

ミトコンドリアカルパインの同定と機能解析

2009. 3

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(弘前大学)

尾崎 拓

目次

第1章 序論

1. 本研究の背景と目的.....	1
2. カルパイン.....	2
(1) カルパインの構造と性質	
(2) カルパインの生理機能	
(3) カルパインの活性制御機構	
3. カルパスタチン.....	4

第2章 ミトコンドリア μ -カルパインの精製とその性質

第1節 緒言.....	9
第2節 実験材料および方法.....	10
(1) ブタ肝臓の細胞分画	
(2) ミトコンドリアの単離と分画	
(3) カルパイン活性測定	
(4) タンパク質の定量	
(5) カラムクロマトグラフィー	
(6) 銀染色法	
(7) Ca^{2+} による活性化、最適 pH、阻害剤の効果	
(8) ウェスタンブロット解析	
(9) カゼインザイモグラフィー	
(10) 内在性ミトコンドリアカルパインによる AIF の限定分解	
(11) 単離ミトコンドリアのトリプシン処理	
(12) グルタミン酸脱水素酵素の活性測定	

第3節 実験結果.....	19
(1) ミトコンドリアにおけるカルパイン活性	
(2) 細胞質 μ -、m-カルパインおよびミトコンドリアカルパインの精製	
(3) ミトコンドリアカルパインの精製度とウエスタンブロット解析	
(4) ミトコンドリア画分の純度	
(5) 細胞質 μ -、m-およびミトコンドリア μ -カルパインの酵素学的性質の比較	
(6) 細胞質およびミトコンドリア画分でのカゼインゼイモグラフィーとウエスタンブロット解析	
(7) ミトコンドリア μ -カルパインのミトコンドリア分布と組織分布	
(8) ミトコンドリア μ -カルパインによる AIF の限定分解と遊離	
第4節 考察.....	27

第3章 ミトコンドリア μ -カルパインの機能解析

第1節 緒言.....	43
第2節 実験材料および方法.....	44
(1) ラット肝臓からの細胞分画とミトコンドリア分画	
(2) ミトコンドリアカルパインの部分精製	
(3) 使用した抗体と阻害剤	
(4) ゲル内トリプシン消化	
(5) MALDI-TOF Mass スペクトロメトリーとデータベース解析	
(6) 非変性ポリアクリルアミド電気泳動 (Native PAGE)	
(7) 免疫沈降	
(8) 内在性ミトコンドリア μ -カルパインによる AIF の限定分解	

第3節 実験結果.....50

- (1) ミトコンドリア μ -カルパインの部分精製
- (2) ミトコンドリアカルパインの精製度と MALDI-TOF Mass 解析
- (3) ERp57 のミトコンドリア局在
- (4) 細胞質およびミトコンドリア分画でのカゼインザイモグラフィとウエスタンブロット解析
- (5) ミトコンドリア μ -カルパインと ERp57 の相互作用
- (6) ミトコンドリア μ -カルパイン-ERp57 複合体に対する Ca^{2+} の影響
- (7) ミトコンドリア μ -カルパインに対する PDI 阻害剤の影響
- (8) ミトコンドリア μ -カルパイン活性に及ぼす ERp57 抗体の効果
- (9) ERp57 結合型ミトコンドリア μ -カルパインによる AIF の限定分解

第4節 考察.....59

第4章 ミトコンドリア m-カルパインの同定と機能解析

第1節 緒言.....76

第2節 実験材料および方法.....77

- (1) 使用した抗体
- (2) 未知ミトコンドリアカルパインの免疫沈降
- (3) ペプチド溶液における脱塩操作
- (4) LC-MS/MS 解析
- (5) データベース検索によるタンパク質の同定
- (6) ミトコンドリア内在性 m-カルパインによる VDAC 切断
- (7) 単離ミトコンドリアでの m-カルパイン活性化、VDAC 切断、AIF およびシトクロム c の遊離

(8) カルパイン阻害剤、VDAC/Bax 抗体による AIF およびシトクロム c
遊離阻害

第3節 実験結果.....82

- (1) 未知ミトコンドリアカルパインの存在
- (2) 未知ミトコンドリアカルパインの分離
- (3) 未知ミトコンドリアカルパインの免疫沈降と SDS-PAGE 解析
- (4) 未知ミトコンドリアカルパインの同定
- (5) 同定されたミトコンドリアカルパインのウエスタンブロット解析
- (6) ミトコンドリア m-カルパインの Ca^{2+} 依存性
- (7) ミトコンドリア m-カルパインと GRP75 との相互作用
- (8) ミトコンドリア m-カルパインの基質分子の探索
- (9) 単離ミトコンドリアでの VDAC 切断および tAIF/シトクロム c の遊離
- (10) tAIF/シトクロム c 遊離に対するミトコンドリアカルパイン、VDAC
および Bax の寄与

第4節 考察.....92

謝辞.....109

引用文献.....110

第1章

序論

1. 本研究の背景と目的

カルパインとは Ca^{2+} 依存性中性システインプロテアーゼで、基質を限定分解し、様々な細胞機能を調節する細胞内調節因子として機能している [1, 2]。カルパインは細胞質にのみ局在すると広く考えられていたが、1999年、遠藤ら [3] によってミトコンドリアにカルパインが存在することが示唆された。報告された重要な発見が、本研究を推進する引き金となった。グルタミン酸脱水素酵素、オルニチンアミノ基転移酵素、グルタミンナーゼ、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AAT) などのグルタミン酸代謝に関わる酵素群は、主にミトコンドリアに局在している。虚血状態においた網膜細胞では、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、この上昇がミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を引き起こし、様々なミトコンドリア酵素を活性化させると考えられる。グルタミン酸代謝に関わる酵素群の中でも、特に AAT が最も高い活性を有している [4-6] ため、遠藤らは虚血・低酸素状態においたラット網膜における AAT 活性の変化に着目した [3]。その結果、30、60、90 分間の虚血・低酸素下においたラット網膜において、時間依存的にミトコンドリアの AAT (mAAT) 活性が減少し、細胞質の AAT (cAAT) 活性はほとんど変化しなかった。さらに低酸素下では細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するので、 Ca^{2+} 依存性のカルパインがこの mAAT の変化に関与しているかを調べた。

ミトコンドリアでのカルパイン活性は、90 分間の虚血・低酸素下で 2.5 倍上昇し、細胞質でのカルパイン活性は 40%程減少した。カルペプチンやカルパイン阻害剤ペプチドなどのカルパイン阻害剤を作用させることで、mAAT 活性の減少が抑制された。こ

これらの結果から、ミトコンドリア内にカルパイン様プロテアーゼが存在し、それが虚血・低酸素下で活性化し mAAT を切断することにより、mAAT 活性を減少させることが示唆された。

1999 年当時、カルパインは細胞質のみに存在すると広く考えられていたが、遠藤らの研究グループ以外にもミトコンドリアにカルパイン様の活性があるという報告があった [7-10]。そこでミトコンドリアにカルパインが存在するのか確認し、そのミトコンドリアカルパインを同定し、その性質と機能を調べることを目的として、本研究を開始した。

2. カルパイン

(1) カルパインの構造と性質

カルパインは活性に Ca^{2+} を必要とする細胞内システインプロテアーゼで、細胞質内に存在し、基質を限定分解することで様々な細胞機能を調節する [1, 2]。

カルパインは、一部の酵母や細菌など単細胞生物から多細胞生物までほとんどの生物種に存在し、多種多様なサブクラスからなるスーパーファミリーを形成する [11, 12]。

哺乳類では発現様式の異なる 14 遺伝子が存在し、それらの分子種では、活性ドメイン

(ドメイン II) は良く保存されているものの、それ以外は多様なドメインからなる個性的な構造を有している。哺乳類のカルパインは、その発現様式によって大きく組織普遍的分子種と組織特異的分子種に分けられる (表 1-1)。組織普遍的に存在する分子種として、カルパイン 1 (μ -カルパイン大サブユニット) [13]、カルパイン 2 (m -カルパイン大サブユニット) [13]、カルパイン 10 [14] など、組織特異的に発現するものとしてカルパイン 3 (筋特異的 p94) [15]、カルパイン 8 (胃特異的 nCL-2) [16]、カルパイン 9 (消化管特異的 nCL-4) [17] などが挙げられる。

カルパインファミリーの中でも最も研究が進んでいるものが、組織普遍的に存在する μ -および m -カルパインである [13]。両分子種は活性化に必要な Ca^{2+} 濃度が異なり、各々 *in vitro* では数 10 μM および 1 mM 前後の Ca^{2+} によって活性化される。これらの Ca^{2+} 濃度は生理的な Ca^{2+} 濃度と比較すると圧倒的に高い。後述するが、生体内ではカルパインの Ca^{2+} 感受性を亢進させる何らかの機構が存在すると考えられる。

μ -および m -カルパインは、分子量約 8 万の活性サブユニット（カルパイン大サブユニット）と、約 3 万の調節サブユニット（カルパイン小サブユニット：30K）からなるヘテロ 2 量体を形成し存在している（図 1-1）。活性サブユニットは、 μ -、 m -カルパインで約 60%のアミノ酸配列相同性をもつ異なった分子（ μCL 、 $m\text{CL}$ ）であるが、調節サブユニットは両者とも同一の分子である。

活性サブユニットの典型的構造は、4 つの機能ドメインに分けることができる。ドメイン II は、パルパインやカテプシン B、H、L など他のシステインプロテアーゼと弱い相同性を示す活性ドメインである [11]。ドメイン I は活性化に伴い N 末端が自己消化を受け、これにより Ca^{2+} 感受性が亢進する [18]。ドメイン III は、リン脂質・ Ca^{2+} と相互作用する C2 様ドメイン（C2 ドメイン；プロテインキナーゼ C に存在するドメイン構造）であり、EF-ハンド構造が 1 ヶ所存在することから活性制御の一端を担っていると考えられる [19, 20]。ドメイン IV は、カルモデュリンなどの EF ハンド型 Ca^{2+} 結合タンパク質と弱い相同性を有する Ca^{2+} 結合領域で、プロテアーゼ活性の Ca^{2+} 依存性を象徴していると考えられる。

調節サブユニットの C 末端側ドメイン（ドメイン VI）も EF ハンド型 Ca^{2+} 結合領域で、活性サブユニットのドメイン IV と約 50%のアミノ酸相同性を示す。N 末端側ドメイン（ドメイン V）はグリシンが連続する疎水性領域となっており、膜系などとの相互作用に関与すると考えられている。

(2) カルパインの生理機能

カルパインが細胞内で重要な働きをしていることは、以下の報告から推測できる。m-カルパイン大サブユニット遺伝子 (*Capn2*) およびカルパイン小サブユニット遺伝子 (*Capn4*) の欠損マウスが胚性致死となること [21, 22]、ヒト p94 (カルパイン 3a) 遺伝子 (CAPN3) 変異が肢帯型筋ジストロフィー-2A 型を引き起こすこと [23]、ヒトカルパイン 10 遺伝子 (CAPN10) 多型が 2 型糖尿病発症に関与すること [24]などが知られている。また、カルパインの活性を抑制すると分化に異常をきたす [25]。カルパインの機能不全が病態と密接に関係していることは、疑いの余地がない。

カルパインは細胞遊走 (基質: 細胞骨格タンパク質等)、シグナルトランスダクション (基質: プロテインキナーゼ C 等)、アポトーシス (基質: カスパーゼファミリー等)、遺伝子発現 (基質: p53 等) および細胞周期 (基質: サイクリン D1 等) など種々の細胞機能を調節している [11]。

(3) カルパインの活性制御機構

カルパインの活性制御機構は、未だ不明な点が多い。通常、活性ドメインであるドメイン II が開裂した不活性状態で存在するが、そのドメインへの 2 分子の Ca^{2+} の結合により構造を変化させ、活性中心を形成して活性化する [26-28]。 Ca^{2+} はドメイン II 以外にも、ドメイン IV と VI の EF ハンドモチーフや、C2 ドメインに似た構造をとるドメイン III にも結合する。 Ca^{2+} が結合すると考えられる部位が複数存在することから、カルパインへの Ca^{2+} の結合は単に活性のオン/オフのみを決定するのではなく、各部位に Ca^{2+} が結合することで多種多様な機能を発揮し、基質特異性や局在部位をコントロールしているという仮説が提唱されている。

カルパイン活性化に関して、カルパイン大サブユニットの N 末端領域の自己消化およびリン酸化、リン脂質との結合、カルパイン小サブユニットとの解離などにより Ca^{2+}

要求性が低下すると提唱されている [11, 12]。また、アシル CoA 結合タンパク質などの活性化因子が存在し、カルパインに直接作用して Ca^{2+} 要求性を低下させることが報告されている [29]。

以上のことから、細胞内でのカルパイン活性の制御機構は、複雑かつ厳密であると考えられる。

3. カルパスタチン

カルパイン活性抑制因子としては、唯一の内在性阻害タンパク質であるカルパスタチンが挙げられる [30, 31]。カルパスタチンの細胞内存在量により、カルパイン活性が制御されているといった報告もある [32, 33]。カルパスタチンは、N 末端側の塩基性アミノ酸残基の豊富な「L ドメイン」と C 末端側の酸性アミノ酸残基の豊富な「カルパイン阻害ドメイン」の 4 つの繰り返しから構成されている (図 1-2)。L ドメインは L 型カルシウムチャネル制御に関与し、生体膜への局在に必要な配列があるとされるが、詳細な機能は明らかにされていない。カルパイン阻害ドメインは、さらに 4 つの A、B、C 領域に細分され、B 領域がカルパインの活性ドメイン近傍で阻害中心として働く。A 領域と C 領域はカルシウム依存的にカルパイン大および小サブユニットの EF ハンド領域 (ドメイン IV、VI) に相互作用することで B 領域での阻害活性を高める。

表 1-1

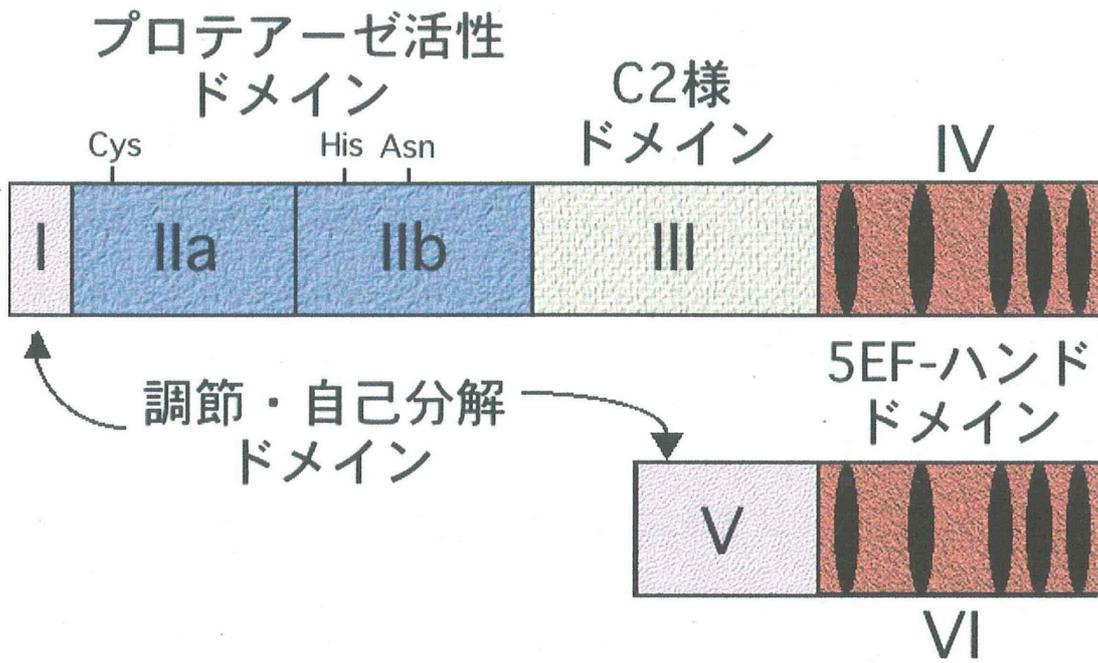
— 普遍的カルパイン —	
<u>タンパク質名</u>	<u>遺伝子名</u>
カルパイン制御サブユニット: 30k-1, 30k-2	(CAPNS1,2)
μ-カルパイン活性サブユニット: μCL	(CAPN1)
m-カルパイン活性サブユニット: mCL	(CAPN2)
カルパイン13,14	(CAPN13,14)
カルパイン5	(CAPN5)
hTRA-3	(CAPN7)
カルパイン10	(CAPN10)
— 組織特異的カルパイン —	
p94	(CAPN3)
nCL-2, nCL-4	(CAPN8,9)
カルパイン11,12	(CAPN11,12)
カルパイン6	(CAPN6)

図 1-2



例) ヒト肝臓カルパスタチン: 75.5 kDa

図 1-1



第2章

ミトコンドリア μ -カルパインの精製とその性質

第1節 緒言

本研究を開始した当時、カルパインは細胞質のみに局在すると広く考えられていた。カルパインファミリーの中でも、最も研究が進んでいる μ -および m-カルパインが網膜細胞の細胞質画分から精製されたことから、そのことが伺える。しかしながら、第1章で述べたように、遠藤らの報告からミトコンドリア内にカルパイン様プロテアーゼが存在し、それが虚血・低酸素下で活性化し mAAT を切断することにより、mAAT 活性を減少させることが示唆された [3]。さらに他のいくつかの研究グループにおいても、ミトコンドリアにカルパイン様の活性が存在すると報告されていた [7-10]。

そこでミトコンドリアに特異的に局在するカルパイン分子を精製し、その分子が 14 種類ある既知のカルパイン分子のどれに相当するのか、または新規なカルパイン分子であるかを同定することを目的とした。さらにその性質を明らかにしようと試みた。

具体的には、ミトコンドリアにおけるカルパイン活性の分布を調べ、種々のカラムクロマトグラフィーによりミトコンドリアカルパインと細胞質 μ -および m-カルパインを精製し、それらの性質を比較した。またミトコンドリアカルパインの組織分布とミトコンドリア分布も調べた。研究をさらに掘り下げ、ミトコンドリアカルパインが何を基質として機能しているかを検証した。

第2節 実験材料および方法

試薬は記載がない限り和光純薬（株）またはシグマ社の試薬特級を使用した。

(1) ブタ肝臓の細胞分画

全ての実験操作を 0-4°Cで行った。新鮮なブタの肝臓をホモジェナイジングバッファーで洗い、血液を抜いた。肝臓にその湿重量 (g) の5倍容のホモジェナイジングバッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、0.25 M sucrose、5 mM 2-mercaptoethanol] を加え、ハサミを用いて肝臓を裁断し、ガラステフロンホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。核画分、ミトコンドリア画分、リソソーム画分、ミクロソーム画分は、各々600 x g で5分間、4,500 x g で10分間、20,000 x g で20分間、100,000 x g で60分間の遠心分離により得た。各画分は、0.14 M NaCl を含んだホモジェナイジングバッファーで懸濁しホモジェナイズした後、同じ条件で遠心分離を行い、上清を取り除き、他の画分からのコンタミネーションを防いだ。3回洗い終わった各画分は、バッファーA [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、5 mM 2-mercaptoethanol] で再懸濁した。また、100,000 x g で60分間の遠心分離した上清を100倍容のバッファーAによって一晩透析し、細胞質画分とした。

(2) ミトコンドリアの単離と分画

ミトコンドリアの単離と分画は、Parson らの方法 [34] に従って行なった。記載がない限り、全ての実験操作を 0-4°Cで行った。遠心分離によって得られたミトコンドリア画分を 10,000 x g で10分間遠心分離し、その沈殿を2倍容の0.2 mg/mLの牛血清アルブミンを含んだ 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁した。この低張条件下で1時間静置し、ミトコンドリアを膨潤させた後、その懸濁液を 3,000 x g で10分間遠

心分離した。その上清には外膜と膜間スペースが含まれ、沈殿にはミトプラスト（内膜とその中身であるマトリクス）が含まれる。上清を 105,000 x g で 30 分間遠心分離し、外膜（沈殿）と膜間スペース（上清）に分離した。沈殿をバッファーA で懸濁し、超音波処理し内膜を断片化しマトリクス成分を可溶化し、77,000 x g で 60 分間遠心分離し、内膜（沈殿）とマトリクス（上清）に分離した。外膜と内膜はそれぞれバッファーA で懸濁し、膜間スペースは 100 倍容のバッファーA を用いて一晚透析した。

ミトコンドリア各画分の精製度は、各画分に対する特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により確認した。細胞質のマーカーとしてグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、外膜のマーカーとして電位依存性陰イオンチャンネル (VDAC) 抗体 (Calbiochem)、内膜のマーカーとしてアポトーシス誘導因子 (AIF) 抗体 (Abcam)、マトリクスのマーカーとしてピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 抗体 (Molecular Probes) を用いた。ウエスタンブロット解析の結果、高純度の画分が採取できていることが確認された。

(3) カルパイン活性測定

カルパインの酵素活性は、Succinyl-Leu-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (Succ-Leu-Tyr - AMC; BACHEM) を基質として測定した [35]。Succ-Leu-Tyr-AMC はカルパインによって特異的に切断され、蛍光物質を形成する。各サンプル 50 μ L (100 μ g タンパク質) を 450 μ L の基質溶液 [100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM 2-mercaptoethanol、100 mM KCl、5 mM CaCl₂、20 μ M Succ-Leu-Tyr-AMC] に加え、25°C で 20 分間インキュベートする。その後、500 μ L の 100 mM EDTA を加え、80°C で 3 分間煮沸し酵素反応を停止する。室温で 30 分間静置させ、10,000 x g で 5 分間遠心分離し、その上清の蛍光強度を蛍光光度計 (日立) で測定する (励起波長: 380 nm; 蛍光波長: 460 nm)。カルパイン活性は 1 分間あたりに増加する蛍光値として定義する。カラムクロマトグラフィーにより溶出さ

れた各画分においても同様の活性測定法を用い、カルパイン活性を測定した。

(4) タンパク質の定量

タンパク質の定量は、Bradford 法に従って行なった [36]。試料 2 μL に Bradford 染色液 (Bio-Rad) 798 μL を加え攪拌し、室温で 15 分間静置した。その後 $\text{OD}_{595\text{ nm}}$ の吸光度を測定した。タンパク質の標準曲線は、牛血清アルブミン (BSA) を用いて作成した。

(5) カラムクロマトグラフィー

細胞質 μ -カルパインおよび m-カルパイン、ミトコンドリアカルパインを精製するため、異なる 3 つのカラムクロマトグラフィーを行なった。用いたカラムは、DEAE-Sepharose CL-6B、Sephacryl S-300、Sepharose 6B カラム (Amersham Pharmacia Biotech) である。記載がない限り、全ての実験操作を 0-4°C で行った。

細胞質 μ -カルパインおよび m-カルパインは、吉村らの方法 [13] に従って、ブタ肝臓細胞質画分から精製した。細胞質画分をスターラーで攪拌しながら、粉末硫酸 (60% 飽和; 1 mL に対して 0.39 g) を徐々に添加し、完全に溶解させ、1 時間静置した。20,000 x g で 30 分間遠心分離し、沈殿をバッファー B [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、5 mM 2-mercaptoethanol、50 mM NaCl] で懸濁した。その懸濁液をバッファー B で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム (26.4 x 700 mm) へ添加した。吸着したタンパク質は、NaCl 濃度勾配を 50-400 mM まで直線的に上げる溶出方法 (リニアグラジエント法) を用いて溶出した。その溶出には、2L のバッファーを用いた。

NaCl のリニアグラジエント法により吸着タンパク質を溶出した結果、2 つのカルパイン活性ピークが検出された。1 つ目のピークが 120 mM NaCl 付近で溶出され、2 つ目のピークが 250 mM NaCl 付近で溶出された。2 つのピークのカルパイン活性における Ca^{2+} 要求性を調べたところ、前半のピークが μ -カルパイン、後半のピークが m-カル

パインを含むフラクションであることが解った。

アミコン PM-10 膜 (Millipore) を用いて2つのピークを各々限外濾過濃縮し、バッファーC [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、1 mM EGTa、5 mM 2-mercaptoethanol、140 mM NaCl] で平衡化した Sephacryl S-300 カラム (19 x 1000 mm) へ添加した。カルパイン活性がみられたフラクションを集め、アミコン PM-10 膜を用い限外濾過濃縮した。濃縮したサンプルをバッファーC で平衡化した Sepharose 6B カラム (19 x 1000 mm) へ添加した。カルパイン活性がみられたフラクションを集め、アミコン PM-10 膜を用い約 4 mL まで限外濾過濃縮した。

ミトコンドリアカルパインも同様の精製方法を用いて、ブタ肝臓ミトコンドリア膜間スペース (IMS) より精製した。IMS をスターラーで攪拌しながら、粉末硫酸 (60%飽和; 1 mL に対して 0.39 g) を徐々に添加し、完全に溶解させ、1 時間静置した。20,000 x g で 30 分間遠心分離し、沈殿をバッファーB で懸濁した。その懸濁液をバッファーB で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム (26.4 x 700 mm) へ添加した。吸着したタンパク質は、NaCl 濃度勾配を 50-400 mM まで直線的に上げる溶出方法 (リニアグラジエント法) を用いて溶出した。その溶出には、2L のバッファーを用いた。

NaCl のリニアグラジエント法により吸着タンパク質を溶出した結果、150 mM NaCl 付近に1つのカルパイン活性ピークが検出された。

アミコン PM-10 膜 (Millipore) を用いて活性ピークを限外濾過濃縮し、バッファーC で平衡化した Sephacryl S-300 カラム (19 x 1000 mm) へ添加した。カルパイン活性がみられたフラクションを集め、アミコン PM-10 膜を用いて限外濾過濃縮した。濃縮したサンプルをバッファーC で平衡化した Sepharose 6B カラム (19 x 1000 mm) へ添加した。カルパイン活性がみられたフラクションを集め、アミコン PM-10 膜を用い約 4 mL まで限外濾過濃縮した。

ミトコンドリアカルパイン精製標品を、Laemmli らの方法 [37] に従って SDS-PAGE

にかけ、その精製度を確認した。電気泳動後、銀染色 MS キット (Wako) を用い、分離されたタンパク質を検出した。

(6) 銀染色法

電気泳動したゲルを 100 mL の固定液 1 (メタノール 50 mL、酢酸 5 mL、ミリ Q 水 45 mL) に浸し、20 分間振とうした。ゲルを 100 mL の固定液 2 (メタノール 50 mL、ミリ Q 水 50 mL) に浸し、10 分間振とうした。ゲルを 100 mL のミリ Q 水に浸し、10 分間振とうした。ゲルを 50 mL の増感液 (増感液 5 mL を脱イオン水 45 mL で希釈) に浸し、1 分間振とうした。ゲルを 100 mL のミリ Q 水に浸し 1 分間の振とうした。この操作を 2 回繰り返した。ゲルを 50 mL の染色液 (染色原液 5 mL を脱イオン水 45 mL で希釈) に浸し、20 分間振とう。ゲルを 100 mL のミリ Q 水に浸し、1 分間の振とうを 2 回繰り返した。ゲルを 50 mL の現像液 (現像粉末 0.5 g を脱イオン水 47.5 mL に溶解し、現像原液 2.5 mL を加える) に浸し、適当な染色増が得られるまで振とうした。適当な染色像が得られたら 5 mL の停止液を加え 1 分間振とうし、現像液を捨て、ゲルを 100 mL のミリ Q 水に浸し、10 分間の振とうを 5 回繰り返した。

(7) Ca²⁺による活性化、最適 pH、阻害剤の効果

μ -、m-カルパインおよびミトコンドリアカルパインの全ての活性測定を、Succ-Leu-Tyr-AMC を基質として行なった。試料として、塩析およびカラムクロマトグラフィーにより部分精製した μ -、m-カルパインおよびミトコンドリアカルパインを用いた。

種々のカルパイン阻害剤および他のプロテアーゼ阻害剤に対する μ -、m-カルパインおよびミトコンドリアカルパインの感受性を比較するため、前述した基質溶液に各々 1 μ M カルパインインヒビター-I、カルペプチン (Calbiochem)、ロイペプチン、キモスタチン、10 μ M ペプスタチン、O-フェナンスロリンを加えたものを用いた。活性測定は、

前述した通りに行なった。

μ -、 m -カルパインおよびミトコンドリアカルパインの活性化における Ca^{2+} 感受性を比較するため、 Ca^{2+} -EGTA バッファーシステム [8] を用いて測定した。各濃度の Ca^{2+} (終濃度 0~1000 nM) を含んだ基質溶液を用いた。カルパイン活性測定は、前述した方法に従って行なった。

μ -、 m -カルパインおよびミトコンドリアカルパインの活性化における最適 pH を比較するため、pH 6.0 から 8.8 までの異なった pH に調整した基質溶液を用いて、活性測定を行なった。活性測定は、前述した通り行なった。

(8) ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロッティングは、Towbin らの方法 [38] に従って行なった。SDS-PAGE 後のゲルを Blotting buffer (25 mM Tris、192 mM Glycine、20% Methanol) に浸し、5 分間振とうした。そのゲルをニトロセルロース膜に重ねウェスタンブロット装置 (マリソル) に設置し、18 V で 18 時間ブロッティングした。ブロッティングしたニトロセルロース膜を TW-PBS [10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、0.14 M NaCl、0.05% Tween 20] に浸し、5 分間振とうした。その後、Blocking buffer (0.5% BSA と 1% 正常ウサギまたは正常ヤギ血清を含む TW-PBS) に浸し、室温で 4 時間振とうした。各種一次抗体を Blocking buffer で適当に希釈し、一晩 4°C で静置した。ニトロセルロース膜を TW-PBS に浸し、室温で 10 分間振とう洗浄し、これを 3 回繰り返した。HRP (Horseradish peroxidase) 標識された二次抗体を Blocking buffer で希釈し、一晩 4°C で静置した。ニトロセルロース膜を TW-PBS に浸し、室温で 10 分間振とう洗浄し、これを 3 回繰り返した。免疫反応シグナルは、ECL または ECL Plus ウェスタンブロッティング検出キット (Amersham Biosciences) を用いて化学発光に変換し、免疫反応をルミノ・イメージ・アナライザ LAS-3000mini (Fujifilm) で検出した。

使用した抗体とその希釈倍率は、次の通りである。マウスモノクローナル抗 μ -カルパインドメイン III 抗体 (1: 5000; Alexis Biochemicals)、抗カルパイン小サブユニット抗体 (1: 4000; Chemicon International Inc.)、ヤギポリクローナル抗カルパスタチン抗体 (1: 4000; Santa Cruz Biotechnology Inc.)、ウサギポリクローナル抗 μ -カルパインドメイン IV 抗体 (1: 5000; Sigma Aldrich)、抗 m-カルパインドメイン III 抗体 (1:4000; Chemicon)、抗 AIF 抗体 (1: 5000)、抗 GAPDH 抗体 (1: 1000)、抗 VDAC 抗体 (1: 5000)、抗 PDH 抗体 (1: 5000)、HRP 標識ウサギ抗マウス IgG、ウサギ抗ヤギ IgG およびヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1: 5000; Dako)。

(9) カゼインザイモグラフィ

カゼインザイモグラフィは、Raser ら [39] と Arthur ら [40] の方法に従って行った。各試料 60 μ L を Sample buffer [0.1 M Tris-HCl (pH 6.8)、20%グリセロール、10 mM 2-mercaptoethanol、10 mM EDTA] で希釈し、10%ポリアクリルアミドゲル (1 mg/mL カゼインを含む) にアプライした。電気泳動は、4°C で 3 時間、125 V で行ない、泳動バッファーには 125 mM glycine、1 mM EDTA、10 mM 2-mercapthoethanol を含む 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いた。電気泳動後、ゲルは Ca^{2+} バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM 2-mercaptoethanol、20 mM CaCl_2] に浸し、室温で一晩振とうした。対照実験として Ca^{2+} を含まないバッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM 2-mercaptoethanol、5 mM EDTA、1 mM EGTA] を用いゲルに作用させた。その後、ゲルを CBB 染色液に浸し、室温で 30 分間振とうし、脱色液に移し、一晩室温で振とうした。カルパイン分子が存在しゲルに含まれたカゼインを切断すると、CBB に染まらず白色のバンドで検出される (バックは CBB に染まるため全体青く染まる)。

(10) 内在性ミトコンドリアカルパインによる AIF の限定分解

ブタ肝臓から単離したミトコンドリア画分を、1 mM CaCl_2 を含むバッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.25 M sucrose、5 mM 2-mercaptoethanol] で懸濁し、37°C で 5~120 分間の範囲で各時間インキュベートした。カルペプチンを終濃度 5 μM となるように添加し、反応を停止した。ミトコンドリア画分は、前述した方法に従って行った。AIF の限定分解とミトコンドリアカルパイン活性化を評価するため、各画分はウエスタンブロット解析に使用した (20 μg タンパク質/レーン)。

(11) 単離ミトコンドリアのトリプシン処理

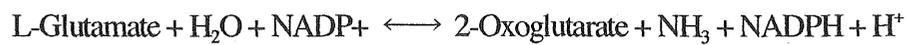
ミトコンドリア画分への細胞質画分の混入を排除するため、Matocha らの方法 [41] に従って、単離したミトコンドリアの外膜表面をトリプシン処理した。ブタ肝臓から単離したミトコンドリアをホモジェナイジングバッファーで懸濁し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TPCK-トリプシン (Worthington) を添加した。30 および 60 分間氷上で静置した後、大豆トリプシン阻害剤を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加し、トリプシン活性を停止させた。4°C、10,000 x g、10 分間遠心分離し、その沈殿を 0.14 M NaCl を含んだホモジェナイジングバッファーで懸濁しホモジェナイズした後、同じ条件で遠心分離を行い、上清を取り除いた。3回洗い終わったミトコンドリア画分は、さらに前述した通り、外膜、膜間スペース、内膜、マトリクスに分画し、ウエスタンブロット解析に用いた。

(12) グルタミン酸脱水素酵素の活性測定

ミトコンドリア各画分の精製度は、マトリクスに特異的に局在するグルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の活性を測定することにより評価した [42]。各サンプル 1 μL (8 μg) を 193 μL の基質溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2.5 mM EDTA、0.2 mM NADH、1 mM ADP、100 μM ammonium acetate、7 mM 2-oxoglutarate] に加え、25°C でインキュベートした。

下に示すこの反応の平衡は、グルタミン酸を形成する方に傾く。オキソグルタル酸と NH_4^+ を基質とし、酵素反応中の $\text{OD}_{340\text{ nm}}$ の吸光度を測定することで、その減少を GDH 活性と定義した。

測定した結果、GDH 活性の分布はマトリクスが 47.5%、内膜が 45.4%、膜間スペースが 4.5%、外膜が 2.6%であった。GDH 活性は主にマトリクスと内膜に局在していたことから、膜間スペース画分へのマトリクス画分混入の可能性は排除された。



第3節 実験結果

(1) ミトコンドリアにおけるカルパイン活性

ブタ肝臓におけるカルパイン活性の細胞内分布を調べた (図 2-1A)。細胞質画分に多くのカルパイン活性が存在したが、ミトコンドリア画分にも活性が存在した。遠藤らの報告 [3] には、正常ラット網膜におけるカルパイン活性の細胞内分布が示されていたが、その結果とおおよそ一致していた。ミトコンドリア内でのカルパイン活性の分布をさらに詳しく調べた (図 2-1B)。その結果、膜間スペースで非常に多くのカルパイン活性がみられ、マトリクス画分においても活性があった。

(2) 細胞質 μ -、m-カルパインおよびミトコンドリアカルパインの精製

ミトコンドリアカルパインの性質を、既知の細胞質 μ -およびm-カルパインと比較するため、まず各酵素を種々のカラムクロマトグラフィーにより部分精製した (図 2-2)。ブタ肝臓細胞質画分を DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーにかけ、細胞質 μ -およびm-カルパインを分離した (図 2-2A)。NaCl 濃度をリニアグラジエント法で上げたところ、 μ -カルパインは 120 mM NaCl で溶出され、m-カルパインは 250 mM NaCl で溶出された。各ピークを Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィーにかけさらに精製を行った (図 2-2B; μ -カルパイン、2C; m-カルパイン)。共にカルパイン活性のある単一ピークがみられたので、それを集め、Sepharose 6B カラムクロマトグラフィーにかけ精製を行った。

ミトコンドリアカルパインも同様の方法で精製を行った。ブタ肝臓から単離した膜間スペースを DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーにかけ、リニアグラジエント法で NaCl 濃度を上げてタンパク質を溶出した (図 2-2D)。その結果、150 mM NaCl にカルパイン活性のピークが 1 つみられた。この溶出位置は、細胞質 μ -およびm-カルパイン

ンの溶出位置と異なっていた。この活性ピークを次に Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィーにかけた (図 2-2E)。カルパイン活性のある 1 つのピークがみられたので、それを集め、Sepharose 6B カラムクロマトグラフィーにかけ精製を行った。精製度 27 倍のミトコンドリアカルパイン精製標品を得た。

(3) ミトコンドリアカルパインの精製度とウエスタンブロット解析

ミトコンドリアカルパインの精製度を確かめるため、SDS-PAGE および銀染色を行った (図 2-3A)。何種類かのタンパク質が混在していたが、カルパイン大サブユニットに相当する 75~80 kDa バンド、およびカルパイン小サブユニットに相当する 26~30 kDa バンドが観察された。細胞質 μ -カルパインおよびミトコンドリアカルパインの部分精製標品を、 μ -カルパイン大サブユニット (ドメイン III) 抗体を用いてウエスタンブロット解析したところ、両分子とも反応した (図 2-3B)。両者の分子量は若干異なり、細胞質 μ -カルパインが約 78 kDa でミトコンドリアカルパインが約 75 kDa であった。一方、ミトコンドリアカルパインはモノクローナル抗 m-カルパイン抗体には反応しなかった (図 2-3C)。細胞質 μ -、m-カルパインおよびミトコンドリアカルパインの精製標品を、カルパイン小サブユニット抗体を用いてウエスタンブロット解析した (図 2-3D)。細胞質 μ -および m-カルパインは約 30 kDa 小サブユニットとヘテロ 2 量体を形成しているのに対し、ミトコンドリアカルパインは約 26 kDa 小サブユニットとヘテロ 2 量体を形成していることが示唆された。

(4) ミトコンドリア画分の純度

細胞質 μ -カルパインがミトコンドリア外膜に結合していないことを確かめるため、単離したミトコンドリアをホモジェナイジングバッファー、0.14 M NaCl を含むホモジェナイジングバッファー、0.01% Triton X-100 を含むホモジェナイジングバッファーで 3

回洗った。ウエスタンブロット解析によって、前述のように外膜を処理したミトコンドリア画分においても μ -カルパイン大サブユニットおよびカルパイン小サブユニットを示すバンドが検出された。

また単離したミトコンドリアをトリプシン処理した場合でも、ミトコンドリア画分で μ -カルパイン大サブユニットおよびカルパイン小サブユニットが存在していることが、ウエスタンブロット解析より示された。従って、細胞質 μ -カルパインがミトコンドリア外膜に結合するなどして、ミトコンドリア画分に混入している可能性は低いと考えられた。

さらに、ミトコンドリア μ -カルパイン大および小サブユニットの分子量が、細胞質 μ -カルパインのものとわずかに異なっていた (図 2-3) ことから、ミトコンドリア画分への細胞質画分混入の可能性は非常に低い。従って、ミトコンドリアには細胞質 μ -カルパインとは異なる μ -カルパインが特異的に局在していることが示唆された。

(5) 細胞質 μ -、m-およびミトコンドリア μ -カルパインの酵素学的性質の比較

部分精製したミトコンドリア μ -カルパインの酵素学的性質 (種々のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性、活性化における最適 pH および Ca^{2+} 要求性) を、細胞質 μ -および m-カルパインのそれと比較した。

まず 3 種プロテアーゼの酵素活性に及ぼすプロテアーゼ阻害剤の効果を検討した (図 2-4A)。カルパインインヒビター I、カルペプチン (カルパイン阻害剤)、ロイペプチン (システインプロテアーゼ阻害剤) に対する細胞質 μ -、m-およびミトコンドリア μ -カルパインの感受性は、ほとんど違いがなかった。一方、ミトコンドリア μ -カルパインは、細胞質 μ -および m-カルパインよりも、キモスタチン (セリンプロテアーゼ阻害剤) に対する感受性が高かった。細胞質 μ -、m-およびミトコンドリア μ -カルパイン共に、ペプスタチン (酸性プロテアーゼ阻害剤) および *o*-フェナンスロリン (メタロプロテアー

ゼ阻害剤) によって阻害されなかった。

細胞質 μ -、m-およびミトコンドリア μ -カルパインの活性化における最適 pH は、各々 7.6、7.8、7.2 であった (図 2-4B)。

細胞質 μ -およびミトコンドリア μ -カルパインの活性化における Ca^{2+} 要求性は、ほとんど変わりがなく、細胞質 m-カルパインとは異なり低 Ca^{2+} 濃度で活性化することが解った (図 2-4C)。

(6) 細胞質およびミトコンドリア画分でのカゼインザイモグラフィとウエスタンブロット解析

カゼインザイモグラフィは、カルパイン活性を評価するために一般的に用いられている手法で、ゲル内でカルパインを活性化させ、ゲルに含まれているカゼインを切断させる。切断されたカゼインは CBB で染色されないので、カルパインが存在してカゼインを切断した箇所は、白く色が抜けて観察される。ゲル電気泳動の移動度の違いにより、活性だけでなくカルパイン分子種の違いも判別できる。

この手法を用いて、ブタ肝臓から単離した細胞質およびミトコンドリア画分におけるカルパイン活性と、そこに存在するカルパイン分子の種類について調べた (図 2-5A)。細胞質画分では、2本の活性バンドが観察された。移動度が小さい上方のバンドは μ -カルパインを示し、移動度が大きい下方のバンドはm-カルパインを示す。 μ -カルパインが多く含まれる赤血球を μ -カルパインの陽性対照として用いたが、細胞質 μ -カルパインと同じ移動度であることが確認できた。膜間スペース (IMS) では2本の活性バンド、マトリクス (Matrix) では1本の活性バンドが検出された。IMS で見られた移動度が小さい上方の活性バンドと、マトリクスで見られた活性バンドは、移動度が一致していた。いずれにせよ、膜間スペースおよびマトリクスで検出された活性バンドの移動度が、細胞質 μ -およびm-カルパインとは異なることから、それらは細胞質と同じカルパイン分

子ではないことが示唆された。ミトコンドリア外膜および内膜では、カルパイン活性バンドが検出されなかった。

カゼインザイモグラフィーにおける膜間スペースおよびマトリクスの活性バンドが、カルパイン分子によるものかどうか確かめるため、カルパイン阻害剤であるカルペプチンで前処理し、カゼインザイモグラフィーを行なった (図2-5B)。その結果、膜間スペースでみられた2本の活性バンドとマトリクスでみられた1本の活性バンドが、カルペプチン存在下で消失した。このことから、ミトコンドリア画分に存在する活性バンドは、カルパイン分子によるものだと示唆された。また予備実験により、細胞質 μ -、m-およびミトコンドリアカルパインの活性バンドが Ca^{2+} 非存在下で消失することから、それらは Ca^{2+} 依存的に活性化することも解った。カゼインザイモグラフィーを用いた以上の実験から、ミトコンドリア膜間スペースに存在する2種のプロテアーゼとマトリクスに存在する1種のプロテアーゼは、カルパイン分子であることが解った。

ミトコンドリア画分に存在するカルパイン分子が、既知のどのカルパイン分子に相当するのか調べた。カゼインザイモグラフィーで得られた活性バンドを切り出し、SDS-PAGE 展開し、 μ -カルパインドメイン III、IV、m-カルパインドメイン III、カルパイン小サブユニットおよびカルパイン 10 に対する各抗体を用いウエスタンブロット解析を行なった (図2-5C)。細胞質 μ -カルパイン (バンド No, 1) と移動度の小さいミトコンドリアカルパイン (バンド No, 3 および 5) は、 μ -カルパインドメイン III、IV 抗体に各々染まった。しかし2種のミトコンドリアカルパインは、m-カルパイン (ドメイン III) 抗体でもカルパイン 10 (ドメイン T) 抗体でも染まらなかった。細胞質 μ -、m-および2種のミトコンドリアカルパインは、カルパイン小サブユニットを有していた。以上の結果から、2種のミトコンドリアカルパインは Ca^{2+} 依存的に活性化され、カルペプチンにより阻害され、細胞質 μ -およびm-カルパインと移動度が異なるカルパイン分子であることが解った。

部分精製したミトコンドリア μ -カルパインと膜間スペースで検出された移動度の小さいカルパイン分子（バンドNo,3）は、同じ分子であると考えられた。一方、膜間スペースで検出された移動度の大きいカルパイン分子は、 μ -、m-カルパインおよびカルパイン10とは異なる未知のカルパイン分子であると考えられた。この未知のカルパイン分子に関しては、第4章で詳しく述べる。

(7) ミトコンドリア μ -カルパインのミトコンドリア分布と組織分布

ミトコンドリア μ -カルパインのミトコンドリア分布と組織分布、さらにカルパイン内在性阻害剤であるカルパスタチンのミトコンドリア分布を調べた（図2-6）。ブタ肝臓から単離した細胞質画分およびミトコンドリア各画分において、 μ -カルパイン（ドメインIII）抗体およびカルパイン小サブユニット抗体を用い、ウエスタンブロット解析を行なった（図2-6A）。 μ -カルパイン（ドメインIII）抗体を用いたウエスタンブロット解析では、細胞質、膜間スペースおよびマトリクス画分において、約78および80 kDaに2本のバンドが検出されたが、外膜および内膜では約80 kDaバンドのみが検出された。カルパイン小サブユニットを用いたウエスタンブロット解析では、細胞質画分で約28および30 kDaに、外膜および内膜では約30 kDaに、膜間スペースおよびマトリクスでは約26 kDaに各々バンドが検出された。このことからミトコンドリア μ -カルパイン大および小サブユニットの分子形が、細胞質 μ -カルパインと異なり、さらにミトコンドリア内においても異なっていることが示された。

興味深いことに、ミトコンドリア各画分においてカルパスタチン抗体に反応する分子が見られなかった（図2-6B）。この結果から、カルパインの内在性阻害剤であるカルパスタチンは、ミトコンドリア各画分に存在しないことが示された。

ミトコンドリア μ -カルパインの組織分布を調べるため、ブタの各組織からミトコンドリアを単離し、ウエスタンブロット解析を行なった（図2-6C）。脾臓以外の各組織（脳：

Brain、心臓：Heart、腎臓：Kidney、脾臓：Spleen、肝臓：Liver、胸腺：Thymus、肺：Lung、胃：Stomach、網膜：Retina) のミトコンドリアにおいて、ミトコンドリア μ -カルパイン大および小サブユニットが局在していることが解った。また、その分子形も組織によって異なっていることが解った。

(8) ミトコンドリアカルパインによる AIF の限定分解と遊離

ミトコンドリアに存在するアポトーシス誘導因子 (AIF; apoptosis-inducing factor) の限定分解に、ミトコンドリアカルパインが関与しているか確かめるため、単離したミトコンドリアにおいてミトコンドリアカルパインを活性化させ、それに伴って AIF が限定分解されるのかをウエスタンブロット解析により確かめた (図 2-7)。ミトコンドリア内膜において、62 kDa の完全長 AIF が検出された (図 2-7A)。単離したミトコンドリアに 1 mM Ca^{2+} を作用させ、37°C で 0~120 分間インキュベーションし、その後ミトコンドリア各画分に分離した。膜間スペースでは、時間依存的に 57 kDa 切断型 AIF (tAIF; truncated AIF) が増加しているのが確認された (図 2-7B)。カルペプチン存在下では、限定分解に伴う tAIF の膜間スペースへの遊離は完全に阻害された。内膜においては、AIF は顕著には減少していなかった。この結果から、ミトコンドリアカルパインにより限定分解され、内膜に遊離する tAIF の量は、AIF に存在する完全長 AIF の量のほんの一部であると示唆された。完全長 AIF と tAIF の分子量が異なっていることを証明するため、単離したミトコンドリアを Ca^{2+} 存在下で 120 分間インキュベートした時の膜間スペースと内膜を混ぜてウエスタンブロット解析を行なった (図 2-7C)。その結果、膜間スペースと内膜を混ぜたレーン (IM+IMS) では、完全長 AIF と tAIF が分離され 2 本のバンドが検出された。従って、これらの分子量は明らかに異なることが示された。

次に、AIF 切断が観察される条件と同じ条件でミトコンドリア μ -カルパインの活性化が起こっているのか、ウエスタンブロット解析により確認した (図 2-7D)。カルパイン

の特徴の1つに自己分解がある。カルパインは活性化に伴って、ドメイン I の N 末端が自己消化を受け若干分子量が小さくなり、これにより Ca^{2+} 感受性が亢進する[18]。この自己分解産物がウェスタンブロット解析により観察されることにより、カルパインが活性化したという指標になる。膜間スペースにおいてミトコンドリア μ -カルパインは、 Ca^{2+} インキュベーション5分後に、すでに約80 kDa から約78 kDa 自己分解型に変化していた。カルパイン小サブユニットも Ca^{2+} インキュベーション5分後に、約30 kDa から約28 kDa および約26 kDa の自己分解型に変化していた。カルペプチン存在下では、このミトコンドリア μ -カルパインの自己分解が完全に阻害された。これらの結果から、ミトコンドリアへの Ca^{2+} の流入に伴い、膜間スペースに局在するミトコンドリア μ -カルパインが活性化され（それに伴い自己分解が起こり）、内膜に結合している AIF を限定分解し tAIF を内膜に遊離させたことが示唆された。内膜ではカルパイン活性が非常に低い（図 2-1）ので、内膜に局在するミトコンドリアカルパインにより AIF が切断されたというよりも、膜間スペースに存在するミトコンドリアカルパインが AIF の限定分解に大きく関与していることが示唆される。

第4節 考察

本章では、細胞質 μ -、m-およびミトコンドリアカルパインの性質を比較し、その共通点および相違点について詳しく調べた。単離ミトコンドリアにおいてカルパイン様の活性が存在するという実験結果が報告されていたが [7-10]、ミトコンドリアに局在するカルパインは同定されておらず、さらにその性質も全く調べられていなかった。一般的にカルパインは細胞質のみに局在する酵素であると広く考えられてきたが、本研究によってミトコンドリアにもカルパインが存在することが明確に示された。

ミトコンドリアカルパインは、膜間スペースに多く存在すること (図2-1B)、 μ -カルパインドメインIIIおよびIV抗体に染まること (図2-2B、-5C)、カルパイン阻害剤であるカルペプチンで阻害されること (図2-4A、-5B) 活性化における Ca^{2+} 要求性が細胞質 μ -カルパインと等しいこと (図2-4C) など、種々の性質が明らかとなった。一方で、ミトコンドリア μ -カルパインと細胞質 μ -カルパインは、いくつか異なった性質を有しているという重要な知見を得た。ミトコンドリア μ -カルパインは細胞質 μ -カルパインと比較し、最適pHが低く (図2-4B)、キモスタチンに対し感受性が高く (図2-4A)、ザイモグラフィーにおいて移動度が大きい (図2-5A) といった違いがあった。このことから、ミトコンドリア μ -カルパインと細胞質 μ -カルパインは全く同じ分子ではないと考えられる。

カゼインザイモグラフィーにより、ミトコンドリアには少なくとも2種のカルパイン分子が存在することが示された (図2-5)。ミトコンドリア μ -カルパインを示す活性バンドは、細胞質 μ -カルパインよりも移動度が大きく、m-カルパインよりも移動度が小さかった。3種プロテアーゼの活性バンドの移動度は、DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーでの溶出位置 (図2-2A、2D) と一致している。ミトコンドリアカルパインが 150 mM NaCl 時に溶出されたのに対し、細胞質 μ -カルパインは 120 mM NaCl 時に、

細胞質 m-カルパインは 250 mM NaCl 時に溶出された。この結果から、ミトコンドリア μ -カルパインは細胞質 μ -カルパインよりも負に荷電し（電荷が小さい）、m-カルパインよりも正に荷電している（電荷が大きい）ことが考えられる。また、ミトコンドリア μ -カルパインにはシャペロン分子など未知の制御因子が結合していることが示唆される。

ミトコンドリアには、ミトコンドリア μ -カルパイン以外のカルパイン分子が局在するという重要な実験結果を得た（図 2-5）。その未知なカルパイン分子は、 Ca^{2+} 依存的に活性化され、カルペプチンにより阻害され、カルパイン小サブユニットを有しているなどカルパインの特徴を有している。しかしながら、 μ -、m-カルパインおよびカルパイン 10 に対する各抗体に反応せず（図 2-5C）、カゼインゼイモグラフィーにおいて細胞質 μ -および m-カルパインと移動度が異なる（図 2-5A）ことから、 μ -、m-カルパインおよびカルパイン 10 以外の既知のカルパイン分子、または新規カルパイン分子であると考えられる。ミトコンドリア μ -カルパインは AIF の限定分解を介してアポトーシス経路を制御するという重要な機能をもつ（図 2-7）ことから、新規ミトコンドリアカルパインを同定し、その機能を解析することは、今後の重要な研究課題と言える。

カルパインの内在性阻害剤であるカルパスタチンがミトコンドリアに局在しない（図 2-6B）ということも、重要な知見である。細胞質において、カルパスタチンはカルパインと結合、解離を繰り返し、その活性を厳密に制御している。カルパスタチンがミトコンドリアに局在しないことから、細胞質とミトコンドリアにおけるカルパイン活性の制御機構は、全く異なっていると考えられる。ミトコンドリアにはカルパスタチンに代わる抑制因子が存在し、カルパイン活性を制御している可能性が考えられる。または、ミトコンドリアカルパイン特異的な活性化因子が存在し、通常ほとんど不活性状態のミトコンドリアカルパインに作用して活性化される、といった機構が存在することも考えられる。ミトコンドリアが Ca^{2+} の保存場所であるという説を考慮すると、カルパインの抑制因子がミトコンドリアに存在しない場合、高 Ca^{2+} 濃度に保たれているミトコンド

リアでは常にカルパインが活性化することが想定できる。ミトコンドリアカルパイン分子と Ca^{2+} 濃度変化のみでは、厳密にカルパイン活性が制御されているとは思えない。従って、ミトコンドリアにおいてカルパイン抑制因子および活性化因子を探索することは、生体内でミトコンドリアカルパイン活性がどのようにコントロールされているかの解明に繋がる。特に細胞死におけるミトコンドリアカルパインの寄与を解明するにあたり、重要な鍵と言える。

先に述べた活性制御因子や活性化因子の他に、ミトコンドリア外膜および内膜が、ミトコンドリアカルパイン活性の制御に関与しているのではないかと思われる。ウエスタンブロット解析により、ミトコンドリア外膜、膜間スペース、内膜、マトリクス全ての画分に、ミトコンドリア μ -カルパインが局在していることが示された (図 2-6A)。しかし外膜および内膜では、ほとんどカルパイン活性が存在しない (図 2-1B、-5)。単離ミトコンドリアへ Ca^{2+} を作用させると、膜間スペースに局在するミトコンドリア μ -カルパインは活性化され自己分解を起こすが、内膜結合型ミトコンドリア μ -カルパインは自己分解を起こさない (図 2-7D)。この結果から、ミトコンドリア μ -カルパインは膜と結合することで、 Ca^{2+} 濃度の上昇に関わらず不活性状態に保たれること、またはミトコンドリア μ -カルパインの抑制因子が膜に存在することなどが考えられる。ミトコンドリア膜の膨潤や膜電位低下に伴う膜透過性の亢進などにより、ミトコンドリア機能が障害された時に、膜からミトコンドリア μ -カルパインが遊離してカルパイン活性を増大させることも考えられる。例えば近年、細胞膜、小胞体 (ER)、ゴルジ体、多胞性エンドソームなどの細胞内膜系におけるカルパインの局在、および膜輸送系 (membrane trafficking) 関連因子とカルパインとの相互作用が明らかになってきた [43, 44]。このように細胞内膜系を介したカルパインの新たな機能が見出されてきており、ミトコンドリア膜とカルパインの相互作用についても、重要な生理機能が隠されていると思われる。

遠藤らの報告により、ラット網膜を 90 分間虚血または低酸素状態におくと、mAAT

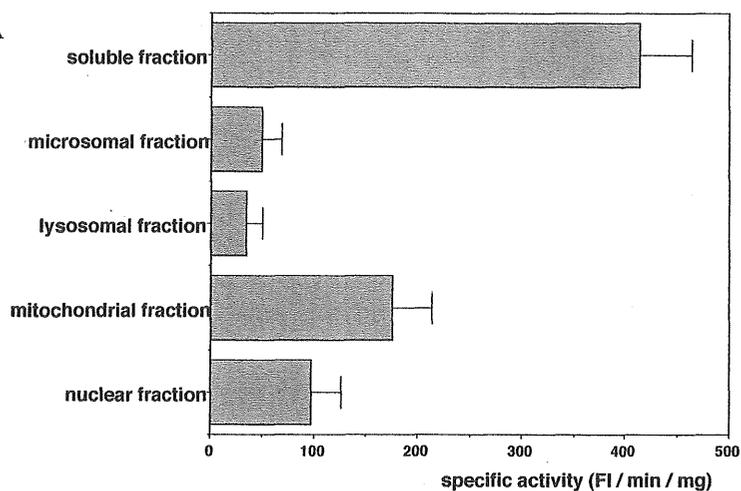
活性が20%減少し、ミトコンドリアにおけるカルパイン活性が2.5倍上昇することが示された [3]。虚血状態のミトコンドリアでは、 Ca^{2+} が蓄積するという報告もある [45-47]。本研究において、マトリクスでは膜間スペースに比べカルパイン活性が比較的強く保たれていた (図2-1B)。このため90分間の虚血・低酸素状態で、mAAT活性が20%しか減少しなかったと考えられる。

本研究で、ミトコンドリアカルパインの基質分子の1つがAIFだということが明らかになった (図2-7)。AIFはミトコンドリアを介したアポトーシスにおいて主要な機能を有するタンパク質であり [48]、それを限定分解するミトコンドリアカルパインが如何に重要な存在であるかを認識できる。AIFは通常内膜に結合しており、ミトコンドリア内在性プロテアーゼで切断されることにより、細胞質へ遊離し、その後核へ移行し、DNAaseを活性化することでDNAの切断を誘導する [49-51]。Polsterらは、tBidがBaxやBakと共役してミトコンドリア外膜にチャンネルを形成し、そのチャンネルをtAIFが通り細胞質へ遊離すると示唆している [52]。さらに彼らは、肝臓および脳から単離したミトコンドリアで、カルパイン活性があることを確認しているが、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴い細胞質からミトコンドリアへ μ -カルパインが移行し、AIFの限定分解を促進する可能性を説いている。内在性ミトコンドリアカルパインのみでもAIFを限定分解しうるということが、本研究における重要な知見である。もちろん、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴い細胞質 μ -カルパインがミトコンドリアへ移行する可能性を否定している訳ではない。虚血/低酸素下ラット網膜でのミトコンドリアカルパイン活性の上昇は、細胞質 μ -カルパインが虚血・低酸素下でミトコンドリアへ移行したことを示唆しているのかもしれない。

本章を要約すると、細胞質 μ -カルパインとは少し性質の異なる μ -カルパインがミトコンドリアに存在していること、それは生理的条件下で組織普遍的にミトコンドリアに局在すること、AIFを限定分解することでミトコンドリアを介したアポトーシスシグナル

を制御していることなどを明らかにした。

図 2-1 A



B

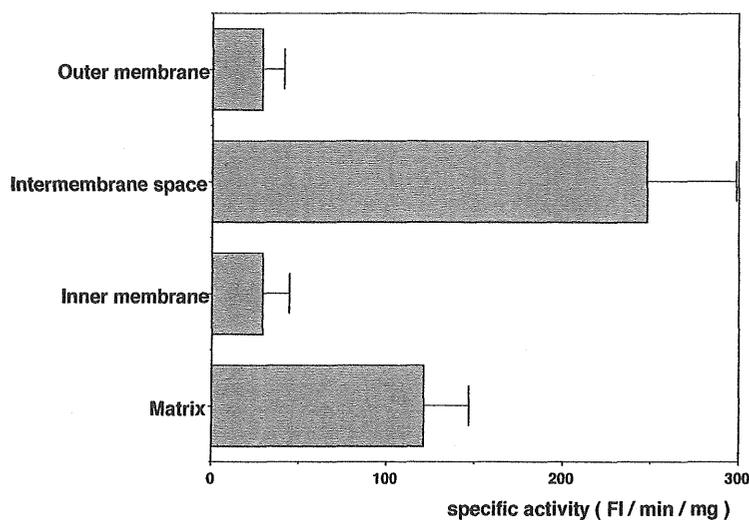


図 2-1. ブタ肝臓におけるカルパイン活性の細胞内分布

(A) 大部分のカルパイン活性は細胞質 (soluble fraction) に存在するが、他の細胞小器官に比べミトコンドリア (mitochondrial fraction) では、比較的カルパイン活性が高い。ブタ肝臓粗画分における全カルパイン活性は、 790 ± 40 (平均値 \pm 標準偏差、検体数=5) FI/min/mg である。

(B) カルパイン活性のミトコンドリア内分布を、外膜 (Outer membrane)、膜間スペース (Intermembrane space)、内膜 (Inner membrane)、マトリクス (Matrix) に分離し評価した。多くのカルパイン活性が膜間スペースに存在し、マトリクスにも活性がみられた。

図 2-2

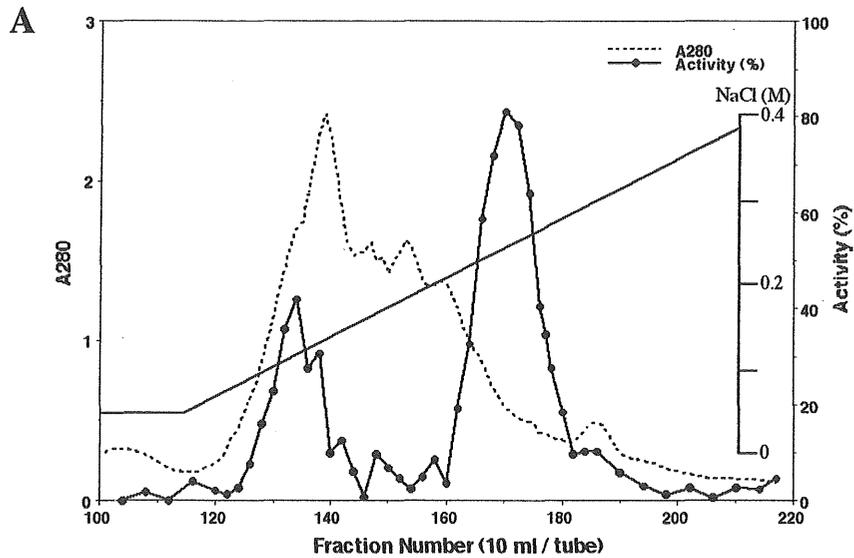
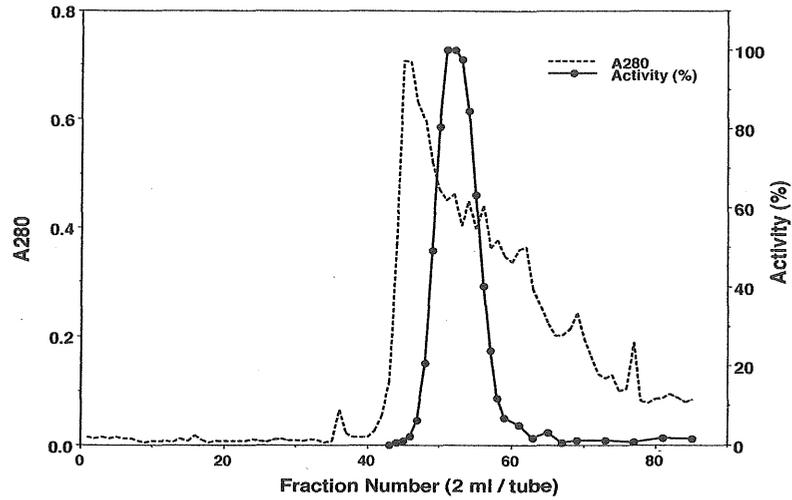


図 2-2. 細胞質 μ -、m-カルパインおよびミトコンドリアカルパインの精製

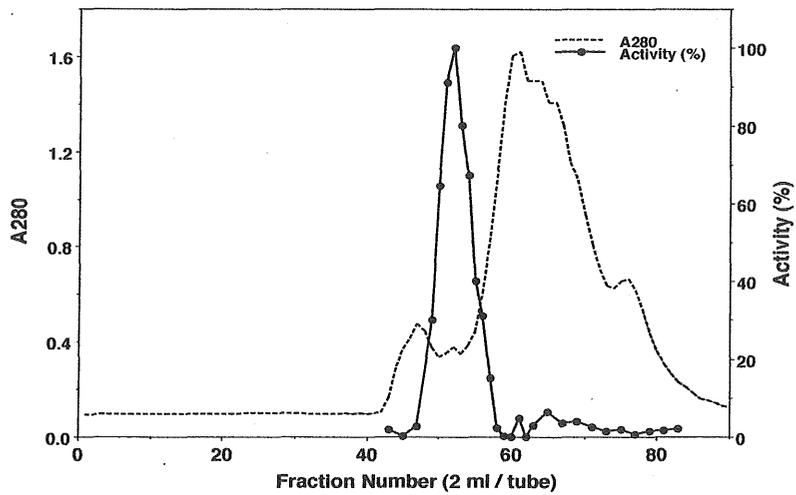
実験方法の詳細は、本章第 2 節（実験材料および方法）に記載した。

(A) DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーによる細胞質 μ -、m-カルパインの分離。120 mM NaCl 時と 250 mM NaCl 時に 2 つのカルパイン活性ピークがみられる。この結果は吉村らの結果 [13] と一致することから、前半のピークに μ -カルパインが含まれ、後半のピークに m-カルパインが含まれると示唆される。

図2-2 B



C



(B) Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィーによる細胞質 μ -カルパインの精製。

DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーで得られた μ -カルパインのピーク

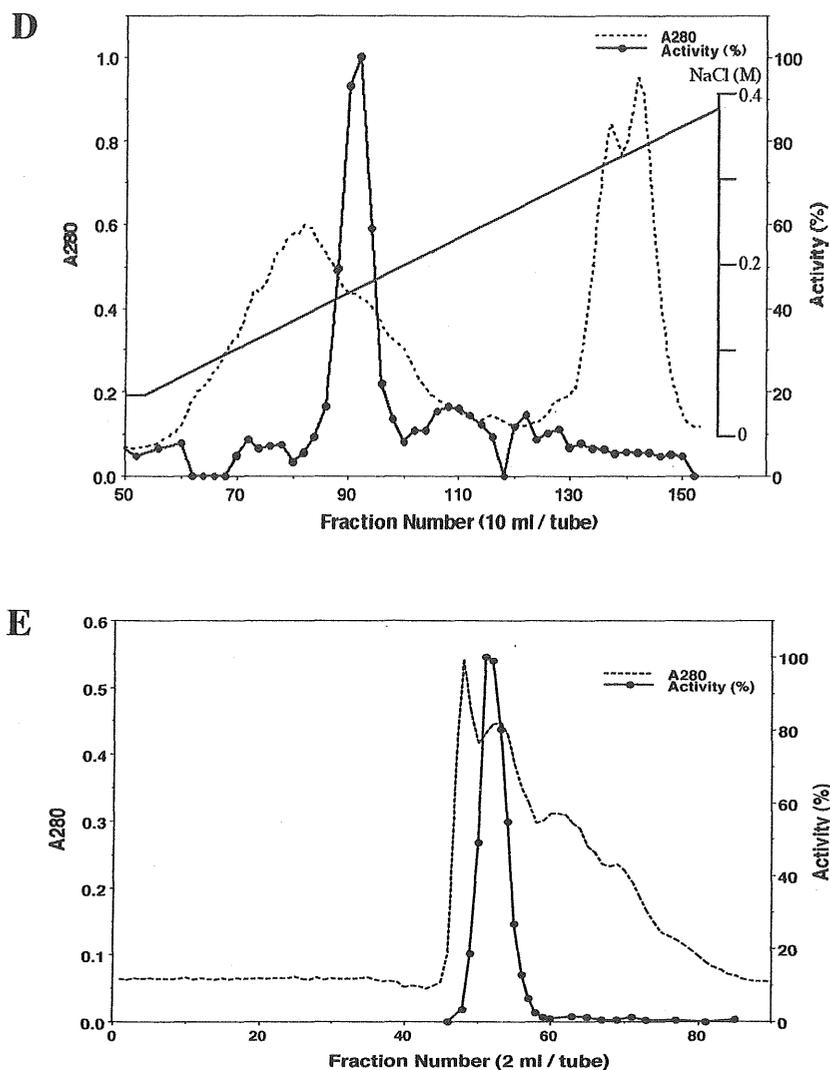
(120 mM NaCl) を Sephacryl S-300 カラムへ添加し、バッファーCで溶出した。1つのカルパイン活性ピークがみられる。

(C) Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィーによる細胞質 m-カルパインの精製。

DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーで得られた m-カルパインのピーク

(250 mM NaCl) を Sephacryl S-300 カラムへ添加し、バッファーCで溶出した。 μ -カルパインと同様に、1つのカルパイン活性ピークがみられる。

図 2-2



(D) DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーによるミトコンドリアカルパインの精製。150 mM NaCl 時に 1 つのカルパイン活性ピークがみられる。

(E) Sephacryl S-300 カラムクロマトグラフィーによるミトコンドリアカルパインの精製。DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーで得られたミトコンドリアカルパインのピークを Sephacryl S-300 カラムへ添加し、バッファー C で溶出した。1 つのカルパイン活性ピークがみられる。

図2-3

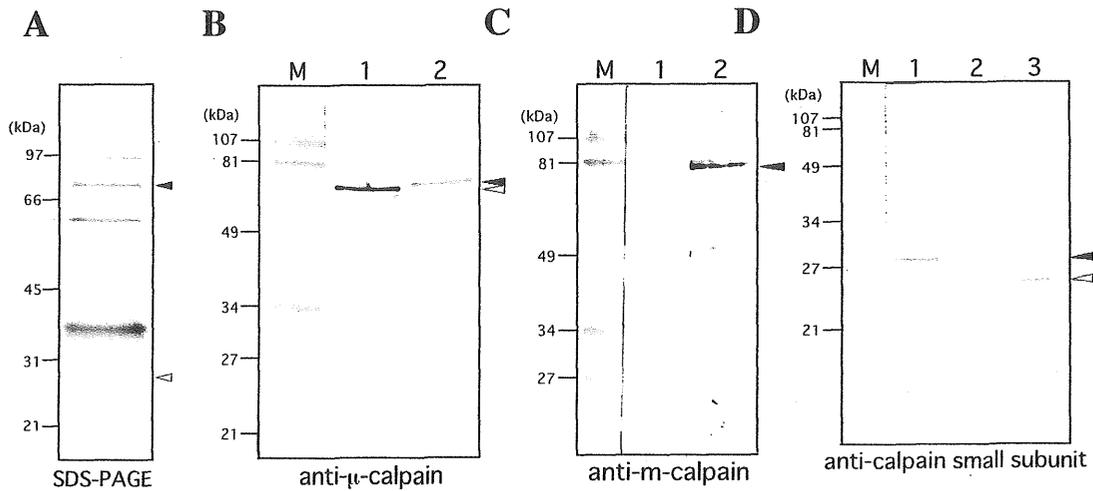


図2-3. ミトコンドリアカルパインのSDS-PAGEとウエスタンブロット解析

(A) ミトコンドリアカルパイン部分精製標品の SDS-PAGE。ミトコンドリアカルパイン部分精製標品 (5 μ g タンパク質) を SDS-PAGE にかき、その後、銀染色を行なった。

黒矢頭および白矢頭は、各々ミトコンドリア大サブユニットおよび小サブユニットと思われるバンドを示す。

(B) μ -カルパイン (ドメイン III) 抗体を用いたウエスタンブロット解析 (10 μ g タンパク質)。レーン 1、ミトコンドリアカルパイン; 2、 μ -カルパイン。ミトコンドリアカルパインは μ -カルパイン抗体に反応し、分子量は約 75 kDa (白矢頭) で、細胞質 μ -カルパインの分子量 (約 78 kDa; 黒矢頭) よりもやや小さい。

(C) m-カルパイン (ドメイン III) 抗体を用いたウエスタンブロット解析 (10 μ g タンパク質)。レーン 1、ミトコンドリアカルパイン; 2、m-カルパイン。ミトコンドリアカルパインはm-カルパイン抗体に反応しない。

(D) カルパイン小サブユニット抗体を用いたウエスタンブロット解析 (10 μ g タンパク質)。レーン 1、 μ -カルパイン; 2、m-カルパイン; 3、ミトコンドリアカルパイン。細胞質 μ -およびm-カルパインは約 30 kDa (黒矢頭)、ミトコンドリアカルパインは約 26 kDa (白矢頭) のカルパイン小サブユニットを各々有している。

図 2-4

A

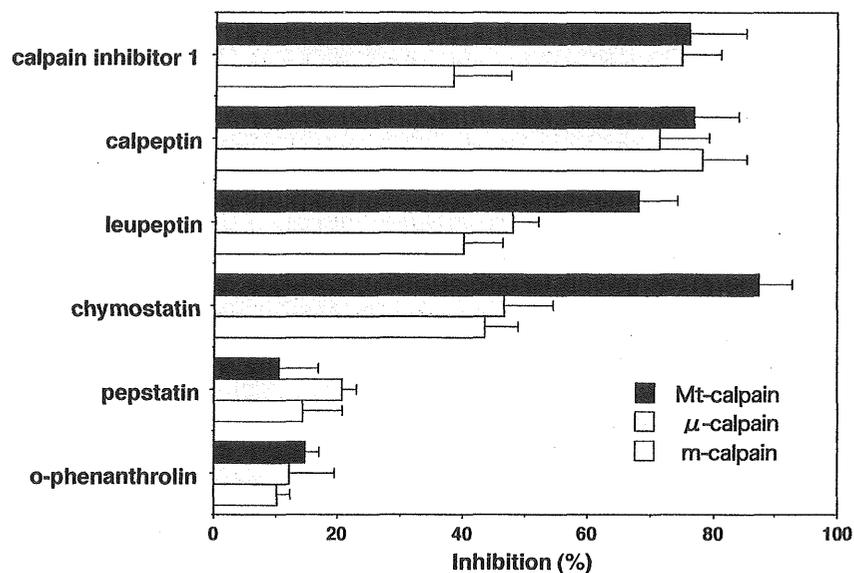


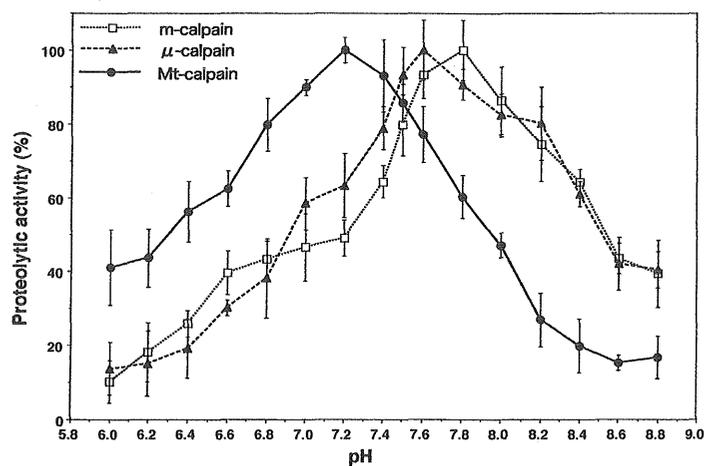
図 2-4. 細胞質 μ -、m-、およびミトコンドリア μ -カルパインの酵素学的性質の比較

細胞質 μ -、m-およびミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品 (25 μ g タンパク質/反応溶液) のを用いた。結果は、 \pm 標準偏差 (検体数=4) で表す。

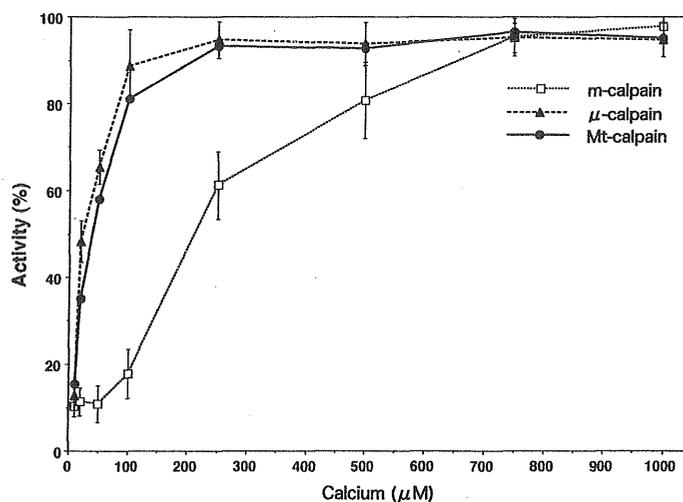
(A) 細胞質 μ -、m-およびミトコンドリア μ -カルパイン活性化に及ぼすカルパイン阻害剤の影響。カルパイン阻害剤 (1 μ M カルパインインヒビターI: calpain inhibitor I、カルペプチン: calpeptin、ロイペプチン: leupeptin、キモスタチン: chymostatin) は、3種のカルパイン活性を阻害するが、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤 (10 μ M pepstain) と金属プロテアーゼ阻害剤 (10 μ M o-phenanthroline) は阻害効果がない。ミトコンドリア μ -カルパインのみキモスタチンに感受性が高い。

図 2-4

B



C



(B) 細胞質μ、m-およびミトコンドリアμ-カルパイン活性化における至適 pH。

細胞質μ、m-およびミトコンドリアμ-カルパインの至適 pH は、各々 7.6、7.8、7.2 であり、ミトコンドリアμ-カルパインはより低い pH で活性化する。

(C) 細胞質μ、m-およびミトコンドリアμ-カルパイン活性化における Ca^{2+} 要求性。

0~1000 μM の範囲で各 Ca^{2+} 濃度の反応溶液を用いて、カルパイン活性測定を行なった。

ミトコンドリアμ-カルパインの活性化における Ca^{2+} 要求性は、細胞質μ-カルパインとほとんど変わりがなく、低 Ca^{2+} 濃度でも活性化する。

図 2-5

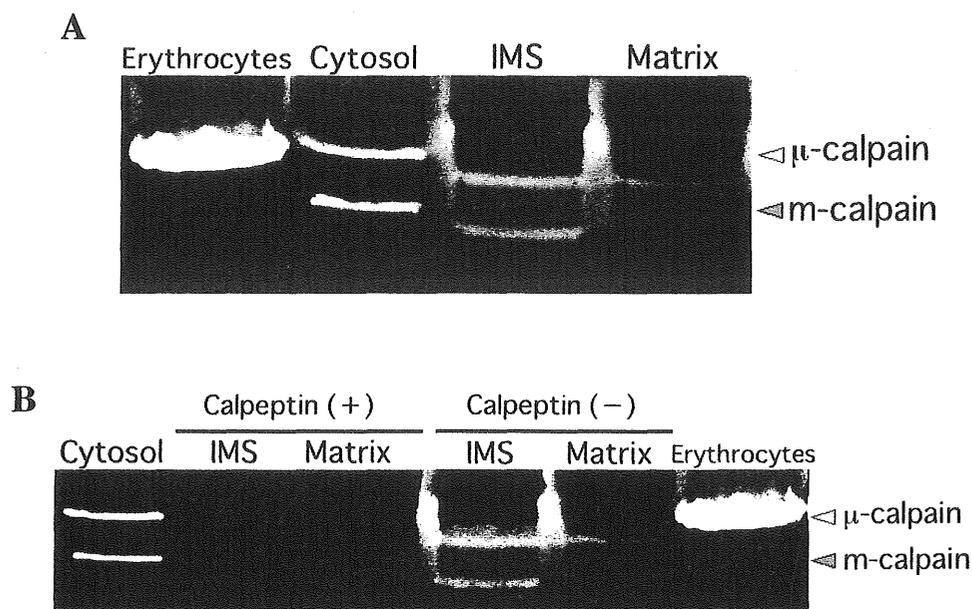
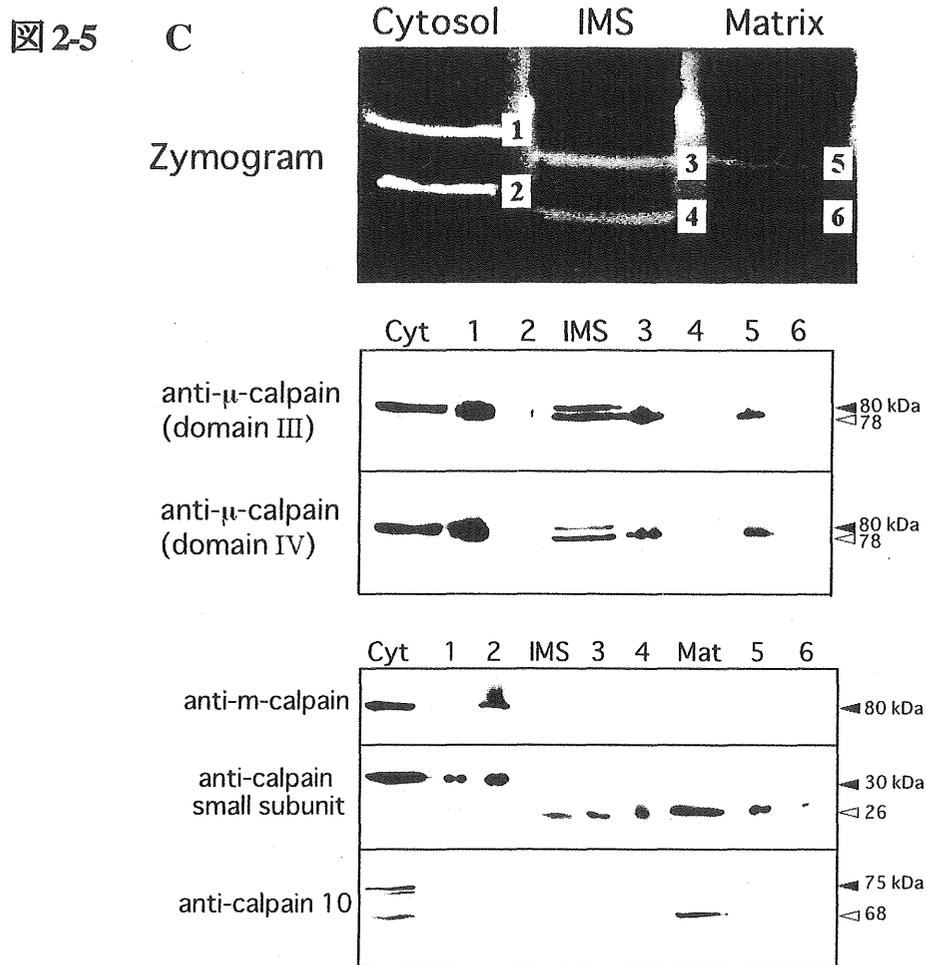


図 2-5. 細胞質およびミトコンドリアでのカゼインザイモグラフィとウエスタンブロット解析

(A) 細胞質 μ -、 m -およびミトコンドリアカルパインのカゼインザイモグラム。試料は、ブタ赤血球 (Erythrocytes; 100 μ g タンパク質)、肝臓細胞質 (Cytosol; 250 μ g) , 膜間スペース (IMS; 400 μ g) およびマトリクス (Matrix; 400 μ g)。赤血球は μ -カルパインの陽性対照として使用。細胞質では μ -カルパインを示すバンド (白矢頭) と m -カルパインを示すバンド (黒矢頭) の2本が検出された。膜間スペースでは、上方の鮮明なバンドと下方の弱いバンドが検出された。上方の鮮明なバンドは、マトリクスでも観察できる。膜間スペースとマトリクスでの活性バンドは、いずれも細胞質 μ -および m -カルパインの移動度とは異なる。

(B) カルペプチン処理したミトコンドリアカルパインのカゼインザイモグラム。カルペプチン処理により、膜間スペースおよびマトリクスでみられた活性バンドは消失する。



(C) カゼインザイモグラフィーにおける活性バンドのウエスタンブロット解析。

カゼインザイモグラフィーで検出された活性バンドを切り出し、SDS-PAGE にかき、それに含まれるタンパク質を分離し、ウエスタンブロット解析を行なった。上のパネルから順に、 μ -カルパインドメイン III、ドメイン IV、m-カルパイン (ドメイン III)、カルパイン小サブユニット、カルパイン 10 (ドメイン T) に対する各抗体を用いた。陽性対照として細胞質、膜間スペース、マトリクス (各 20 μ g タンパク質) を使用。細胞質 μ -カルパイン (バンド No. 1) と上方のミトコンドリアカルパイン (バンド No. 3 と 5) は、 μ -カルパインドメイン III および IV 抗体で染まる。細胞質 m-カルパイン (バンド No. 2) は、m-カルパイン抗体のみに染まる。全ての活性バンドは、カルパイン小サブユニット抗体に反応するが、カルパイン 10 抗体には反応しない。

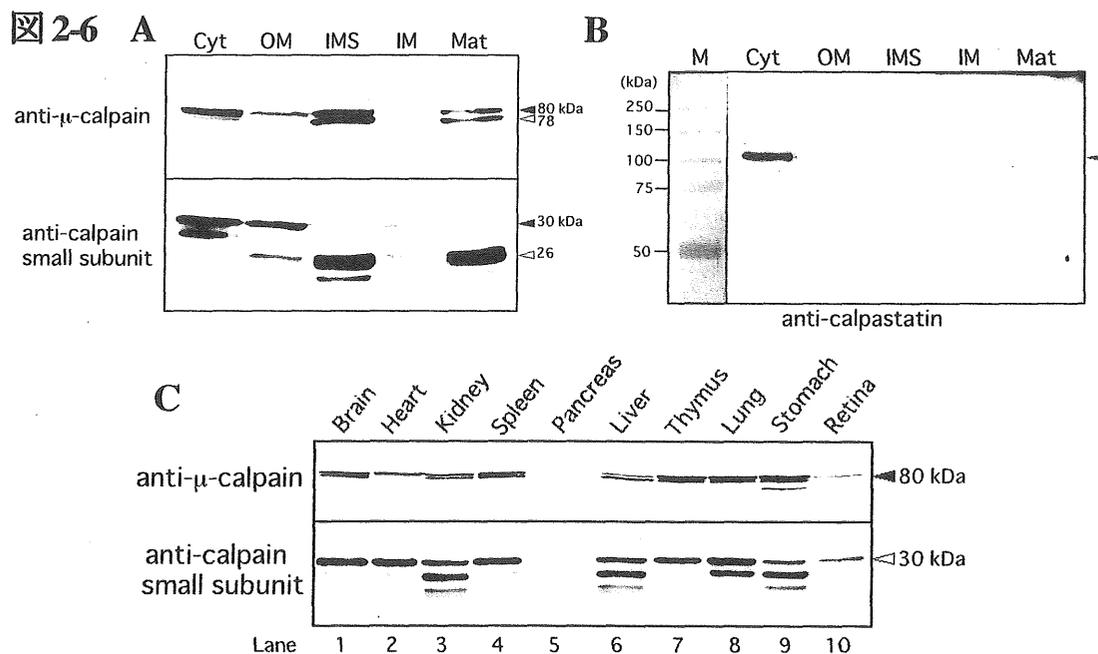


図2-6. ミトコンドリア μ -カルパインの組織分布

各レーン40 μ gの試料(タンパク質)を添加した。

(A) ブタ肝臓ミトコンドリア各画分における μ -カルパイン(ドメインIII)およびカルパイン小サブユニットのウエスタンブロット解析。膜間スペースとマトリクスでは、約80 kDa(黒矢頭)と約78 kDa(白矢頭)の2つのバンドがみられる(パネル上)。細胞質カルパインは、約30 kDa(黒矢頭)と約28 kDaの小サブユニットを持つが、ミトコンドリアカルパインは外膜と内膜では約30 kDa、膜間スペースとマトリクスでは約26 kDa(白矢頭)の小サブユニットと相互作用している。

(B) ブタ肝臓ミトコンドリア各画分におけるカルパスタチンのウエスタンブロット解析。カルパスタチンは細胞質では検出できる(黒矢頭:約110 kDa)ものの、ミトコンドリアでは検出されない。

(C) ミトコンドリア μ -カルパインの組織分布。膵臓以外の各組織(脳:Brain、心臓:Heart、腎臓:Kidney、脾臓:Spleen、肝臓:Liver、胸腺:Thymus、肺:Lung、胃:Stomach、網膜:Retina)のミトコンドリア画分において、ミトコンドリア μ -カルパイン大および小サブユニットが検出される。それらの分子形は、組織によって異なっている。

図 2-7

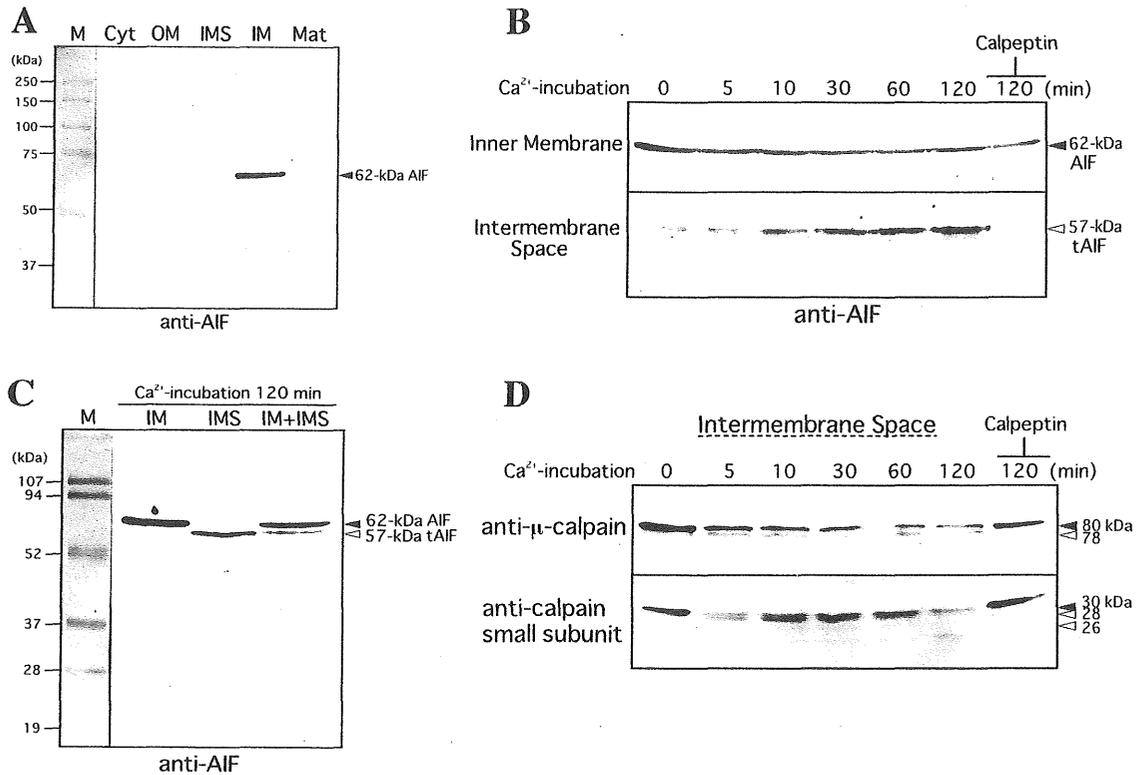


図 2-7. ミトコンドリアカルパインによる AIF の限定分解と内膜からの遊離

実験方法の詳細は、本章第 2 節 (実験材料および方法) に記載した。

(A) ブタ肝臓ミトコンドリア各画分における AIF の局在。約 62 kDa AIF (黒矢頭) がミトコンドリア内膜 (IM) のみに局在する。(B) Ca²⁺-インキュベーションによる内膜および膜間スペースでの AIF の局在変化。内膜では約 62 kDa AIF の増減がみられないが、膜間スペースではインキュベーション時間依存的に約 57 kDa 切断型 AIF (tAIF) が顕著に増加している。カルペプチンは AIF の切断と膜間スペースへの遊離を完全に阻害する。(C) Ca²⁺-インキュベーション 120 分後の内膜および膜間スペースにおける AIF 分子形の違い。内膜での 62 kDa AIF (黒矢頭) と膜間スペースに遊離した 57 kDa tAIF (白矢頭) は、共に分離されて観察される。(D) ミトコンドリア μ -カルパイン大および小サブユニットは、Ca²⁺-インキュベーション 5 分後に既に活性化を示唆する自己分解が始まっている。その自己分解はカルペプチンにより完全に阻害される。

第3章

ミトコンドリア μ -カルパインの機能解析

第1節 緒言

第2章では、ミトコンドリアにはカルパイン分子が2種類存在し、その1種は μ -カルパイン抗体に反応することからミトコンドリア μ -カルパインと名付けたが、もう1種は未知のカルパイン分子である。さらにカルパインの内在性阻害因子であるカルパスタチンが、ミトコンドリアには局在しないことが明らかとなり、ミトコンドリアには細胞質とは異なる独自のカルパイン活性制御機構が存在することが考えられる。ミトコンドリアには、カルパスタチンに代わる阻害因子や、活性化因子および安定化因子が存在し、ミトコンドリアカルパインを制御していると推測される。そこで本章では、ミトコンドリアに局在するカルパイン制御因子を同定し、その機能を解明しようと試みた。

ラット肝臓ミトコンドリアからミトコンドリア μ -カルパインを部分精製し、その部分精製標品に含まれるタンパク質をMALDI-TOFMSおよびPMF法により同定した。同定されたタンパク質の1つに、プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)に属するERp57分子シャペロン[53-56]が存在した。ERp57はシャペロン分子であるため、ミトコンドリア μ -カルパインと相互作用しているのではないかと考えられた。そこで、様々な手法を用いてそれらが相互作用しているのか検証した。さらにERp57がミトコンドリア μ -カルパインに対してどのような機能を有しているのか確かめた。

ミトコンドリアカルパインは Ca^{2+} 依存的にAIFを限定分解することが示された(第2章)。しかし2種のカルパイン分子のどちらがそれに関与するのか明らかにしておらず、本章では、その限定分解がミトコンドリア μ -カルパインによるものかどうか検証した。

第2節 実験材料および方法

第2章で既述した実験方法は、省略する。

試薬は記載がない限り和光純薬（株）またはシグマ社の試薬特級を使用した。

(1) ラット肝臓からの細胞分画とミトコンドリア分画

全ての実験操作を 0~4°Cで行った。ミトコンドリア μ -カルパインを精製するため、8週令の Sprague-Dawley ラット 20 匹の肝臓を摘出し、ミトコンドリア膜間スペースを調製した。細胞分画とミトコンドリア分画は、第2章で記述した方法に従って行った。各画分の精製度は、各画分に対する特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により確認した。細胞質のマーカーとしてグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 抗体、外膜のマーカーとして電位依存性陰イオンチャンネル (VDAC) 抗体、膜間スペースのマーカーとしてアデニル酸キナーゼ (AK2)、内膜のマーカーとしてアポトーシス誘導因子 (AIF) 抗体、マトリクスのマーカーとしてピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 抗体を用いた。

(2) ミトコンドリアカルパインの部分精製

ミトコンドリアカルパインを部分精製するため、膜間スペースを Phenyl-Sepharose および DEAE-Sepharose CL-6B (Amersham Pharmacia Biotech.) カラムクロマトグラフィーにかけた。記載がない限り、全ての実験操作を 0~4°Cで行った。

ラット肝臓から採取したミトコンドリア膜間スペースをスターラーで攪拌しながら、粉末硫酸 (1 M 飽和) を徐々に添加し、完全に溶解させ 1 時間静置した。その懸濁液を 1 M 硫酸を含むバッファーA (第2章「実験材料および方法」に記載) で平衡化した Phenyl-Sepharose カラム (15 x 300 mm) へ添加した。その後 1 M 硫酸を含むバッファー

A を 220 mL 流し、吸着しないタンパク質を除き、樹脂に吸着しているミトコンドリアカルパインを 180 mL のバッファーB (第 2 章「実験材料および方法」に記載) で溶出した。流速は 1.0 mL/分で、1 フラクション当たり 4 mL 回収した。各フラクションから 50 μ L とり、カルパイン活性測定に使用した。カルパイン活性が存在するフラクションを集め、500 mL のバッファーB で一晩透析を行った。

透析した試料をバッファーB で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム (26.4 x 700 mm) へ添加した。吸着しないタンパク質は、500 mL のバッファーB で洗い流し、樹脂に吸着しているミトコンドリアカルパインは、NaCl 濃度勾配を 50~300 mM まで直線的に上げ (リニアグラジエント法) 溶出した。50 mM NaCl を含むバッファーB 500 mL と 300 mM NaCl を含むバッファーB 500 mL を用いた。その溶出には、1L のバッファーを用いた。流速は 1.0 mL/分で、1 フラクション当たり 10 mL 回収し、各フラクション 50 μ L をカルパイン活性測定に使用した。カルパイン活性が存在するフラクションを集め、アミコン PM-10 膜を用い 4 mL まで限外濾過濃縮した。濃縮した試料を 400 mL のバッファーC (第 2 章「実験材料および方法」に記載) で一晩透析した。

ミトコンドリアカルパイン精製標品を、Laemmli らの方法 [37] に従って SDS-PAGE にかけて、その精製度を確認した。電気泳動後、銀染色キット (Wako) を用い、分離されたタンパク質を検出した。

(3) 使用した抗体と阻害剤

ウサギ抗 ERp57 抗血清は、ヒト ERp57 の C 末ペプチド 17 アミノ酸残基 (VIQEEKPKKKKKAQEDL) に対して作製したもので、岩手大学農学部の山下哲郎博士より分与された [57]。ウサギ抗カルネキシンおよび抗 BiP 抗血清も、山下哲郎博士より分与されたものを使用した [58]。

その他の抗体は、次の通りである。第 2 章で既述した抗体は、省略する。ウサギポリ

クローナル抗 m-カルパイン-ドメイン III (Chemicon Inc.)、抗カルパイン小サブユニット-ドメイン V 抗体 (Triple Point Biologics Inc.)、抗 AK2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)。

プロテインジスルフィドイソメラーゼ (Protein disulfide isomerase; PDI) 阻害剤である 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)、phenylarsine oxide (PAO)、triiodothyronine (T3) は、シグマ社より、カルパイン阻害剤であるカルペプチンと PD150606 は、Calbiochem より購入した。DTNB はチオール基の S-S 結合に直接作用し、S-S 結合を切断する機能を有する [59]。PAO は、As³⁺ を介して ERp57 などのタンパク質に含まれる CXXC モチーフの近接チオール基と配位結合を形成する [60]。PDI は T3 受容体と相同性を有しており、2 カ所の T3 結合部位をもち、1 つは高親和性で、もう 1 つは低親和性である。甲状腺ホルモンである T3 はいくつかの異なった生物作用に影響を及ぼすが、PDI にも結合しその機能を弱く阻害する [61]。

(4) ゲル内トリプシン消化

銀染色したタンパク質バンドをゲルから切り出し、Hellman らの方法 [62] に若干の修正を加えた方法に従い、ゲル内トリプシン消化を行った。記載がない限り、全ての実験操作を室温で行った。タンパク質バンドを銀染色ゲルから切り出し、細片化し、200 μ L の脱色液 (銀染色 MS キットの脱色液 A と脱色液 B の等量混合溶液) を加えて 15 分間振とうした。脱色液を取り除き、500 μ L のミリ Q 水で 3 回洗い、50%アセトニトリルを含む 25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を 200 μ L 加え、5 分間振とうした。上清を取り除き、100%アセトニトリルを 200 μ L 加え、5 分間静置した。上清を除き、ゲル片の入ったチューブを遠心式濃縮機 (Speed Vac) に約 50°C、15 分間かけ真空乾燥させた。

200 μ L の還元溶液 (0.1 M 炭酸水素アンモニウム、10 mM ジチオスレイトール: DTT) を加え、ブロック型インキュベーター (Thermo Alumi Bath, Iwaki) を用い 56°C で 45 分間保温した。還元溶液を取り除き、200 μ L のアルキル化溶液 (0.1 M 炭酸水素アンモニウム)

ウム、55 mM ヨードアセトアミド) を加え、遮光し 30 分間静置した。アルキル化溶液を取り除き 500 μL のミリ Q 水で 2 回洗った後、50%アセトニトリルを含む 25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を 200 μL 加え 10 分間振とうした。上清を除き 100%アセトニトリルを 200 μL 加え、室温で 5 分間静置した。上清を除き 0.1 M 炭酸水素アンモニウム溶液を 200 μL 加え、室温で 5 分間静置した。上清を除き、100%アセトニトリルを 200 μL 加え、室温で 15 分間静置する。上清を除き、遠心式濃縮機に約 50°C で 30 分間かけ、ゲル片を真空乾燥させた。乾燥させたゲル片に 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のトリプシン溶液 (Promega) をゲルが浸る程度加え染み込ませ、37°C に設定した恒温機で 20 時間インキュベートした。

ゲル内トリプシン消化されたペプチドを回収するため、50%アセトニトリルを含む 25 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を 200 μL 加え 15 分間振とうし、上清を回収した。さらに 50%アセトニトリルを含む 5%トリフルオロ酢酸溶液 200 μL をゲル片の入ったチューブに加え、15 分間振とうし、上清を回収した。回収したペプチドが入ったチューブを遠心式濃縮機 (約 50°C) にかけて、濃縮乾燥させた。

(5) MALDI-TOF Mass スペクトロメトリーとデータベース解析

濃縮乾燥させたペプチドを 0.1%トリフルオロ酢酸 20 μL で懸濁した。DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) をマトリクスとして使用した。DHB を 33%アセトニトリル / 0.1%トリフルオロ酢酸に溶かした飽和溶液を、33%アセトニトリル / 0.1%トリフルオロ酢酸で 3 倍に希釈した溶液 (マトリクス溶液) を作製し、サンプルプレートに 0.4 μL 滴下した。質量校正用標準ペプチド混合物 (Peptide Mass Standard, Applied Biosystems) をサンプルプレートに 0.4 μL 滴下した。同様にペプチド溶液を 0.4 μL 滴下した。サンプルプレートを 10 分間静置して、風乾させた。そのサンプルプレートを MALDI-TOF 型質量分析計 (Voyager-DE RP, Applied Biosystems) で測定 (MALDI-TOFMS 解析) した。m/z

値の範囲は、800 から 3000 に設定し測定し、アンジオテンシン I (angiotensin I) と副腎皮質刺激ホルモン (adenocorticotrophic hormone) のフラグメント 18-39 を用いて、得られたマススペクトルを校正した。得られたペプチドの質量をペプチド・マス・フィンガープリント法 (peptide mass fingerprinting; PMF) で同定した。データベース検索は、Swiss-Prot データベースを基にした MS-Fit プログラム (<http://prospector.ucsf.edu>) を用いモノアイソトープ質量で検索した。

(6) 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native PAGE)

タンパク質-タンパク質相互作用を解析するため、カゼインザイモグラフィーの方法に若干の修正を加えた非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった [39, 40]。分離ゲルには、7.5%ポリアクリルアミドゲルを使用し、サンプルバッファーと泳動バッファーはカゼインザイモグラフィーに用いたものと同じものを使用した。

(7) 免疫沈降

ウサギポリクローナル抗 ERp57 抗体に含まれる IgG 含量を測定するため、石黒らの方法 [63, 64] に従って Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。コントロールとして 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の正常ウサギ IgG を用いた。ELISA の結果、3.87 mg/mL の IgG が含まれていた。500 μL のバッファー C に懸濁した膜間スペース (400 μg タンパク質) に、各濃度 (0.2~50 μg) のウサギポリクローナル抗 ERp57 抗体および正常ウサギ IgG を添加し、4°C で 18 時間ローターにより攪拌した。Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech.) を 12 μL 添加し、4°C で 2 時間ローターにより攪拌した。4°C、12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清の一部をカルパイン活性測定に使用した。沈殿はバッファー C で 6 回洗い、SDS-PAGE または Native PAGE 用サンプルバッファーを加え、ウエスタンブロット解析に使用した。

(8) 内在性ミトコンドリア μ -カルパインによる AIF の限定分解

8 週令の SD ラット 2 匹の肝臓からミトコンドリア画分を単離し、0.2 mg/mL の牛血清アルブミンを含んだ 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁した。10 μ M DTNB、5 μ M カルペプチン、10 μ M PD150606 の存在下および非存在下で、その懸濁液を 4°C で 1 時間静置した。等張バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM 2-mercaptoethanol] を添加し、さらに CaCl₂ を終濃度 1 mM となるように加えた。37°C で 1 時間インキュベーションし、その後 EGTA を終濃度 5 μ M となるように添加した。ミトコンドリア画分を第 2 章に述べた方法に従って行い、得られた膜間スペースと内膜はウエスタンブロット解析に用い、AIF の限定分解に伴う内膜からの tAIF 遊離を観察した。

第3節 実験結果

(1) ミトコンドリア μ -カルパインの部分精製

ミトコンドリア μ -カルパインと相互作用するタンパク質を同定するため、ラット肝臓ミトコンドリア膜間スペースから種々のカラムクロマトグラフィーを用いてミトコンドリア μ -カルパインを部分精製した。Phenyl-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより1つのピーク活性ピークが得られた (図 3-1)。得られた活性ピークを DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーにかけ、リニアグラジエント法で NaCl 濃度を上げてタンパク質を溶出した。その結果、150 mM NaCl 時にカルパイン活性のピークが1つみられた。精製標品の回収率は5.3%で、14.7倍の精製度であった。

(2) ミトコンドリアカルパインの精製度と MALDI-TOFMS 解析

ミトコンドリア μ -カルパインの精製度を確かめるために、SDS-PAGE および銀染色を行なった (図 3-2)。約 10 本のバンドが検出された。その分子量 50~80 kDa のバンドを各々切り出し、ゲル内トリプシン消化によりペプチドを抽出し、MALDI-TOF 型質量分析計にかけ、PMF 法によりタンパク質を同定した (図 3-3)。MALDI-TOF 型質量分析計で検出された 11 ペプチドが、ラット ERp57 (MW 56,624) のアミノ酸配列と一致した。その 11 ペプチドは、ラット ERp57 の全アミノ酸配列の 27%をカバーしており、平均誤差は 152 ppm であった。SDS-PAGE で示された 57 kDa バンド (図 3-2; 白矢頭) が ERp57 に相当する。また、16 ペプチドが、ラット propionyl-CoA carboxylase (MW 77,712) のアミノ酸配列と一致した。そのカバー率は 14%で、平均誤差は 124 ppm であった。SDS-PAGE で示された 70 kDa バンド (図 3-2; 黒矢頭) が propionyl-CoA carboxylase に相当する。ミトコンドリア μ -カルパインの部分精製標品から、 μ -カルパイン抗体およびカルパイン小サブユニット抗体に反応するバンドが検出され、確実にミトコンドリア μ -

カルパインを部分精製したことが確認された (図 3-2B、2C)。

(3) ERp57 のミトコンドリア局在

ERp57 およびミトコンドリア μ -カルパインのミトコンドリア分布を調べた。ラット肝臓から単離した細胞質およびミトコンドリア各画分において、ERp57 抗体、 μ -カルパイン (ドメイン III) 抗体およびカルパイン小サブユニット抗体を用い、ウエスタンブロット解析を行なった (図 3-4)。各画分に特異的に局在するタンパク質をマーカーとして、それらに対する抗体を用いたウエスタンブロット解析より、各画分の精度を確認した。選択した各マーカーは、細胞質ではグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH)、ミトコンドリア外膜では電位依存性陰イオンチャンネル (VDAC)、膜間スペースではアデニル酸キナーゼ (AK2)、内膜ではアポトーシス誘導因子 (AIF)、マトリクスではピルビン酸脱水素酵素 (PDH)、ER ではカルネキシン (calnexin) と BiP である。

ERp57 は ER 画分のみならず、ミトコンドリア各画分および細胞質画分にも局在していた。ミトコンドリア画分では、特に外膜に多く存在していた。ミトコンドリア μ -カルパインは、主に膜間スペースとマトリクスに局在していた。

ヒトミトコンドリアタンパク質を網羅的に解析および同定したリストを検索したところ、ERp57 がミトコンドリアに局在することが報告されている [65]。ER および細胞質における ERp57 の機能は詳しく調べられているが、ミトコンドリアでの機能は全く知られていない。

(4) 細胞質およびミトコンドリア画分でのカゼインゼイモグラフィーとウエスタンブロット解析

第 2 章では、ブタ肝臓から単離した細胞質およびミトコンドリア画分におけるカルパ

イン活性と、そこに存在するカルパイン分子の種類について調べた (図 2-5A)。本章ではラット肝臓を材料として全ての実験を行なっているため、同様にカゼインゼイモグラフィによりラットのミトコンドリアカルパインの存在と、その分子の種類について調べた (図 3-5A)。細胞質画分では、2本の活性バンドが観察され、移動度が小さい上方のバンドは μ -カルパインを示し、移動度が大きい下方のバンドはm-カルパインを示す。膜間スペースおよびマトリクスでは、2つの活性バンドが検出され、それらは細胞質 μ -および m-カルパインの移動度と異なっていた。マトリクスにおいて下方の活性バンドが検出されたという実験結果以外は、ブタ肝臓を用いて行なった結果 (図 2-5A) と同様であった。

カゼインゼイモグラフィにおける膜間スペースおよびマトリクスの活性バンドが、カルパインによるものかどうか確かめるため、カルパイン阻害剤であるカルペプチンで前処理し、カゼインゼイモグラフィを行なった (図 3-5B)。その結果、膜間スペースおよびマトリクスでみられた全ての活性バンド (No. 1~4) が、カルペプチンにより阻害された。このことから、膜間スペースとマトリクスには少なくとも2種のカルパイン分子が局在していることが示唆された。

細胞質およびミトコンドリアで検出された活性バンドを各々切り出し、SDS-PAGE 展開し、 μ -カルパイン (ドメイン IV)、m-カルパイン (ドメイン III)、カルパイン小サブユニットおよびカルパイン 10 に対する各抗体を用いて、ウエスタンブロット解析を行なった (図 3-5C)。細胞質 μ -カルパインと移動度の小さいミトコンドリアカルパイン (バンド No. 1 および 3) は、 μ -カルパイン抗体に染まった (パネル上段)。しかし2種のミトコンドリアカルパインは、いずれも m-カルパイン抗体に反応しなかった (パネル上から 2 段目)。細胞質 μ -、m-および 2 種のミトコンドリアカルパインは、カルパイン小サブユニット抗体に反応した (パネル上から 3 段目)。興味深いことに、移動度の小さいミトコンドリア μ -カルパイン (バンド No. 1 および 3) のみが ERp57 抗体に染ま

った (パネル下段)。この結果から、ミトコンドリア μ -カルパインのみが ERp57 と結合 (相互作用) していることが示唆された。

(5) ミトコンドリア μ -カルパインと ERp57 の相互作用

ミトコンドリア μ -カルパインと ERp57 が結合しているか確かめるため、ERp57 抗体によって膜間スペースからミトコンドリア μ -カルパインが免疫沈降されるか調べた。正常ウサギ IgG を対照として用いた。ポリクローナル抗 ERp57 抗体を膜間スペースに作用させ、免疫沈降し、その上清をカルパイン活性測定 (図 3-6A) とカゼインゼイモグラフィに使用した (図 3-6B)。免疫沈降によって、膜間スペースにおけるカルパイン活性が最大約 75%も減少した。さらにカゼインゼイモグラフィにおけるミトコンドリア μ -カルパインの活性バンドが、ERp57 抗体による免疫沈降によって消失した。免疫沈降物をウエスタンブロットにより解析したところ、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットおよび小サブユニットが ERp57 抗体で免疫沈降されていることが示された (図 3-6C)。

ミトコンドリア μ -カルパインと ERp57 が相互作用していることをさらに調べた。ERp57 抗体で免疫沈降した複合体に抗原として用いた ERp57 ペプチド (100 μ g/mL) を添加し、複合体のみを遊離・回収した。回収した試料に SDS-PAGE および Native PAGE 用サンプルバッファーを添加し、電気泳動を行ない、ERp57、 μ -カルパイン大サブユニットおよびカルパイン小サブユニット抗体でのウエスタンブロット解析を行なった。免疫沈降物には、ERp57 (約 57 kDa)、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニット (約 76 kDa) および小サブユニット (約 26 kDa) が含まれていた (図 3-7A)。Native PAGE からのウエスタンブロット解析により、ERp57、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットおよび小サブユニットが同じ移動度であることが示された (図 3-7B)。これらの結果から、ミトコンドリア μ -カルパインと ERp57 が複合体を形成していることが強く

示唆された。

(6) ミトコンドリア μ -カルパイン-ERp57 複合体に対する Ca^{2+} の影響

カルパインは Ca^{2+} 依存的に、 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴って活性化される。ミトコンドリア μ -カルパインは ERp57 と結合している状態では不活性で、それと解離することによって活性状態に変換されることが考えられる。もちろん、ERp57 と複合体を形成した状態でも活性化することも想定される。まず Ca^{2+} によって、ミトコンドリア μ -カルパインと ERp57 が解離するのかを検討した (図 3-8)。カルペプチンを前処理し、 Ca^{2+} 存在下および非存在下で 25°C 、30 分間インキュベーションし、その後未変性ゲル電気泳動に展開し、ウエスタンブロット解析を行なった。その結果、 Ca^{2+} の存在下および非存在下に関係なく ERp57、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットおよび小サブユニットが同じ移動度の位置に検出された。従って、 Ca^{2+} はミトコンドリア μ -カルパインと ERp57 の結合状態に何ら影響を与えないことが示唆された。

カルパイン小サブユニット抗体により 3 つのバンドが検出された (図 3-8; 右側 3 レーン)。カゼインザイモグラフィーの結果 (図 3-5) と照らし合わせると、最も移動度が小さい上方バンド (黒矢頭) はミトコンドリア μ -カルパイン小サブユニットに相当し、中間のバンド (グレー矢頭) は未知のミトコンドリアカルパインの小サブユニットに相当する。最も移動度が大きい下方バンド (白矢頭) は単量体で存在するカルパイン小サブユニット、もしくはカゼインザイモグラフィーで検出されないカルパイン分子と相互作用する小サブユニットであることが示唆される。

(7) ミトコンドリア μ -カルパインに対する PDI 阻害剤の影響

ERp57 はプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) ファミリーに属し、主にタンパク質の S-S 結合の構築を介してその安定化に寄与している。ERp57 がミトコンドリア

μ -カルパインを安定化させる機能を有しているのか確かめるため、PDI 阻害剤により ERp57 の機能を抑制することで、ミトコンドリア μ -カルパインに影響が出るのかをウエスタンブロットにより解析した (図 3-9)。作用機序の異なる 3 種 PDI 阻害剤、DTNB、PAO、T3 を使用した。DTNB はチオール基の S-S 結合に直接作用し、S-S 結合を切断する[59]。PAO は、As⁺³ を介して ERp57 などのタンパク質に含まれる CXXC モチーフの近接チオール基と配位結合を形成する[60]。甲状腺ホルモンである T3 は、T3 受容体と相同性のある PDI ファミリー分子にも結合し、その機能を弱く阻害する[61]。

細胞質 μ -カルパインは PDI 阻害剤の影響を受けなかったが、DTNB 作用下でミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットを示すバンドが顕著に減少し、PAO 作用下でも若干の減少がみられた (図 3-9A)。この結果から、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットは DTNB と PAO 作用下で分解されていることが示唆された。一方、ミトコンドリア μ -カルパイン小サブユニットおよび ERp57 は、PDI 阻害剤の影響を全く受けなかった (図 3-9B、-9C)。

DTNB および PAO が ERp57 の機能を阻害することにより、ミトコンドリア μ -カルパインの安定性が失われ、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットの分解 (または減少) が誘導されたと考えられた。そこで、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットの分解がミトコンドリアのプロテアーゼによるものか確認した。使用したプロテアーゼ阻害剤は、システインプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチン (leupeptin)、セリンプロテアーゼ阻害剤であるキモスタチン (chymostatin)、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるペプスタチン (pepstatin)、金属プロテアーゼ阻害剤である *O*-フェナンスロリンである。この予備実験から、DTNB および PAO が誘導するミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットの分解は、ロイペプチンおよびペプスタチン作用下で抑制されることが示された。従って DTNB および PAO が ERp57 の機能を阻害することで、ミトコンドリア μ -カルパインが不安定化し、ミトコンドリアに存在するシステインプロテ

ーゼやセリンプロテアーゼにより基質として認識され分解されたことが示唆された。

(8) ミトコンドリア μ -カルパイン活性に及ぼす ERp57 抗体の効果

先に、PDI 阻害剤により ERp57 機能を抑制し、ミトコンドリア μ -カルパイン分子に与える影響をみた。ここでは ERp57 抗体を用いて ERp57 機能を特異的に阻害することで、ミトコンドリア μ -カルパインに影響が及ぶのかどうか、カゼインゼイモグラフィーにより調べた (図 3-10)。膜間スペースに ERp57 抗体を添加し 4°C で 2 時間作用させ、カゼインゼイモグラフィーにかけた。ERp57 抗体量依存的に、ミトコンドリア μ -カルパインの活性バンドが特異的に減少した (図 3-10A)。一方、正常ウサギ IgG 作用下では、ミトコンドリア μ -カルパイン活性バンドに全く影響を及ぼさなかった (図 3-10B)。

(9) ERp57 結合型ミトコンドリア μ -カルパインによる AIF の限定分解

第 2 章では、ミトコンドリアカルパインが Ca^{2+} 依存的に AIF を限定分解し、内膜から膜間スペースへ遊離させることを示した。また、ミトコンドリアには 2 種のカルパイン分子が存在し、1 つは μ -カルパインと性質が似ていることからミトコンドリア μ -カルパインと呼んでいるが、もう 1 つは同定されていない未知のカルパイン分子である。従って、 Ca^{2+} 依存的な AIF の限定分解に、ミトコンドリア μ -カルパインと未知ミトコンドリアカルパインのどちらが関与しているのかを確認することが研究課題として残されていた。本章では、ERp57 がミトコンドリア μ -カルパインに結合し、安定化していることが示唆された。そこで ERp57 結合型ミトコンドリア μ -カルパインが、AIF の限定分解に寄与しているのかどうか調べることにした。

図 3-6 では、ERp57 抗体を用いた免疫沈降よりミトコンドリアカルパインの活性が減少し、ERp57 とミトコンドリア μ -カルパインが共沈降することを示した。そこで ERp57 抗体を用いた免疫沈降法を採用し、ミトコンドリア μ -カルパインの存在量依存的に AIF

が限定分解されるのかをウエスタンブロット法により解析した。ERp57 抗体 (0、5、10、20、30、50 μg) を膜間スペース試料に添加し、ミトコンドリア μ -カルパインを免疫沈降させたところ、ERp57 抗体を加えない試料のカルパイン活性を 100%とすると、80、50、32、27、25%のカルパイン活性が ERp57 抗体 (0、5、10、20、30、50 μg) での免疫沈降上清に各々存在していた (図 3-6)。その各上清を、ミトコンドリア内膜に添加し、1 mM Ca^{2+} 存在下で 37°C、1 時間インキュベーションした。その後、遠心分離によって内膜 (沈殿) とその上清を分離し、内膜に存在する AIF と限定分解により内膜から遊離した tAIF をウエスタンブロット解析により観察した。ERp57 抗体量依存的にミトコンドリア μ -カルパインを免疫沈降させたところ、内膜からの tAIF の遊離 (図 3-11A; 白矢頭) が抑制された。内膜結合型 AIF は、ERp57 抗体量およびカルパイン活性依存的にわずかに増えていた (図 3-11B; 黒矢頭)。この結果から、ミトコンドリア μ -カルパインの存在量が少なくなるにつれて、AIF の限定分解が抑制され、内膜からの遊離も阻害されることが示された。

さらに詳しく、ERp57 結合型ミトコンドリア μ -カルパインが AIF の限定分解に寄与しているのかどうか確かめた。図 3-9 では、PDI 阻害剤である DTNB および PAO により ERp57 の機能を阻害すると、ミトコンドリア μ -カルパインが不安定化し、ミトコンドリアに存在するシステインプロテアーゼやセリンプロテアーゼにより分解されることを示した。この阻害機構を応用し、ミトコンドリア μ -カルパインを不安定化させると、 Ca^{2+} 依存的な AIF の限定分解に影響が及ぶのか観察した。DTNB で前処理した単離ミトコンドリアに、1 mM Ca^{2+} を添加しインキュベーションした後、膜間スペースを調製し、内膜から遊離した tAIF をウエスタンブロット法により解析した (図 3-11C)。 Ca^{2+} のみを作用させると、tAIF が膜間スペースに遊離した (レーン 2) が、DTNB で前処理することによって、 Ca^{2+} 依存的な tAIF の遊離が抑制された (レーン 3)。カルパイン阻害剤であるカルペプチンおよびより特異的なカルパイン阻害剤である PD150606 により、 Ca^{2+}

依存的な tAIF の遊離が完全に阻害された (レーン 4 および 5)。遊離された tAIF の分子量は、内膜結合型 AIF の分子量と明らかに異なることが観察できる (レーン 6)。

第4節 考察

本章では、ERp57 がミトコンドリア μ -カルパインと相互作用し、その安定化に寄与していること、ERp57 結合型ミトコンドリア μ -カルパインが AIF を限定分解することを明らかにした。PDI 阻害剤である DTNB および PAO を作用させると、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットの安定性が失われ、その結果、他のミトコンドリアプロテアーゼにより分解される。ミトコンドリア μ -カルパインが不安定化されることで活性も失われ、AIF の限定分解とそれに伴う内膜からの遊離が阻害される。

カルパインの内在性阻害剤であるカルパスタチンがミトコンドリアに局在しない（第2章図 2-6）ことから、ミトコンドリアカルパインの活性化因子や抑制因子が局在し、活性を制御していることが想像できる。Kar らは、肺平滑筋細胞から単離したミトコンドリアにカルパスタチンが存在すると報告している [66, 67]。カルパスタチンがミトコンドリアに存在せず、ミトコンドリア μ -カルパインが ERp57 と相互作用していることから、少なくともカルパイン分子を取り巻く環境は、細胞質とミトコンドリアで大きく異なっていると考えられる。

ミトコンドリア DNA にコードされた数種類のタンパク質を除いて、ほとんどのミトコンドリアタンパク質は核 DNA にコードされ、細胞質で前駆体タンパク質が合成される。ミトコンドリアは、細胞質から前駆体タンパク質を取り込む精巧な機構をもち、ミトコンドリア各画分に特異的に導き、適切な高次構造を再構築させる。このプロセスには多くの因子が関与している。前駆体タンパク質をミトコンドリアへ輸送する細胞質分子シャペロン（Hsp70; heat shock protein 70、Hsp90）、前駆体の膜透過に関与する TOM（Translocase of the outer membrane）複合体および TIM 複合体（Translocase of the inner membrane）、外膜タンパク質の取り込みに関与する SAM（Protein sorting and assembly machinery）複合体、前駆体に含まれるミトコンドリア移行シグナルを切断・除去する

ミトコンドリアプロセッシングペプチダーゼ (mitochondrial processing peptidase; MPP)、ミトコンドリア分子シャペロン (膜間スペース; small TIM protein、マトリクス; Hsp60 および Hsp10) など、複雑かつ多彩な機構を介し、ミトコンドリアタンパク質が各ミトコンドリア画分へ輸送され機能している [68-72]。Small TIM protein はシャペロン様分子として機能し、膜間スペースを通過して疎水性前駆体を TOM 複合体から TIM 複合体へ輸送する [71]。Hsp60 や Hsp10 はマトリクスに存在し、前駆体タンパク質の高次構造を再構築する。ER でのタンパク質ジスルフィド結合の形成は複雑である。ERp57 などの PDI ファミリー分子のみが、ポリペプチドのフォールディング経路において律速段階を触媒している [73, 74]。

ERp57 は、Transporter associated with antigen processing (TAP)-tapasin 複合体と共役して、MHC (major histocompatibility complex) クラス I の免疫グロブリン H 鎖と結合し、免疫グロブリン H 鎖の分解を防ぐことにより MHC クラス I による抗原提示に寄与する [75, 76]。この機構と同様に、ERp57 は TOM や TIM 複合体などのタンパク質輸送装置と相互作用し、前駆体タンパク質の再構築とジスルフィド結合の構築を担っていると考えられる。ERp57 はミトコンドリア外膜に多く局在し、細胞質 ERp57 と明らかに分子形が異なること (図 3-4)、さらに細胞質 μ -および m-カルパインは ERp57 と相互作用していないことも示された (図 3-5)。PDI 阻害剤である DTNB および PAO を作用させると、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットの安定性が失われる (図 3-9)。これらの結果を総括すると、ミトコンドリア ERp57 はミトコンドリア μ -カルパインが細胞質から輸送された時、ジスルフィド結合の構築を介して、それが機能性タンパク質として機能するように、高次構造の再構築を行なっていると考えられる。おそらくフォールディングが外れた状態のミトコンドリア μ -カルパイン分子では、疎水性部分がむき出しになっており、その部位を ERp57 が認識して結合すると思われる。

最近、Badugu らによって、カルパイン 1 (μ -カルパイン大サブユニット) のアミノ

酸 N 末端に両親媒性の α -ヘリックスドメインが含まれ、共輸送機構 (piggyback import mechanism) によって、カルパイン小サブユニットは μ -カルパイン大サブユニットと共にミトコンドリア膜間スペースに輸送されることが報告された [77]。彼らは、 μ -カルパイン大サブユニットがミトコンドリアへ移行しても、その N 末端が切断されないことも示唆している。また Herrmann らは、膜間スペースに存在するタンパク質がそこに留まるには、フォールディングやジスルフィド結合の構築が必要であることを示唆している [78]。Badugu によってミトコンドリアへ移行すると提唱された細胞質 μ -カルパインと本研究で解析したミトコンドリア μ -カルパインが同一分子である場合、ミトコンドリア μ -カルパインが ERp57 と相互作用するという実験結果は、Herrman らの報告 [78] を強くサポートする。細胞質 μ -カルパインがミトコンドリアへ輸送され、そこでトラップされる一連の経路において、ミトコンドリア μ -カルパインが ERp57 と相互作用することは、ミトコンドリア μ -カルパインがミトコンドリアに留まり機能する上で重要な生理現象ではないだろうか。本研究で示した結果から、ミトコンドリア μ -カルパインの前駆体 (または細胞質 μ -カルパイン) が、TOM 複合体などの輸送装置を介してミトコンドリアへ移行し、ERp57 と結合することで、高次構造の再構築およびジスルフィド結合の形成が行なわれ、ミトコンドリア内で機能するようになると考えられる。

最近になって多くの研究者が AIF に注目するようになった。例えば、網膜桿体細胞が未知の機構で死ぬことにより網膜変性を起こし、失明に至る難病である網膜色素変性症に、AIF が関与していることが明らかとなった [79]。大寺ら [49] によると、AIF は N 末端の 101 アミノ酸残基を含む約 67 kDa 前駆体タンパク質として合成され、ミトコンドリアに輸送され約 62 kDa の成熟タンパク質として内膜に局在する。アポトーシス時には、約 57 kDa 切断型 AIF が細胞質へ遊離する。通常 AIF は膜間スペース側の内膜に埋め込まれており、限定分解を受けない限り可溶性タンパク質として遊離せず、アポトーシスを誘導しない。

本章で示したように、内在性 ERp57 結合型 μ -カルパインが Ca^{2+} 依存的に成熟 AIF (約 62 kDa) の限定分解を行ない、tAIF (約 57 kDa) を内膜から膜間スペースへ遊離させる。従って、内在性 ERp57 結合型 μ -カルパインはミトコンドリアを介したアポトーシス経路におけるイニシエーター (開始因子) として機能する。

最近 Cao らは、酸素およびグルコースを枯渇させた培養ニューロン、さらに一過性全脳虚血を誘導したラットモデルにおいて tAIF の遊離が観察され、その遊離には μ -カルパインが関わっていることを報告している [80]。それらの条件下で細胞質 μ -カルパインまたはミトコンドリア μ -カルパイン前駆体が活性化され、ミトコンドリア内膜へ移行し、AIF の限定分解と遊離を誘導することを示唆している。本研究では、既にミトコンドリアへ局在している内在性ミトコンドリア μ -カルパインが AIF を限定分解することを示した。Cao らの実験結果を考慮すると、酸素およびグルコースの枯渇時、および一過性脳虚血時において、内在性ミトコンドリア μ -カルパインが AIF を限定分解しうるが、細胞質からさらに μ -カルパインがミトコンドリアへ移行し、AIF の限定分解を促進することが考えられる。

本章図 3-9 では、PDI 阻害剤である DTNB および PAO を作用させることで、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットの分解が誘導され、T3 によっては何も影響を受けないことが示された。これら 3 種の PDI 阻害剤は、それぞれ作用機序が異なる [81]。DTNB はチオール基の S-S 結合に直接作用し、S-S 結合を切断する [59]。PAO は、 As^{43} を介して ERp57 などのタンパク質に含まれる CXXC モチーフの近接チオール基と配位結合を形成する [60]。甲状腺ホルモンである T3 は、T3 受容体と相同性のある PDI ファミリー分子にも結合し、その機能を弱く阻害する [61]。PDI ファミリーには T3 結合部位が 2 カ所存在し、1 つが高親和性で、もう 1 つが低親和性結合部位である。T3 はミトコンドリア μ -カルパインの分解を誘導しないことから、ERp57 にミトコンドリア μ -カルパインが結合することで、T3 の高親和性結合部位がブロックされ、T3 が ERp57

分子に結合できなかつたと考えられる。DTNB は、チオール基の S-S 結合に作用し PDI の機能を阻害するので、ミトコンドリア μ -カルパインに直接作用し分解を誘導する可能性が考えられる。DTNB は PAO や T3 よりも特異性が低いが、PAO は PDI ファミリー特有のモチーフである CXXC モチーフに結合しその機能を阻害する。カルパイン分子はその CXXC モチーフを有していないため、その影響を受けない可能性が高い。それに関わらず、PAO はミトコンドリア μ -カルパインの分解を誘導したことから、ERp57 の機能を阻害することでミトコンドリア μ -カルパインが分解されたことが示唆される。ERp57 は4つのチオレドキシソドメイン (abb'a') を有し、a および a'ドメインには触媒作用をもつ CGHC モチーフが含まれ、b および b'ドメインには触媒作用がない。ヒト ERp57 の b および b'ドメインの結晶構造から、カルネキシンやカルレティキュリンなどのレクチン様シャペロン分子との結合部位がそのドメインに存在することが想定できる [82]。ミトコンドリア μ -カルパインも同様にそのドメインを介して ERp57 と相互作用していると考えられる。従って、PAO は容易に ERp57 の CGHC モチーフと結合でき、その機能を阻害することが可能であると思われる。

本章では、ERp57 がミトコンドリア μ -カルパインと相互作用していること、ERp57 結合型ミトコンドリア μ -カルパインは AIF の限定分解を介してミトコンドリアアポトーシスシグナルを制御することが明らかとなった。ERp57 阻害剤を用いて、網膜色素変性症など各組織で観察される細胞死に伴う病変を抑制できる可能性がでてきた。

図3-1

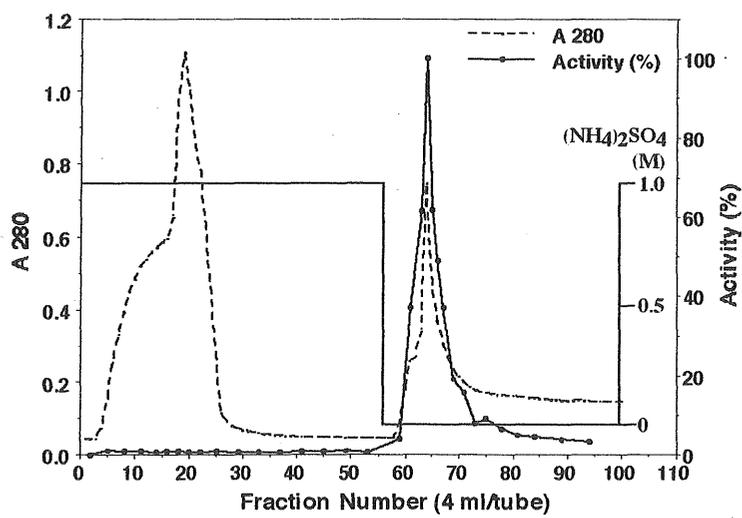


図3-1. ラット肝臓からのミトコンドリアカルパインの精製

実験方法の詳細は、本章第2節（実験材料および方法）に記載した。

Phenyl Sepharoseカラムクロマトグラフィー。硫酸を除くと、ミトコンドリアカルパインが溶出され、1つのカルパイン活性ピークがみられる。

図 3-2

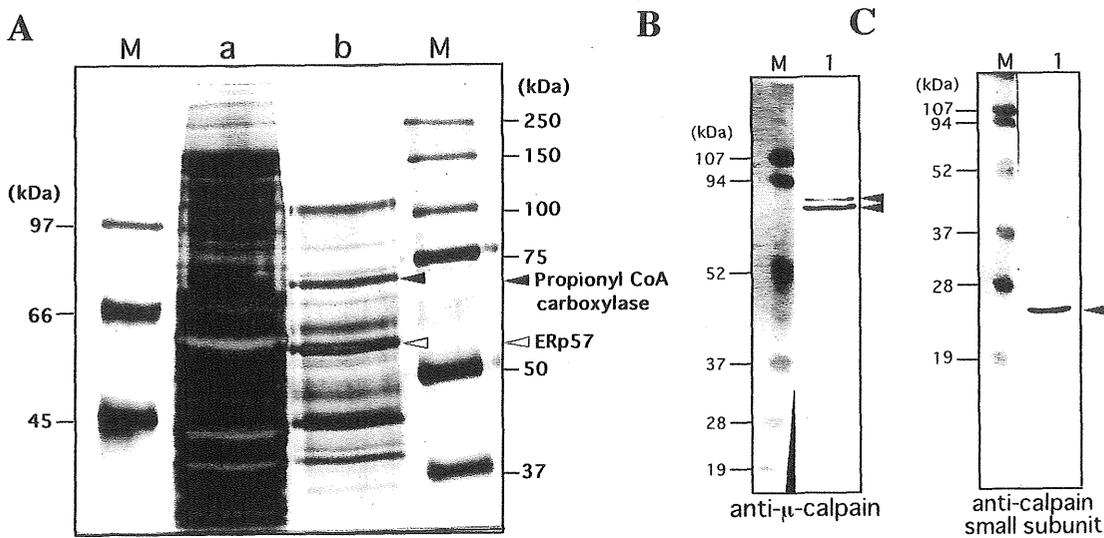


図 3-2. ミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品の SDS-PAGE、MALDI-TOFMS 解析およびウエスタンブロット解析

(A) SDS-PAGE (銀染色)。レーン a、ミトコンドリア膜間スペース (10 μ g) ; レーン b、ミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品 (2 μ g)。部分精製標品で観察される分子量約 50~80 kDa のバンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化し、MALDI-TOFMS 解析および PMF 法によるタンパク質の同定を行った。その結果 (図 3-3) から、Propionyl CoA carboxylase (黒矢頭) と ERp57 (白矢頭) が同定された。

(B) ミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品での μ -カルパイン (ドメイン IV) のウエスタンブロット解析。レーン 1、ミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品 (10 μ g)。ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットが検出される (黒矢頭)。

(C) ミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品でのカルパイン小サブユニットのウエスタンブロット解析。レーン 1、ミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品 (10 μ g)。ミトコンドリア μ -カルパイン小サブユニットが検出される (黒矢頭)。

図 3-3

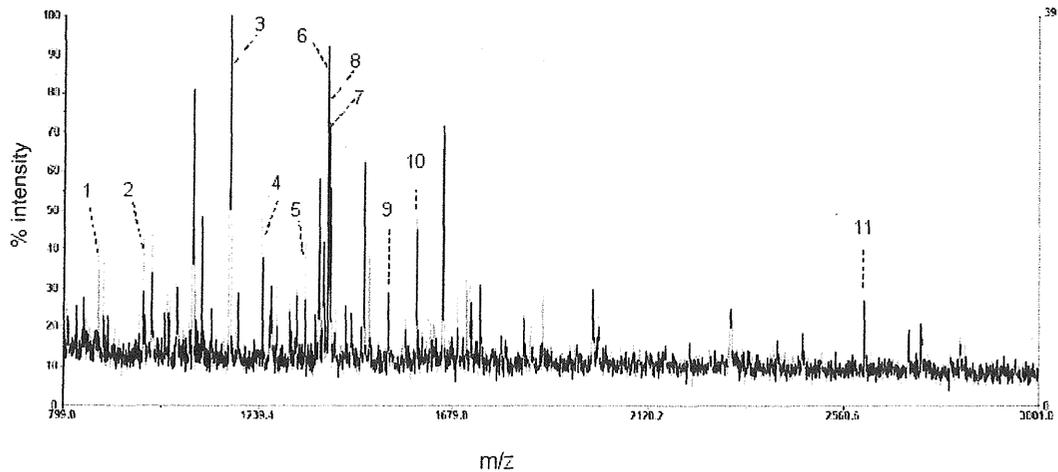


図 3-3. ミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品に含まれるタンパク質の MALDI-TOFMS 解析 実験方法の詳細は、本章第 2 節（実験材料および方法）に記載した。ミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品の銀染色ゲルで観察された分子量約 50~80 kDa のバンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化し、MALDI-TOF 型質量分析計にかけた。得られたペプチド情報を PMF 法により同定した（表 3-1）。

表 3-1

Peak No.	m/z Submitted	MH+ Matched	Delta ppm	Start	End	Missed Cleavages	Sequence
1	877.588	877.489	113	297	304	0	(K) LNFVAVSR(K)
2	997.705	997.5102	195	153	161	0	(K) DASVVGFFR(D)
3	1172.729	1172.5405	161	336	344	0	(K) FVMQEEFSR(D)
4	1244.833	1244.6634	136	184	194	0	(R) FAHTNVESLVK(E)
5	1341.856	1341.6838	128	449	460	0	(K) GFPTIYFSPANK(K)
6	1394.904	1394.6587	176	162	173	0	(R) DLFSGDGHSEFLK(A)
7	1396.905	1396.6955	150	367	379	0	(K) SEPIPETNEGPVK(V)
8	1397.923	1397.706	155	472	482	0	(R) ELNDFISYLQR(E)
9	1530.02	1529.7747	160	352	363	1	(R) FLQEYFDGNLKR(Y)
10	1594.113	1593.8483	166	483	496	0	(R) EATNPPIQEEKPK(K)
11	2605.654	2605.3144	130	306	329	0	(K) TFSHELSDFGLESTTGEIPVVAIR

表3-1. PMF法によるミトコンドリア μ -カルパイン部分精製標品に含まれるタンパク質の同定

MALDI-TOFMS解析で得られたペプチドをPMF法により解析したところ、11本のピークがラットERp57(分子量 56,624)と同定された。得られたペプチドはラットERp57の全アミノ酸配列の27%をカバーしており、平均誤差は152 ppmであった。

図3-4

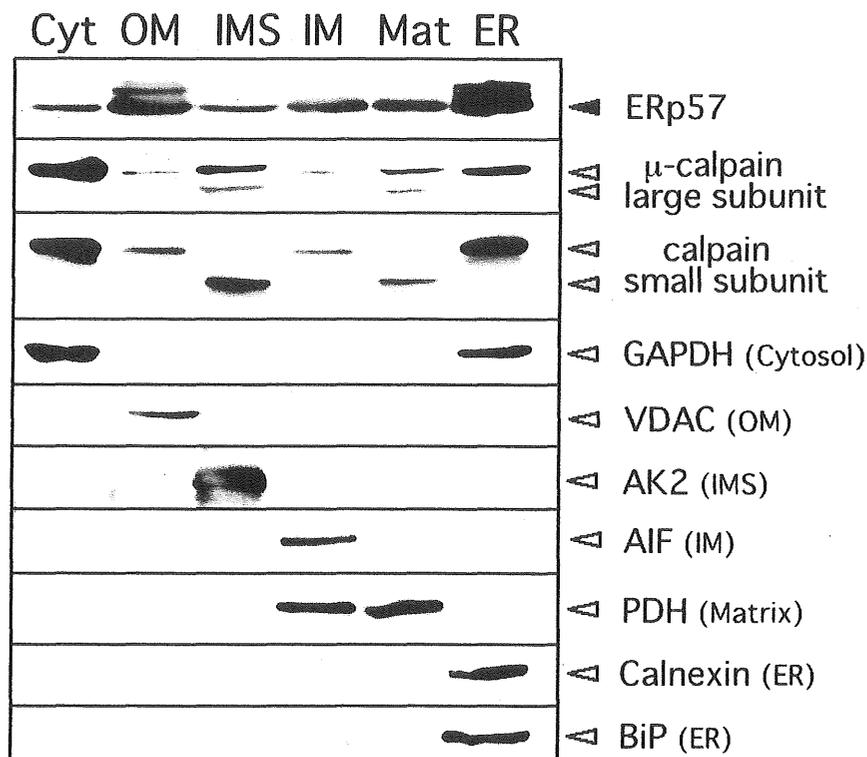


図3-4. ERp57のミトコンドリア局在

ラット肝臓ミトコンドリア各画分において ERp57 のウエスタンブロット解析を行った (5 μ g タンパク質/レーン)。ERp57 はミトコンドリア各画分に局在し、特にミトコンドリア外膜に多く存在する。ミトコンドリア μ -カルパイン大および小サブユニットは、主に膜間スペースおよびマトリクスに局在する (20 μ g タンパク質/レーン)。

各画分に特異的に局在するタンパク質をマーカーとして、それらに対する特異抗体を用いてウエスタンブロット解析を行い、各画分の純度を確認した。その結果、高純度のミトコンドリア画分が採れていることが確認され、細胞質および ER 局在タンパク質がミトコンドリア画分へ混入している可能性が排除された。

図 3-5

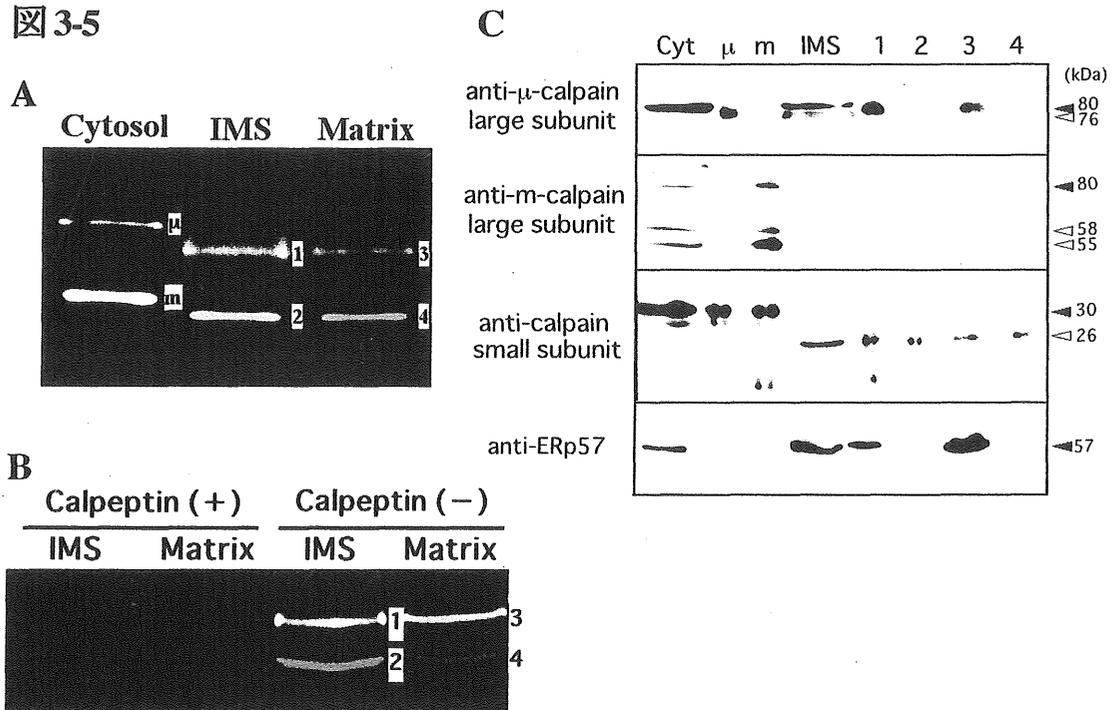


図 3-5. 細胞質およびミトコンドリアでのカゼインゼイモグラフィとウエスタンブロット解析

(A) 細胞質 μ -、 m -およびミトコンドリアカルパインのカゼインゼイモグラフィ。レーン1、ラット肝臓細胞質 (50 μ g) ; ミトコンドリア膜間スペース (100 μ g) ; マトリクス (100 μ g)。膜間スペースおよびマトリクスでは、上方のバンド (No, 1 と 3) と下方のバンド (No, 2 と 4) が検出され、いずれも細胞質 μ -および m -カルパインの移動度と異なる。(B) カルペプチン処理したミトコンドリアカルパインのカゼインゼイモグラム。カルペプチン処理により、膜間スペースおよびマトリクスでみられた活性バンドは消失する。(C) 活性バンドのウエスタンブロット解析。パネル上段から μ -カルパイン、 m -カルパイン、カルパイン小サブユニット、ERp57 に対する抗体。細胞質 μ -カルパインと上方のミトコンドリアカルパイン (バンド No, 1 と 3) は、 μ -カルパイン抗体に染まる。2種のミトコンドリアカルパインは、いずれも m -カルパイン抗体に反応しない。全ての活性バンドは、カルパイン小サブユニット抗体で染まる。上方のミトコンドリア μ -カルパイン (バンドNo, 1 と 3) のみが ERp57 抗体に染まる。

図 3-6

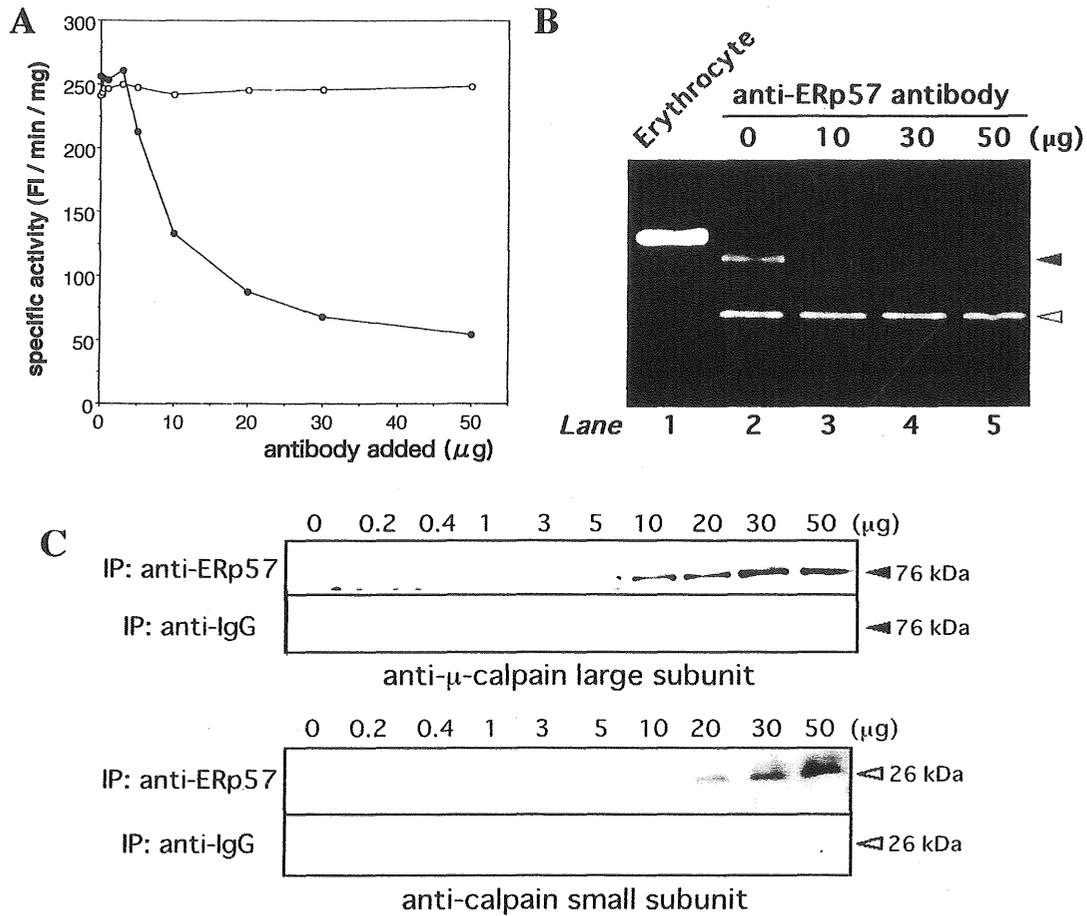


図 3-6. ERp57 抗体によるミトコンドリアμ-カルパインの免疫沈降

実験方法の詳細は、本章第 2 節 (実験材料および方法) に記載した。

(A) ERp57 抗体によるミトコンドリアカルパイン活性の免疫沈降。ERp57 抗体により最大約 75%のカルパイン活性が免疫沈降される(●)。正常ウサギ IgG は、ERp57 抗体の対照として用いた(○)。(B) ERp57 抗体存在下でのカゼインザイモグラフィー。ERp57 抗体量依存的にミトコンドリアμ-カルパインの活性バンド (黒矢頭) が減少するが、未知ミトコンドリアカルパインの活性バンドには影響しない (白矢頭)。(C) ERp57 抗体量依存的にミトコンドリアμ-カルパイン大サブユニット (黒矢頭) および小サブユニット (白矢頭) が共沈降される。正常ウサギ IgG は、ERp57 抗体の対照として用いた。

図 3-7

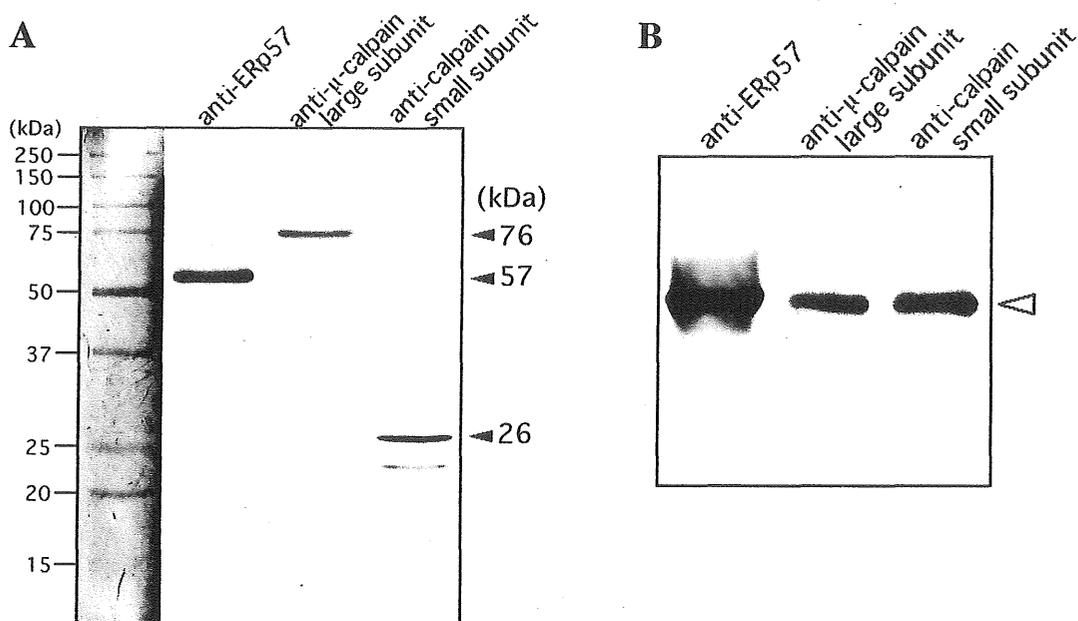


図 3-7. ERp57 とミトコンドリア μ -カルパインの相互作用

実験方法の詳細は、本章第 2 節（実験材料および方法）に記載した。

ERp57 抗体で免疫沈降した複合体に ERp57 ペプチド (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、複合体のみを遊離・回収し、SDS-PAGE および Native PAGE を行ない、ERp57、 μ -カルパインおよびカルパイン小サブユニット抗体を用いたウエスタンブロット解析を行なった。

(A) SDS-PAGE からのウエスタンブロット解析。免疫沈降物には、ERp57 (約 57 kDa)、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニット (約 76 kDa) および小サブユニット (約 26 kDa) が含まれる。

(B) Native PAGE からのウエスタンブロット解析により、ERp57、ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットおよび小サブユニットが同じ移動度であることが観察される (白矢頭)。

これらの結果から、ミトコンドリア μ -カルパインと ERp57 が複合体を形成し、共沈降することが解る。

図 3-8

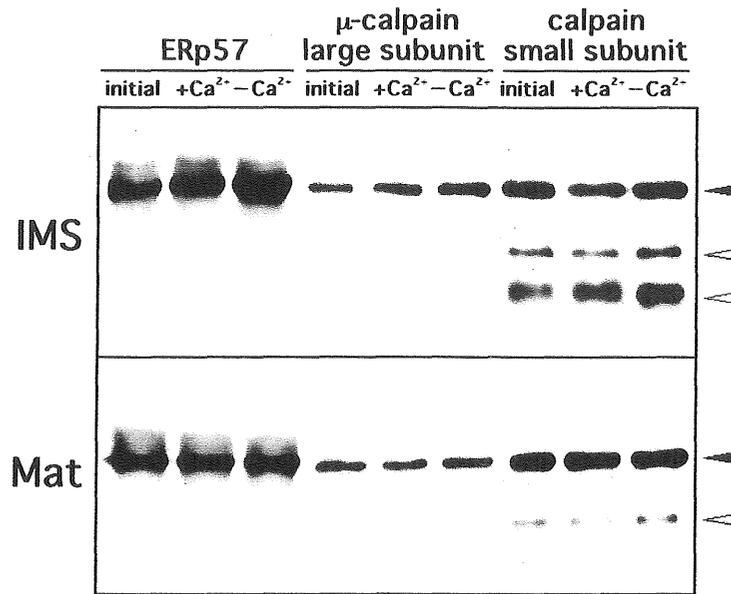


図 3-8. ミトコンドリアμ-カルパイン-ERp57 複合体に対する Ca²⁺の影響

カルペプチンを前処理し、Ca²⁺存在下および非存在下で 25°C、30 分間インキュベーションし、その後未変性ゲル電気泳動に展開し、ウエスタンブロット解析を行なった (50 μg タンパク質/レーン)。Ca²⁺の存在下および非存在下に関係なく ERp57、ミトコンドリアμ-カルパイン大サブユニットおよび小サブユニットが同じ移動度で検出される (黒矢頭)。その複合体は、Ca²⁺によって解離しないことが示唆される。

カルパイン小サブユニット抗体により 3つのバンドが検出される (右側 3レーン)。カゼインザイモグラフィーの結果 (図 3-5) と照らし合わせると、最も移動度が小さい上方バンド (黒矢頭) はミトコンドリアμ-カルパイン小サブユニット、中間のバンド (グレー矢頭) は未知のミトコンドリアカルパインの小サブユニット、最も移動度が大きい下方バンド (白矢頭) は単量体で存在するカルパイン小サブユニット、または他のカルパイン分子と結合している小サブユニットであると示唆される。

図3-9

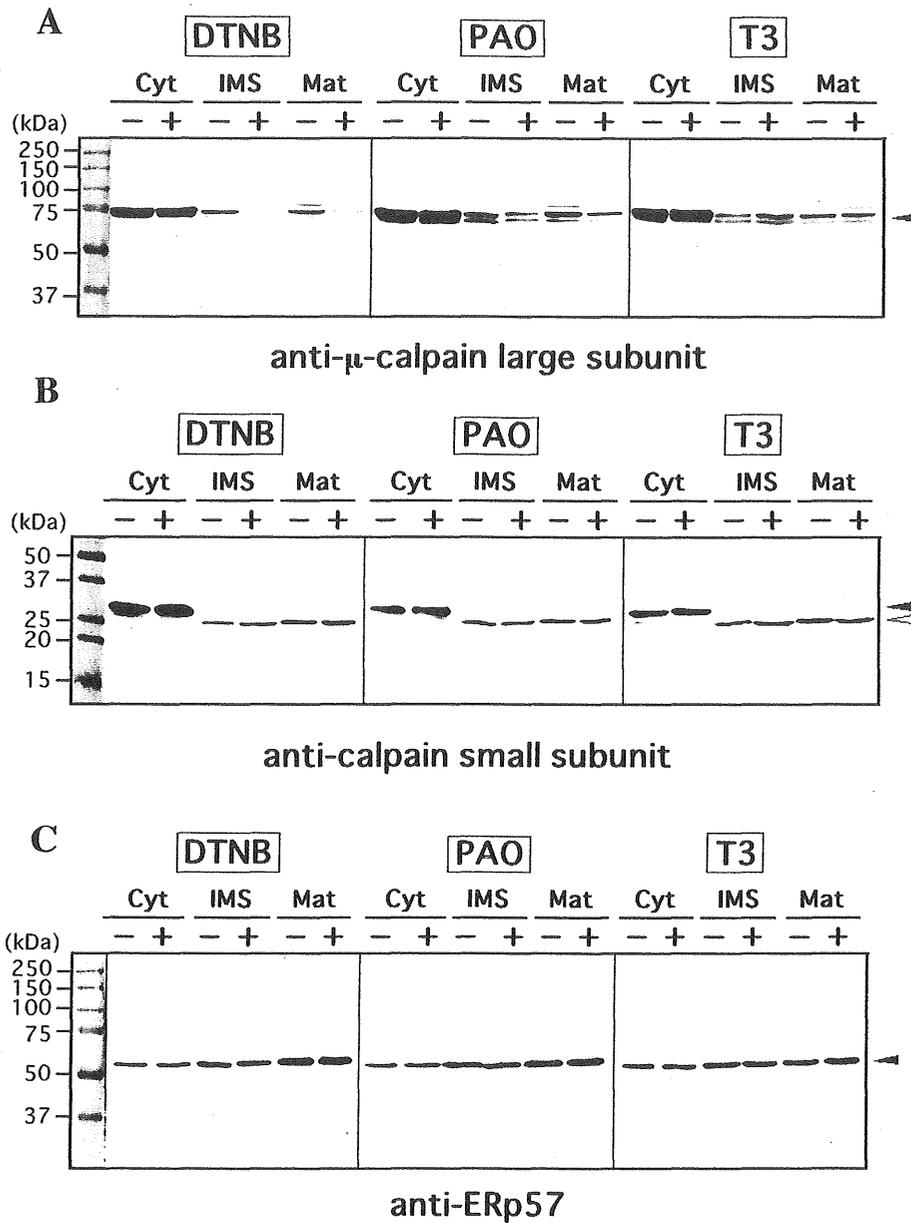


図3-9. PDI 阻害剤作用下でのミトコンドリア μ -カルパインの分解

細胞質、膜間スペース、マトリクス (40 μ g タンパク質/チューブ) に5 μ M カルペプチンを添加し、1 mM DTNB, PAO and T3 存在下および非存在下で、37°C、5 分間インキュベーションを行ない、各試料を μ -カルパイン大サブユニット (A)、カルパイン小サブユニット (B)、ERp57 (C) に対する各抗体を用いたウエスタンブロット解析にかけた。ミトコンドリア μ -カルパイン大サブユニットのみ、DTNB および PAO 作用下で分解され、T3 作用下では変化がない。

図3-10

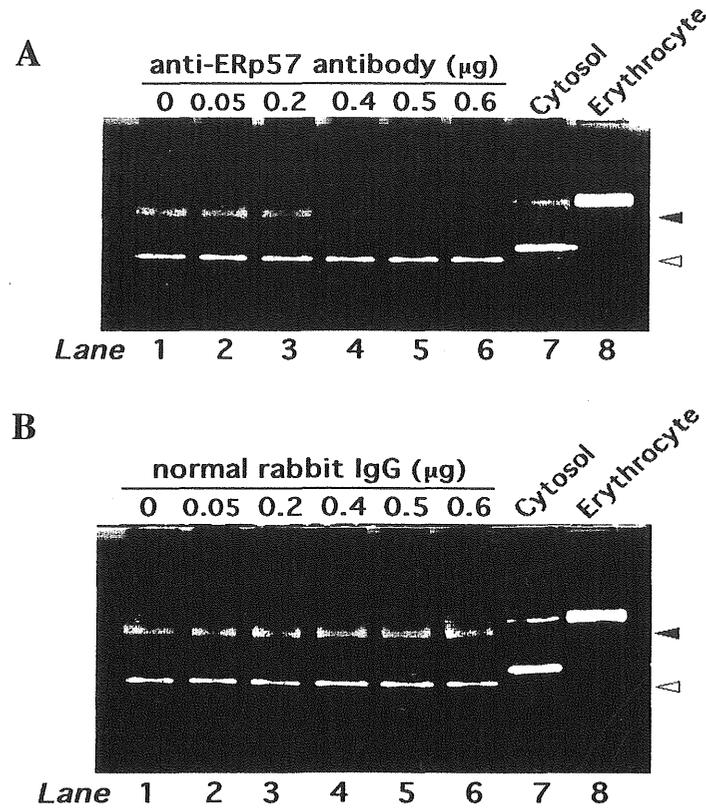


図3-10. ミトコンドリア μ -カルパイン活性に及ぼすERp57抗体の効果

(A) 膜間スペース (100 μg) にERp57抗体を各々0.05、0.2、0.4、0.5、0.6 μg 添加し、4°Cで2時間反応させ、カゼインザイモグラフィーにかけた。ミトコンドリア μ -カルパインの活性バンド (黒矢頭) の強度は、ERp57抗体量依存的に減少する。一方、未知なミトコンドリアカルパインの活性バンド (白矢頭) は、ERp57抗体の影響を全く受けない。

(B) 正常ウサギIgGを対照として用いたが、2種のミトコンドリアカルパイン活性に変化は見られない。

図 3-11

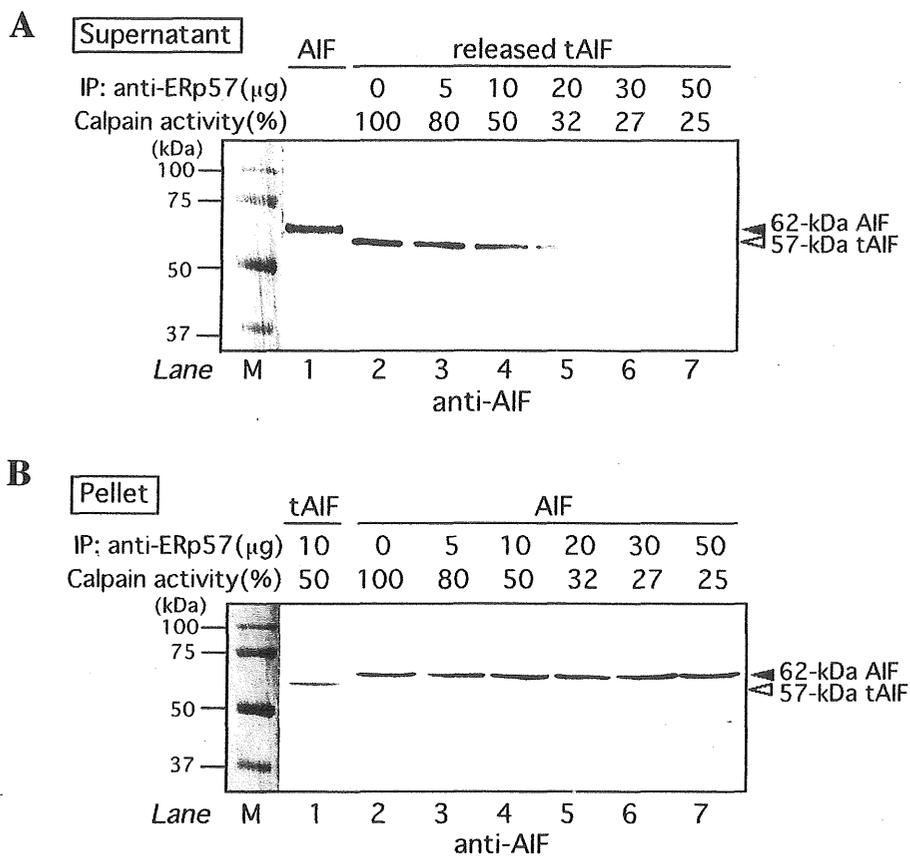


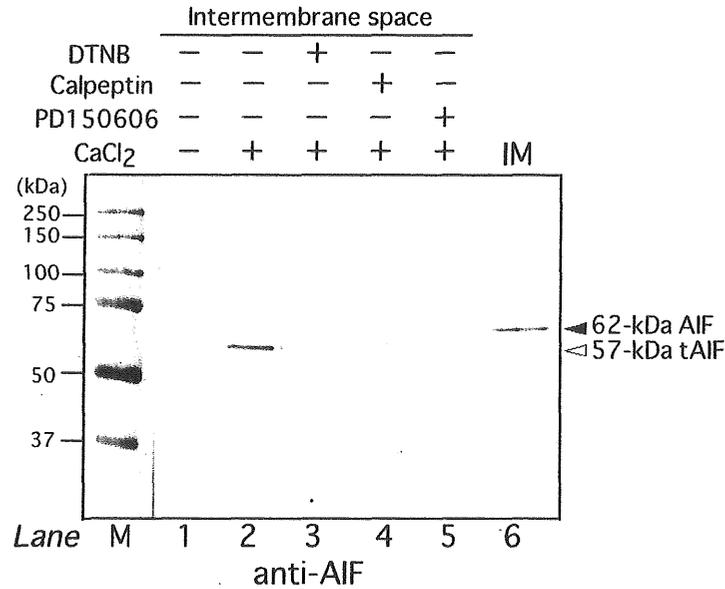
図 3-11. ERp57 結合型ミトコンドリア μ -カルパインによる AIF の限定分解

実験方法の詳細は、本章第 2 節（実験材料および方法）に記載した。

(A) ERp57 抗体を用いた免疫沈降により、抗体量依存的にミトコンドリア μ -カルパインが免疫沈降された（図 3-6）。免疫沈降によるミトコンドリアカルパイン活性の減少に伴い、AIF の限定分解および内膜からの遊離が抑制される。白矢頭は、内膜から遊離した 57 kDa tAIF を示す。

(B) 内膜結合型 AIF（黒矢頭）は、免疫沈降によるミトコンドリアカルパイン活性の減少に伴い、限定分解されず内膜に留まっている AIF の量がわずかに増える（回復される）。

C



(C) AIF の限定分解および内膜からの遊離における DTNB の阻害効果

単離したミトコンドリアを各条件下でインキュベーションし、その後膜間スペースを調製し、ウエスタンブロット解析に用いた (20 μg タンパク質/レーン)。レーン 1、Ca²⁺ 非存在下；レーン 2、Ca²⁺ 存在下；レーン 3、DTNB および Ca²⁺ 存在下；レーン 4、カルペプチンおよび Ca²⁺ 存在下；レーン 5、PD150606 および Ca²⁺ 存在下；レーン 6、内膜 (無処理)。Ca²⁺ 存在下で tAIF が膜間スペースへ遊離する (レーン 2)。DTNB は、その限定分解および遊離を抑制する (レーン 3)。カルパイン阻害剤であるカルペプチン および PD150606 では、tAIF の遊離が完全に抑制される。黒矢頭は約 62 kDa AIF、白矢頭は内膜から遊離した約 57 kDa tAIF を指す。

第4章

ミトコンドリア m-カルパインの同定と機能解析

第1節 緒言

第2章および3章では、ミトコンドリアカルパインが2種類存在し、その1種はミトコンドリア μ -カルパインであり、もう1種は未知のカルパイン分子であることを述べた。ミトコンドリア μ -カルパインは、ERp57 分子シャペロンと結合することで安定化され、さらに Ca^{2+} 濃度の上昇に伴い AIF を限定分解し、内膜から tAIF を遊離させる。未知のカルパイン分子は、 Ca^{2+} 依存的に活性化し、カルパイン阻害剤で抑制され、カルパイン小サブユニットをもち、カゼインザイモグラフィーで細胞質 μ -および m-カルパインと移動度が異なることが明らかとなった。

未知ミトコンドリアカルパインを同定し、その機能を解析することで、ミトコンドリアにおけるカルパインの役割の理解が飛躍的に発展することが期待される。

そこで本章では、カラムクロマトグラフィーおよび免疫沈降法により未知のミトコンドリアカルパインを精製し、LC-MS/MS 解析およびデータベース検索により未知のカルパインを同定した。またそれと相互作用する因子を同定し、その相互作用を検証した。さらに未知ミトコンドリアカルパインがミトコンドリア内でどのような役割を果たしているのかを、基質分子を探索することで調べた。

第2節 実験材料および方法

第2および3章で既述した実験方法は、省略する。

試薬は記載がない限り和光純薬（株）またはシグマ社の試薬特級を使用した。

(1) 使用した抗体

ウサギポリクローナル抗 m-カルパインドメイン I、III、IV 抗体 (Abcam)、抗カルパイン小サブユニット抗体 (ドメイン V ; Abcam)、抗VDAC 抗体 (Calbiochem)、抗AIF 抗体 (Abcam)、抗 Bax 抗体 (Abcam)、ヤギポリクローナル抗 VDAC-C 未抗体、シトクロム c 抗体、抗 GRP75-C 未抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を使用した。

(2) 未知ミトコンドリアカルパインの免疫沈降

記載がない限り、全ての実験操作を 0~4°Cで行った。ラット肝臓ミトコンドリア膜間スペースから DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより未知なミトコンドリアカルパイン (ピーク 1) を分離した (図 4-1B)。このカラムクロマトグラフィーは、第2章に既述した方法に従って行った。そのピーク 1 をバッファー C で一晚透析し、限外濾過濃縮した後、1.5 mL チューブに分注した (1.8 mg/mL; 1 mg/チューブ)。ウサギポリクローナル抗カルパイン小サブユニット抗体を 1 µg 添加し、2 時間攪拌した後、さらに Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech.) を 12 µL 添加し、2 時間攪拌した。12,000 rpm で 1 分間遠心分離し、上清を除き、沈殿を 1.0 mL の洗浄バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.5 M NaCl、0.1% emulphogen] で懸濁し、8,000 rpm で 30 秒間遠心分離した (この洗浄を 3 回繰り返した)。さらに 1.0 mL のミリ Q 水で 3 回洗浄した。SDS-PAGE 用 2 x サンプルバッファーを 10 µL 添加し、80°C で 5 分間ボイルした。12,000 rpm で 1 分間遠心分離し、上清を回収し SDS-PAGE にかき、銀染色を行っ

た。

(3) ペプチド溶液における脱塩操作

銀染色したタンパク質バンドをゲルから切り出し、第3章「実験材料および方法」で述べた方法に従って、ゲル内トリプシン消化を行った。ゲル片から回収したペプチドを Speed Vac にかけて濃縮乾燥し、0.1%トリフルオロ酢酸 20 μL で懸濁した。その試料から塩を除くため、ZipTip C18 (standard bed, Millipore) を使用し、脱塩操作を行った。P20 のマイクロピペットに ZipTip をつけ、50%アセトニトリルを吸い上げ、廃液用チューブに捨てた (5回繰り返す)。75%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸を吸い上げ、廃液用チューブに捨てた (5回繰り返す)。0.1%トリフルオロ酢酸を吸い上げ、廃液用のチューブに捨てた (5回繰り返す)。試料をゆっくりと 30 回ピペッティングし、樹脂に添着させた。0.1%トリフルオロ酢酸を吸い上げ、廃液用のチューブに捨てた (5回繰り返す)。500 μL チューブに 75%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸を 10 μL 加え、ペプチド試料を吸着させた ZipTip をそのチューブ内で 10 回ピペッティングし、樹脂から溶出させた。約 50°C で Speed Vac にかけて、濃縮乾燥させる。0.1%ギ酸を 20 μL ずつ加えて懸濁した。各試料をオートサンプラーバイアル瓶へ移し、キャップをはめた。バイアル瓶を日立液体クロマトグラフ質量分析計 (NanoFrontier LD; 日立ハイテクノロジー) に設置した。

(4) LC-MS/MS 解析

得られたペプチドは、日立液体クロマトグラフ質量分析計を使用し、LC-MS/MS 解析した。ゲル内トリプシン消化および脱塩操作を行ったペプチド溶液 (0.1%ギ酸に懸濁) を、C18 キャピラリーカラム (75 mm x 100 mm; GL Science) に添加した。キャピラリーカラムに吸着したペプチドは、A 液 (2%アセトニトリル/0.1%ギ酸) および B

液 (98%アセトニトリル/0.1%ギ酸) を用いたリニアグラジエント法で溶出した。流速は 200 nL/分に設定した。2-40%B 液を 60 分間、100%B 液を 20 分間順に流すことで、グラジエントをかけた。リニアグラジエント法によりペプチドがキャピラリーカラムから溶出され、そのマスマスペクトロメトリーを NanoFrontier LD マスマスペクトロメーターで行った。MS 閾値は 50~に、MS_n は 100~に設定した。100~2000 の Mass Range で全ての測定を行った。3 回 MS/MS にかけたイオンを排除するよう設定した。MS/MS 実験は、分離幅を 8 Hz、衝突エネルギーを 1~1.5V、活性化時間を 5 に設定した。

(5) データベース検索によるタンパク質の同定

LC-MS/MS 解析で得られた MS/MS ピークリストから、PEAKS Studio (Infocom) を用いて NCBI データベースを基に *de novo* シーケンシングとデータベース解析を行った。*de novo* シーケンシングでは、MS/MS 解析から得られたイオンの質量をもとに、ペプチドのアミノ酸配列を算出する。データベースを全く使用しないので、データベースに登録されていない配列の解析も可能である。PEAKS Studio でのデータベース解析では、*de novo* シーケンシング結果を利用し、あらかじめ候補となるタンパク質を絞り込むため、従来のデータベース解析ソフトウェアと異なり、誤ったタンパク質同定を低く抑えることが可能である。ペプチド断片の中に、トリプシン分解されない切断部位を 2 箇所まで含むことを許容するよう設定した。システイン残基の Carbamidomethylation が誘導されていなくても、誘導されていても、データベース解析するよう設定した。プレカーサーイオンの許容誤差範囲を 0.5、フラグメントイオンの誤差範囲を 0.5 に設定した。さらに +2 および +3 にチャージしたプレカーサーイオンを解析するよう設定した。

(6) ミトコンドリア内在性 m-カルパインによる VDAC 切断

ミトコンドリア m-カルパインが VDAC を基質としているのか検討した。DEAE-

Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーにより部分精製したミトコンドリア m-カルパインを、ラット肝臓から調製したミトコンドリア内膜に添加した。Ca²⁺存在下および非存在下で、37°C、1 時間インキュベーションを行い、終濃度 1 mM EGTA を作用させ反応を停止した。Ca²⁺濃度は 0~1 mM の範囲でとった。各内膜サンプル (20 µg/レーン) をウエスタンブロット解析し、VDAC の変化を観察した。また、カルパイン特異的阻害剤である PD150606 を終濃度 10 mM となるように部分精製したミトコンドリア m-カルパインに添加した後、同様の実験を行い、VDAC 切断に及ぼす効果を観察した。ミトコンドリア m-カルパインの対照として、ミトコンドリアµ-カルパイン (DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーでの活性ピーク) を用いた。

(7) 単離ミトコンドリアでの m-カルパイン活性化、VDAC 切断、AIF およびシトクロム c の遊離

本節「実験結果」に示すが、ミトコンドリア m-カルパインが VDAC を限定分解することが解った。そこでミトコンドリア m-カルパインによる VDAC 切断が単離ミトコンドリアでも誘導されるのか確認した。同時にミトコンドリア m-カルパイン活性化に伴う自己分解、ミトコンドリアからの AIF とシトクロム c の遊離も観察した。

ラット肝臓から単離したミトコンドリアを懸濁用バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.25 M sucrose、5 mM 2-mercaptoethanol] で懸濁した。各濃度 (0~1 mM) の CaCl₂ を添加し、さらにµ-およびm-カルパインを除いた細胞質画分 (9.2 mg/mL) を添加した。37°C で 1 時間インキュベートした後、5 mM EGTA を添加し反応を停止させた。4,500 x g で 10 分間遠心分離し、上清を回収し、沈殿のミトコンドリア画分を第 2 章に既述した方法に従い、外膜、膜間スペース、内膜、マトリクスに分離した。膜間スペースにおけるミトコンドリア m-カルパインの活性化/自己分解、外膜における VDAC の限定分解、ミトコンドリア外に遊離した AIF とシトクロム c をウエスタンブロット解析により観

察した。ウエスタンブロット解析では、m-calpain 抗体では膜間スペースタンパク質 (40 μg /レーン)、VDAC 抗体では外膜タンパク質 (20 μg /レーン)、VDAC および AIF 抗体ではミトコンドリア上清タンパク質 (20 μg /レーン) を使用した。

(8) カルパイン阻害剤、VDAC/Bax 抗体による AIF およびシトクロム c 遊離阻害

Ca^{2+} 依存的にミトコンドリア m-カルパインが VDAC を切断することが、単離ミトコンドリアを用いた実験で確認された (本節「実験結果」に示す)。この VDAC の限定分解が AIF の遊離に影響を及ぼすのか確かめるため、以下の実験を組んだ。

ラット肝臓から単離したミトコンドリアを懸濁用バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.25 M sucrose、5 mM 2-mercaptoethanol] で懸濁した。終濃度 50 μM Ca^{2+} を作用させ、37°C で 30 分間インキュベートすることによりミトコンドリア μ -カルパインのみを活性化させ AIF 切断を誘導した。内膜から膜間スペースに tAIF が遊離したことは、ウエスタンブロット解析により確認した (40 μg タンパク質/レーン)。内膜から tAIF が遊離した状態でミトコンドリア m-カルパイン活性化を誘導するため、終濃度 1 mM Ca^{2+} を作用させ、 μ -および m-カルパインを除いた細胞質画分 (9.2 mg/mL) を添加した。対照サンプル 1 には、 Ca^{2+} を加える前に終濃度 10 μM PD150606 を作用させ、4°C で 60 分間静置した。また対照サンプル 2 および 3 には、Ott らの方法に若干の修正を加えた方法に従って、 Ca^{2+} を加える前に各々抗 VDAC 抗体および抗 Bax 抗体を加え、4°C で 60 分間攪拌した。各サンプルを 37°C で 30 分間インキュベートした後、5 mM EGTA を添加し反応を停止させた。4,500 x g で 10 分間遠心分離し、上清を回収し、沈殿のミトコンドリア画分は、第 2 章に記述した方法に従い外膜、膜間スペース、内膜、マトリクスに分離した。ミトコンドリア外に遊離した tAIF とシトクロム c、ミトコンドリア膜間スペースに留まった tAIF、内膜に留まったシトクロム c はウエスタンブロット解析により観察した (40 μg タンパク質/レーン)。

第3節 実験結果

(1) 未知ミトコンドリアカルパインの存在

ミトコンドリア膜間スペースを用いたカゼインザイモグラフィーにより、2つの活性バンドが観察された (図 4-1A)。移動の小さい上方の活性バンド (黒矢頭) は、ERp57 作用下で消失することから (レーン 3)、ミトコンドリア μ -カルパインの活性バンドだと示された。第3章の実験結果 (図 3-5) で示したように、移動度の大きいバンド (白矢頭) は、 Ca^{2+} 依存的に活性化され、カルペプチンで阻害され、カルパイン小サブユニット抗体に反応することから、未知のカルパイン分子であると示唆された。この未知なミトコンドリアカルパイン (白矢頭) を同定するため、カラムクロマトグラフィーおよび免疫沈降法によりそれを精製しようと試みた。

(2) 未知ミトコンドリアカルパインの分離

まず未知なカルパイン分子とミトコンドリア μ -カルパインを分離するため、ミトコンドリア膜間スペースを用いて DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーを行った (図 4-1B)。バッファーC (50 mM NaCl を含む) で未吸着タンパク質を溶出した後、50~250 mM NaCl のリニアグラジエント法により吸着タンパク質を溶出した。その結果、未吸着画分に1つの大きな活性ピーク (ピーク 1)、吸着画分には、約 130 mM NaCl 時に小さな活性ピーク (ピーク 2)、約 150 mM NaCl 時に大きな活性ピーク (ピーク 3)、約 200 mM NaCl 時に小さなピーク (ピーク 4) がそれぞれ分離・溶出された。

分離された4つのピークのうち、どのピークに未知カルパインが含まれているのかを確かめるため、ウエスタンブロット解析を行い (図 4-2A)、さらにカルパイン活性における Ca^{2+} 依存性とカルパイン阻害剤に対する感受性を確かめた (図 4-2B)。 μ -カルパイン抗体を用いたウエスタンブロット解析により、ピーク 2 および 3 (レーン P2 および

P3) でバンドが検出された。カルパイン小サブユニット抗体では、ピーク 1、2 および 3 (レーン P1、P2 および P3)、ERp57 抗体では、ピーク 3 のみバンドが検出された。カルパイン 10 抗体では、どのピークにおいてもバンドが検出されなかった。この結果から、ピーク 2 には μ -カルパイン、ピーク 3 には μ -カルパインと ERp57 が含まれていることが示唆された。

続いて各ピークにおけるカルパイン活性の Ca^{2+} 依存性とカルパイン阻害剤に対する感受性を調べた (図 4-2B)。ピーク 1 と 2 は Ca^{2+} 依存性があり、カルパイン阻害剤であるカルペプチンおよび PD150606 によって強く阻害された。ピーク 3 は Ca^{2+} 依存性が約 60% であり、PD150606 による阻害効果が約 40% と低かった。このため、ピーク 3 には μ -カルパインの他にもカルパイン以外のプロテアーゼが含まれていることが示唆された。ピーク 4 は Ca^{2+} 依存性がないにも関わらず、カルペプチンにより強く、PD150606 により約 60% 抑制された。よってカルペプチンに感受性が高く Ca^{2+} 依存性がないため、ピーク 4 にはカルパイン以外のプロテアーゼが含まれていると示唆された。

図 4-2A および 2B の結果から、DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーで分離した各活性ピークにおいて、ピーク 1 には未知のカルパイン分子、ピーク 2 には μ -カルパイン、ピーク 3 には ERp57 結合型 μ -カルパイン、ピーク 4 にはカルパイン以外のプロテアーゼが含まれていることが示された (図 4-2C)。

(3) 未知ミトコンドリアカルパインの免疫沈降と SDS-PAGE 解析

DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィー未吸着画分におけるピーク 1 に、未知なミトコンドリアカルパインが含まれ、さらにカルパイン小サブユニットとヘテロダイマーを形成していることが示唆された。そこで、カルパイン小サブユニット抗体を用いてピーク 1 から未知ミトコンドリアカルパインを免疫沈降しようと試みた。免疫沈降サンプルを SDS-PAGE 展開し、銀染色を行った (図 4-3)。IgG の重鎖および軽鎖を

除いて、約 8 本のバンドが検出された。未知ミトコンドリアカルパイン大サブユニットと思われる分子量約 75 kDa に顕著なバンドがみられた (白矢頭)。

(4) 未知ミトコンドリアカルパインの同定

約 75 kDa バンドとその他の銀染色バンドに含まれるタンパク質を同定するため、切り出した各バンドをゲル内トリプシン消化し、各ペプチド断片を LC-MS/MS 解析にかけ、その結果をデータベース検索した。その結果 75-kDa バンド (白矢頭) からは、カルパイン 2 (m-カルパイン大サブユニット) およびミトコンドリア特異的シャペロン分子である GRP75 が同定された (表 4-1)。また予備実験から、カゼインザイモグラフィにおける未知ミトコンドリアカルパインの活性バンド (図 4-1A、白矢頭) からも、GRP75 が同定された。これらの結果から、同定されたミトコンドリアカルパインと GRP75 が相互作用していることが示唆された。

カルパイン 2 のアミノ酸配列と相同性の高いペプチドは、ドメイン III (64%, 15%) およびドメイン IV (98%) に含まれており、データの信憑性を示す MS スコアは 93% と高い値であった (表 4-2)。

分子量約 75 kDa バンド以外のバンドからは、Carbamoyl-phosphate synthetase 1 (P160-200, P140, P125)、Glutamate oxaloacetate transaminase 2 (P40)、IgG (P35)、Electron transferring flavoprotein (P30) が同定された (図 4-4)。しかし、GRP75 シャペロン分子のように、ミトコンドリアカルパインと相互作用する可能性がある分子は同定されなかった。

(5) 同定されたミトコンドリアカルパインのウエスタンブロット解析

同定されたミトコンドリアカルパインが m-カルパイン抗体に反応するのか、m-カルパインのドメイン I、III、IV に対する各抗体を用いたウエスタンブロット解析により確認した (図 4-5A)。同定されたミトコンドリアカルパイン (部分精製標品) は、m-カル

パインドメイン I と IV 抗体には染まったが、ドメイン III 抗体には反応しなかった。未知なミトコンドリアカルパインが m-カルパイン抗体で検出されたことから、ミトコンドリア m-カルパインと名付けた。このミトコンドリア m-カルパインは、細胞質 m-カルパインと相同性を有するが、ドメイン III 抗体に反応しなかったことから、一部のアミノ酸配列が異なっていることが示唆された。

m-カルパインドメイン IV 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、ミトコンドリア m-カルパインのミトコンドリア内局在を調べた (図 4-5B)。ミトコンドリア m-カルパインは、外膜、膜間スペース、マトリクスに局在しており、特に外膜に多く局在していた。

(6) ミトコンドリア m-カルパインの Ca^{2+} 依存性

ミトコンドリア m-カルパインの部分精製標品をカゼインゼイモグラフィーにかけて、活性バンドの位置を確認した (図 4-6A)。ミトコンドリア m-カルパインを流したレーン (レーン 2) には、細胞質 μ -および m-カルパインと異なる位置に活性バンドが観察され、図 4-1A で予想していた活性バンドの位置と一致した。

ミトコンドリア m-カルパインの活性化における Ca^{2+} 依存性をみたところ、 $300 \mu\text{M Ca}^{2+}$ で 60%の活性化が起こり、細胞質 m-カルパインとほぼ同じ Ca^{2+} 依存性を示した (図 4-6B)。

(7) ミトコンドリア m-カルパインと GRP75 との相互作用

DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーおよび免疫沈降により、ミトコンドリア m-カルパインを部分精製し、LC-MS/MS 解析およびデータベース検索した結果、m-カルパイン大サブユニット (カルパイン 2) の他に GRP75 が同定された (表 4-1)。GRP75 はミトコンドリア特異的に存在し、Cation 依存性 ATPase 活性をもちシャペロン

分子として機能している [83]。Heat shock protein 70 (HSP70) family に属し、タンパク質の膜透過の介助 [84, 85]、タンパク質高次構造の再構築 [86]、活性タンパク質-調節タンパク質の相互作用の調節および異常タンパク質分解の介助 [87] などに寄与している。

GRP75 のミトコンドリア分布をウエスタンブロット解析により確かめたところ、外膜、膜間スペース、内膜、マトリクスの全てのミトコンドリア画分に局在した (図 4-7A)。

GRP75 は通常分子シャペロンとして機能しており、ミトコンドリア m-カルパインと結合している可能性が考えられたため、免疫沈降法およびウエスタンブロット解析により調べた (図 4-7B および 6C)。まず膜間スペースにおいて GRP75 抗体を用いて免疫沈降を行ない、m-カルパイン大サブユニットおよび小サブユニット抗体で検出されるかを調べた (図 4-7B)。その結果、免疫沈降サンプルにおいて約 75 kDa m-カルパイン大サブユニット (白矢頭) と約 28 kDa 小サブユニット (黒矢頭) が検出された。

続いて、膜間スペースにおいて m-カルパイン (ドメイン IV) 抗体を用いて免疫沈降を行ない、GRP75 抗体で検出されるか確認した (図 4-7C)。免疫沈降サンプルにおいて、GRP75 を示す約 75 kDa バンドが検出された。これらの結果から、ミトコンドリア m-カルパインと GRP75 が相互作用していることが示された。

(8) ミトコンドリア m-カルパインの基質分子の探索

図 4-1~図 4-7 の結果から、ミトコンドリアに局在する μ -カルパイン以外のカルパイン分子は m-カルパインに相同性のある分子であること、 Ca^{2+} 依存性も細胞質 m-カルパインと非常に類似していること、カゼインゼイモグラフィーでは細胞質 μ -および m-カルパインと異なる位置に活性バンドが検出されること、ミトコンドリア外膜と膜間スペースに多く局在すること、GRP75 と結合して存在していることなどが明らかとなった。

そこで、ミトコンドリア m-カルパインがミトコンドリア内で何を基質として機能しているか同定することは、最も重要かつ興味深い研究課題として挙げられる。最初の候

補分子として、以前から注目している VDAC を基質分子の候補に絞った。予備実験において、単離ミトコンドリアに Ca^{2+} を作用させると、VDAC が切断され、分子として減少するのがウエスタンブロット解析から示された。この Ca^{2+} 依存的な VDAC の変化に、ミトコンドリア m-カルパインが関与しているか調べた。

VDAC はヌクレオチド [88]、 Ca^{2+} とその他のイオン [89]、代謝産物 [90] などを通す（細胞質とミトコンドリア間で）だけでなく、アポトーシス時には Bax と結合することで大きな孔を外膜内に形成し [91]、シトクロム c などのアポトーシス誘導因子を膜間スペースから細胞質へ遊離させる。すなわち VDAC は、細胞の生と死を司る因子として知られている [92]。

図 3-4 から、VDAC はミトコンドリア外膜に特異的に局在することが示された。まずミトコンドリア外膜に部分精製したミトコンドリア m-カルパイン（DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーのピーク 1）とその対照としてミトコンドリア μ -カルパイン（ピーク 2 および 3）を作用させ、 Ca^{2+} 存在下および非存在下でインキュベーションを行なった。続いて、VDAC の変化をウエスタンブロット解析により確かめた（図 4-8）。 Ca^{2+} 存在下および非存在下で外膜のみをインキュベーションしても、VDAC に変化は見られなかった（レーン 2 および 3）。 Ca^{2+} 非存在下で外膜にミトコンドリア m-カルパイン（ピーク 1）を作用させても、VDAC に変化はなかった（レーン 4）。 Ca^{2+} 存在下ではミトコンドリア m-カルパインのタンパク質量依存的に VDAC が切断されてバンドが弱くなった（レーン 6 および 7）。このミトコンドリア m-カルパインによる Ca^{2+} 依存的な VDAC 切断は、カルパイン特異的な阻害剤である PD150606 で強く阻害された（レーン 8）。一方、 Ca^{2+} 存在下でミトコンドリア μ -カルパイン（ピーク 2 および 3）を作用させても VDAC の変化は起こらなかった（レーン 5）。また予備実験により、細胞質 μ -および m-カルパインは VDAC 切断を誘導しないことが解った。これらの結果から、VDAC は Ca^{2+} 依存的にミトコンドリア m-カルパインにより特異的に切断されることが

示された。

(9) 単離ミトコンドリアでのVDAC切断およびtAIF/シトクロムcの遊離

図4-8では、VDAC分子に対し過剰量のミトコンドリア m-カルパインを作用させ、その分解を誘導したが、単離ミトコンドリアにおいてもミトコンドリア m-カルパイン活性化に伴い、VDACの切断が誘導されるのか検討した(図4-9Aおよび9B)。それと同時に単離ミトコンドリアからtAIFとシトクロムcが遊離するの観察した(図4-9Cおよび9D)。

ミトコンドリア m-カルパインはCa²⁺濃度依存的に活性化され、Ca²⁺濃度100 μM以上の条件で、自己分解産物と思われるバンドが約40 kDaに見られた(図4-9A)。PD150606作用下では、ミトコンドリア m-カルパインの自己分解が阻害された(レーン9)。

VDACはCa²⁺濃度依存的に切断され、Ca²⁺濃度250 μM以上の条件で、分解産物を示すバンドが約23 kDaに見られた(図4-9B)。その切断はカルパイン阻害剤PD150606で完全に阻害された(レーン9)。

ミトコンドリアからのtAIFの遊離は、Ca²⁺濃度20 μM以上で以降Ca²⁺濃度依存的に誘導され、その遊離はPD150606で抑制された(図4-9C)。

ミトコンドリアからのシトクロムcの放出は、Ca²⁺濃度20 μM以上でCa²⁺濃度依存的に誘導された(図4-9D)。しかし、その放出はPD150606作用下でも阻害されなかった(レーン9)。

これらの結果から、単離ミトコンドリアにおいて、ミトコンドリア m-カルパインはCa²⁺依存的に活性化し自己分解が誘導すること、VDACはCa²⁺依存的に切断されるが、その切断はカルパイン阻害剤で抑制されること、tAIFおよびシトクロムcの放出はCa²⁺依存的に誘導されること、tAIFの遊離のみカルパイン阻害剤で抑制されること、などが示された。

図4-9では、単離ミトコンドリアに細胞質画分を加えてCa²⁺インキュベートしたので、対照実験として細胞質画分を加えずに同様の実験を行った。この予備実験においても、ミトコンドリア m-カルパインはCa²⁺濃度依存的に活性化され、自己分解産物が約40 kDa付近に見られた(図4-10A)。さらにVDACはCa²⁺濃度依存的に切断され、その分解産物が約23 kDaに観察され、その切断はPD150606で阻害された(図4-10B)。一方tAIFとシトクロムcは、細胞質画分を作用させないと遊離しないことが示された(図4-10C、10D)。

(10) tAIF/シトクロムc遊離に対するミトコンドリアカルパイン、VDACおよびBaxの寄与

細胞質に存在するBid、Bax、Bakなどがミトコンドリア外膜に移行しミトコンドリア依存的アポトーシスを誘導することは、一般的に知られている。予備実験の結果から、それらが存在しない状態では、m-カルパインがVDACを切断しても、tAIFとシトクロムcの遊離を誘導しないと示唆される。一方でm-カルパインがVDACを切断することでVDACとBaxとの相互作用が促進され、tAIFとシトクロムcの遊離を促進することも考えられる。

しかしながら、Ca²⁺依存的なミトコンドリアからのtAIFの遊離が、ミトコンドリアm-カルパイン活性化とVDAC切断に伴う現象なのか、図4-9で証明できた訳ではない。そこで、まずtAIFがVDACを介してミトコンドリアから遊離するのか確かめた(図4-11)。

単離ミトコンドリアに50 μMのCa²⁺を作用させ、ミトコンドリアm-カルパインのみを活性化させAIFの切断および内膜から膜間スペースへの遊離を誘導した(図4-11A)。この時細胞質画分は存在しないので、ミトコンドリア外へtAIFおよびシトクロムcが遊離しない。tAIFを膜間スペースに遊離させた状態で、1 mM Ca²⁺を作用させミトコン

ドリア m-カルパインを活性化させた。それに伴って、tAIF およびシトクロム c がミトコンドリア外へ遊離するかどうか観察した (図 4-11B および 11D)。同時にそれらがどこを通過して細胞質へ遊離するのか調べるため、VDAC 抗体および Bax 抗体を作用させ、それらを特異的に阻害した状態で同様の実験を行った。

ミトコンドリア外へ遊離した tAIF をウエスタンブロット解析した結果 (図 4-11B)、細胞質画分が存在しなければ tAIF の遊離は見られないが (レーン 1)、細胞質画分存在下では顕著に tAIF の遊離が観察された (レーン 2)。その tAIF の遊離をカルパイン阻害剤 PD150606 が抑制し (レーン 3)、VDAC 抗体作用下でも抑制された (レーン 4)。膜間スペースに存在した (残存した) tAIF の相対量をみた結果 (図 4-11C)、細胞質画分を加え遊離させたレーン (レーン 2) ではバンドが減少しており、ミトコンドリア外へ遊離されたことが示された。PD150606 および VDAC 抗体を作用させたレーン (レーン 3 および 4) では、細胞質画分非存在下 (レーン 1) よりややバンドが弱い程度で、遊離が抑制されていることが示された。

同様に、シトクロム c の遊離をウエスタンブロット法により解析した (図 4-11D)。tAIF と同様に細胞質画分が存在しなければシトクロム c 遊離は観察されなかったが (レーン 1)、細胞質画分存在下では顕著に遊離するのが確認された (レーン 2)。この遊離は、PD150606 および VDAC 抗体では抑制されなかった (レーン 3 および 4)。しかし Bax 抗体を作用することで、その遊離が強く抑制された (レーン 5)。内膜に局在したままの残存シトクロム c を調べた結果 (図 4-11E)、サンプル間で大きな差はみられないが、図 4-11D で遊離が観察された細胞質画分存在下 (レーン 2)、細胞質/PD150606 存在下 (レーン 3)、および細胞質/VDAC 抗体存在下 (レーン 4) ではややバンドが減少していた。これらの結果から、tAIF は VDAC もしくは VDAC と他のタンパク質の複合体を介して遊離し、一方でシトクロム c は Bax を介して遊離することが示唆された。また、ミトコンドリア外へのそれらの遊離において、細胞質タンパク質 (Bid、Bax、Bak

など) が必須であることが明らかとなった。