# 生体情報応答性カルシウム結合蛋白質および その相互作用因子に関する構造と機能

名古屋大学大学院生命農学研究科　牧　　正　敏

## はじめに

カルシウムは，主要な必須ミネラルとして骨・歯などを形成する重要な栄養素であり，動物は食物よりカルシウムを摂取している．ミルク中に高濃度に存在する蛋白質カゼインは，カルシウムイオン（$Ca^{2+}$）と結合し，小腸からの高い$Ca^{2+}$吸収率を支えている．また，下等真核生物から高等動植物に至るまで，$Ca^{2+}$は情報伝達因子としても働き重要な生体調節機能を担っている．とくに動物細胞では，通常，細胞内$Ca^{2+}$濃度は細胞外の1/10000以下に保たれ，細胞内$Ca^{2+}$濃度の上昇がシグナルとなり，酵素の活性化，遺伝子発現誘導，細胞形態変化，筋収縮，開口分泌，細胞死など様々な生理作用をもたらす．私は，大学院博士課程修了後，まだ黎明期にあった遺伝子操作技術を駆使し，研究対象とする蛋白質の一次構造情報を得ることに始まり，遺伝子発現や試験管内での構造・機能相関解析を主要な研究戦略として位置づけた．しかしこのような研究スタイルが評価される時代は長くは続かず，3次元構造や相互作用因子，細胞内局在の時空間的動態，生理機能など多くの情報が同時に求められるようになった．このような苦悩の中でpenta-EF-handカルシウム結合蛋白質について幸運にも一筋の活路を切り開くことができた．本講演では本テーマ関連研究開始のきっかけから現在に至るまでの過去30年余りの研究展開について紹介したい．

## 1.　カルパインの内因性阻害蛋白質の構造と阻害機構

動物組織に広く存在するカルシウム依存性プロテアーゼ（カルパイン）の内因性阻害蛋白質カルパスタチンの精製標品部分ペプチド断片のアミノ酸配列情報をもとにcDNAクローニングを行い，塩基配列決定により蛋白質全長の一次構造を推定した．また，組換体および合成オリゴペプチドを用いた解析により，カルパスタチンは4つの繰返し阻害ドメインをもつが，保存されたB領域が阻害中心であり，A領域とC領域がそれぞれカルパインの大小サブユニットのカルシウム結合ドメインに特異的に直接結合することが判明し，3部位結合モデルを提唱した．ゲノムDNAの解析により，繰返し保存領域A，B，Cが4回ともすべて別々のエクソンにコードされていること，組織特異的な選択的転写開始や選択的スプライシングにより多様なアイソフォームが生成されることなども明らかとなった．

## 2.　penta-EF-hand（PEF）ファミリー

従来，カルパインの大小サブユニットがもつ相同的なカルシウム結合ドメインはともに一次構造上4つのEF-handからなるとされていた．共同研究によって小サブユニットのX線結晶構造解析を行った結果，驚いたことにEF-handが4つではなく，立体構造上は5つのEF-handをもち，EF5が対になって二量体形成することが明らかになった[1]．このような特徴的な構造をpenta-EF-hand（略称，PEF）ドメインと新たに命名した[2]．典型的カルパイン以外に細胞死関連因子ALG-2（Apoptosis-Linked Gene 2, 別名PDCD6）や新たに発見して名付けたpeflinなどもこのファミリーに属し，PEF蛋白質ファミリーが原生生物や酵母などの下等真核生物から高等動植物に至るまで広く存在することが明らかになった（表）．

## 3.　ALG-2相互作用因子

ALG-2の生理機能解明を目指して，$Ca^{2+}$依存的に結合する相互作用因子探索を行い，結合部位の同定と機能を解析してきた．これらの因子の中には膜交通（メンブレントラフィック），RNAプロセシングや遺伝子発現調節に関わる因子が多数含まれていた．また，相互作用因子ALIX（ALG-2-interacting protein X）とSec31Aについては，それぞれ同定したALG-2結合領域の合成ペプチドとALG-2との複合体のX線結晶構造解析および変異体解析を行い[3,4]，両者がALG-2表面の異なる疎水ポケットに結合すること，また，異なるタイプのALG-2結合モチーフをもつことなど，分子認識機構の一端を明らかにした（図1）．

### 3-1.　エンドソーム選別輸送複合体（ESCRT）

酵母で報告されていたEndosomal Sorting Complex Required for Transport（ESCRT）-III複合体構成因子Snf7の哺乳類ホモログであるCHMP4をALIXと相互作用する因子として同定し，CHMP4が細胞膜表面EGF受容体の細胞内取込み後のエンドソーム内出芽と多胞体形成ならびにリソソーム分解経路での選別輸送に関与していることを明らかにした[5]．時を

表　PEF蛋白質ファミリーの生物界分布

| 蛋白質名 | 原生生物 | 植物 | 酵母 | カビ | 線虫 | ハエ | 哺乳類 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PEF蛋白質 | | | | | | | |
| ALG-2 | + | + | + | + | + | + | + |
| peflin | − | − | − | − | − | + | + |
| 典型的カルパイン | | | | | | | |
| 大サブユニット | − | − | − | − | − | + | + |
| 小サブユニット | − | − | − | − | − | − | + |
| sorcin | − | − | − | − | − | − | + |
| grancalcin | − | − | − | − | − | − | + |
| 非典型的カルパイン | | | | | | | |
| calpain-7（CAPN7） | − | − | + | + | + | − | + |

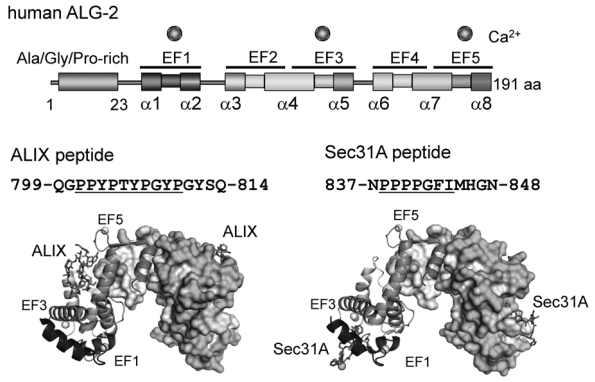


図1.　5つのEF-handをもつALG-2の構造模式図ならびに相互作用因子ペプチドとの複合体のX線結晶構造．両ペプチドはそれぞれ異なる部位に結合する．

同じくしてHIVなどレトロウイルスがESCRT群をハイジャックして細胞膜からの出芽に利用していることが報告され注目された．その後も，分裂期における核膜再形成や損傷した細胞膜やリソソーム膜の修復にも関与していることが報告されている．私も共同研究により成熟C型肝炎ウイルスの産生にもESCRT系および他のALG-2相互作用因子が関与していることを明らかにした．ALG-2はESCRT-I（TSG101, VPS37B/C）やESCRT-III関連因子（IST1）とも相互作用し，作動場所に応じてESCRT系における初期調節因子のひとつとして働いていると考えられる．

**3-2. 核内因子**

ALG-2は細胞質のみならず核内にも存在する．相互作用因子として同定したCHERP（Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein）は小胞体に存在する蛋白質として報告されていたが，細胞内分布を詳細に解析すると核質にスペックル状に存在し，$Ca^{2+}$濃度上昇時のALG-2分布と一致することが判明した．CHERPは活性型RNAポリメラーゼIIと共免疫沈降され，$IP_3R1$ mRNA前駆体の選択的スプライシング補助因子として作用すること，そして構造的および機能的にSRSFスーパーファミリーに属すことが明らかになった[6]．

**3-3. 小胞体–ゴルジ体間小胞輸送調節**

小胞体からゴルジ体への初期分泌経路において，輸送される積荷は小胞体出芽部位（ERES）に集積する．ALG-2はERESにおいてCOPII小胞外殻構成因子Sec31Aとリン脂質結合性カルシウム結合蛋白質アネキシンA11との橋渡しをし，小胞輸送速度を制御していることが明らかになった[7]．さらにERESからの小胞輸送において，ALG-2は機能未知であったMISSLを微小管結合蛋白質MAP1Bに橋渡し，小胞輸送を制御していること[8]，および，がん細胞で見出されているMAP1B変異体の幾つかはALG-2との結合性が喪失あるいは低下していることも判明した．

**3-4. ALG-2の作用原理**

ALG-2は$Ca^{2+}$依存的に様々な蛋白質と結合するが，複合体の安定化，異分子間連結，オリゴマー化促進に作用していることから，ALG-2二量体の「$Ca^{2+}$依存性アダプター機能仮説」を提唱し，単量体で機能するカルモジュリンとは根本的に異なる作用原理を有することを幾つかのケースで示した．

## 4. カルパインとESCRTとの接点

CHMPファミリーで形成されるESCRT-III複合体を解離するVPS4 ATPaseのMITドメインはCHMPがもつMIMモチーフと結合することが知られていた．非典型的カルパインのひとつcalpain-7（CAPN7）はPEFドメインをもたないがMIT様ドメインをもっていたため調べて見ると，IST1など一部のCHMPファミリー蛋白質と結合すること，また，CAPN7のプロテアーゼ活性がESCRT系因子によって活性化されることが分かった．また，直接に作用する生理的基質は未同定であるが，CAPN7はエンドソーム・リソソーム経路においてEGF受容体の分解に関わっていることも判明した（図2）[9]．進化の過程で典型的カルパインの誕生はPEFドメインを獲得することによりESCRT系から$Ca^{2+}$による制御系へと機能の多様化をもたらしたと思われる．

## おわりに

私と$Ca^{2+}$の出会いは，京都大学農学部・旧食品化学研究室在籍中に恩師（故）千葉英雄先生からカゼインミセル形成における$Ca^{2+}$の役割を教えられたときに始まり，ラットやウシのカゼインcDNAのクローニングを手掛けたことが今日に繋がっている．生体情報因子としての$Ca^{2+}$の生理作用を担う結合蛋白質群とその相互作用因子ネットワークには依然として不明な点も多く，今後のバイオサイエンス研究の進展に期待したい．

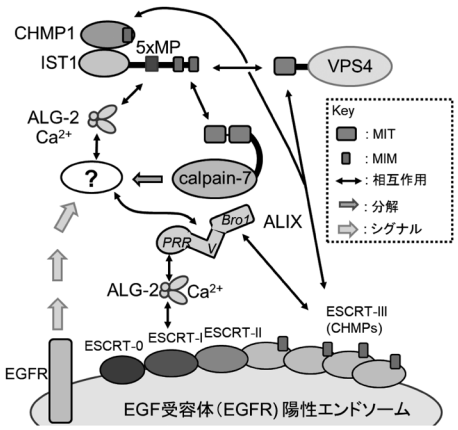


**図2.** calpain-7のESCRTシステムにおける作業仮説


（引用文献）

1）Lin GD *et al.* Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat Struct Biol.* 4, 539–547（1997）.

2）Maki M *et al.* A growing family of the $Ca^{2+}$-binding proteins with five EF-hand motifs. *Biochem J.* 328, 718–20（1997）

3）Suzuki *et al.* Structural basis for $Ca^{2+}$-dependent formation of ALG-2/Alix peptide complex: $Ca^{2+}$/EF3-driven arginine switch mechanism. *Structure.* 16, 1562–1573（2008）

4）Takahashi T *et al.* Structural analysis of the complex between penta-EF-hand ALG-2 protein and Sec31A peptide reveals a novel target recognition mechanism of ALG-2. *Int J Mol Sci.* 16, 3677–3699（2015）

5）Katoh *et al.* The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J Biol Chem.* 278, 39104–39113（2003）.

6）Sasaki-Osugi K *et al.* Nuclear ALG-2 protein interacts with $Ca^{2+}$ homeostasis endoplasmic reticulum protein（CHERP）$Ca^{2+}$-dependently and participates in regulation of alternative splicing of inositol trisphosphate receptor type 1（$IP_3R1$）pre-mRNA. *J Biol Chem.* 288, 33361–33375（2013）.

7）Shibata H *et al.* A new role for annexin A11 in the early secretory pathway via stabilizing Sec31A protein at the endoplasmic reticulum exit sites（ERES）. *J Biol Chem.* 290, 4981–4993（2015）.

8）Takahara T *et al.* The calcium-binding protein ALG-2 regulates protein secretion and trafficking via interactions with MISSL and MAP1B proteins. *J Biol Chem.* 292, 17057–17072（2017）

9）Maemoto Y *et al.* Involvement of calpain-7 in epidermal growth factor receptor degradation via the endosomal sorting pathway. *FEBS J.* 281, 3642–3655（2014）.


**謝　辞**　本研究課題の発端となった研究は，助手・助教授として在籍した京都大学ウイルス研究所において行ったものであり，ご指導・ご支援を賜った畑中正一先生（京都大学名誉教授）ならびに（故）村地孝先生（京都大学名誉教授）と関係者の皆様に心より感謝します．また，名古屋大学に異動したのちも，同僚や研究室の学生・大学院生ならびに国内外の多くの共同研究者に支えられて成果を出すことができました．ここに深く感謝いたします．最後に，学生・大学院生時代にご指導を賜った佐々木隆造先生（京都大学名誉教授），廣瀬正明先生（京都大学名誉教授）ならびに貴重な助言を頂いた先輩・同輩・後輩諸氏に感謝申し上げます．