図Ⅴ-20に示したように、大腸菌においてはp94もm-カルパイン大サブユニットも同程度に大量に発現する事が判明したが、これらのタンパク質は全て超音波破砕後沈澱画分に検出された。そこで変性剤及び透析によって、これらの発現タンパク質の活性の発現を試みたが、顕著な活性を認めることはできなかった。大腸菌と脊椎動物では、翻訳のシステムも、縮重しているコドンの使用率も全く異なるため、大腸菌内で生合成されたp94やm-カルパイン大サブユニットは哺乳類の細胞において生合成されるときと全く違った様式でフォールディングしたためにアグリゲーションが起こり正常なタンパク質として得られなかったと考えられる。或は、この大腸菌でのコンストラクトには表IV-IVに示したように、そのN端にネイティブなp94には存在しない MAMIT KNVFL PKLPA という15残基が付加されているのでこれが一因である可能性もある。以下の実験では、主にウェスタンブロッティングでのポジティブコントロールとして用いた。

<3> *in vitro*翻訳系による発現

p94の大腸菌での発現では、p94が超音波破砕物の沈澱画分に回収されたため以後の解析が困難であった。そこで、今度は*in vitro*翻訳系を用いてp94を発現させた。「実験方法」に述べたように、ラットp94のcDNAをT7プロモーターの下流に組み込んで(pT7-p94)、ウサギ網状赤血球抽出物の系を用いて ^{35}S ラベルしたメチオニンを取り込ませたタンパク質を発現させた。比較のためにヒトμ-カルパイン大サブユニット[15]も同様にして(pT7-μ)発現させてみた(プラスミドの構築に関しては、「実験方法」を参照)。

その結果、ラットp94(メチオニン残基を22残基含む)は発現はするものの、ヒトμ-カルパイン大サブユニット(メチオニン残基を16残基含む)に比べて1／25のシグナルしか得られなかった(図Ⅴ-21の白及び黒鏃)。すなわち、メチオニンの数を補正した実際の生成量を考えると、p94はμ-カルパイン大サブユニットの1／34となる。この量は、システインプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチンを加えてもほとんど変化しなかった(図Ⅴ-21の leupep. + のレーン)。また、p94を流したレーンには、94kDaよりも分子量の低い位置に多数のバンドが観察された。この結果は大腸菌での発現の結果とかなり様子が異なっており、p94の生成がμ-カルパイン大サブユニットに比べて、見かけ上2桁近く低い事が判明した。これは後に述べるCOS細胞を用いた実験とも一致するもので、p94タンパク質の特異な性質を示す実験結果の1つであると言える。このウサギ網状赤血球の*in vitro*翻訳系にはカルパインが含まれている事が知られているが、この活性は既にキレート剤によって完全に抑制されている。しかし、他のプロテアーゼの混在も考えられ、p94の検出量の低さは、生成量の低さによるものかあるいは分解速度の速さによるものか、どちらかであるとここでは考察できる。

<4> 培養細胞における発現

（図Ⅴ-20）　p94とμ-カルパイン大サブユニットの大腸菌による発現

contは発現ベクターpTV118Nのみを形質転換した大腸菌MM294を誘導発現したもの、p94、p94＋30、μは本文中のp*lac*-p94、p*lac*-p94/30K、p*lac*-μを発現させたものを示している。誘導した大腸菌は、「実験方法」に述べたように遠心して集めてから超音波破砕をし、さらに超遠心で沈澱を集め、サンプルとした。白三角は発現したp94のバンドを、黒三角は発現したμ-カルパイン大サブユニットのバンドを示している。p94＋30で発現しているはずのカルパイン小サブユニットのバンドは、大腸菌のバンドに隠れて見えていない。

（図V-21）　ラットp94及びヒトμ-カルバイン大サブユニットの*in vitro*翻訳系による発現

blankはmRNAを入れずに翻訳反応を行ったもの、μ、p94は、それぞれ、本文中の pT7-μ、pT7-P94を in vitro 転写、翻訳したものを表している。上部の＋記号は翻訳反応中にロイペプチンを30mg/mlの濃度で加えた時を、－は加えなかった時を示している。白三角は翻訳されたp94のバンドを、黒三角はμ-カルバイン大サブユニットのバンドを示している。

<1>の結果より、骨格筋にはp94のmRNAが多量に存在しているにも関わらず、そのタンパクは存在しないか、あるいは非常に量が少ないと結論できた。また、<3>の結果もm-カルパイン大サブユニットと同量のmRNAからは約2桁近く少ない量のタンパク質しか検出できない事を示していた。その原因を明らかにするために今度はCOS細胞をモデル系として用いることを考え、COS細胞でp94を発現することを試みた。

<4>-(a)　DEAE-dextran法によるp94のトランスフェクション

ラットp94のcDNAをSV40プロモーターの下流に組み込んだクローンpWT-p94を、DEAE-dextran法によりCOS細胞にトランスフェクトして発現させた。(プラスミドの構築、トランスフェクションの方法に関しては、「実験方法」を参照)。

トランスフェクトした細胞は、「実験方法」に記したように上清画分,沈澱画分に分画し、各々においてα-pNS, α-pIS2, α-P94を用いたウェスタンブロットによってp94の発現を検索したが、コントロール(ベクターのみをトランスフェクトしたもの)と比較して、特異的なバンドは確認できなかった(ここでは図に示さないが、後に挙げる図Ⅴ-26に同じ実験結果が含まれている)。同時にトランスフェクトした細胞の一部は、グアニジン－チオシアネート法によりRNAを精製し、ノーザンブロット解析によってmRNA自体の発現を確認した。即ち、図Ⅴ-22に示すように対照として用いたm-カルパイン大サブユニットのmRNA(これはCOS細胞にもともと良く発現している)は、コントロール(pSRD)とp94をトランスフェクトしたものの両方に確認されたが、p94のmRNAはp94のcDNAをトランスフェクトしたもの(図Ⅴ-22の＋レーン)にのみ存在していた。

この結果は、ラット骨格筋で起きている現象、即ち、mRNAは検出できるが特異的なタンパク質は検出できないということが、COS細胞でも再現されていることを示している。そこで、COS細胞を用いた発現系の系を使用して、p94タンパク質についてさらに詳細に検討する事にした。

<4>-(b)　エレクトロポレーション法によるp94のトランスフェクト

次にDEAE-dextran法よりも高効率にトランスフェクションを行えるエレクトロポレーション法を用いてワイルドタイプp94のコンストラクトpWT-p94をもう一度COS細胞に発現させてみた。

その結果、図Ⅴ-23に示すように、まず後に述べるpΔIS2のトランスフェクタント(これは正常な量のタンパク質を発現している事が後に示される)では、CBB染色でもバンドが検出できる位に発現した。一方、ワイルドタイプpWT-p94のトランスフェクタントでは、CBB染色ではもちろん検出できなかったが、α-pNSを用いたウェスタンブロットによって非常に微かだが94kDaの位置に特異的なバンドを確認できた(図Ⅴ-31)。しかし、その量はpΔIS2やpfs-IS2の数100分の1程度であり(図Ⅴ-31のpptの白鏃(pfs-IS2－このコンストラクトも後に述べるように正常な量のタンパク質を発現している)と黒鏃(pWT-p94)とを比較した)、さらにα-pIS2, α-P94を用いたウェスタンブロット解析によると(図Ⅴ-24)、p94の分解産物と考えられるバンドが55, 37, 30kDaの位置付近などに検出された。これらのバンドはα-pNSとは反応していないため、p94のN-端側を欠いていると考えられる。

（図Ⅴ-22）　DEAE-dextran法によりp94cDNAをトランスフェクトしたCOS細胞におけるp94の発現

＋、－は、それぞれ、pWT-P94、pSRD（ベクターのみ）をトランスフェクトした細胞から抽出したRNAをノザンブロット解析にかけたものである。p94、m-カルパインはそれぞれ、ラットp94のcDNA（図Ⅴ-2参照）及び、ヒトm-カルパイン大サブユニットのcDNA（5'端から全体の3分の1の部分）をプローブとして用いた。洗浄条件はラットp94が65℃、0.1×SSC／0.1％SDSであり、ヒトm-カルパインは65℃、2×SSC／0.1％SDSである。

（図Ⅴ-23）　エレクトロポレーション法によるp94の発現

pΔIS2、pWT-p94、pSRD をエレクトロポレーション法でトランスフェクトし、発現させたCOS細胞を直接SDS-PAGE緩衝液に溶解し、電気泳動後、クマシーブリリアントブルーで染色したもの。白三角はpΔIS2のみで検出された84kDaのバンドを示している。

（図Ⅴ-24）　エレクトロポレーション法によるワイルドタイプp94の発現

左がα-pIS2、右がα-P94によるウェスタンブロット解析。白三角が各レーンで特異的に得られたバンドを示している。＋はp*lac*-P94を大腸菌で発現させたものを流したレーンである。なおα-pNSを用いた結果は図Ⅴ-31を参照。

ワイルドタイプのp94タンパク質が正常な量よりもずっと少量(数100分の1)しか検出されない原因としては大きく分けて以下の4つの可能性が考えられる。

①翻訳自体が抑制(阻害)されている。
②翻訳後非常に速く分解される。
③翻訳後修飾を受けて抗体で認識できなくなっている。
④翻訳後直ちに細胞外に放出される。

この内で③についてはエピトープが異なると考えられる3種の抗体(α-pNS, α-pIS2, α-P94)を同時に用いており、図Ⅴ-24, 図Ⅴ-31で検出された 94 kDa のバンドは、これらのどれを用いても同程度に微かにしか反応しなかったため、この可能性は低いと考えられる。また、④についても、p94にシグナル配列は存在しない事(図Ⅴ-3参照)、pWT-p94 をトランスフェクトした細胞の培養液中に、上記3種の抗体と反応するものが検出されなかった事(データは示していない)から可能性は低いと考えられる。

そして、ここで得られた結果より、p94タンパク質が検出されなかった理由はp94が翻訳後直ちに分解されてしまうためである可能性(上記②)が示唆された。そこで、この可能性を検証し、①の可能性を否定するためにさらに以下の実験を行った。

<5> C端及びIS2領域欠失cDNAの発現

ワイルドタイプのp94は、おそらく分解を受けるために、COS細胞で発現される見かけ上のタンパク質量が少ない可能性が示唆された訳だが、この可能性を検証するためと、その原因を探るために、p94の一部を欠失させる事によってp94の発現がどの様な影響を受けるかを解析することにした。

<5>-(a)　p94のC-末端領域欠失ミュータントのトランスフェクション

「実験方法」に述べた方法で、図Ⅴ-25に示したようにp94のC-末端付近が欠失するような種々のクローンをコンストラクトした。pΔBK(643-739 を欠失、以下同様), pΔ12(644-821), pΔ11(589-739), pΔ1(580-821), pΔ9(514-739), pΔ2(399-739), pΔ4(279-821)は、第279～739残基の間の一部を欠失しており、第740残基以降もフレームのつながり方によっては欠失していた(pΔ12, pΔ1, pΔ4)。これらをCOS細胞にトランスフェクトし、<4>-(a)と同様にα-pNSを用いてp94の発現を調べたところ、図Ⅴ-26に示したようにクローンpΔBK, pΔ12, pΔ1は特異的なバンドが検出されなかったが、クローンpΔ11では微かなバンドが検出され、クローンpΔ9, pΔ2, pΔ4では、明確に特異的タンパク質の発現が確認された。図Ⅴ-25と併せて考えると、これら7つのクローンの中でIS2が完全に欠失しているもののみがp94タンパク質の発現を確認できたことになり、IS2領域がp94タンパク質の発現に影響を与えていると考えられた。

<5>-(b)　p94のC-末端領域欠失ミュータントのラット筋芽細胞へのトランスフェクション

ここでCOS細胞を用いた実験系の妥当性を確認するためにも、ラット筋芽細胞であるL8を用いて、これにp94のC-末端領域欠失ミュータントをトランスフェクトして発現させてみた。ラットL8は培養条件を変化させると細胞融合及び筋繊維様構造の出現という、極めて骨格筋に相同の事象を引き起こすこ

（図Ⅴ-25）　p94のC-末端領域欠失ミュータントのコンストラクション

点線は各ミュータントが欠失を含んでいる部位、太黒線部分は実際にそのミュータントが翻訳されるであろう部分を示し、細黒線部分は、5'- 及び 3'- 非翻訳領域を示しており、その上部のp94の模式図に対応している（模式図については図Ⅴ-5の脚注を参照）。欠失部位でフレームシフトが起きているΔ12, Δ1, Δ4では本来翻訳領域であるところも 3'- 非翻訳領域となっている。最右列にある数字は各ミュータントから翻訳されるであろうタンパク質の計算上の分子量をkDa単位で示している。また、"Expression"の欄は図Ⅴ-26で得られたバンドの濃さを定性的に示したものであり、＋の数が多いほどバンドが濃く、－では検出されなかったことを示している。

（図Ⅴ-26）　p94のC-末端領域欠失ミュータントをトランスフェクトしたCOS細胞のウェスタンブロット解析

cont、WT は、pSRD、pWT-P94、を発現させたもの、他は図Ⅴ-25に示したものを発現させたCOS細胞を超音波破砕し、超遠心で沈澱を上清とに分離し、それぞれをα-pNSでウェスタンブロット解析したものである。＋はp*lac*-P94 を大腸菌で発現させたものを流したレーンである。白三角は各レーンで特異的かつ計算上の分子量と一致するバンドを示してある。なおクローンΔ4の発現については図Ⅴ-27を参照。

とが知られている細胞である。結果は図Ⅴ-27に示したようにCOS細胞での発現と全く同一の傾向が見られた。すなわち、クローンpΔBK(642-740を欠失), pΔ12(643-821), pΔ1(579-821)は特異的なバンドが検出されなかったが、クローンpΔ11(588-741)では微かなバンドが検出され、クローンpΔ9(513-740), pΔ2(398-740), pΔ4(272-821)は、明確に発現が確認された。ただし、pΔ2, pΔ4において、COS細胞に比べてL8細胞の方は、発現したp94由来のバンドの上清に来る量の割合が若干多いことは観察されたが、基本的なp94の発現様式についてはCOS細胞を用いてもL8細胞を用いても変化がないと結論された。よって、COS細胞を用いたp94発現系はp94の転写翻訳機構を解析する目的には適切であると考えられ、引き続きCOS細胞を用いて実験を進めた。

<5>-(c)　p94のIS2領域ミュータントのトランスフェクション

<5>-(a), <5>-(b)の結果をもとに、図Ⅴ-28に示したようにIS2のみ(図の箱で囲んだ部分)を欠失したクローンpΔIS2をコンストラクトし、COS細胞にトランスフェクトした。<4>-(a)と同様にα-pNSを用いたウェスタンブロットによってp94の発現を調べたところ、図Ⅴ-29に示したようにクローンpΔIS2では<5>-(a)のクローンpΔ9, pΔ2, pΔ4と同程度に明確なバンドが、予測された位置に確認された。よって、少なくともIS2領域がp94タンパク質発現に影響を及ぼしていることが明らかになった。このことはp94の構造－機能相関を考える上で非常に興味深いが、この後に述べる結果も含めて討論したいのでので、「総合討論」において詳細に検討を加えてみた。

そこで今度は<4>-(b)で考察した①の可能性を調べるために、図Ⅴ-30に示したようにIS2領域の直前に4塩基の欠失または挿入のみをもつクローンpfs-IS2-d／-iをコンストラクトし、その発現を調べた。その結果、このクローンにおいてもpΔIS2やpΔ9, pΔ2, pΔ4と同様にp94の明かなバンドが検出された(図Ⅴ-31の白鏃)。pfs-IS2は欠失(-d)或いは挿入(-i)された4塩基(*Eco*RIサイトのAATT)以外はワイルドタイプのp94のコンストラクト(pWT-p94)と完全に一致した配列を持つため、もしmRNAが特異な立体構造をとる、あるいはmRNAに結合する因子が存在するなどの理由で翻訳自体が抑制されている(前述の①の可能性)ならば、pfs-IS2もワイルドタイプpWT-p94も同様な効果が現れるはずである。ところがpfs-IS2は発現したためこの可能性は極めて低いと考えられる。よって、前述の②の可能性、即ち、翻訳後に速やかに分解されている可能性がさらに強く支持されることになった。

<6> 活性中心のシステイン残基に変異を起こしたp94の発現

最後に、p94が分解されるのは他のプロテアーゼによるものか、自己消化によるものかという点も含めてp94タンパク質を解析するために、「実験方法」で示したように部位指向性 mutagenesis によって、p94の活性中心と考えられるシステイン残基をセリン及びグリシンに変異させたクローンpC>S-P94及びpC>G-P94を作製し、COS細胞にトランスフェクトしてその発現を見た。その結果、両クローンとも pΔIS2 の正常量のタンパク質を発現するクローンと同程度の明確な発現を示した(図Ⅴ-32の白鏃)。そして、その分子量は、計算値の94 kDa と完全に一致した。大腸菌で発現されたp94は<2>で述べたようにそのN-端にベクターpTV118N由来のアミノ酸が15残基追加されており、計算値は

（図Ⅴ-27）　ラット筋芽細胞（L8）でのp94欠失ミュータントの発現

Sは超遠心の上清、Pは沈澱を表す。他の記号は図Ⅴ-26を参照。左のパネルはCOS細胞の実験を比較のため（独立に）繰り返して示したものである。

IS2 配列：

...ILRVFSEKRNLSEEAENTISVDRPVKKKKNKPIIFVSDRANS
NKELGVDQEAEEGKDKTGPDKQGESPQPRPGHTDQESEEQQQ...

（図Ⅴ-28）　**p94のIS2-領域欠失ミュータントのコンストラクション**

上段はワイルドタイプの、下段はpΔIS2の構造を示す。四角い箱の領域が各コンストラクトで翻訳される部分である。また、図の下部に示したのはp94のIS2領域の構造であり、網掛けで示したのはpΔIS2で欠失している部分である。また、下線で示した部分は、α-pIS2を作製する際に抗原として用いた配列である。

（図Ⅴ-29）　**p94のIS2-領域欠失ミュータントをトランスフェクトしたCOS細胞のウェスタンブロット解析**

ΔIS2、WT、CONTは、pΔIS2、pWT-P94、pSRDを発現させたものであり、Pは*plac*-P94を大腸菌で発現させたものを流したレーンである。白三角は各レーンで特異的かつ計算値と一致するバンドを示している。

（図Ⅴ-30）　IS2-領域フレームシフトミュータントのコンストラクション

上段はワイルドタイプの、下段はpfs-IS2の構造を示す。四角い箱の領域が各コンストラクトで翻訳される部分である。白三角がそれぞれの終止コドンの位置を示している。pfs-IS2に於いて4塩基の欠失、挿入が存在する部位は矢印とギャップで示した。

（図Ⅴ-31）　**p94のIS2-領域フレームシフトミュータントをトランスフェクトしたCOS細胞のウェスタンブロット解析**

CONT、WT、fs-IS2は、pSRD、pWT-P94、pfs-IS2-d を発現させたものである。白三角はfs-IS2のレーンで特異的かつ計算値と一致するバンドを示している。ここでは pfs-IS2-i のデータを示していないが、pfs-IS2-d と全く同じ結果が得られている。このデータは実はトランスフェクトにエレクトロポレーション方を用いており、これについては本文で後述してある。黒三角は、微かなワイルドタイプのp94の発現を示している。

（図Ⅴ-32）　活性中心のシステイン残基に変異を起こしたp94をトランスフェクトしたCOS細胞のウェスタンブロットによる解析

CONT、Mut-C-S、Mut-C-G、WT は、それぞれ、pSRD、pC>S-P94、pC>G-P94、pWT-P94 をトランスフェクトしたCOS細胞を直接SDS-PAGE緩衝液に溶解して電気泳動し、α-pNSを用いてウェスタンブロットしたものである。白三角の位置が94kDa の位置を示す。＋は *plac*-P94 を大腸菌で発現させたものを流したレーンである。

96kDaであるため、COS細胞で発現させた pC>S-p94 あるいは pC>G-p94(94 kDa)よりもわずかに大きい分子量を示しており、すなわち計算値と一致している。このことは、pC>S-p94 あるいは pC>G-p94 から発現されたタンパク質が大腸菌で発現されたものとほぼ同程度の修飾しか受けていないことを示唆している。

この結果より、まず第一に、<4>-(b)で考察した①,③,④のすべてが否定できる。①が起こるとすれば、何らかのmRNA結合因子がp94のmRNAに結合するか、p94のmRNA自身が特異な高次構造をとって翻訳因子が作用できないようになった状態を考えることができるが、これは、pC>S-P94 及び pC>G-P94 のmRNAがワイルドタイプのものと1又は3塩基しか異ならないことを考えると、その可能性はほとんどないと結論できる。また、この変異タンパク質は821残基のなかで1アミノ酸残基のみが異なる構造(しかも pC>S-P94 の方は特にシステイン残基がセリン残基に置換した、すなわち、全体で1万個以上もの原子から構成されている分子の中のただ1カ所の酸素原子が、同族元素のイオウ原子に置換した構造)であるため、ワイルドタイプのp94と比べて全体の立体構造の変化は極めて少ないと考えられるタンパク質であり、作製した抗体に非常によく反応すること、かつ細胞外に放出されることもないという事から、③,④のどちらの可能性も否定できる。

よって②の、p94が速やかに分解される可能性が立証されたことになる。これは<4>-(b)で示したように、ワイルドタイプのp94をエレクトロポレーション法でトランスフェクトし、発現させたもののウェスタンブロット解析では、非常に少量ではあるが94 kDa の位置にバンドが検出され、加えて、55kDa、37kDa、30kDaの位置付近にベクターのみをトランスフェクトしたものには存在しないバンドが見いだされたことからも支持される。

では、分解の作用機構はどうであろうか。多くのタンパク質で知られているように、あるタンパク質が分解される場合は、まず数カ所が部分分解され、その後速やかに分解される。つまり、その第一段階が何によってもたらされるのかという点が重要となってくる。p94は、COS細胞に発現させた後ウェスタンブロット解析にかけるまでの間に、実験的な分解が生じないような条件下(細胞に直接SDS-PAGEサンプル緩衝液を加えて直ちに攪拌溶解する方法)においても上記の位置に分解物と考えられるバンドが94 kDa のバンドよりも強く(しかし、例えば pC>S-P94 を発現させたもので検出される94 kDa のバンドよりは数十分の一以下の強さで)存在していることから、p94の分解は非常に早いスピードで起こっていると考えられる。さらに<3>で示したように、他の分解系があまり存在しないと考えられる*in vitro*翻訳系においても、p94の94 kDa のバンドがm-カルパイン大サブユニットの80 kDa のバンドの数十分の一の強度しかなかったことや、骨格筋とCOS細胞というある意味では、非常にかけ離れた系で共通の分解現象が見られるということなどからも、p94が自己分解している可能性が強く示唆されていた。

そしてここで得られた実験結果はp94の自己分解の可能性をほぼ明確にしたということが言える。すなわち、システインプロテアーゼと考えられるp94の、活性中心のシステインであると予想される残基をセリン、またはグリシン残基に置換したものでは、ほとんど分解が見られず94 kDa のバンドが、他のタンパク質(例えばm-, μ-カルパイン大サブユニットやp94の変異体であるΔIS2や fs-IS2 など)と同程度の強さで検出された事実と、以上行ってきた実験結果を合わせると、以下に述べる解釈が最も妥当であると考えられる。つまり、p94はその相同性から予想される129番目のシステイン残基が活性中心をなすシステインプロテアーゼであり、ワイルドタイプは、翻訳後直ちに自己分解をする。そして、このシステイン残基をセリンまたはグリシンに置換したものでは

p94のプロテアーゼ活性がほぼ消失し、自己分解も起こらないために見かけ上ワイルドタイプの数百倍の量が検出されるようになる。

もちろん、反論も考えられる。一残基置換とはいえ、それがp94の高次構造に影響を及ぼし、言い換えると、p94がネイティブな構造を保持できなくなり、p94を認識し分解していた他のプロテアーゼが、p94を認識できなくなり、分解されなくなったというものである。しかし、この場合には、まず骨格筋、COS細胞、*in vitro*翻訳系(ウサギ網上赤血球)の3つの系に共通して存在し、かつ、p94が翻訳された直後にp94と作用し得るプロテアーゼの存在が仮定されなければならない。さらに、アミノ酸の置換が(アスパラギン酸がリジンに換わったとかグリシンがチロシンに換わったとか言うのならともかく)、システインからセリンというどちらも電荷がなく親水性、電気陰性度も同じ様な傾向を示す残基へのものであるだけに、何度も繰り返すことになるが、高次構造が大きく変化する可能性は極めて少ないと考えられる。

p94が自己分解して消失するということの完全な証明は不可能であるが、以上論じてきたように本論文で示した結果は、この可能性を極めて強く支持していると考えられる。

[5] COS細胞に発現させたp94の細胞内局在

[4]<4>-(b)で用いた、pΔIS2 及び pWT-p94 をトランスフェクトしたCOS細胞についてまず、細胞の様子を観察してみた。定量的な事は言えないが、pWT-P94をトランスフェクトした細胞は、pΔIS2 やpSRD をトランスフェクトした細胞と比べて分裂速度が遅く、さらに図Ⅴ-33に示したように細胞の形態が少し丸みを帯びている、即ち、プレートにしっかりと張り付いていないように観察され(図Ⅴ-33のC及びF)、トランスフェクト後にプレートから剥がれる細胞も多かった。データは示さないが、プレートから剥がれた細胞にもp94が検出され、その分解物のパターンも剥がれていない細胞のものと同一であった。細胞が死んでプレートから剥がれた場合、その細胞の内容物は培養液中に放出され、その過程において速やかに分解されると考えられる。よって、これはプレートから剥がれた細胞が死んで浮いたのではなく、細胞の接着能力の低下から剥離したことを示唆している。

ここで、pWT-p94 を発現させたCOS細胞の超音波破砕物の超遠心上清画分をもう一度注意深く観察してみると、ベクター(pSRD)やpΔIS2を発現させたCOS細胞で明確に認められる65 kDaのバンドが完全に消失していることが判明した(図Ⅴ-34の白鏃の部分)。この結果と、pWT-p94 をトランスフェクトしたCOS細胞が剥がれやすい傾向にあったこととが、直接結びつくかどうかはわからないが、この65 kDa のバンドが、細胞の接着性に関与している分子で、それがために接着性が低下したという可能性も考えられる。

さらに、「実験方法」で示した蛍光抗体法を用いて発現しているp94をα-pNSで染色した結果、pΔIS2 及び pWT-p94 をトランスフェクトしたCOS細胞のどちらも核のまわりに局在してシグナルが検出された(図Ⅴ-35のC及びD)。但し、蛍光が検出された頻度は著しく異なり、pΔIS2 では約3個に1個の細胞で検出されたのに対し、pWT-P94 では数100個に1個の割合でしか検出できなかった。

以上をまとめると、ワイルドタイプのp94をトランスフェクトした細胞では、ベクターあるいはミュータントのp94をトランスフェクトした細胞と比較して、以下の点で異なっていた。

- 細胞の分裂速度が遅い。
- 細胞の形態が丸まった感じである。

（図Ⅴ-33）　p94を発現させたCOS細胞の位相差顕微鏡像

A, B、**C, D**、及び**E, F**は、各々pSRD、pΔIS2、及びpWT-P94をトランスフェクトしたCOS細胞の位相差顕微鏡像、A, C, Eは48倍、B, D, Fは120倍の倍率の像である。

（図Ⅴ-34）　p94を発現させたCOS細胞の超音波破砕物の超遠心上清画分の電気泳動パターン

pSRD、pΔIS2、pWT-P94 をエレクトロポレーション法でトランスフェクトし、発現させたCOS細胞を超音波破砕し、超遠心分離した。得られた上清画分を電気泳動し、その後クマシーブリリアントブルーで染色したもの。白三角はpWT-P94のみで欠失が認められる65 kDa のバンドを示している。

（図V-35）　トランスフェクトにより発現させたp94の細胞内局在

A, B及び**C**は、pΔIS2 をトランスフェクトしたCOS細胞の、**D**はpWT-P94をトランスフェクトしたCOS細胞をα-pNSを用いて蛍光抗体法で染色し、その蛍光を検出したもの。

● トランスフェクト後にプレートから剥離する細胞数が多い。
● 細胞の超音波破砕物の超遠心上清に65kDa のバンドが欠失している。
● α-pNSに反応するシグナルが非常に低い頻度でしか検出されない。

欠失の見られた65kDa のバンドがどのようなタンパク質であるかは全く不明であるが、他のバンドと比較してもはっきり見えるバンドであり、細胞質内にかなり多量に存在すると考えられる。また、目で確認できないだけで、他にも消失しているバンドが存在する可能性も十分ある。これらの事を説明する一つの考え方は、ワイルドタイプのp94タンパク質はCOS細胞内で発現した直後に自己分解を始めるが、この自己分解の前後に(非常に短時間である可能性はあるが)COS細胞内の細胞接着と関係するようなタンパク質を切断し、その結果COS細胞は、プレートへの接着性や分裂速度が低下する、というものである。もちろん、ここでみられたタンパク質の消失が、p94に直接分解をうけた証拠はない。p94が他のプロテアーゼなどに作用して活性化し、最終的にバンドの消失を導いたとも考えられる。いずれにしてもバンドの消失と細胞の挙動変化とは関係していると考えられる。そして、バンドの消失はベクターのみを発現させたものはもちろんのこと、IS2を欠失したり(pΔIS2)、活性中心を変位させたp94(pC>S-P94 及び pC>G-P94)を発現させたものでは観察されなかったという事実から、p94の自己分解活性と強く関連していると考えられる。COS細胞と骨格筋との間で、共通あるいは非常に構造の類似するタンパク質が存在することは考えられるので、COS細胞で見られたようにp94が骨格筋においてもある特定のタンパク質と相互作用していると考えられ、この現象はp94の骨格筋での機能を考える上でも興味深いものと言える。例えば、p94もこのタンパク質も生成量と分解量との微妙なバランスの上に動的定常状態に達しており、p94の微かな量的変動あるいは活性変動で、この標的タンパク質の量が非常にレスポンス良く変動する、などの機構が想像できる。

また、[1]<4>で述べたようにp94のIS2領域には核移行シグナルらしいものが存在している。ここで、ワイルドタイプで非常に少量の細胞(数百個に1個)で観察された、核の周囲に存在するα-pNS抗原は自己分解を受けていないものであると考えられる。なぜならこれはα-pNSと反応しており、α-pNSと反応するバンドは94kDaのものだけだからである。よって、次のような解釈も可能である。すなわち、ここで検出されたシグナルは、何らかの理由でまだ核内に移行していなかったために分解を受けていないp94のものであるという可能性である。言い換えると他の大部分の細胞ではp94は翻訳後直ちに核内に移行し、それと同時に自己分解してしまい、pΔIS2の発現タンパク質ではほぼ3個に1個の細胞で観察されたα-pNSとの反応物は核移行シグナルを持っていないため核内に移行できなかったのかもしれない。このように考えるとp94の活躍の場が核内である可能性も高くなってくる。少なくともm-, μ-カルパインが、核内にも存在するが細胞質内にも拡散的に存在するものの方が多いという知見と比較すると、これもp94の特異性の一つということができる。

[6] p94のプロテアーゼ活性

p94のプロテアーゼ活性とカルシウム感受性を実際に解析するためにCOS細胞にワイルドタイプのp94、及びIS2を欠失したp94と、対照としてm-, μ-カルパイン大サブユニットを発現させ、その活性を調べた。陰性コントロールとしてベクターのみをトランスフェクトした細胞も用意した。また、すべての細胞には、カルパイン小サブユニットを共発現させた。これらを「実験方法」で示

した条件で活性測定を行い、SDS－PAGEとそのゲルのCBB染色(図Ⅴ-36, 図Ⅴ-37)や抗フォドリン抗体を用いたウェスタンブロット(図Ⅴ-38)で解析した結果、m-, μ-カルパインでは、そのカルシウム感受性と一致する活性が検出されたにも関わらず、p94及びΔIS2では陰性コントロールに比べて顕著な活性は見られなかった。即ち、m-大サブユニットを小サブユニットと共に発現させたものでは、細胞内タンパク質、特にカルパインの良い基質であることが報告されている[17]フォドリンの分解がカルシウム濃度0.1mMから観察され(図Ⅴ-36, 図Ⅴ-38のmのレーン4～6)、μ-大サブユニットを小サブユニットと共に発現させたものでは1μMから分解が見られている(図Ⅴ-36, 図Ⅴ-38のμのレーン2～6)。しかし、p94ではベクターのみを発現させた陰性コントロールとの差は顕著ではなかった。p94のIS2領域を欠失したものを発現させた場合、0.1mMのカルシウム濃度で陰性コントロールよりも強い分解活性が認められるものの(図Ⅴ-38のΔIS2のレーン5)、1mMの濃度では再び活性が認められず(同レーン6)、また、CBB染色でも0.1 mM, 1 mM においてコントロールよりも、特に高分子量のタンパク質が、若干強く分解を受けているようにも見えるが(図Ⅴ-37のレーン5, 6の比較)、プロテアーゼ活性のはっきりとしたカルシウム感受性を示すデータは得られなかった。

さらに、p94を濃縮する目的で免疫沈降を行ってみた。「実験方法」に記載したようにpWT-P94、pΔIS2をトランスフェクトしたCOS細胞の超音波破砕物の超遠心上清を免疫沈降し、IgGと複合体を形成したまま活性を測定した。しかしデータは特に示さないが、やはり明確な活性は検出されなかった。これは上清に来る両タンパク質の量が少なすぎたため、あるいは抗体の結合が活性を阻害したためと考えられる。

以上述べたように、p94のプロテアーゼ活性とカルシウム感受性は残念ながらはっきりしないが、対照実験のm-, μ-カルパインでは、活性の明らかなカルシウム感受性が見られたため、実験系は適切であると考えられる。p94のカルシウム感受性が検出できなかった理由としては、次の可能性が高い。p94のワイルドタイプを発現させたものは自己分解によって活性を示すp94の量が非常に少なくなっていた可能性、そして、pΔIS2を発現させたものでは、pΔIS2そのものにプロテアーゼ活性が無かった可能性である。他にp94の基質がCOS細胞内に存在しなかったという可能性も存在するが、[5]で述べたようにワイルドタイプのp94を発現させたCOS細胞において、65kDa のバンドの消失が観察されたことから、native なp94はCOS細胞でも直接的ではないにせよ相互作用できるタンパク質が存在するであろうことが考えられる。

いずれにしても、ドメインⅣの相同性からp94がカルシウム結合能を有する事はまず間違いないが、その濃度依存性については基質の検索も含めてこれからの課題である。しかし、p94が自己分解を起こすために native なタンパク質を得る事が非常に困難である事から、これらの事に結論をつける事は大変難しいと予想される。とにかく、p94がCOS細胞内で自己分解という活性を発現している事は確かであると考えられるため、p94の自己分解は少なくとも細胞内の通常のカルシウム濃度(10^{-8}～10^{-6}M)で達成可能であるという事は推定できる。初めてp94が発見されたときに我々は novel という意味で、実はp94に n-calpain という名称を付けて呼んでいたのだが、もしp94が本当にnMオーダーのカルシウムで活性化するのならば、p94は二重の意味で "n"-カルパインであるのかも知れない。

（図Ⅴ-36）　COS細胞に発現させたm-, μ-カルパインサブユニットのプロテアーゼ活性

レーンの番号は、以下のカルシウム濃度に対応する。1、0mM（EDTA5mM）；2、1μM；3、10μM；4、100μM；5、1mM；6、10mM。「実験方法」に記載した活性測定を行った各反応物をSDS-PAGEにかけ、クマシーブリリアントブルーで染色した。

（図Ⅴ-37）　COS細胞に発現させたpΔIS2、pWT-P94のプロテアーゼ活性

レーンの番号は、以下のカルシウム濃度に対応する。1、0mM（EDTA5mM）；2、1μM；3、10μM；4、100μM；5、1mM；6、10mM。cont、ΔIS2、WTは各々pSRD、pΔIS2、pWT-P94をトランスフェクトした細胞示している。その他は図Ⅴ-36の脚注を参照

(図Ⅴ-38)　COS細胞に発現させたカルバインサブユニットのプロテアーゼ活性のウェスタンブロットによる解析

図Ⅴ-36、図Ⅴ-37を抗フォドリン抗体を用いてウェスタンブロット解析したもの。レーン番号などは図Ⅴ-36を参照。

Ⅵ. 総合討論

[1] はじめに

本論文では、「結果と討論」に述べたようにニワトリm-カルパイン大サブユニットをプローブとして、m-, μ-カルパイン大サブユニットの双方ともに相同性を有すが異なった新しいcDNA分子種を、ヒトcDNA骨格筋のcDNAライブラリーから単離し、これがコードするタンパク質をp94と命名した。引き続き、ラット、ニワトリからも同一分子種であると考えられるものをコードするcDNAを単離した。p94は未知の新しいタンパク質と予想されたので、まずこれらの一次構造を決定し、次にp94のタンパク質レベルでの同定を試みた。p94はm-, μ-カルパインとは組織分布が全く異なり、骨格筋にのみ特異的に発現しているので、p94の同定はカルパイン生理機能や骨格筋の機能を考える上でも必須であると考えられた。p94は生体内での自己消化による分解が著しく速いため、これをタンパク質レベルで完全に同定する事はできなかった。本考察ではこれらの結果をふまえて、まずこの新しく発見されたp94分子の一次構造を詳細に比較検討し、ここから得られる知見を考察した([2])。続いて、COS細胞発現系での結果をもとに異常に速い自己分解性を示すp94のタンパクレベルでの性質を考察した([3])。また、p94は骨格筋特異的発現という、m-, μ-カルパインとは著しく異なった組織分布を示すため、この意義についても考えてみた([4])。次に、p94を考えに含めた上で考察をカルパイン全体に広げ、情報伝達系での位置づけ([5])、分子進化の過程([6])について検討を進めてみた。

[2] p94の一次構造について

<1> m-, μ-カルパインサブユニットとの比較

まず、ヒト、ラット、ニワトリの3種から強く保存された分子が得られたことは、この第三のカルパイン大サブユニットファミリーのメンバーと考えられるp94が、生体にとってm-, μ-カルパインと同等かそれ以上に重要な役割をはたしていることを強く示唆するものである。「カルパイン大サブユニットファミリー」という言葉を使ったが、ここではこれは次のように定義する。即ち、「ヒトm-カルパイン大サブユニットの4つのドメインのすべてに有意の相同性を有する分子群」ということである。もちろん上記の「ヒト」は「ウサギ」でも良いし「ニワトリ」でも良い。また「m-カルパイン」は「μ-カルパイン」でも、(多少本末転倒の感があるが)「p94」でも良い。今後他の生物種における同種分子の発見によって、この定義における唯一の不確定な語である「有意の」という言葉をもう少しきちんとしたものに換えることができるようになるかもしれないが、現在では「有意」としか言いようがない。但し、現在までに知られている(データベースに存在する)アミノ酸配列の中で「有意」かどうかでの判定が困難であるような配列は一切存在しないので、その意味においては絶対的な定義である。表Ⅵ-Ⅰを見るとわかるように、現在までに知られているすべてのカルパイン大サブユニットファミリーは互いに30%以上の相同性(正確には「一致率」というべきもので、適当にギャップを考慮して両配列を並べたときに一致するアミノ酸の比率が最大になるときのその比率のことを指す。相同性と言うとアミノ酸のレベルで相同なもの(例えばセリンとスレオニンなど)にも適当なスコアーを与えて計算する方法もあるが、そのスコアーの設定方法によって値が大きく変わるので、本論文では単純(だが明確)に上記の

（表Ⅵ-Ⅰ）　カルパイン大サブユニットファミリーのアミノ酸配列の相同性

表中に示した数字は本文で述べた「一致率」であり（以下に挙げたすべての表中の数字も同様である）、p94に存在する3つの特異的配列、NS, IS1, IS2は、計算に入れていない（すなわち、これらの配列は存在しないものとして一致率を計算した）。ドメインⅣについてはカルパイン小サブユニットとの相同性も記した。そのドメインにおいて、比較したサブユニットの少なくともどちらかのアミノ酸配列が完全に決定されていない場合、相同性を（）で示した。また、太字で表した数字は際だって相同性の高いものを示している。

		Chicken m	Human μ	Chicken μ	Rat p94	Chicken p94	*S. mansoni*	Human 30K
Domain I	Human m	**70.3**	55.4	—	32.4	32.4	17.6	
	Chicken m		51.9	—	32.4	32.4	18.2	
	Human μ			—	37.8	35.1	13.1	
	Chicken μ				—	—	—	
	Rat p94					**62.9**	24.3	
	Chicken p94						35.1	
Domain II	Human m	**75.1**	**73.5**	**81.7**	65.0	62.5	47.7	
	Chicken m		**79.4**	**73.0**	64.2	62.1	48.1	
	Human μ			**75.7**	65.4	62.9	49.2	
	Chicken μ				65.7	60.2	48.7	
	Rat p94					**75.8**	50.6	
	Chicken p94						49.4	
Domain III	Human m	63.3	60.3	(58.1)	52.6	56.3	35.1	
	Chicken m		68.9	(64.2)	60.9	62.5	41.2	
	Human μ			**(75.4)**	58.9	59.4	38.8	
	Chicken μ				(54.0)	(54.5)	(36.2)	
	Rat p94					**79.1**	37.9	
	Chicken p94						36.9	
Domain IV	Human m	55.1	50.9	47.3	45.5	43.1	31.4	47.9
	Chicken m		66.7	63.7	56.0	53.6	27.8	52.4
	Human μ			**82.1**	52.4	51.2	29.0	51.2
	Chicken μ				50.0	48.2	30.8	45.2
	Rat p94					**86.3**	32.0	**57.7**
	Chicken p94						30.2	**57.1**
	S. mansoni							30.2
Total	Human m	66.3	62.3	(53.2)	51.8	51.0	37.4	
	Chicken m		70.3	(64.0)	55.3	54.8	38.4	
	Human μ			**(78.4)**	53.9	53.2	37.3	
	Chicken μ				(50.3)	(50.0)	(33.8)	
	Rat p94					**77.6**	40.4	
	Chicken p94						39.8	

ような「一致率」を以て「相同性」という言葉として用いる)を持っており、特に話を哺乳類、鳥類に限れば50%以上の高い相同性が認められる。表Ⅵ-Ⅰに示すように同型間で比較してみると、ニワトリと哺乳類(ラットまたはヒト)の相同性はp94では78%、μ-型でも78%、m-型では少し下がって66%となっており、p94はμ-型と同程度に、かつm-型よりも強く進化の過程で保存されたことがわかる(ニワトリm-型はヒトm-型よりもむしろヒトμ-型との相同性が高いがこの点については後で述べる)。さらに哺乳類間では、p94で94%(表Ⅵ-Ⅱ)、μ-型で95%(表Ⅵ-Ⅲ)、m-型で93%(表Ⅵ-Ⅳ)という高い相同性を持っており、これもp94はm-, μ-型と同程度に高い値である。

図Ⅵ-1にまとめたように、部分的に見ると、p94はm-, μ-型との相同性において、ドメインⅡが最も高い値(約65%)を示している。ドメインⅡはパパイン、カテプシンB, H, Lなどとの相同性から触媒ドメインと考えられているので、この領域が高い相同性を保っていることは理にかなっている。特に活性中心に配位すると考えられているシステイン、ヒスチジン、アスパラギンの各残基(ヒトm-型のそれぞれ105, 262, 286番目である：図Ⅵ-2に＊で示した)は、p94においてもその残基の周囲を含めて連続的に保存されている(ラットp94のそれぞれ129, 334, 358番目に当たる)。また、パパイン、カテプシンも含めてシステインプロテアーゼ全般で見られる、活性中心ヒスチジン残基のC-端側に数個のトリプトファン残基が存在するという特徴が、p94でもm-, μ-型と全く同じ様に見いだされる(図Ⅵ-2の太字で示したW(トリプトファン)残基)。これらのシステインプロテアーゼを特徴づけるアミノ酸残基が良く保存されていることは、言い換えるとp94にシステインプロテアーゼ活性が存在することを強く示唆している。但し、p94には上記の活性中心ヒスチジン残基のすぐN-端側にIS1と名付けた48残基の挿入を含む配列が存在していた。この配列がp94の活性に及ぼす影響は、配列の上からはなんともいえないが、m-, μ-型が既にパパインと比べて活性中心システイン残基とヒスチジン残基の間にかなりの挿入が見られることから(活性中心のシステイン残基とヒスチジン残基との距離はパパインで129残基、m-, μ-カルパイン大サブユニットで156残基、カテプシンBで164残基、p94で204残基である)、IS1配列もp94のプロテアーゼ活性そのものに与える影響は少ないと推測できる。

また、ドメインⅡの相同性は、同タイプ内でもタイプ間(m-型とμ-型、μ-型とp94、あるいはp94とm-型の間)でも余り変わらずに高い値を示しており、特徴の一つとなっている。これは、このドメインが各タイプ(m-型、μ-型、そしてp94型)を特徴づけると言うよりは、逆にどのタイプにも共通した「システインプロテアーゼ」としての機能を与えるモジュールであることを示している。言い換えれば、m-, μ-型で異なるカルシウム依存性を示すという特徴は、このドメインではなく他のドメインに負われるべきものであると考えられる。

<2> E-Fハンドスコアーから予測されるカルシウム結合能

同様にカルシウム結合領域であるドメインⅣに目を向けてみると、まずp94とm-, μ-型の間の相同性はそれほど高くなく、50%前後である。しかしこれは、m-型とμ-型との間においても同様であり、相同性だけではカルシウム結合能を論ずることはできない。但し、μ-型とp94はニワトリとヒトの間でもそれぞれ82%、87%と非常に高い相同性を有しており(表Ⅵ-Ⅱ, 表Ⅵ-Ⅲを参照)、両タイプを特徴づけるドメインの一つとなっている。一方m-型では55%と、上記と比較するとかなり低い値を示しているが、この点については後述したい。

（表Ⅵ-Ⅱ）　ラット、ヒト、ニワトリにおけるp94のアミノ酸配列の相同性

Domain I-NS、Domain II-IS1、Domain III-IS2 の欄は、そのドメインから特異的配列を除いた部分について比較した相同性を示している。各ドメインにおいて、比較したサブユニットの少なくともどちらかのアミノ酸配列が完全に決定されていない場合、相同性を () で示した。また、太字で表した数字は際だって相同性の低いものを示している。

		Rat	Chicken
Domain I	Human	(98.2)	(76.4)
	Rat		62.9
NS	Human	(100.0)	(83.3)
	Rat		**55.7**
Domain I -NS	Human	97.2	72.2
	Rat		75.0
Domain II	Human	93.7	76.2
	Rat		75.8
IS 1	Human	93.5	**51.6**
	Rat		**48.4**
Domain II -IS 1	Human	93.8	82.5
	Rat		82.9
Domain III	Human	92.1	76.7
	Rat		79.1
IS 2	Human	85.5	**50.0**
	Rat		**50.0**
Domain III -IS 2	Human	93.7	85.3
	Rat		88.5
Domain IV	Human	95.8	86.9
	Rat		86.3
Total	Human	(94.0)	(78.5)
	Rat		77.6

（表Ⅵ-Ⅲ）　ヒト、ウサギ、ニワトリにおけるμ-カルパイン大サブユニットのアミノ酸配列の相同性

各ドメインにおいて、比較したサブユニットの少なくともどちらかのアミノ酸配列が完全に決定されていない場合、相同性を () で示した。また、太字で表した数字は際だって相同性の高いものを示している。ドメインⅠ,Ⅱについては、参考のためにラットで得られたクローン（データは示していない）の配列情報をウサギの代わりに用いて、数字を計算してある。また、ジストマ（*S. mansoni*）のカルパインの配列との相同性も参考のために加えた。

		Rat	Chicken	*S. mansoni*
Domain I	Human	79.8	—	13.1
	Rat		—	14.3
	Chicken			—
Domain II	Human	(93.0)	75.7	49.2
	Rat		(83.7)	(51.2)
	Chicken			48.7
Domain III	Human	(96.3)	(75.4)	38.8
	Rabbit		(74.6)	(41.5)
	Chicken			(36.2)
Domain IV	Human	94.6	82.1	29.0
	Rabbit		78.6	30.2
	Chicken			30.8
Total	Human	(95.4)	(78.4)	37.3
	Rabbit		(76.8)	(35.2)
	Chicken			(33.8)

(表Ⅵ-Ⅳ)　ヒト、ウサギ、ニワトリm-カルパイン大サブユニットのアミノ酸配列の相同性

各ドメインにおいて、比較したサブユニットの少なくともどちらかのアミノ酸配列が完全に決定されていない場合、相同性を（）で示した。また、ジストマ（*S. mansoni*）のカルパインの配列との相同性も参考のために加えた。

		Rabbit	Chicken	*S. mansoni*
Domain I	Human	(85.7)	70.3	17.6
	Rabbit		(78.6)	(24.2)
	Chicken			18.2
Domain II	Human	92.9	75.1	47.7
	Rabbit		74.3	47.7
	Chicken			48.1
Domain III	Human	94.7	63.3	35.1
	Rabbit		62.8	35.5
	Chicken			**41.2**
Domain IV	Human	92.8	55.1	31.4
	Rabbit		53.3	29.2
	Chicken			27.8
Total	Human	(93.1)	66.3	37.4
	Rabbit		(65.5)	(39.0)
	Chicken			38.4

(図VI-1)　p94とカルパイン大サブユニットの各ドメインでの相同性

●は p94 (ラットとヒト)、○は p94 (ラットとニワトリ)、■はラット p94 とニワトリ m-カルパイン大サブユニット、□はラット p94 とヒト m-カルパイン大サブユニット、▲はラット p94 とヒト m-カルパイン大サブユニットとの間の相同性を示している。

No. of Rat p94
1 Rat p94
2 Human p94
3 Chicken p94
4 Human m
5 Rabbit m
6 Chicken m
7 Human μ
8 Rabbit μ
9 Chicken μ
10 S. mansoni
No. of Human m
Domain I
Domain II
Domain III
Domain IV
IS1
IS2
IS2-Domain III
NS
No. of Rat p94
Rat p94 1
Human p94 2
Chicken p94 3
Human m 4
Rabbit m 5
Chicken m 6
Human μ 7
Rabbit μ 8
Chicken μ 9
S. mansoni 10
No. of Human m

(図Ⅵ-2)　カルパイン大サブユニットファミリーのアミノ酸配列の比較
(前頁)

レーンは、1: ラットp94, 2: ヒトp94, 3: ニワトリp94, 4: ヒトm-カルパイン大サブユニット, 5: ウサギm-カルパイン大サブユニット, 6: ニワトリm-カルパイン大サブユニット, 7: ヒトμ-カルパイン大サブユニット, 8: ウサギμ-カルパイン大サブユニット, 9: ニワトリμ-カルパイン大サブユニット, 10: ジストマ(S. mansoni)カルパイン大サブユニットのアミノ酸配列を示す。－はその位置に該当するアミノ酸残基が存在しないことを示す。反転文字は、配列の判明しているすべてのサブユニットの間で保存されているアミノ酸残基を示している。配列の上部にはラットp94の、下部にはヒトm-型の開始メチオニンを、それぞれ1とした番号を示し、さらにドメインⅠ～Ⅳ、NS、IS1、IS2の各領域を示した。上、下部に*印がある部位は、活性中心を形成するシステイン、ヒスチジン、アスパラギン残基を表している。ドメインⅣの下部に示した太線と数字（Ⅰ～Ⅳ）は、4つのE-Fハンド構造の位置を表している。白三角はニワトリm-カルパイン大サブユニットの遺伝子においてイントロンが挿入されている位置を示している。

次に、ドメインⅣで実際にカルシウムを結合するのはE-Fハンド構造[1][2]といわれる配列であることが明かとなっているので、この構造に注目してカルシウム結合能について考えてみる。ドメインⅣが別名カルモジュリンドメインと呼ばれることからもわかるとおり、m-, μ-型にはカルモジュリンと同様に4つのE-Fハンド構造が含まれている。もちろんp94にも相同性のある4つの構造が同定できるので、これらの構造のE-Fハンドスコアーを比較してみた(表Ⅵ-Ⅴ)。するとp94のE-Fハンド構造のスコアーは、m-, μ-型やカルパイン小サブユニットのものと比較してE-Fハンド構造の位置(1から4)によって値は異なるものの、同程度の値となっている。このスコアーだけからは断定はできないが、p94もカルシウムを結合すること、そして、恐らくはカルシウムによって機能を調節されていることを強く示唆するものである。

ここで一つ興味深いことは、Andresenらによって報告された「第5番目」のE-Fハンド構造である[3]。それはドメインⅡとドメインⅢとにまたがるように存在しており、Andresenらが示した*S. mansoni*のカルパインとラットp94以外に、m-, μ-型にも存在している(表Ⅵ-Ⅴ中の Extra 欄参照)。Andresenらは*S. mansoni*のカルパインにおいて、この領域が実際にカルシウムを結合することをゲルオーバーレイの実験で確認しており、*in vivo*での機能はともかく、カルシウムを結合し得る構造であることはまちがいないようである。実際にこの領域がカルパインの活性制御に関与しているかどうかを明らかにするためには、X線解析などのカルパインの高次構造解析か、mutagenesis による活性変化の解析が必要であり、一筋縄ではいかないであろう。

さて、ドメインⅡ, Ⅳ以外については、m-, μ-型においても、その機能はあまり明かではない。しかし、m-, μ-型においてドメインⅠは自己消化との関連性も指摘されており、各タイプを特徴づけるドメインの一つとなっている。実際に、各タイプ内の相同性は比較的高いが(ニワトリと哺乳類間で、m-型, p94はそれぞれ70%, 63%の相同性を持つ：表Ⅵ-Ⅰ参照)、タイプ間では低い値となっている。特にp94は、m-型にもμ-型にも30%強の相同性しか持たず、かつN-端にはNSと名付けた特異な配列が存在している。これは、p94がm-, μ-型とは全く違った自己消化活性を持つ可能性を示唆しているのかも知れない。一方ドメインⅢは、タイプ内はもちろん良く保存されているが、タイプ間においてもドメインⅡに次いで比較的良く保存されており、カルパインの基本機能に関与していること示唆していると考えられる。

<3> p94に特異的に存在するNS, IS1, IS2の相同性について

以上は、p94のm-, μ-型との共通性について述べてきたが、ここで、p94に特徴的な配列である3つの領域について考えてみる。

まずp94のN-端に存在するNS配列であるが、「結果と討論」でも述べたようにデータベース上にこの配列と有意の相同性を示す配列は存在しなかった。この配列の特徴は、まずニワトリ、ラット間の保存が比較的低いということである(56%：表Ⅵ-Ⅱ参照)。これは、後述するIS1, IS2配列にも同様に言えることであり、他の部分が70%以上の相同性を有するのに対してどれも50%前後の相同性しか無い。このことが意味するのは、これらの領域が種特異的な構造を体現しているか、あるいはこれらの領域が、例えばループアウトといった立体構造上の理由から、保存される必要が余り無い領域であるかのどちらかである。この点については後に詳述する。配列自体を見ると、ラットNS配列では特にそのN-端部分にプロリン残基が多い(N-端の26残基中8残基がプロリン残基、NS全体の60残基中10残基がプロリン残基)。しかし、ニワトリp94では54残基中3残基と特に多いわけではなく、その意味は不明である。

（表Ⅵ-Ⅴ）　カルパインサブユニットに含まれるE-Fハンド構造のスコアーの比較

各スコアーは図Ⅵ-2に下線で示した配列が、順にEL--LL--LO-O-OG-LO--OL--LL--L（E: グルタミン酸、L: ロイシン, バリン, イソロイシン, フェニルアラニン, メチオニン、O: アスパラギン, アスパラギン酸, グルタミン, グルタミン酸, セリン, スレオニン、G: グリシンをそれぞれ示す）と何個一致するかを示したものである。太字は、実験的に実際にカルシウムイオンを結合していると考えられる領域を示している。Extra については本文参照。1-4 Total の欄は1～4のスコアーの合計値、最下段の数字は各欄の平均値をそれぞれ表している。

Position		1	2	3	4	Extra	1-4 Total
p94	Human	13	11	10	11	12	45
	Rat	13	11	10	11	12	45
	Chicken	13	11	11	11	11	46
m-Calpain Large Subunits	Human	12	11	11	13	9	47
	Rabbit	**12**	**11**	11	**13**	10	47
	Chicken	**11**	11	11	**11**	10	45
μ-Calpain Large Subunits	Human	12	12	11	13	11	48
	Rabbit	**12**	12	11	**13**	—	48
	Chicken	12	12	10	13	—	47
X-Calpain	*S. mansoni*	12	11	11	8	**13**	42
Calpain Small Subunits	Human	12	10	12	11	—	45
	Porcine	12	10	11	11	—	44
	Rabbit	**12**	10	11	**11**	—	44
	Bovine	12	10	11	11	—	44
	Rat	12	10	12	11	—	45
pMP41	Mouse	12	12	10	11	—	45
Average through Species		12.1	10.9	10.9	11.4	11.0	45.4

IS1配列に関しても、相同性を示すものはデータベース上に存在しない。上でも述べたようにこの配列は、活性中心を形成すると考えられるシステイン残基とヒスチジン残基の間に存在するため、一つの可能性として、この領域がp94のプロテアーゼ活性を制御しているということが考えられる。p94の高次構造についての情報が得られることにより、この可能性について明らかになるかも知れない。

最後に、IS2配列であるが、最展目でみればこれに相同性がある配列が無いわけではない(図Ⅵ-3)。しかし、これらの相同性に意味があるかどうかは不明である。図Ⅵ-3に登場したα-アクチニンもジストロフィンもどちらも骨格筋において主要な役割をはたしているタンパク質だけに期待が高まるが、正直なところ図Ⅵ-3に示した相同性は非常に小さいと言うべきであり、また、この部分がα-アクチニンやジストロフィンにとって特に重要な機能を果たす部分であるかどうかは不明であるので、余り固執すべきでは無いかも知れない。配列自体に目を移してみるとすぐに気がつくのが、この領域のN-端付近に連続しているリジン残基である。しかもその直前か直後にプロリン残基が存在するので、「結果と討論」で詳しく論じたようにこの配列は核移行シグナルとして機能している可能性がある。この部分は、ニワトリ、ラット間で保存の比較的悪いIS2配列内に在りながらもその中では良く保存されている部分であり、重要な部分であることは確かである。また、図Ⅵ-3の(B)に示したように、その意味は不明だがこの配列と相同性があると考えられる配列も存在する上、IS2がp94の自己分解に影響を与えることも「結果と討論」で示したように明かであるので、意味もなくここにIS2が挿入されているわけではなさそうである。

<4> NS, IS1, IS2とエキソンシャッフリング

視点を転じて、これら3つの特異的配列について遺伝子のエキソン、イントロンとの関係から少し論じてみたい。すなわち、3つの配列の挿入がエキソンの交換で説明できるかどうかということである。NSについては、適切な説明はつかない。しかしIS1は、そのちょうど始まる位置(p94において、267番目のアスパラギン酸と268番目のアスパラギン酸との間)に、ニワトリm-カルパイン大サブユニットにおける第5エキソンと第6エキソンの切断点[4]がくる(図Ⅵ-2参照)。そこでp94では、ニワトリm-カルパイン大サブユニットの第5エキソンと第6エキソンに当たるエキソンの間にもう一つエキソンが挿入されているか、第6エキソンの5'側ジャンクションの位置がもう少し5'側に(あるいは第5エキソンの3'側ジャンクションが3'側に)ずれているかすれば、IS1の挿入を説明できる。またIS2では、さらに都合が良いことに、ほぼIS2の開始位置と終止位置の両方にエキソンの切れ目が存在する(それぞれ、第12と第13、第13と第14エキソンの切断点)。即ち、第13エキソンがp94のIS2をコードするより長いエキソンと交換されればIS2の挿入は簡単に説明できる。

この現象はエキソンシャッフリングと呼ばれ、良く知られる現象であり、多くのタンパク質が、不連続的に進化を遂げる一因ともなっている。実際に生物が使用しているタンパク質における突然変異(置換、欠失、挿入)は、非常に高い確率でその生物にとって有害であり、自然淘汰の結果直ちに排除される。しかし、実際に使用しているタンパク質をコードする部分ではなく、イントロンや偽遺伝子(pseudgene)における変異は、その生物の生命活動に影響を与えることはほとんど無いので、この変異は次世代に伝えられる。しかし、自然淘汰圧も全くかからないので、この変異は方向性を持たず、多くの場合ただのがらくたになってしまう。しかし、無作為な置換、欠失、挿入、重複の結果、たまたま今までにその生物が実現できなかった新しい機能を与えるモジュールができあがる場合がある。その確率は非常に小さいが、母集団の膨大な大きさと試行数の天文学的な数のおかげで、進化のスケールにおいては割と頻繁にこのよ

（図Ⅵ-3）　p94IS2領域と相同性のある配列

(A)は比較的広範囲にわたって、相同性を有するα-アクチニン、ジストロフィンとp94との相同性を示した。一段目と二段目とで、p94の配列は連続しているがα-アクチニンの配列は連続していない。また、二段目の位置のp94の配列と相同性のある配列はジストロフィンには存在しない。(B)はp94のリジンに富む配列付近に局所的に相同性を有する配列を比較したもの。A, Bとも反転文字は一致する、あるいは相同なアミノ酸を示している。

うなものが出来上がってくる。この時点でも、まだ自然淘汰圧は一切かかっていない。圧がかかるのは、このモジュールが実際に使われているタンパク質に組み込まれたときである。もし、このモジュールが組み込まれた、あるいは一部分と置換されたものが、もとのタンパク質よりも機能上有利であるならば、より正確に表現すると、結果としてその個体の生存確率を高めたとするならば、この出来上がった新しいモザイクタンパク質は、自然淘汰圧によって、徐々にその種の間に広がり、ついには元のタンパク質を席捲してしまうであろう。

実際にp94の挿入配列がどのようにできたかは、p94の遺伝子構造を解析しなくてはならないであろう。しかし、今述べたようなことが起きている可能性は十分にあると考えられる。これらの点については他のカルパインも含めて後にもう一度詳しく論じたい。

[3] p94のプロテアーゼ活性について

<1> 自己消化活性とプロテアーゼ活性

一次配列の上からだけの議論はそろそろおわりにして、今度は、実際にp94にプロテアーゼ活性があるかどうかという点について考えたい。

「結果と討論」で詳しく述べたが、p94はまずそのcDNAが単離解析され、タンパクの同定が後から始まった。常法通り抗体を作製し、p94のmRNAの多量に存在する骨格筋をホモジナイズ、分画し詳細に検索したが、p94タンパク質は検出できなかった。そこで考えられたことは以下の4つであった。

① p94は翻訳が阻害されている。
② p94は翻訳されても直ちに分解されている。
③ p94は翻訳後著しく修飾を受けて抗体で認識されなくなる。
④ p94は翻訳されても直ちに細胞外に放出される。

これらの他にもいくつか可能性は存在するかも知れないが、大筋は上の4つに収束する。これらの可能性を検証するに当たって、主にCOS細胞での発現系を用いたわけであるが、「結果と討論」で詳細に述べたように以下の2点からこの系は妥当であると考えられた。

(a) p94mRNAは骨格筋で多量に(少なくともm-, μ-カルパイン大サブユニットのmRNAの10倍程度)存在しているにも関わらず、ウエスタンブロット解析で特異的なタンパク質のバンドが検出できないという現象が、p94を発現させたCOS細胞においても同様に観察された。
(b) ラット筋芽細胞(L8)にp94及びその mutants を発現させた時、COS細胞での発現様式と良く一致する結果が得られた。

そして、「結果と討論」で詳しく考察したように、p94において活性中心を形成するシステイン残基と考えられる部位を、1または3塩基置換によってセリンまたはグリシンに変位させたタンパク質(pC>S-P94 及び pC>G-P94)が、他のタンパク質(例えばμ-カルパイン大サブユニット)と同程度に発現したことから、②が実際に起こっているということが示された。

p94が自己分解して消失するということの完全な証明は不可能であるが、「結果と討論」で述べたように、この可能性が極めて強いと考えられる。では、逆にp94の自己分解による消失を認めるなら、次のことも同時に確からしいことになる。即ち、p94はシステインプロテアーゼであり、その活性中心は129番目のシステイン残基である。言い換えると、mutagenesis の結果は、今までパパインなどとの相同性やチオール基修飾剤の反応性から論じられてきた、カルパイン大サブユニットの活性中心システイン残基を直接的に支持するものであるともいえる。この先は、実際に骨格筋からp94を単離し、その活性を解析するべきであるが、p94の自己分解性から考えるとこれは非常にむずかしい課題である。今後の展望も含めてこの点については後述した。

<2> 小サブユニットの問題

p94のプロテアーゼ活性を考える上で興味深いことは、p94もm-, μ-型と同様にヘテロダイマーなのかどうかという点である。即ち、次の3通りの可能性が考えられる。

(i) p94はモノマー(またはホモポリマー)で存在し機能する。

(ii) p94はm-, μ-型と同一の小サブユニットを共有する。

(iii) p94は独自のサブユニットを所有している。

p94が*in vivo*でサブユニットを持つかどうかは明かではないが、プロテアーゼ活性にカルパイン小サブユニットあるいは別のサブユニットが必要かどうかという点では、p94が翻訳直後に自己分解する事から、p94のみで活性を発現し得ると考えられる。大サブユニットのみでプロテアーゼ活性を持つことはm-, μ-カルパインでも報告されている。しかし、骨格筋においてp94がどのような形で存在しているかは、プロテアーゼ活性とはまた別の問題である。上記(ii)の可能性は、p94とm-, μ-型の相同性を考えると有り得ない事ではない。m-, μ-型でカルパイン小サブユニットが結合していると考えられているドメインⅣは、p94, m-, μ-型の三者で同程度の相同性を示しているので、p94がカルパイン小サブユニットと結合し得る可能性は高い。

しかし、*in vivo*においてp94がカルパイン小サブユニットと実際に結合している可能性はあまりないと考えられる。その根拠として、pC>S-P94及びpC>G-P94を発現させた細胞でも細胞の形態、分裂速度は正常のものと変化がなく、m-, μ-型カルパインのウェスタンブロットでの挙動も変化がなかったことが挙げられる(データは示していない)。pC>S-P94及びpC>G-P94は、ワイルドタイプのp94と同程度の小サブユニット結合能を有すると考えられるため、もしp94がCOS細胞内で小サブユニットと会合しているのならば、多量に発現しているpC>S-P94及びpC>G-P94 タンパク質が細胞内の小サブユニットのほぼすべてを占有し、COS細胞内のm-, μ-カルパインが正常に機能できなくなり、m-, μ-カルパインの挙動のみならず細胞自体の生命活動も大きな影響を受けることが予測される。これが観察されないという事は、p94がCOS細胞内では少なくともカルパイン小サブユニットと複合体を作らない事を示唆している。

では、(i)と(iii)とどちらであろうか。一つ興味深い事は、p94、m-型、μ-型を通じて、カルパイン小サブユニットと最も相同性が高いのはp94であり、その値はラットで58%、ニワトリで57%と抜きんでたものとなっている(表Ⅵ-Ⅰ参照)。特に両者のC-末端の9残基(EWLQLTMY$^{A}_{S}$)は8残基連続して一致している。ニワトリm-型及びヒト、ウサギμ-型では6残基、ヒト、ウサギm-型ではわずか2残基しか一致していない。また、小サブユニットがm-, μ-カルパインの自己消化の際に切断を受ける位置(ヒト小サブユニットの92番目のアラニン残基のN-末端)付近の配列、NESEEは、ラット、ヒトp94のIS2領域中に2回繰り返される、QE$^{S}_{A}$EE という配列に相同性がある(但し、この配列はニワトリでは保存されていない)。そしてこの配列はm-, μ-型には存在しない。つまり、p94はカルパイン小サブユニットと配列の共通点が多いというわけであり、このことはp94が小サブユニットなしで存在している、即ち、自分自身のIS2領域とドメインⅣとが小サブユニットの役割を引き受けている、という可能性((i)

の可能性)を示唆しているのかも知れない。そもそも大サブユニットのドメインⅣと相同性を持つ小サブユニットがなぜm-, μ-カルパインにとって必要なのかという疑問も生ずるわけであるが、この点については章を改めて論じたい。

一方、p94が骨格筋で機能するためには、発生時期特異的にせよ、何らかのシグナルに反応してにせよ、一時的にp94の自己分解が停止、あるいは、遅延しなくてはならない(そうでない可能性もあるがそれについては後述する)。そのためには、何らかの因子がp94に作用して、p94のコンフォメーションを変化させるなり、プロテアーゼ活性を抑制するなりしなくてはならない。それは、リン酸化酵素かも知れないし、プロテアーゼかも知れないが、サブユニットである可能性もある。つまり、(iii)の可能性である。これらの点は、p94のカルシウム感受性の問題と共に、これからの課題の1つではあるが、nativeなp94を得る事が非常に困難である事を考えるとこれらの解決はかなり難しいと言わざるを得ない。

<3> プロテアーゼ活性に及ぼすIS2配列の影響について

p94の構造－機能相関を考える上で非常に興味深い事は、IS2の存在である。「結果と討論」で示したように、IS2の大部分を欠失するとp94の自己分解は抑えられるように観察される。このことが意味する可能性は次の4つである。

(a) IS2がp94の活性中心に直接関与している。
(b) IS2がp94の活性のエンハンサー的に作用している。
(c) IS2がp94の自己分解時のターゲット配列となっている。
(d) IS2がp94のコンフォメーションを決定する上で重要な位置を占めている。

(d)は、IS2が消失したときに、p94が活性中心の構造を崩すことによって活性をもてなくなる可能性と、p94の自己分解のターゲット配列と活性中心がアクセスできなくなる可能性の両方を含んでいる。既に立体構造解析の行われているパパインとの一次構造上の相同性から、活性中心を形成するシステイン残基、ヒスチジン残基、アスパラギン残基以外に活性中心に入り込んでくる構造があるとは考えにくいので(a)の可能性は低い。また、ニワトリと哺乳類の間でIS2の保存が低いことに加えて、ショウジョウバエの2種のカルパインではどちらもp94のIS2の位置にIS2とは相同性が全く無い別の挿入配列が存在する事[5]、および*S. mansoni*のカルパインも11残基の短いものであるがやはり挿入配列が存在している事[3]などを考え合わせると、この位置、即ち、ドメインⅢとドメインⅣの間が立体構造上外側に位置するなどの理由で、挿入を受け入れ安い部分となっていると考える事もできよう。そう考えると、この部分はむしろ全体の構造に寄与する部分の少ない領域と考えられ、(d)の可能性も低くなってくる。逆に、既に述べたようにIS2は数々の特徴を持った配列であるため、(b), (c)の可能性は高い。一つ注意すべき点は、上記(a), (d)の場合は、IS2が欠失した場合にp94の活性は無くなるが、(b)の場合は、活性の低下あるいは活性化条件の変化のみが観測され、(c)の場合は、活性自体は変化しないということである。もしpΔIS2を発現させたもので活性が検出できなかったという結果が、p94はIS2なしでは活性を発現し得ないと言うことを示しているのならば、(c)の可能性は無くなるわけである。しかし、(a)～(d)のうちの複数が同時に成立する可能性も高く(例えば、IS2がコンフォメーションに重要で、かつ自己分解のターゲットにもなっている、など)、断定は難しい。

ここでp94に変異を導入した実験の結果から問題の領域をさらに特定することを試みる。一見矛盾しているように見えるのが、pΔ11(欠失部位はアミノ

酸残基番号 589-739)は自己分解が抑えられたのに対し、pΔ1(同じく 580-821)は分解されたという結果である。両者とこれに関連した mutants の変異部位付近の配列は図Ⅵ-4の通りである。この現象は、pΔ1がたまたま安定性の極端に悪い配列となってしまい、自己分解ではなく分解している可能性と、pΔ11が本来なら自己分解するべきはずが、その配列の連結の仕方(588番目から740番目に結合している)がp94の全体構造に影響を与えることによってp94の自己分解活性が完全に発現していない可能性の2つが考えられるが、いずれにしてもこの付近がボーダーラインであることには間違いがない。逆に、この付近がボーダーラインであるからこそ、この付近に欠失を持つ mutant の発現が不安定であるとも考えられる。pΔ1は、完全に分解していて痕跡もない事、そして、pΔ11は、pΔIS2や他の分解されない変異体と比べて検出されるバンドが極めて薄い事が、pΔ11の発現が反規則的である事を表しているなら次のような事が言える。つまりpΔ11は、IS2領域に関しては分解されるに十分な領域を確保しているが、そのC-端側の構造によりp94の活性をうまくエンハンスする事ができない(上記(b)の可能性の場合)か、あるいはp94の活性中心がIS2領域をアクセスできない(上記(c)の可能性の場合)のではないか、という事である。するとこの場合、問題の配列はpΔ1に存在してpΔIS2に存在しないものとなり、それは即ちILRVFSEKRNQである。この短い配列がエンハンサー活性を持っていないとは断定できないが、非常に相同性の高い配列がm-, μ-型にも存在する事を考え合わせるとその可能性は低い。よって、この位置がp94の自己分解のターゲットであるという方が確からしいと考えられる。

一方、pΔ1の分解が異常である場合には、問題の配列はpΔ11に存在せず、pΔBK, pΔ12には存在する部分であり、それはSVDRP VKKKK NKPII FVSDR ANSNK ELGVD QEAEE GKDKT GPDKQ GESPQ PRPGとなる。こちらの方は、十分な長さを持ち、リジンに富むなどの特徴を持っており、(b), (c)いずれの可能性も支持できる。しかし、これらの事にはっきりとした結論を得るには、p94の立体構造解析などの研究が必要であり、非常に困難である事が予想される。

<4> p94が細胞に及ぼす影響について

「結果と討論」で詳しく述べたように、ワイルドタイプのp94をトランスフェクトした細胞では、ベクターあるいはミュータントのp94をトランスフェクトした細胞と比較して分裂速度が遅く、形態が丸まっており、プレートから剥離するものが多かった上、細胞の超音波破砕物の超遠心上清に65kDa のバンドが欠失している事も観察された。これらの現象はp94の骨格筋での機能を考える上でも重要であると言えるが、定量的な解析と結果の解釈とが困難であることからはっきりしたことが言えないのは残念である。しかし、例えば、p94もこの65 kDa のタンパク質のようにp94と相互作用するものも、生成量と分解量との微妙なバランスの上に動的定常状態に達しており、p94の微かな量的変動あるいは活性変動で、この標的タンパク質の量が非常にレスポンス良く変動する、などの機構が存在するとしたら、大変興味深いものである。この点については次章でさらに考察した。

[4] p94の骨格筋特異性の意義について

```
          569                                                                  643                 821
pΔIS2     EGEF----------------------------------------------------------------HTDQES...........TMYA*   非分解
                                588                                            643   741           821
pΔ12      EGEFILRVFSEKRNLSEEAENTISVDRPVKKKKNKPIIFVSDRANSNKELGVDQEAEEGKDKTGPDKQGESPQPRPGH-----TINSYEM....TMYA*   非分解
pΔ11      EGEFILRVFSEKRNLSEEAENTI-------------------------------------------------------NSYEM....TMYA*   非分解
pΔ1       EGEFILRVFSEKRWQ*                                                                                  分解
                     579

pfs-IS2-d EGASSGSSLKRGISLRKLRIQSLWTGQ*                                                                      非分解
pfs-IS2-i EGELIHPPGLL*                                                                                      非分解
```

（図Ⅵ-4）　変異体p94の変異部位付近の配列とその発現様式

数字はラットp94のアミノ酸残基番号を表し、その番号に対応する残基を斜体太字で示した。-＊及び－はそれぞれ終止コドン及び欠失部位を示している。分解、非分解はそれぞれ、バンドがウェスタンブロットで検出されたか否かを示している。

<1> 自己分解性と骨格筋

p94はそのmRNAのノーザンブロット分析より骨格筋のみで発現している事が判明した。これはほぼすべての組織に発現しているm-, μ-型とは大きく異なる点の1つであり、p94の機能を考える上で1つの大きなポイントとなっている。当然p94は骨格筋特異的な機能を果たしていると考えられる。細胞の普遍的な機能に関与すると考えられているm-, μ-型とp94は、一次構造上全体に渡って高い相同性を保持している事を考えると、やはりNS, IS1, IS2といったp94特異的な挿入配列がp94の骨格筋特異的機能と深い関係を持っていると考えられる。そして通常の骨格筋ではp94は、自己分解のため非常に少量しか存在していないのであろう。このp94の自己分解性が骨格筋特異的な機能と関連するとすれば、前章でも述べたとおり、ある時期、シグナルに特異的な分解の抑制があるか、あるいは、分解産物が意味を持つかのどちらかである。

<2> p94の自己分解が停止する時が存在するか？

<2>-(a)　阻害因子の可能性

もしp94の分解が抑制されるときがあるとしたら、それは、いつどのような形で行われるのであろうか？

骨格筋細胞は多くの点で非常にユニークである。その代表的な点を箇条書きにすると、次のようになる。

1. 骨格筋細胞は胎児の段階で最終分化をし、その後一生分裂をする事がない。
2. 分化とともに細胞が融合し最終的に多核細胞となる。
3. ミオシン、アクチンによる極めて規則的かつ特異なフィラメント構造が存在し、それらが細胞の大部分を占める。
4. マイオジェニン、アクチニンなど骨格筋特異的に発現するタンパク質群が存在し、骨格筋の機能の重要な部分を担っている。
5. 多くの骨格筋特異的タンパク質は細胞が分化をする過程で厳密なアイソフォーム変換を行い、その結果構成タンパク質のアイソフォームが変化していく。
6. 骨格筋特異的な転写因子が存在し、この働きのみで細胞を骨格筋に分化させる事ができる。

この内でプロテアーゼが関係すると考えられるのが、5.のアイソフォーム変換の過程である。これは、比較的短い期間にmRNAのスプライシングの相違によって数種の非常に相同性の高いタンパク質(アイソフォーム)群が順番に発現する現象であり、一つのアイソフォームから次のアイソフォームに変換するときには、前のアイソフォームはプロテアーゼによって直ちに完全に分解される事が観察されている。この現象にp94が関係していても不思議ではない。p94が翻訳と同時に自己分解している状態は、車に例えるとエンジンがアイドリングを行っている状態であり、一旦ギアが入ると、即ち、何らかの因子によってp94の自己分解が抑制されると一気にp94本来の基質である骨格筋アイソフォームの分解を行うのではないだろうか？前にも述べたが、この動的定常状態というものは、静的平衡状態に比べてエネルギーの損失は大きいがレスポンスの速さという点で非常に優れている。もちろん、現在の段階では推測の域をでないし、実験的に証明することも難しが、試行する価値はあるかも知れない。とにかく、p94が、通常は自己分解という一見すると大変な無駄、自己犠牲を払ってまで存在していると言う事は、必要とされる時のレスポンスのすばやさが要求されていると考えられる。もちろん、p94の機能は、m-, μ-カルパインの機能を考える上でも重要となるので是が非でも解明したいこれからの課題である。

逆に、もしp94の自己分解機構という、ある意味では安全弁的な機構が崩れ、活性を持ったp94が骨格筋中に集積したらどうなるであろうか。当然骨格筋中のタンパク質は重大なダメージを受け、その生物の筋肉系は機能しなくなるであろう。筋ジストロフィー症の主要な原因はジストロフィンの変異によるものと考えられてきており、カルパインの関与はジストロフィン変異の結果であるという見方が強い。しかし、p94が、今述べたように無秩序に活性を発現したら同様の症状を引き起こすことは十分考えられる。即ち、p94の骨格筋での機能を考える上でも、もう一度筋ジストロフィー症などの筋疾患とp94との関係を再考する必要があるのかも知れない。

<2>-(b)　Alternative Splicing の可能性

ここで、一つp94の自己分解の抑制機構として考えられる、一風変わった仮説としては、alternative splicing が挙げられる。今までは、p94の自己分解を抑制するものを別の分子に求めてきたが、1つの可能性として、ある時期、シグナル特異的にp94のmRNAが、例えばIS2領域をコードするエキソンを飛ばしてスプライシングを受けるなどして、p94タンパク質の構造自体を変化させてしまうことも考えられない事ではない。もちろん、本論文で用いたヒト、ラット、ニワトリ骨格筋cDNAライブラリーからは、そのようなcDNAは得られなかったが、時期の違う骨格筋には存在するという可能性もある。これをスクリーニングし検証するのは大変なことだが、今後の解析にあたって考慮してもよいことかも知れない。

<3> p94の細胞内局在について

p94は、COSで発現させた場合、核内に移行する可能性があることを「結果と討論」で詳しく考察したが、これはどんな意味を持っているのであろうか？少なくともm-, μ-カルパインは、核内にも存在するが細胞質内にも拡散的に存在するものの方が多いという知見と比較すると、これもp94が骨格筋において担っている特異的な機能の一つと関係があると考えられる。想像としては、MyoD1やマイオジェニンなどの骨格筋特異的な転写因子の速やかな分解などがすぐに浮かんでくる。これらの転写因子が時期特異的に出現することも報告されているので、これらの分子とp94との関係は非常に興味深いものであると考えられ、これも今後の課題の一つである。

<4> プロテアーゼとして以外の可能性(ポリプロテインとしてのp94)

以上、p94そのものがプロテアーゼとして重要な機能を持つと仮定して論じてきたわけであるが、既に言及したようにもう一つの可能性も存在する。それは、p94の自己分解物自体が意味を持つ可能性である。もちろん、分解物がさらにコンパクトなプロテアーゼである可能性も否定はできない。

ワイルドタイプのp94をCOS細胞に発現させたとき、ほぼ一定の位置(55kDa、37kDa、30kDa)に分解物のバンドが認められる。しかもそれらはα-pIS2と反応し、α-pNSとは反応しない。しかし、α-pIS2と反応するものが1種ではなく数種存在することから、一定の切断を受けてそのまま変化しないというわけではない。むしろ段階的に分解を受けた、いろいろな中間分解産物が存在しているわけである。しかし、一番最初の分解の速度が最も早く、2番目、3番目の分解速度が多少遅くなるようであれば、中間産物が見えても不思議ではない。つまり、p94は一種のポリプロテインであり、最終的に分解された数個のフラグメントが、あるものはプロテアーゼとして、あるものはカルシウム結合タンパクとして、あるものはセカンドメッセンジャーとして、それぞれ機能を果たすと考えれば、p94が常に自己分解しているとしても異常な挙動では無い

ことになる。これは、NS、IS1、IS2などが単独で生理活性を持つことが見いだされたならばかなり確からしいこととなるであろう。

p94については以上詳しく論じてきたものの、大部分が推測に過ぎないことは非常に歯がゆい思いである。p94をcDNAレベルで見つけたときには、誰もこのようにある意味で非常にやっかいな分子であるとは思わなかったが、いざ蓋を開けてみると本論文で延々と論じてきたように一筋縄ではいかないことがまもなくはっきりした。しかし、以上で考察してきたように非常に興味深い分子であることも確かであるので、今後も本考察で指摘したポイントを中心にさらに研究を進めて生きたいと考えている。

[5] カルパインが複数存在することの意義について

次に、p94を考えに含めた上で考察をカルパイン全体に広げて、序論で述べたようにp94, m-, μ-型の3者の「部品」としての位置づけについて論じてみたい。

<1> カルパインのアイソザイムの種類

タンパクレベルで良く研究されたm-, μ-型に加えて、今回さらにp94という第三のカルパイン大サブユニットファミリーのメンバーを見いだした訳だが、それを加えても3種類である。レセプター、G-プロテイン、フォスフォリパーゼC、プロテインキナーゼC、転写因子などでは膨大な数のアイソザイムが知られていることと比較すると非常に少ないと言って良いであろう。では、カルパインは、何故種類が少ないのだろうか。あるいは、見つかっていないだけで他にも多数存在するのだろうか。

ほぼすべての組織に普遍的に存在する、m-, μ-型の様なカルパインがこれ以上発見される可能性は少ないと考えられる。それは、カルパインが既にいろいろな動物のいろいろな組織においてタンパクレベルとcDNAレベルの両方から検索されているが、m-, μ-型以外検出されていないからである。少なくともプロテインキナーゼCのように、一つのcDNAプローブで他のものが続々と単離できるような巨大な分子群はカルパインには存在しない。哺乳類、鳥類のm-, μ-型は、条件によっては互いに他のcDNAとハイブリダイズする事ができる。そのような条件下でも他のカルパイン分子は(骨格筋におけるp94を除いて)釣れてこない(データ不提示)。しかし、骨格筋特異的カルパインが存在したという事実から心筋や平滑筋をはじめとして、特定の組織に特異的なカルパインが存在する可能性は十分にある。

<2> アイソザイムとスペクトルによる情報伝達

まず、m-, μ-型のカルパインの存在意義であるが、現在までに両者の*in vitro*での活性化に必要なカルシウム濃度が異なること、および微妙に組織分布が違っていること以外には、両者の相違を決定づける明確な機能分担は、見つかっていない。これは多くのアイソザイムを持つプロテインキナーゼCやフォスフォリパーゼCといった他の情報伝達系の「部品」についてもほぼ同じことが言える。これらのアイソザイムの機能分担は、現在多くの研究者が血眼になって検索しているところであるが、最終的に明確な分担が存在するのであろうか？

明確な、とはアイソザイムの1つ1つが情報伝達系において(完全ではないにせよ)独立した経路を形成していると言う意味である。これは、実は後に述べるように、進化的にも生理的にも不利であると考えられる。そこで、新たに仮説を立てるとすれば「スペクトル」としての情報伝達である。各アイソザイムが、作用を受ける物質や作用を施す物質を共有しており、作用の仕方がアイ

ソザイムによって微妙に異なっているだけでも、それらの物質をスペクトルとして捉えればそこに「質」を表現することが可能になるのである。

具体的に、カルバインを例にしよう。単純化して、m-カルバインは物質A_1, A_2によって活性化されるが、その活性化のされ方は単位量当たり、a_{1m}, a_{2m}となると仮定する。そして、m-カルバインは基質S_1, S_2に作用して分解するがその作用の強さはs_{1m}, s_{2m}であるとする。同様にμ-カルバインもA_1, A_2から$a_{1\mu}, a_{2\mu}$の作用を受けS_1, S_2へ$s_{1\mu}, s_{2\mu}$の作用をすると仮定する。また、この細胞内にはm-, μ-カルバインがそれぞれt, uだけ存在し、今A_1, A_2がα, β送られてきたとすると、S_1はm-カルバインによって

$$t\cdot(\alpha\cdot a_{1m}\cdot s_{1m}+\beta\cdot a_{2m}\cdot s_{1m})$$

だけ分解され、μ-カルバインによって

$$u\cdot(\alpha\cdot a_{1\mu}\cdot s_{1\mu}+\beta\cdot a_{2\mu}\cdot s_{1\mu})$$

だけ分解される。よって、この細胞において分解されるS1の総量(xとする)は、

$$x = t\cdot(\alpha\cdot a_{1m}\cdot s_{1m}+\beta\cdot a_{2m}\cdot s_{1m})+u\cdot(\alpha\cdot a_{1\mu}\cdot s_{1\mu}+\beta\cdot a_{2\mu}\cdot s_{1\mu})$$

となる。同様にS_2の総量(yとする)は、

$$y = t\cdot(\alpha\cdot a_{1m}\cdot s_{2m}+\beta\cdot a_{2m}\cdot s_{2m})+u\cdot(\alpha\cdot a_{1\mu}\cdot s_{2\mu}+\beta\cdot a_{2\mu}\cdot s_{2\mu})$$

となる。これは行列式を用いて簡単に表示することができる。

$$S = \begin{pmatrix} s_{1m} & s_{1\mu} \\ s_{2m} & s_{2\mu} \end{pmatrix}$$

$$A = \begin{pmatrix} a_{1m} & a_{2m} \\ a_{1\mu} & a_{2\mu} \end{pmatrix}$$

$$\alpha = \begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \end{pmatrix}$$

$$\boldsymbol{x} = \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}$$

$$\boldsymbol{m} = (\ t\ \ u\ )$$

と、おくと

$$\boldsymbol{x} = \boldsymbol{m}\cdot S\cdot A\cdot\alpha$$

$$= \boldsymbol{m}\cdot M\cdot\alpha \qquad (\text{但し、} M = S\cdot A)$$

となる。ここで便宜上、Mをカルバインの特性行列と名付けておく。

実際に、数字を入れて見る。もし、

$$S = \begin{pmatrix} 1 & 2 \\ 2 & 3 \end{pmatrix}$$

$$A = \begin{pmatrix} 2 & -3 \\ -1 & 2 \end{pmatrix}$$

$$\boldsymbol{m} = (\ 1\ \ 1\ )$$

であるならば、

$$M = \begin{pmatrix} 0 & 2 \\ 2 & 0 \end{pmatrix}$$

となり、入力として、

$$\alpha = \begin{pmatrix} 2 \\ 1 \end{pmatrix}$$

という値が来たならば

$$x = \begin{pmatrix} 2 \\ 4 \end{pmatrix}$$

となり

$$\alpha = \begin{pmatrix} 1 \\ 2 \end{pmatrix}$$

に対しては

$$x = \begin{pmatrix} 4 \\ 2 \end{pmatrix}$$

となり、S_1, S_2の分解量が逆転する。

一般化するならば、あるアイソザイム群の数をn、これに作用する因子の数をk、これから作用を受ける基質の数をiとすると、

$\boldsymbol{x}$	は	k 行	1 列
A	は	k 行	n 列
S	は	n 行	i 列
M	は	k 行	i 列
α	は	i 行	1 列
$\boldsymbol{m}$	は	1 行	n 列

の行列となり、

$$\begin{aligned} \boldsymbol{x} &= \boldsymbol{m} \cdot S \cdot A \cdot \alpha \\ &= \boldsymbol{m} \cdot M \cdot \alpha \end{aligned}$$

と表せる。

これは、このシステムにおいても入力物質($A_1, A_2, \ldots, A_k$)で出力物質($S_1, S_2, \ldots, S_i$)をコントロールできることを示している。入力物質の量で出力物質の量が調節できること自体は、独立な伝達系のシステムと変わりはないが、この仮説の利点は、入力も出力もスペクトルで捉えられるため、進化的にも生理的にも無理のないことである。

情報伝達系の各部位のアイソザイム群がそれぞれ独立の経路を形成するためには、はじめに遺伝子重複で、ある部位の「部品」が種類を増やしたとき、まずこの新生の「部品」が長い進化の末新しい機能を獲得し、さらにこの新生の「部品」に対応した各部位の「部品」の新生を待たねばならない。しかし、この独立した新生の経路が完全に出来上がるまではその生物にとって特に利点はないため、選択圧(進化圧)がかかることもない。進化としてこれはかなり厳しい条件である。

一方、スペクトル伝達の方は、初めて遺伝子重複で「部品」の種類が増えたときに必要な条件は少しだけ元のものと異なるということだけである。しかも、この変化は、すべての部位で同時に起きたり、関連して起きる必要はない。各部位で、少しずつ異なるアイソザイムを多数保持すること自体がその伝達系の効率化(精密化)につながる訳であり、これは最初の遺伝子重複から途切れることなくその増幅の方向に選択圧が掛かり続けるのである。さらにこの体制がある程度進化して、各部位がアイソザイムを増やしたとすると、システム全体としても、万が一あるアイソザイムが欠けてしまったときにもその代償がやり易いという利点もでてくる。また、ある程度基本的なシステムを組んでおけば、ある特定の組織で特定のレスポンスが必要なときに、ある部位のアイソ

ザイム群の存在比(上記の*m*)を変化させたり特定のアイソザイムを加減する(nを変化させる)ことで柔軟に対応できる。これは、m-, μ-カルパインが基本システムで、これに対しp94が骨格筋特異的なスペクトルを与える因子としてカルパイン群に加わっているという位置づけができることを示している。

アイソザイムの種類が2から3に増えると、上記の行列のS及びAの行または列の字数が増えるため、αから*x*への変換の自由度が増えるので、生理的には情報をより正確に伝えられるようになる。例えばアイソザイムの種類が2の時は独立に操作できる出力量は2種類だが、アイソザイムの種類が3に増えると出力も独立に3つ操作できるようになる。ここで注意すべき点は、独立経路を仮定しても一度に操作できる出力量の数はアイソザイムの種類(＝経路の数)に等しく、数の上ではスペクトル伝達と同等であるが、独立経路では、独立に選べる出力の組は決まっているのに対し(各経路が受け持つ出力に限定される)、スペクトル伝達ではそのような制約が全くないという利点が存在する。

この見地からみると、複雑さを極める細胞内の「部品」群が、あたかもネットワーク仮説で捉えた免疫系のように、大きなネットワークを形成している姿が浮かんでくる。しかし、ネットワーク仮説が巨大な単一アイソザイム群とも言える免疫グロブリンの全体的なバランスを問題にしているのに対し、この仮説ではシグナルをスペクトルという立体的なものとして考え、さらに各部位に位置するアイソザイム群全体が一つの集合として、スペクトルを変換するトランスフォーマーであると捉えていることが特徴である。

このシステムが実際に細胞の中で機能しているという直接的な証拠はないし、実験的に証明することも非常に難しい。しかし、m-, μ-カルパインやプロテインキナーゼC群等すべての部位の「部品」群において、これらアイソザイムの活性が微妙に異なりながらも明確な差異は検証できずにいる事実は、この仮説を支持しているものである。実験的には、今までm-またはμ-カルパインのどちらか一方のみを*in vitro*の実験系として用いて、両者の差異を検索する方法が主であったが、この仮説を頭におくなら、両者を系の中に同時に存在させて、*in vivo*の状況をうまく反映させるような条件で実験を組み立てていくことも重要になってくるのではないだろうか。但し、その実験系の構築、結果の解釈は極めて困難であると考えられる。しかし、現在カルシウム濃度からは全く細胞内活性化を説明し得ないm-カルパインの生理作用機序は、このような実験系を用いて初めて明らかにできることなのかも知れない。

[6] カルパインの分子進化について

では、カルパイン分子自身の進化についてはどのようなことが考えられるであろうか。

<1> p94, m-, μ-型の相同性から考えた進化上の位置

最初にカルパインサブユニットがクローニングされた時[6]から、カルパイン大サブユニット遺伝子はシステインプロテアーゼの遺伝子ととカルモジュリンの遺伝子とが融合してできたものであると考えられた。また、その後の解析でm-, μ-型の2種類が哺乳類、鳥類で存在することが判明し、そのどちらも同一起源の遺伝子であると考えられた。また、小サブユニットの構造にも祖先遺伝子と考えられるカルモジュリン遺伝子に相同な構造が含まれていること、さらにその部分のイントロン、エキソンの構成は大サブユニットのそれと同一であることから、この部分は大サブユニットと小サブユニットとで起源が同じと考えられる。そして、今回見いだされたp94もm-, μ-カルパイン大サブユニットとその起源は同じと考えられ、しかし、そのエキソン構成は、m-, μ-カルパイン大サブユニットと多少異なる可能性のあることが判明した。

以上の知見と各サブユニット相互の相同性とから、これらの進化上の位置を考えると次のようになる。まず、哺乳類と鳥類とを比較すると、哺乳類内、あるいは鳥類内でのカルパイン大サブユニットファミリーの異タイプ間相同性は、哺乳類－鳥類間での同タイプ間相同性よりも値が低いため、各タイプ(p94, m-, μ-型)は、それぞれの種で固有の機能を担っていることを強く示唆している。また、異タイプ間の相同性は50%前後と余り高くないので比較的進化の早い時期でまず3タイプに分化し、その後それぞれの種に分化したと考えるのが自然であろう。ここで、一つ問題になるのは、ニワトリm-型がヒトm-型よりもヒトμ-型に相同性が高いことである(表Ⅵ-Ⅰ参照)。ヒトm-型は、ニワトリμ-型よりもm-型に近く、ヒトμ-型は、ニワトリm-型よりもμ-型に近い、さらに、ニワトリμ-型は、ヒトm-型よりもμ-型に近い。よって、ニワトリm-型が「m-型」であることはまちがいないと言える。しかし、では、何故ニワトリm-型が、ヒトμ-型よりもm-型に似ていないのだろうか。ニワトリm-型のドメインⅠはヒトμ-型よりもm-型に非常に近い(それぞれ52%と70%)。ドメインⅡ, Ⅲは少しだけヒトm-型よりμ-型に近いがこれは誤差範囲と言える。問題はドメインⅣであり、ヒトm-型とμ-型にそれぞれ55%と67%相同性を持ち、これが全体としてニワトリm-型をヒトm-型よりもμ-型に近くさせている原因となっている。しかし、これらの値はp94, μ-型のドメインⅣのニワトリ－哺乳類間の相同性が82%, 86%であることと比較するとどちらもかなり低い値である。つまり、ドメインⅣがm-型ではとりわけニワトリ－哺乳類間で保存されていないと言える。ニワトリのm-型とμ-型の間の相同性が64%もあることから、おそらくドメインⅣがm-型よりもμ-型に近いのはある程度偶然が作用していると考えられる。言い換えれば、特にドメインⅣに関してp94, μ-型はその機能がかなり限定されているため、鳥類から哺乳類へ進化する際に強い保存を受けたが、m-型はそれほどではなかったということである。このことは、カルシウム依存性が異なること、哺乳類赤血球でm-型のみしか検出できないこと、自己消化パターンが異なることに加えて、数少ないm-, μ-型の間での差異であり、両者の機能分担を考える上で興味深い。

さて、実は今まで、序論で触れたm-型とμ-型の定義の問題をあえて無視してきた。ニワトリm-型の問題はそれに静かな波紋を投げかける物であったが、とうとう無視できないことになるのは、既に何度かとりあげたジストマ(*Schistoma mansoni*)のカルパインの配列を考えた時である。この分子は、ジストマ患者の血清でジストマのcDNA発現ライブラリー(λgt11)をイムノスクリーニングしたところ単離された物である。図Ⅵ-2からもわかるとおり、m-, μ-カルパイン大サブユニットと全体に渡って相同性があり、p94同様カルパイン大サブユニットファミリーに属することはまちがいない。では、この分子はm-型かμ-型かp94か、あるいはどれでもないのか、そもそも他の型がジストマに存在するのか。結論から言うと明かではない。既に述べたように鳥類－哺乳類間のm-型の比較でドメインⅠは良く保存されており、m-型同士の相同性とm-, μ-型間の相同性の比(一種のS／N比と考えられる)がいちばん大きいドメインである。そこで、一つの考え方としては、ドメインⅠをm-, μ-型のクライテリアにするとことが上げられる。しかし、ジストマのカルパインのドメインⅠは、m-, μ-型のどちらとも非常に相同性が低く事実上比較は無理である。また、この分子がp94の系列である可能性も全くは否定できない(全体の相同性はニワトリ、ラットp94にいちばん大きな値を示している)。つまり、判定不能ということである。

カルパイン大サブユニットファミリーの進化を考える上で、p94, m-, μ-型という概念が本当に重要かどうかはわからないが、この点については、以下の可能性がある。

(i) p94, m-, μ-型に分かれたのは鳥類ー哺乳類の分化よりは前のことだが、ジストマー鳥類の分化よりは最近のことであり、進化上ある時期よりも古い種においてはp94, m-, μ-型に機能分化していないか、あるいは別種の機能分化をしているかのどちらかであり、p94, m-, μ-型を考えること自体意味がない。

(ii) p94, m-, μ-型に分かれたのはカルパイン大サブユニットの祖先遺伝子ができて間もなくの事であり、これらの機能分担は存在する。進化の段階を追って(哺乳類→鳥類→は虫類→. . .)順番に比較していくとp94, m-, μ-型のそれぞれの系列が確かに存在するが、大きく間を飛ばして比較しても一次構造上の相同性は顕著ではない。

もし、(i)であれば、ジストマの分子はカルパイン大サブユニットファミリーの祖先遺伝子に近いという事になるし(実はニワトリm-型の時も長らくそれが祖先型であると信じられていた)、(ii)であれば、この先データの蓄積によって分類も精度を増し、各タイプの機能分担も明らかになっていくかもしれない。いずれにしてもジストマと鳥類の間に相当する種や、ジストマよりもさらに下等な種でカルパインを検索する事は意味あることである。カルパインの機能を探る上でも、より下等な生物で解析するのは大事なことである。この点については最後にまとめた。

<2> 小サブユニットの位置

では、小サブユニットの位置はどうなるであろうか。小サブユニットについては、残念ながら哺乳類のデータしか存在しないため、比較から得られる情報が少ない(表Ⅵ-Ⅵ)。しかし、既述したようにウサギの小サブユニットのドメインⅣ'はニワトリのm-型大サブユニットのドメインⅣとその遺伝子のエキソン、イントロンの構成が同じであるため、比較的最近にm-, μ-カルパイン大サブユニット遺伝子から遺伝子重複によって生成したと考えられる。しかし、ドメインⅣとドメインⅣ'の相同性自体はそれほど高くないこと、m-, μ-型のどちらとも同程度の相同性を持つことから、小サブユニットの少なくともドメインⅣ'はカルパイン大サブユニット祖先遺伝子がm-, μ-型に分化する前に遺伝子重複を起こしたと考えられる。しかも、ヒト、マウスではm-, μ-カルパイン大サブユニット、p94、小サブユニットのすべてが異なる染色体に位置していることが報告されていることからも、この重複はこれらの遺伝子が染色体上で十分に攪拌される位には昔のことであったと予測される。

新たに創り出された小サブユニットが現在まで存続しているのは、もちろん小サブユニットが大サブユニットと会合することが少なくともその生物の生存上利益を与えたからであるが、カルシウム結合領域が大サブユニットにも存在しながらも小サブユニットを必要としたのは、そのN-端に存在するドメインⅤの為かもしれない。

<3> 小サブユニットの存在意義

小サブユニットのドメインⅤについては生体膜との相互作用という機能が示唆されているが、他にはグリシン残基が連続して数十残基も存在するという特異な一次構造と、自己消化の際にドメインⅤの大部分が切り落とされるということぐらいしか明らかにはなっていない。プロテアーゼとして機能するときにドメインⅤの大部分が必要ないことから、このドメインはカルパインに付

（表Ⅵ-Ⅵ）　カルパイン小サブユニットのアミノ酸配列の相同性

ドメインⅣ'については、マウスで発見されている小サブユニットと相同性を持つ分子pMP41との相同性も示した。ドメインの分け方や数値については、本文を参照。

		Porcine	Rabbit	Bovine	Rat	Mouse pMP41
Domain V	Human	98.0	97.0	94.0	93.0	—
	Porcine		96.9	95.9	91.8	—
	Rabbit			94.9	92.8	—
	Bovine				89.5	—
	Rat					—
Domain IV'	Human	97.0	96.4	96.4	91.7	31.1
	Porcine		97.6	98.2	92.3	31.8
	Rabbit			97.0	90.4	31.1
	Bovine				90.5	33.3
	Rat					31.8
Total	Human	97.4	96.6	95.5	92.2	26.8
	Rabbit		96.6	96.6	92.1	27.5
	Porcine			96.2	91.4	26.8
	Bovine				90.1	28.8
	Rat					27.5

加的な機能を与えたと考えられる。進化的には、このドメインVのような構造がGCに富んだDNA領域から偶然創り出され、そのままでは意味を持たなかったが、たまたま遺伝子重複で創り出されたドメインIV'と遺伝子融合した際にカルパイン大サブユニットと複合体を形成できたため、全体としてカルパイン大サブユニットにドメインVが付加された形になった。それが、うまくカルパインの機能を補助し、生存により有利な生物へと変わり得たために、現在の様なカルパイン分子が出来上がったと考えられる。このことも、より下等な生物の小サブユニットに当たる分子を解析することによって明らかになっていくであろう。

<4> カルパスタチンの位置と存在意義

最後にカルパスタチンについて考察してみる。表VI-VIIを一見してわかることは、カルパインサブユニットに比べて、相同性がかなり低いということである。プロテアーゼの進化上の保存の良さに比べて、そのインヒビターの保存性の悪さは既に報告されていることであり、その機構として gene convergence が考えられている[7][8]。簡単に説明すると、プロテアーゼ自身は祖先型遺伝子が存在し、それが保存されつつも進化の過程で拡散的に分化してきたが(gene divergence)、インヒビター分子の方は、その種でプロテアーゼが分化した後でゼロから進化を始め、それぞれの種で全く独立にそれぞれの種のプロテアーゼに対応するように進化を遂げていった結果、プロテアーゼが種を通じてある程度保存されているために、インヒビターの遺伝子自体には共通の祖先型遺伝子は存在しないにも関わらず収束的に相同性を持つに至ったという考え方である。カルパインーカルパスタチンの場合でも同様のことは考えられるが、もともとある遺伝子進化形態が convergent か divergent かは実験的に証明不能の事柄であるので、考え方は興味深いが余り深く考えても仕方がないことなのかもしれない。

しかし、他のプロテアーゼならいざ知らず、細胞内プロテアーゼであるカルパインにとってその特異的インヒビターであるカルパスタチンの存在意義は非常に大きいものがある。そして興味深いことには、カルパインは2種(p94をいれれば3種)存在し、その一次構造は保存されているとはいえかなり違いの目立つ部分も多いにも関わらず、一つのカルパスタチン分子がm-, μ-型のどちらにも同程度に良く作用する。また、ウサギのカルパスタチンは、ヒト、ニワトリカルパインにも同程度に良く阻害効果を現す。このことは、カルパスタチン分子が哺乳類間でも全体で65%前後の相同性しかないことを考えると少し不思議である。これは convergent な遺伝子進化を具現しているのかもしれない。

カルパスタチンには良く知られているように4つの繰り返し構造が存在し、その領域(Ⅰ～Ⅳ)間での相同性はやはりかなり低い値である(種内、種間を問わず30%前後)。にもかかわらず、多少の差異は存在するもののどの領域もカルパインを良く阻害する。一分子に4つの阻害ユニットがあることの機能的な意味は不明だが、このことも含めて、カルパスタチンにおいてもさらに下等な生物を検索することが、一つの有効な解明手段となるであろう。さらに、p94にカルパスタチンが作用するか、あるいは、p94に特異的なインヒビターが存在するのか(前述した自己分解を阻害する因子について参照)という点も興味深いが、その検索はp94の検索と同様に難しいであろう。

[7] 終わりに

以上、p94, m-, μ-型の分類と進化について考えながらこれらの機能について論じた。p94は骨格筋特異的という意味で進化的にもm-, μ-型とは異なってい

（表Ⅵ-Ⅶ）　ラット、ウサギ、ブタのカルバスタチンのアミノ酸配列の相同性

N-terminal Domainはウサギカルバスタチンにおいてアミノ酸残基番号1~157の領域を、Repeat Domain I~IVはそれぞれ、158~290、291~434、435~571、572~718の領域を表している。太字は、異種間で同領域を比較した値を示している。

		Rat	Porcine
N-terminal Domain	Rabbit	48.8	55.7
	Rat		46.0

		Rat	Porcine
Total	Rabbit	62.6	68.3
	Rat		63.4

Repeat Domain		Rabbit			Rat				Porcine			
		II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Rabbit	I	26.4	29.9	24.5	**62.4**	22.7	29.9	29.0	**73.1**	18.4	31.4	26.2
	II		36.2	28.4	24.6	**64.0**	38.6	27.7	23.4	**73.6**	36.6	31.1
	III			33.3	25.5	44.6	**66.4**	32.6	24.8	37.5	**70.8**	33.8
	IV				25.9	36.8	33.6	**66.4**	30.6	31.5	36.7	**70.1**
Rat	I					21.5	26.9	28.0	**65.2**	22.0	25.8	28.9
	II						46.4	37.8	25.0	**64.0**	40.2	39.5
	III							32.1	29.9	38.4	**69.3**	33.8
	IV								29.2	29.8	35.0	**66.2**
Porcine	I									19.9	25.6	30.5
	II										35.8	29.9
	III											38.1

る。おそらく植物には存在しないであろうことが容易に予想される上、筋肉の形態の著しく異なる下等な生物においてもp94は構造、機能的にかなり状況が変わっている可能性がある。おそらく、我々動物が筋肉という動力手段を手に入れた後にカルパイン大サブユニット祖先遺伝子から遺伝子重複を受けて、一部にはアレンジを受け、我々の遺伝子として定着したのであろう。そうであれば、より下等な動物も含めて、筋肉のように極端な分化を遂げた組織に特異的に存在するカルパインを検索するのも興味深いことである。また、p94とm-, μ-型との距離がどちらも等しい事は、p94がm-, μ-型のどちらか一方が遺伝子重複して成立したものではなく、m-, μ-型が分化する前の祖先遺伝子から遺伝子重複をうけているという事を示している。こうしたp94のカルパインファミリーにおける異端性と共通性とを同時に考察し、実験を進める事によって、カルパインの機能研究にとって新たな道が開けていく事になるであろう。

以上、長々と憶測ばかりを述べてきたが、そうせざるを得ないもどかしさはカルパインを研究している者なら多かれ少なかれ心に抱いているのではないだろうか。カルパインは、遺伝子工学が最盛期を迎える頃に華々しくその構造をクローニングによって決定され、構造の特異性と細胞内のプロテアーゼであるという独自性から、今度は多くの研究者が参列してその機能を探ろうとした。しかし現実はなかなかうまくゆかず、カルパインの機能について決定的なデータを誰もが出し得ずにいる。一部の研究者はカルパインの研究を捨て他のプロテアーゼに研究テーマを変更したりした。しかし、考えてみれば、すべての科学研究はその時代その時代でほんの少しだけ難しい事柄を説いた者が賞賛を受け、しかし、すぐその後の時代では、そんなことは易しいことになっている。今、簡単にできることは、何も自分でしなくても次の時代の始まる頃にはすべて解明されているだろう。だからこそ今難しいと考えられる問題に打ち込むことは意味のあることである。簡単なことであれば誰かが既に解決してしまっていただろう。難しいからこそやりがいがあるのである。この壁を破って後ろを振り返ると、実は簡単なことであるのかも知れないが。

p94にせよカルパインにせよこれからまだまだ新しいことが発見されていくことであろう。序論にも述べたように本研究がその発見に僅かでも貢献できれば、と願ってやまない。更に言えば、その発見自体に関与できればこれほどの幸せはないであろう。今後も、以上で考察してきたことをもとにして、さらに研究を進めていく所存である。

VII. 文献

[序論]

(1) Martins De Sa, C., Gross De Sa, M.-F., Akhayat, O., Borders, F., Scherrer, K. Horsch, A. and Schmid, H.-P. (1986) *J. Mol. Biol.* **187**, 479-493.

(2) Pontremoli, S., Michetti, M., Melloni, E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 3705-3707.

(3) Huang, F. L., Yoshida, Y., Cunha-Melo, J. R., Beaven, M. A. and Huang, K.-P. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 4238-4243.

(4) Pontremoli, S., Melloni, E., Sparatore, B., Michetti, M., Salamino, F. and Horecker, B. L. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 706-712.

(5) Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S., Tominaga, M., Kuroda, T. and Nishizuka, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 4088-4092.

(6) Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernlod, M., Frentzel, S. and Kloetzel, P. M. (1991) *Nature (Lond.)* **353**, 662-664.

(7) Martinez, C. K. and Monaco, J. J. (1991) *Nature (Lond.)* **353**, 664-667.

(8) Kelly, A., Powis, S. H., Glynne, R., Radley, E. and Beck, S. (1991) *Nature (Lond.)* **353**, 667-668.

(9) Brown, M. G., Driscoll, J. and Monaco, J. (1991) *Nature (Lond.)* **353**, 355-357.

(10) Glynne, R., Powis, S. H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L.-A. and Trowsdale, J. (1991) *Nature (Lond.)* **353**, 357-360.

(11) Simpson, M. V. (1953) *J. Biol. Chem.* **201**, 143-154.

(12) Ciechanover, A., Hod, Y. and Hershko, A. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 1100-1105.

(13) Hershko, A. and Ciechanover, A. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 335-364.

(14) Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H. Hass, A. L. and Rose, I. A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 1783-1786.

(15) Hough, R., Pratt, G. and Rechsteiner, M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8303-8313.

(16) Waxman, L., Fagan, J. M. and Goldberg, A. L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 2451-2457.

(17) Fagan, J. M., Waxman, L. and Goldberg, A. L. (1987) *Biochem. J.* **243**, 335-343.

(18) Wilk, S. and Orlowski, M. (1980) *J. Neurochem.* **35**, 1172-1182.

(19) Bond, J. S. and Butler, P. E. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 333-364.

(20) Rivett, A. J. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 1-8.

(21) 田中啓二 (1989)*生化学* **61**, 157-176.

(22) Dahlmann, B., Kuehn, L., Ishiura, S., Tsukahara, T., Sugita, H., Tanaka, K., Rivett, J., Hough, R. F., Rechsteiner, M., Mykles, D. L., Fagan, J. M., Waxman, L., Ihii, S., Sasaki, M., Kloetzel P.-M., Harris, H., Ray, K., Behal, F. J., DeMartino, G. N. and McGuire, M. J. (1988) *Biochem. J.* **255**, 750-751.

(23) Orlowski, M. and Wilk, S. (1988) *Biochem. J.* **255**, 751.
(24) Edmunds, T. and Pennington, R. J. T. (1982) *Int. J. Biochem.* **14**, 701-703.
(25) Hardy, M. f., Mantle, D. and Pennington, R. J. T. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 348-349.
(26) Dahlmann, B., Kuehn, L. and Reinauer, H. (1983) *FEBS Lett.* **160**, 243-247.
(27) Achstetter, T., Ehmann, C., Osaki, A. and Wolf, D. H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13344-13348.
(28) Dahlmann, B., Kuehn, L., Rutschmann, M. and Reinauer, H. (1985) *Biochem. J.* **228**, 161-170.
(29) Ray, K. and Harris, H. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7545-7549.
(30) Ishiura, S., Sana, M., Kamakura, K. and Sugita, H. (1985) *FEBS Lett.* **189**, 119-123.
(31) Rivett, J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 12600-12606.
(32) Tanaka, K., Ii, K., Ichihara, A., Waxman, L. and Goldberg, A. L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 15197-15203.
(33) McGuire, M. J. and DeMartino, G. N. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **873**, 279-289.
(34) Hough, R., Pratt, G. and Rechsteiner, M (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8303-8313.
(35) Zolfaghari, R., Baker, C. R. F., Canizaro, P. C., Amirgholami, A. and Behal, F. J. (1987) *Biochem. J.* **241**, 129-135.
(36) Mykles, D. L. (1987) *J. Cell Biol.* **105**, 28a.
(37) Arrigo A.-P., Tanaka, K., Goldberg, A. L. and Welch, W. J. (1988) *Nature (Lond.)* **331**, 192-194.
(38) Tanaka, K., Yoshimura, T., Ichihara, A., Ikai, A., Nishigai, M., Morimoto, Y., Sato, M., Tanaka, N., Katsube, Y., Kameyama, K. and Takagi, T. (1988) *J. Mol. Biol.* **203**, 985-996.
(39) Ishiura, S., Yoshimoto, T. and Villee, C. A. (1986) *FEBS Lett.* **201**, 87-93.
(40) Martins De Sa, C., Gross De Sa, M.-F., Akhayat, O., Broders, F., Scherrer, K., Horsch, A. and Schmid, H.-P. (1986) *J. Mol. Biol.* **187**, 479-493.
(41) Arrigo, A. P., Darlix, J. L., Khandjian, E. W., Simon, M. and Spahr, P. F. (1985) *EMBO J.* **4**, 399-406.
(42) Kleinschmidt, J. A., Hugle, B., Grund, C. and Franke, W. W. (1983) *Eur. J. Cell. Biol.* **32**, 143-156.
(43) Kloetzel, P.-M., Falkenburg, P.-E., Hossl, P. and Glatzer, K. H. (1987) *Exp. Cell Res.* **170**, 204-213.
(44) Fujiwara, T., Tanaka, K., Kumatori, A., Shin, S., Yoshimura, T., Ichihara, A., Tokunaga, F., Aruga, R., Kakizuka, A. and Nakanishi, S. (1989) *Biochemistry* **28**, 7332-7340.
(45) Haass, C., Pesold-Hurt, B., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Kloetzel, P.-M. (1989) *EMBO J.* **8**, 2373-2379.
(46) Suzuki, K. (1991) *Biomed. Biochim. Acta* **50**, 483-484.
(47) Suzuki, K. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **8**, 167-169
(48) Murachi, T. (1989) *Biochem. Int.* **18**, 263-194
(49) Mellgren, R. L. (1987) *FASEB J.* **1**, 110-115

(50) 大海忍、川崎博史、榎森康文、大野茂男、鈴木紘一 (1988) *蛋白質・核酸・酵素* **33**, 2175-2192.
(51) 西道隆臣、鈴木紘一 (1990) *蛋白質・核酸・酵素* **35**, 1864-1870.
(52) 鈴木紘一 (1991) *Annual review細胞生物学* 1991, 294-306, 中外医学社, .
(53) Mellgren, R. L. and Murachi, T. (1990) *Intercellular calcium-dependent proteolysis* CRC Press, Boca Raton.
(54) Suzuki, K. and Ohno, S. (1990) *Cell Structure Function* **15**, 1-6.
(55) Suzuki, K., Imajoh S., Emori, Y. and Ohno, S. (1988) *Advances in enzme regulation* (ed. Weber, G.) Vol. **27**, pp.153-169, Pergamon Press, Oxford.
(56) 村地孝 (1989) *蛋白質・核酸・酵素* **33**, 2193-2206.
(57) 上林純一、左近賢人、芝英一、有吉秀男、森武貞 (1990) *日本血栓止血学会誌* **1**, 183-202.
(58) Johnson, P. (1990) *Int. J. Biochem.* **22**, 811-822.
(59) Wang K. K. W., Villalobo, A. and Roufogalis, B. D. (1989) *Biochem. J.* **262**, 693-706.
(60) Suzuki, K. Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S. and Kawasaki, H. (1987) *Prog. Clin. Biochem. Med.* **5**, 43-65.
(61) Mykles, D. L. and Skinner, D. M. (1982) *J. Biol. Chem.* **258**, 10474-10480.
(62) Mykles, D. L. and Skinner, D. M. (1985) *J. Biol. Chem.* **261**, 9865-9871.
(63) Pinter, M. and Friedrich, P. (1988) *Biochem. J.* **253**, 467-473.
(64) Andresen, K., Tom, T. D. and Strand, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15085-15090.
(65) Ojah, M. and Wallace, C. J. A. (1988) *J. Bact.* **170**, 1254-1260.
(66) Wolfe, F. H., Szpacenko, A., McGee, K. and Goll, D. E. (1989) *Life Science* **45**, 2093-2101.
(67) Minami, Y., Emori, Y., Kawasaki, H. and Suzuki, K. (1987) *J. Biochem. (Tokyo)* **101**, 889-895.
(68) Minami, Y., Emori, Y., Imajoh-Ohmi, S., Kawasaki, H. and Suzuki, K. (1988) *J. Biochem. (Tokyo)* **104**, 927-933.
(69) Zimmerman, U. J. P. and Schlaepfer, W. W. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **266**, 463-469.
(70) Kageyama, H. Shimizu, M., Tokunaga, K., Hiwasa, T. and Sakiyama, S. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1008**, 225-257.
(71) Suzuki, K., Imajoh, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Minami, Y. and Ohno, S. (1987) *FEBS Lett.* **220**, 271-277.
(72) Coolican, S. A. and Hathaway, D. R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11627-11630.
(73) Mellgren, R. L. and Rozanov, C. B. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 589-595.
(74) Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y. and Imahori, K. (1981) *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 275-278.
(75) Suzuki, K., Tsuji, S., Ishiura, S., Kimura, Y., Kubota, S. and Imahori, K. (1981) *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 1787-1793.
(76) Kubota, S., Suzuki, K. and Imahori, K. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 1189-1194.
(77) Kubota, S. and Suzuki, K. (1982) *Biomed. Res.* **3**, 699-702.

(78) Hathaway, D. R., Werth, D. K. and Haeberle, J. R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9072-9077.
(79) Dayton, W. R. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **709**, 166-172.
(80) Melloni, E., Salamno, F., Sparatore, B., Michetti, M. and Pontremoli, S. (1984) *Biochem. Int.* **8**, 477-489.
(81) Parkes, C., Kembhavi, A. A. and Barrett, A. J. (1985) *Biochem. J.* **230**, 509-516.
(82) Pontremoli, S. and Melloni, E. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 455-581.
(83) Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K. and Kawashima, S. (1985) *J. Biochem. (Tokyo)* **98**, 407-416.
(84) Coolican, S. A., Haiech, J. and Hathaway, D. R. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 4170-4176.
(85) DeMartino, G. N., Huff, C. A. and Croall, D. E. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12047-12052.
(86) Kawashima, S., Inomata, M. and Imahori, K. (1986) *Biomed. Res.* **7**, 327-331.
(87) Inomata, M., Imahori, K. and Kawashima, S. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 638-643.
(88) Inomata, M., Kasai, Y., Nakamura, M. and Kawashima, S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 19783-19787.
(89) Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Saito, Y. and Kawashima, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 18838-18843.
(90) McClelland, P., Lash, J.A. and Hathaway, D. R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17428-174431.
(91) Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M. and Suzuki, K. (1984) *Nature (Lond.)*, **312**, 566-570.
(92) Crawford, C., Brown, N. R. and Willis, A. C. (1990) *Biochem. J.* **265**, 575-579.
(93) Inomata, M., Saito, Y., Kon, K., Kawashima, S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 625-632.
(94) Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Sparatore, B. and Horecker, B. L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 1740-1743.
(95) Mellgren, R. L. and Rozanov, C. B. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 589-595.
(96) Rechsteiner, M., Rogers, S. and Rote, K. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 390-394.
(97) Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A. and Suzuki, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6296-6300.
(98) Watanabe, N., Vande-Wounde, G. F., Ikawa, Y. and Sagata, N. (1989) *Nature (Lond.)* **342**, 505-511.
(99) Schollmeyer, J. E. (1988) *Science* **240**, 911-913.
(100) Sheppard, A., Wu, J., Rutishauser, U. and Lynch, G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 156-160.
(101) Rriedrich, P. (1990) Neuroscience **35**, 1-7.
(102) Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Saido, C. T., Kawasaki, H., Oppenheim, J. J. and Matsushima, K. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5548-5552.

(103) 塚原俊文、杉田秀夫 (1988)*実験医学* **6**, 1097-1102.
(104) Pontremoli, S., Melloni, E., Salamino, F., Sparatore, B., Viotti, P., Michetti, M., Duzzi, L. and Bianchi, G. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 1287-1294.
(105) Okita, J. R., Frojmovic, M. M., Kristopeit, S., Wong, T., and Kunicki, T. J. (1989) *Blood* **74**, 715-721.
(106) Kawasaki, H., Emori, Y., Imajoh-Ohmi, S. and Suzuki, K. (1989) *J. Biochem. (Tokyo)* **106**, 274-281.
(107) 牧正敏, 畑中正一, 高野恵美子, 村地孝 (1988)*細胞工学* **11**, 870-879.
(108) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Minami, Y. and Suzuki, K. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2364-2370.
(109) Maki, M., Takano, E., Osawa, T., Ooi, T., Murachi, T. and Hatanaka, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10254-10261.
(110) 今城忍, 鈴木紘一 (1987)*蛋白質・核酸・酵素* **32**, 96-115.
(111) 神奈木玲児, 村地孝 (1987)*蛋白質・核酸・酵素* **32**, 116-129.
(112) 村地孝, 神奈木玲児 (1987)*細胞工学 別冊* **3**, 95-102.
(113) Gopalakrishna, R. and Barsky, S. H. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13936-13942.
(114) Schollmeyer, J. E. (1988) *Exp. Cell Res.* **163**, 413-422.
(115) Imajoh, S., Aoki, K., Ohno, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Sugihara, H. and Suzuki, K. (1988) Biochemistry 27, 8122-8128.
(116) Hata, A., Ohno, S., Akita, Y. and Suzuki, K. (1989) J. Biol. Chem. 264, 6404-6411.
(117) Aoki, K., Imajoh, S., Ohno, S., Emori, Y., Koike, M., Kosaki, G. and Suzuki, K. (1986) FEBS Lett. 205, 313-317.
(118) Ohno, S., Emori, Y. and Suzuki, K. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 5559.
(119) Emori, Y., Ohno, S., Tobita, M. and Suzuki, K. (1986) FEBS Lett. 194, 249-252.
(120) Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y. and Suzuki, K. (1989) J. Biol. Chem. 264, 20106-20111.
(121) Asada, K., Ishino, Y., Shimada, M., Shimojo, T., Endo, M., Kimizuka, F., Kato, I., Maki, M., Hatanaka, M. and Murachi, T. (1989) J. Enzyme Inhibition 3, 49-56.
(122) Emori, Y., Kawasaki, H., Sugihara, H., Imajoh, S., Kawashima, S. and Suzuki, K. (1986) J. Biol. Chem. 261, 9465-9471.
(123) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Kawashima, S. and Suzuki, K. (1986) J. Biol. Chem. 261, 9472-9476.
(124) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Minami, Y. and Suzuki, K. (1988) J. Biol. Chem. 263, 2364-2370.
(125) Samis, J. A., Back, D. W., Graham, E. J. and Elice, J. S. (1990) EMBL data base No. X51772 and X51773 (unpublished).
(126) Ishida, S., Emori, Y. and Suzuki, K. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1088, 436-438.
(127) Sakihama, T., Kakidani, H., Zenita, K., Yumoto, N., Kikuchi, T., Sasaki, T., Kannagi, R., Nakanishi, S., Ohmori, M., Takio, K., Titani, K. and Murachi, T. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82, 6075-6079.

(128) Takano, E., Maki, M., Mori, H., Hatanaka, M., Marti, T., Titani, K., Kannagi, R., Ooi, T. and Murachi, T. (1988) Biochemistry 27, 1964-1972.
(129) McClelland, P., Lach, J. A. and Hathaway, D. R. (1989) J. Biol. Chem. 264, 17428-17431.
(130) Miyake, S., Emori, Y. and Suzuki, K. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 8805-8817.

[実験材料]

(1) Hirai, S., Ryseck, R.-P., Mechta, F., Bravo, R. and Yaniv, M. (1989) *EMBO J.* **8**, 1433-1439.
(2) Hirai, S., Bourachot, B. and Yaniv, M. (1990) *Oncogene* **5**, 39-46.
(3) Hirai, S., Kawasaki, H., Yaniv, M. and Suzuki, K. (1991) *FEBS lett.* **287**, 57-61.

[実験方法]

(1) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1982) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
(2) Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
(3) 岩野政雄, 山崎常行 (1984)*昆虫のバイオテクノロジーマニュアル* (三宅端, 西郷薫, 柴忠義, 上田龍, 編著)頁 95-99, 講談社, 東京
(4) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
(5) Sorimachi, H., Emori, Y., Kawasaki, H., Kitajima, K., Inoue, S., Suzuki, K. and Inoue, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17678-17684.
(6) Huynh, T. V., Young, R. A., and Davis, R. W. (1985) *DNA cloning, a Practical Approach.* (Glover, D. M., ed.) Vol. 1, pp. 49-78, IRL Press, Oxford.
(7) Perron, C. Y., Vieira, J., and Messing, J. (1985) *Gene* **33**, 103-119.
(8) Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
(9) Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2172-2175.
(10) Henikoff, S. (1987) *Methods in Enzymology* **155**, 156-165.
(11) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985) *Science* **230**, 1350-1354.
(12) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., HOrn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) *Science* **239**, 487-491.
(13) Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G., Smith, A. J. H., and Roe, B. (1980) *J. Mol. Biol.* **143**, 161-178.
(14) Hattori, M., and Sakaki, Y. (1986) *Anal. Biochem.* **152**, 232-238.
(15) Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 488-492.

(16) Kunkel, T. A. Roberts, J. D. and Zakour, R. A. (1987) *Methods in Enzymology* **154**, 367-382.
(17) Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M. and Arai, N (1988) *Molec. Cell. Biol.* **8**, 466-472.
(18) Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S. and Suzuki, K. (1988) *Cell* **53**, 731-741.
(19) Saido, T. C., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Sorimachi, H., Murofushi, H., Tsuchiya, T., Ito, H. and Suzuki, K. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* in press.
(20) Laemmli, U. K. (1970) *Nature(Lond.)* **227**, 680.
(21) *続生化学実験講座2「タンパク質の化学上」*(日本生化学会 編集)頁13-80, 東京化学同人(東京)
(22) *生化学実験講座15「筋肉」*(日本生化学会 編集)頁3-102, 東京化学同人(東京)
(23) Hasselbach, W. and Schneider, G. (1951) Biochim. Z. 321, 461-494
(24) *組織培養の技術*(第二版)(日本組織培養学会 編集)頁25-65, 朝倉書店(東京)
(25) Yokota, T., Arai, N., Lee, F., Rennick, D., Mosmann, T. and Arai, K. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 68-72.
(26) Chu, G., Hayakawa, H. and Berg, P. (1987) *Nucl. Acids Res.* **15**, 1311.

[結果及び考察]

(1) Kozak, M. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 857-872.
(2) Kozak, M. (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 229-241.
(3) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Kawashima, S., and Suzuki, K. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 9472-9476.
(4) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Imahori, K., and Suzuki, K. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3590-3594.
(5) Sorimachi, H., Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Saido, T. C., Ohno, S., Minami, Y. and Suzuki, K. (1990) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **371**, 171-176.
(6) Goldfarb, D., S., Gariepy, J., Schoolnik, G. and Kornberg, R. D. (1986) *Nature* **332**, 641-644.
(7) Dingwall, C., Robbins, J., Dilworth, S. M., Roberts, B. and Richardson, W. D. (1988) *J. Cell. Biol.* **107**, 841-849.
(8) Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M., and Suzuki, K. (1984) *Nature* **312**, 566-570 .
(9) Emori, Y., Kawasaki, H., Sugihara, H., Imajoh, S., Kawashima, S., and Suzuki, K. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 9465-9471.
(10) Miyake, S., Emori, Y. and Suzuki, K. (1986) *Nucl. Acid Res.* **14**, 8805-8817.
(11) Emori, Y., Ohno, S., Tobita, M. and Suzuki, K. (1986) *FEBS Lett.* **194**, 249-252.
(12) Sorimachi, H., Saido, C. T., Kawasaki, H., Sugita, H., Ishiura, S. and Suzuki, K. manuscript in preparation.
(13) Suzuki, K., Ishiura, S., Katamoto, T., Sugita, H. and Imahori, K. (1979) *FEBS Lett.* **104**, 355-358.

(14) Imajoh, S., Aoki, K., Ohno S., Emori, Y., Kawasaki, H., Sugihara, H., and Suzuki, K. (1988) *Biochemistry* **27**, 8122-8128 .
(15) Aoki, K., Imajoh, S., Ohno, S., Emori, Y., Koike, M., Kosaki, G., and Suzuki, K. (1986) *FEBS Lett.* **205**, 313-317.
(16) Minami, Y., Emori, Y., Kawasaki, H. and Suzuki, K. (1987) *J. Biochem.* **101**, 889-895.
(17) Saido, T. C., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Sorimachi, H., Murofushi, H., Tsuchiya, T., Ito, H. and Suzuki, K. (1992) Biochim. Biophys. Acta, in press.

[総合討論]

(1) Kretsinger, R. H. and Nockolds, C. E. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3313-3326.
(2) Tufty, R. H. and Kretsinger, R. H. (1975) *Science* **187**, 167-169.
(3) Andresen, K., Tom, T. D. and Strand, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15085-15090.
(4) Emori, Y., Ohno, S., Tobita, M. and Suzuki, K. (1986) *FEBS Lett.* **194**, 249-252.
(5) 榎森康文、東島真一、小嶋徹也、西郷薫 (1991)*生化学* **63**, 914.
(6) Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M., and Suzuki, K. (1984) *Nature* **312**, 566-570
(7) Hill, R. E. and Hastie, N. D. (1987) *Nature* **326**, 96-98.
(8) Laskowski, M., Kato, I., Ardelt, Wo, Cook, J., Denton, A., Empie, M. W., Kohr, W. J., Park, S. J., Parks, K., Schatzley, B. L., Schoenberger, O. L., Tashiro, M., Vichot, G., Whatley, H. E., Wieczorek, A. and Wieczorek, M. (1986) *Biochemistry* **26**, 202-225.

Ⅷ. 謝辞

本論文の実験のほぼ全ては東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門で行われました。言葉ではとても言い尽くせぬ程お世話になりました鈴木紘一部門長（現東京大学応用微生物学研究所教授）ならびに同研究室の榎森康文博士（現東京大学理学部助教授）、大野茂男博士（現横浜市立大学医学部教授）、大海忍博士（現東京大学医科学研究所助手）、川崎博史博士、西道隆臣博士、秋田朗子博士、南康文博士（現東京都臨床医学総合研究所細胞生物研究部門）、平井秀一博士（現横浜市立大学医学部助手）、本間好博士（現東京都老人総合研究所）、棗田豊博士（現Syntex主任研究員）、久保況子博士、水野恵子博士（現横浜市立大学医学部助手）、石堂一巳博士（現順天堂大学医学部助手）、矢野明彦博士（現長崎大学医学部教授）、今野保彦博士（現住友金属工業）、藍沢広行博士（現東京大学医学部）、近藤平人博士（現サントリー生物医学研究所）、阿部啓子博士（現東京大学農学部）、朝倉富子博士（現東京大学農学部）、渡辺正人博士（現名古屋大学医学部助手）、室伏擴博士（現東京大学理学部助教授）、宮城妙子博士（現東北大学抗酸菌病研究所教授）、羽田明子氏（現横浜市立大学医学部）、長田真一博士（現横浜市立大学医学部助手）、新野由子博士（現東京都臨床医学総合研究所腫瘍免疫研究部門）、塚原俊文博士（現コールドスプリングハーバー研究所）、三島一彦氏（現国立ガンセンター）、Neil E. Forsberg 博士（現オレゴン州立大学準教授）、吉沢敏男氏（現東京大学農学部）、長尾俊介氏、白峰幹郎氏（現大王製紙株式会社三島工場）、塚口満弥氏（現福武書店）、伴真伊氏（現東京農業工業大学）、秋本和憲氏（現横浜市大医学部）、石田重樹氏（現富士レビオ株式会社中央研究所）、和田仁氏（現帝人生物医学第２研究所）、寺崎千波氏（現山之内製薬）、西谷尚美氏に心から感謝を申し上げます。また、実験に限らず広く御指導を頂きました東京都臨床医学総合研究所山川民夫所長（現東京薬科大学学長）、永井克孝所長及び東京大学農学部農芸化学科荒井綜一教授に心から感謝を申し上げます。特に骨格筋の実験で非常にお世話になりました、国立精神神経センター神経研究所の杉田秀夫所長、石浦章一博士（現東京大学応用微生物学研究所助教授）、荒畑喜一博士をはじめとする研究室の皆様に心から感謝いたしております。本論文を審査していただく際に審査委員会の委員として丁寧に論文を読んで頂いたのみならず貴重な御意見を賜りました東京大学農学部農芸化学科の野口忠教授、松沢洋教授に心から感謝申し上げます。また、公私にわたっていつも助言を頂いた前田達也博士（ハーバード大学ダナファーバー研究所）、鈴木謙二博士（日本放送協会ディレクター）、宮田愛彦博士（東京都臨床医学総合研究所細胞生物研究部門）、馬見塚拓博士（日本電気株式会社C&C情報研究所）にも心からのお礼を申し上げます。そして、同じ研究所でお世話にな

り、いつも私を叱咤激励して下さった山崎博男副所長、鈴木義之副所長、野本明男博士、鈴木明身博士、米川博通博士、宮坂昌之博士、金田秀樹博士、小安重夫博士（ハーバード大学ダナファーバー研究所教授）、石井愛博士、米原伸博士、米原美奈子博士、松本清治博士、小池智博士、飯塚成志博士、老沼明博士、三浦伸彦博士、橋本康弘博士、神田大輔博士、山本行男博士、盛岡清和博士、前田正治博士、川島育夫博士、小沢秀樹博士、小谷政晴博士、内海忠雄博士、伊東敦博士、川口肇博士、北村ふじ子博士、玉谷卓也博士、田中稔之博士、杭田慶介博士、吉野忠雄博士、名畑目誠博士、灘丘陽子博士、フォトセンターにいらっしゃる種田敬夫主事、長岡達雄主事、事務にいらっしゃる木島敬三部長、唯木暁課長、高橋善夫課長、須田茂雄課長補佐、太田幸雄係長、工藤定夫係長、鈴木幸雄係長、寺岡博係長、大久保庸子係長、村田順義主事、永野富子主任、高橋律子主事、廣山久子主事、川島さつき主事、金子正二主任、相沢邦夫主事、松原きぬ子主事、大谷照男主事、谷中美佐子主査、狩野京子主事、佐々木由利子主事、喜田山悦子主事、本橋紀子係長、武田典子主事、柴崎澄子主事、大日方佐織主事、中島美代子主事に心からお礼を述べさせて頂きたいと思います。最後に、すべてのしわ寄せを引き受けてくれたのみならず実験的にもサポートしてくれた妻典子に心から感謝いたします。

名前の羅列となり表現も同一となったのは、謝意をすべて書き表していたらこの博士論文の厚さが倍以上になってしまうからです。決して等閑な気持ちからではありません。本当にこの6年間、皆様どうもありがとうございました。

論文の内容の要旨

論文題目 骨格筋特異的に発現するカルシウム依存性プロテアーゼの構造と機能に関する考察

氏名 反町 洋之

[序論]

細胞内情報伝達の機構は細胞が外界の状況に自らを対応していくために、長い進化の末に獲得した複雑かつ精巧なネットワークシステムである。この機構には非常に多くの酵素群が関与しており、これらの発現や活性の制御を司っていると考えられるものが細胞内プロテアーゼである。即ち、細胞質内に存在し、タンパク質である酵素群を限定分解することによって、その酵素を活性化したり、ダウンレギュレーションしたりする。また、他のプロテアーゼと共同してターンオーバー速度を調節したり、さらには転写因子の分解を制御することで、間接的にタンパク質の転写量の調節をも行う。このように、細胞内プロテアーゼは単にタンパク質を分解するだけではなく、積極的に細胞内情報伝達系に関与していると考えられ、ATP依存性プロテアーゼ複合体(1)、マルチキャタリティックプロテイナーゼ(2)、そして本論文の主題であるカルシウム依存性プロテアーゼ(カルパイン)の3つがよく研究されている。

カルパインは1964年にその存在が発見されてから主に哺乳類においてその構造、機能が詳細に解析された(3)(4)。カルパインはほぼすべての組織の細胞質内に存在するシステインプロテアーゼであり、活性の発現にカルシウムイオンを必要とする。そして、少なくとも2種のアイソザイムが存在し、両者は異なるカルシウム依存性を示す(mMオーダーのカルシウム濃度で活性化するものをm-カルパイン、μMオーダーのカルシウム濃度で活性化するものをμ-カルパインという)。両アイソザイムともヘテロダイマーであり、それぞれ異なる80kDaの活性大サブユニットと同一の30kDaの調節小サブユニットとから構成

されている。その大サブユニットは一次構造的に4つのドメインに分割でき、その第II, IVドメインは、それぞれシステインプロテアーゼ及びカルシウム結合ドメインとなっている(図1参照)。また、細胞内には特異的なインヒビター(カルパスタチン)が存在し、カルパインの活性を制御している。

(図1) p94及びカルパインサブユニットの構造模式図

Cys, Hisは活性中心を形成するアミノ酸残基を示す。

このようにカルパインはほぼすべての組織で発現しており、細胞内の基本的な生命現象と密接に関係した機能を果たしていると考えられるが、その生理機能について決定的なことは明らかになっていない。カルパインが実際に細胞内情報伝達のどこに位置づけられ、どのような機能を担っているのかを最終的には解明しなければならないわけだが、カルパインを組織特異的な機能との関連で考えることができないことは、機能研究に大きな障害となっている。本論文ではカルパイン大サブユニットのcDNAクローニングの過程で発見した第三の分子種、p94が後述するように骨格筋特異的に発現している特徴を利用してp94の骨格筋での機能をはじめとして、カルパインの一般的な機能についても考察した。

[結果]

<1>　p94のmRNAの構造とその特徴

ニワトリのm-カルパイン大サブユニットのcDNA[5]をプローブとし、ヒトm-, μ-カルパイン大サブユニットのcDNAを骨格筋cDNAライブラリーを用いてスクリーニングしたところ、m-, μ-カルパイン大サブユニットのcDNA以外にどちらとも相同性を持ちながらも両者と異なるcDNAが単離された[6]。このcDNAがコードすると考えられるタンパク質(p94と命名した)はm-, μ-カルパイ

ン大サブユニットの双方と約50%の相同性を持ち、その相同性から同様に4つのドメインに分割することができた(図1)。特にシステインプロテアーゼ領域であるドメインIIは他のドメインよりも強く保存されており(約65%)、p94もシステインプロテアーゼとしての活性を持つ事が強く示唆された。カルシウム結合領域(ドメインIV)もよく保存されており、m-, μ-カルパインと同様のカルシウム結合性も示す事が予想された。しかし、p94にはそのN-末端、ドメインII、ドメインIVにm-, μ-カルパイン大サブユニットと全く相同性を示さない部分が挿入的に存在した(図1のNS, IS1, IS2)。次にヒトp94のcDNAを用いて他種における相当分子種を検索したところ、ラット及びニワトリから全体として94%及び79%の相同性をもつ分子が発見されp94は進化の過程を通じて保存されている事が示された。

<2>　p94のmRNAの発現分布

ノーザンブロット解析によりp94は骨格筋のみで発現している事が判明した。上述したように、m-, μ-カルパイン大、小サブユニットはほぼ全ての組織で発現しており、対照的である。しかもcDNAスクリーニングの結果も含めると、骨格筋においてp94のmRNAはm-, μ-カルパイン大サブユニットより10倍程度多く発現している事も判明した。

<3>　p94の遺伝子構造

ラットゲノムDNAのEcoRI, HindIII, BamHI消化物を、p94cDNAのほぼ全長をプローブとした遺伝子サザンブロットにより解析したところ、どの消化物からも複数のバンドが得られた。これらを総合的に解析すると、p94の遺伝子の全長はm-カルパイン大小サブユニットの遺伝子よりも長く約30kbpであることが判明した。

<4>　p94のタンパク質レベルでの骨格筋における解析

次にp94をタンパク質レベルで同定、解析するため、まずp94の特異的アミノ酸配列(既述したNS及びIS2領域のそれぞれから一部)を含むペプチドを合成し、これに対するポリクローナル抗体を作製した。両抗体は十分な特異性と感度とを有している事を確認した後、これを用いて骨格筋抽出液を遠心分離、分離抽出、イオン交換カラムクロマトグラフィーで分画し、ウェスタンブロットによって検出を試みたが、m-カルパインは検出されるのに対して、p94は全く検出されなかった。

<5>　p94のCOS細胞における発現

mRNAは多量に存在するがタンパク質が検出できないという、一見矛盾する現象を解析するために、p94のcDNAをSV40プロモーター下流に組み込みCOS細胞内で発現する事を試みた。ワイルドタイプのp94をCOS細胞に導入し発現させた場合、p94のmRNAは検出されるが、その翻訳産物は非常にわずかしか検出されず、低分子量領域に分解産物と考えられるタンパク質のバンドが検出された。さらに、IS2領域を欠失させるか、活性中心と考えられるシステイン残基をセリン、グリシンに変異させると通常のタンパク質(例えばμ-カルパイン大サブユニット)と同程度に良く発現することが明らかになった。これらの結果から、p94がワイルドタイプのままではCOS細胞に発現させてもそのタンパク質は非常に微量しか検出されなかった事、さらに骨格筋においてp94が検出されなかった事は、p94が翻訳された直後に自己消化によって自らをほぼ完全に分解してしまう事が原因であると考えられた。また、この自己分解には、p94特異的領域の１つであるIS2が関与していることも判明した。

<6>　p94の細胞内局在

COS細胞に発現させたp94の細胞内局在を、蛍光抗体法によって調べてみると、核を取り囲むように細胞質に分布している事が判明した。p94のIS2領域にはリジン残基が連続して4残基存在している部位があり、核移行シグナルとの相同性が認められる。よって、COS細胞内での分布がこの配列と関与する可能性もある。また、骨格筋の断面を免疫組織染色によって調べてみると、核の部分と細胞質に弱いシグナルが得られた。

<7>　p94のプロテアーゼ活性

COS細胞に発現させたp94について、そのプロテアーゼ活性とカルシウム依存性を測定した。ここではカルパインの良い基質として知られているフォドリンをターゲットとしてウェスタンブロットの系によって検出を行った。COS細胞に発現させたm-, μ-カルパイン大サブユニットを対照に用いて解析した場合には、それぞれmM及びμMオーダーのカルシウム濃度で明らかなフォドリンの分解が観察されたが、p94では明らかな活性は得られなかった。これは、p94がフォドリンを基質としない可能性、ワイルドタイプのp94発現量が絶対的に少なかった可能性、p94がm-, μ-カルパインに対して著しく不安定である可能性などが考えられる。p94が翻訳される場である細胞質のカルシウム濃度

は10^{-8}～10^{-6}Mと考えられ、ここにおいて自己消化活性を示している事から、p94はnMオーダーのカルシウム濃度で活性を発現する可能性が高いことが考えられる。

[総合討論]

p94はm-, μ-カルパイン大サブユニットと相同性があるものとして発見されたが、その分布はm-, μ-カルパインとは異なり、骨格筋のみで発現している事が明らかとなった。さらに、翻訳直後に自己消化によって分解するという特殊な挙動を示す事も判明した。一方、全体の相同性からp94もm-, μ-カルパインと同様にシステインプロテアーゼ活性とカルシウム結合性とを有する事も明らかであり、p94がm-,μ-カルパインと基本的な機能は共有し、その上でp94独自の機能を付加的に備えている事が示唆された。すなわち、p94は骨格筋においてm-, μ-カルパインと共同して、細胞内情報伝達系の酵素群のメインテナンスという細胞内プロテアーゼとしての基本的役割を果たすと同時に、骨格筋という特殊化された器官に固有の、例えば骨格筋に分化する際に必要となる転写因子群のプロセッシング等の機能を担っていると考えられる。

[文献]

(1) Fagan, J. M., Waxman, L. and Goldberg, A. L. (1987) Biochem. J. 243, 335-353.

(2) Kelly, A., Powis, S. H., Glynne, R., Radley, E., Beck, S. and T'Owsdale, J. (1991) Nature, 353, 667-668.

(3) Suzuki, K. (1991) Biomed. Biochim. Acta 50, 483-484.

(4) 鈴木紘一 (1991) Annual Review 細胞生物学 (中外医学社) , 294-306.

(5) Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M. and Suzuki, K. (1984) Nature 312, 566-570.

(6) Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y. and Suzuki, K.(1989) J. Biol. Chem. 264, 20106-20111.

(7) Sorimachi, H., Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Saido, T. C., Ohno, S., Minami, Y. and Suzuki, K. (1990) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 171-176.

inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
C
Y
M
Kodak Gray Scale
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19