

第4節 考察

本章で示した全ての結果から、未知ミトコンドリアカルパインについて次のことが明らかとなった。1) ミトコンドリアにはミトコンドリア μ -カルパインの他にミトコンドリア m-カルパインも局在していること (表4-1)。2) ミトコンドリア m-カルパインは、m-カルパインドメイン I および IV 抗体に反応するがドメイン III 抗体で染まらないこと (図 4-5A)。3) カゼインザイモグラフィーにおいて、細胞質 μ -および m-カルパインとは移動度が異なる (図 4-6A) ことから、それらとは性質が少し異なること。4) ミトコンドリア m-カルパイン活性化に必要な Ca^{2+} 濃度は、細胞質 m-カルパインと類似していること (図 4-6B)。5) ミトコンドリア外膜、膜間スペースおよび内膜に局在し、特に外膜に多く存在すること (図 4-5B)。6) HSP70 ファミリーに属する GRP75 と相互作用していること (図 4-7)。7) Ca^{2+} 依存的に VDAC を限定分解すること (図 4-8、4-9)。このように、ミトコンドリアにはミトコンドリア μ -カルパインのみならず m-カルパイン様のカルパイン分子が局在し、VDAC の限定分解に寄与しているという重要な知見を得た。

以前からカゼインザイモグラフィー解析により、ミトコンドリアにはマトリクスのみ局在するカルパイン 10 を除く少なくとも 2 種類のカルパイン分子が存在することが示唆されていた。その 1 つは、第 2 章および第 3 章で示したミトコンドリア μ -カルパインで、ERp57 と相互作用し、AIF を限定分解するという機能を有する。もう 1 つのカルパイン分子は、本章で示したミトコンドリア m-カルパインで、GRP75 と相互作用し、VDAC を限定分解するという機能を有している。本研究では、VDAC 限定分解の生理的意義を証明するには至らなかったが、ミトコンドリアを介したアポトーシス経路に寄与していると考えられる。おそらくミトコンドリア μ -および m-カルパインは、tAIF の細胞質遊離において、共役して機能しているのではないのだろうか。図 4-11 に示した

が、膜間スペースでの tAIF 存在下で、 Ca^{2+} を添加することにより tAIF が遊離するが、PD150606 および VDAC 抗体作用下ではその遊離が抑制される。このことから、m-カルパインの活性化を阻害すると tAIF の細胞質遊離が抑制されることが示唆される。従って、ステップ 1 として、ミトコンドリア μ -カルパインが内膜結合型 AIF を限定分解し膜間スペースへ tAIF を遊離させる。ステップ 2 として、ミトコンドリア m-カルパインが VDAC を限定分解することによって、VDAC の高次構造の変化または Bax との相互作用が強まり、tAIF の細胞質への遊離が誘導される。これらのステップを経てはじめて tAIF はアポトーシス誘導因子として、核へ移行し、DNA の断片化を誘導すると考えられる。

VDAC 孔は一定以上の電圧がかかると頻繁に開閉を繰り返すが、Bax を結合させると常に開放状態となり、その大きさは VDAC 単独孔 (直径 2.3 nm) より 4 倍の大きさになる [91]。また Bax はアポトーシス時にそれ自身でミトコンドリア外膜に孔を形成することが解っている [93-96]。VDAC がミトコンドリア m-カルパインにより限定分解を受けることにより、Bax との相互作用が促進されるのか検証することは、今後の重要な課題である。VDAC の制御機構を含め、ミトコンドリアを介したアポトーシスの分子機構は、明らかにされていないことが多い。例えば、細胞質に存在するアポトーシス促進タンパク質 (Bid、Bax、Bak など) がアポトーシス時にミトコンドリアに集積する機構、ミトコンドリア膜透過性変化の機構、シトクロム c 漏出の機構などである。

シトクロム c 遊離に関しては、近年その分子機構が明らかになりつつある。本研究でもシトクロム c の細胞質遊離に関して、いくつか実験を行った。単離ミトコンドリアに細胞質を添加し、 Ca^{2+} 存在下でインキュベーションすると、シトクロム c が細胞質へ遊離した (図 4-9D)。しかし、カルパイン阻害剤を作用させてもその遊離が阻害されなかったため、ミトコンドリアカルパインの活性化とシトクロム c の遊離には因果関係はないと示唆される。また、VDAC 抗体作用下でシトクロム c の遊離に変化がなかったが、

Bax 抗体作用下ではそれが強く抑制された (図 4-11D)。これよりシトクロム c は Bax を介して細胞質へ遊離すると示唆された。この結果は、Ott らや Ahsen らの報告と一致する [97, 98]。tAIF 遊離がシトクロム c の遊離を促すというユニークな実験結果も示されている [99]。

ミトコンドリア m-カルパインの部分精製標品 (図 4-3) から GRP75 が同定された (表 4-1)。さらに免疫沈降法により、ミトコンドリア m-カルパインと結合して存在することが示された (図 4-7)。GRP75 は Heat shock protein 70 (HSP70) family に属し (表 4-4)、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]。タンパク質の膜透過の介助 [84, 100]、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。本研究では、GRP75 がミトコンドリア m-カルパインに対してどのような機能を有しているのかという疑問を解決するには至っていない。常に結合しているとすると、ミトコンドリア m-カルパインがミトコンドリアへ移行する時に高次構造を再構築し、その後の安定化に寄与していると考えられる。また、カルパイン小サブユニットとの相互作用を調節することで、不活性型から活性型への変換を介助している可能性もある。

本章では、ミトコンドリアにおける新たなカルパイン分子の同定とその機能について述べてきた。それらの発見は、ミトコンドリアカルパイン研究を発展させる上でとても重要なものである。今後の課題としては、ミトコンドリア m-カルパインによる VDAC 限定分解の生理的意義を、Bax との相互作用を含めて調べること、VDAC 以外の基質分子の探索、これまでの *in vitro* での知見を培養細胞および組織レベルで検証することなどが挙げられる。

図4-1

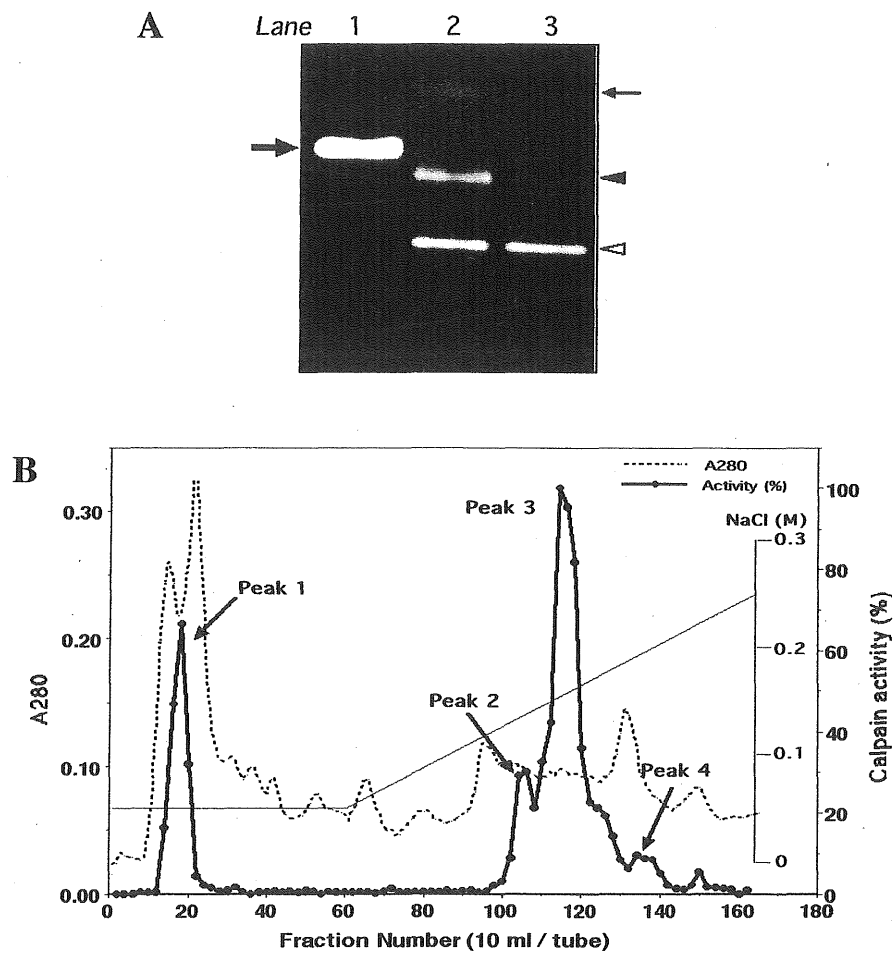


図4-1. 未知ミトコンドリアカルパインの存在およびその精製

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) カゼインゼイモグラフィー。レーン1、ラット赤血球（50 µgタンパク質）；レーン2、ミトコンドリア膜間スペース（100 µg）；レーン3、ERp57抗体を添加した膜間スペース（100 µg）。膜間スペースでは2つの活性バンドが検出され、いずれも細胞質µ-カルパインと移動度が異なる。ERp57存在下で消失するバンド（黒矢頭）は、ERp57結合型ミトコンドリアµ-カルパインを示す。ERp57抗体により影響を受けないバンドは、未知ミトコンドリアカルパインを示す。(B) 膜間スペースを用いたDEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー。未吸着画分に1つの活性ピーク（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）がそれぞれ溶出された。

図4-2

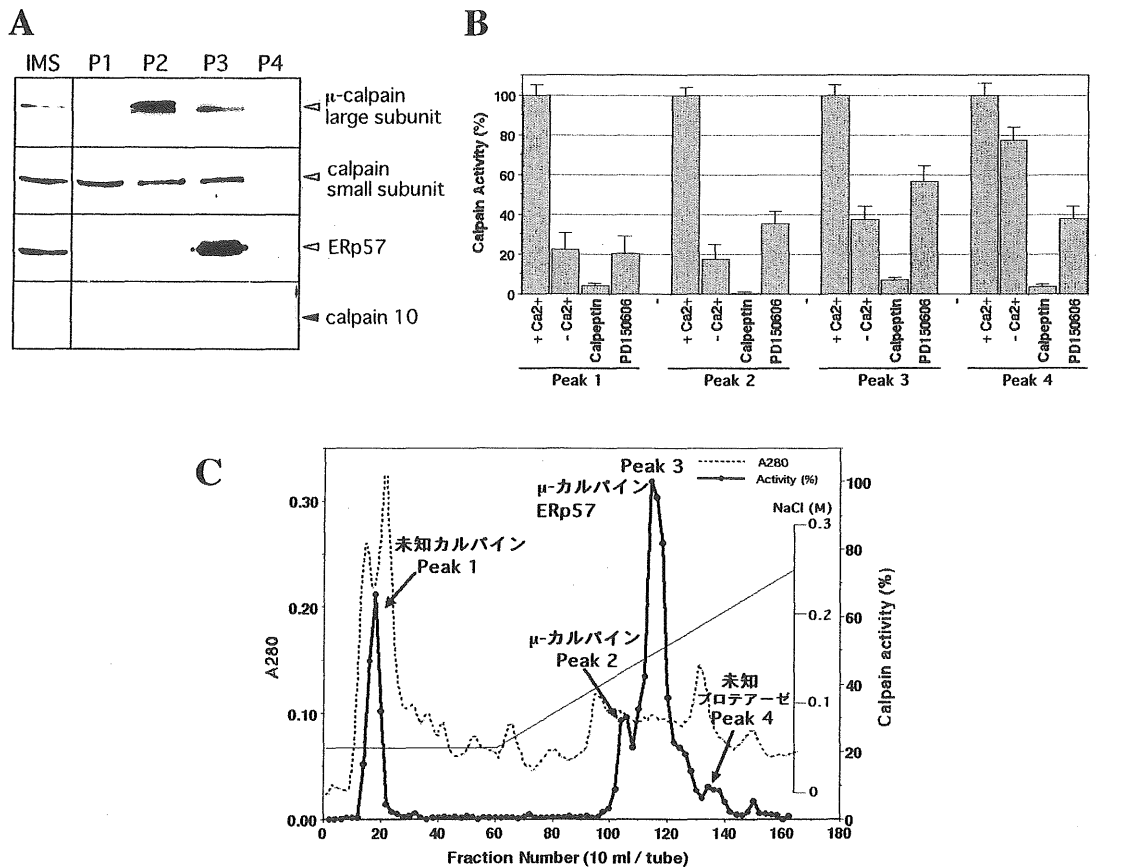


図4-2. 未知ミトコンドリアカルパインを含む画分の同定

(A) 各ピークにおけるウエスタンブロット解析 (40 μgタンパク質/レーン)。μ-カルパイン抗体により、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のみで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。

(B) 各ピークでのカルパイン活性のCa²⁺依存性とカルパイン阻害剤に対する感受性。

(C) DEAE-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィーにおいてピーク1には未知ミトコンドリアカルパイン、ピーク2にはミトコンドリアμ-カルパイン、ピーク3にはERp57結合型ミトコンドリア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43

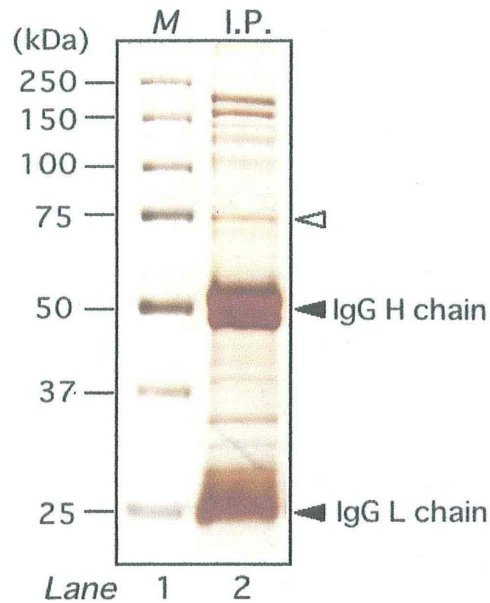


図43. 未知ミトコンドリアカルパインの免疫沈降

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。

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と示唆された。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た。免疫沈降サンプルを SDS-PAGE 展開し、銀染色を行った (40 μ g タンパク質/レーン)。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 に顕著なバンドが観察された (白矢頭)。

表 4.1. 未知ミトコンドリアカルパインの同定結果

Accession	Mass	Score	Cover.	Match	Description
Gi18393038	79,919	93%	4%	4	Calpain 2 (m-calpain)
Gi13122170	73,731	92%	7%	4	Stress-70 protein, mitochondrial precursor 75-kDa glucose-regulated protein (GRP75) Heat shock 70-kDa protein 9A

未知ミトコンドリアカルパインの部分精製標品の SDS-PAGE においてカルパイン大サブユニットと思われる分子量約 75 kDa のバンドが見られた (図 4-3)。そ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 4-2. m-カルパインのアミノ酸配列における同定ペプチド断片

		Domain
1	MAGIAMKLAK DREAAGEGLGS HERAIRKYLNQ DYETLRNECL EAGALFQDPS FPALPSSLGF	I
61	KELGPYSSKT RGI EWK RPTL TCADPQFLIG GATRTDICQG ALGDCWLLAA IASLTLNEEL	
121	LARVVPDDDS FQENYAGLFH FQFWQYGEWV EVVVDURLPT KDGELLFVHS AEGSEFWDAI	II
181	LEKAYAKING CYEALSGGAI FEGFEDFICG IAEWYELRRP PPNLFKIIQK ALERGSLLSG	
241	SIDI PSA DS EAVIYOKLVK GHAYSVIGAE EVESGSLQK LIRIPNPWQD VEWIGKWNDAI	
301	LPSWNTVDPE VRANL I ERQE DGEFWMSFSD FLR HYS RLEI CMLTPDTLIC DSYKRWKLIK	
361	MDGNWRNGST AGGCKNIYPII FWMNPQYLLI LEEDEDEDED GEN GCTFLVG LIQK IKKRLQY	III
421	KMSF PHH IG FGLYEVPLEL TGGTNSHLSK NFFLTTR ARE RSD F INLRE VLNRFKLRPG	
481	EYVLVSDIFE PHKNGDFCIR VFSERKADYQ TVDDELEANL EEIEANEEDL GGGFRKLFAD	
541	LAGE DALISA FELQ II RRV LARRREDIKSD GFSIETCK IM VDMLDEDGSG K LGKREFFLY	
601	WIKLQKTKKI YREIIVDRSG TMSSEMKKA LEEAGFRLPC DLHQVIVARE ADDELLIDFQ	IV
661	NEVRFIVRLE ILF F IFKQLD PENIGTIDLD LISWLSFSVL	

四角に囲ってあるアミノ酸配列は、各々検出されたペプチド配列を示す。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%; GCTFLVGLIQK, 15%; NFFLTIR)およびドメインIV (98%; KIMVDNLDEDGSGK)に含まれており、データの信憑性を示すMSスコアは93%と高い値である。

図4-4

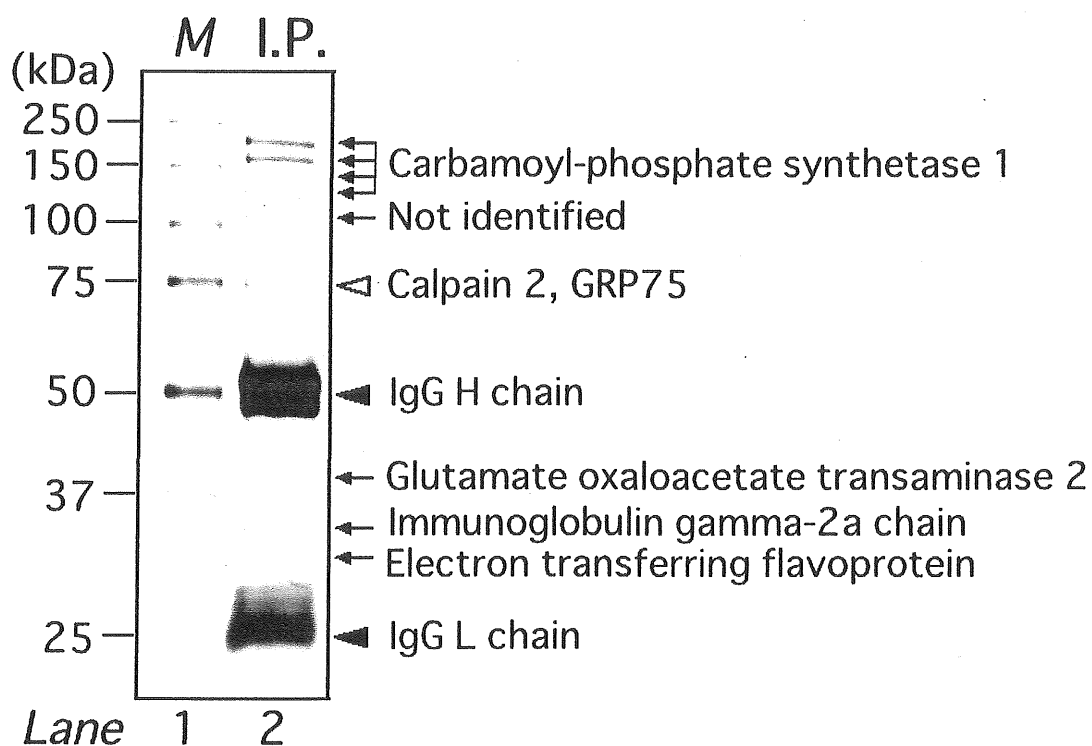


図4-4. 未知ミトコンドリアカルパイン部分精製標品に含まれる75 kDa以外のタンパク質の同定結果

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。

しかし GRP75 シャペロン分子のように、カルパイン分子と相互作用する可能性がある分子は同定されなかった。

図45

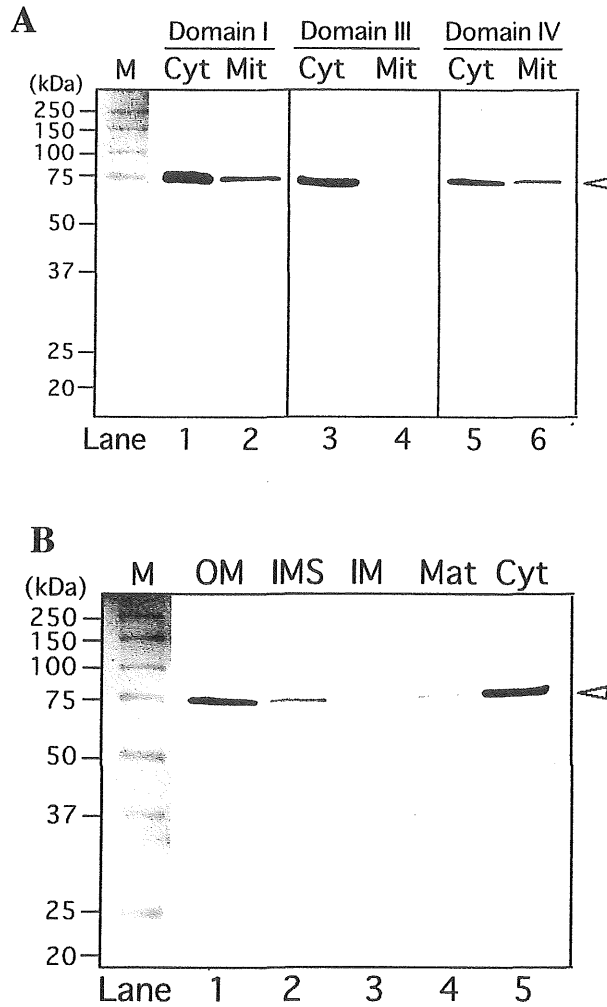


図45. ミトコンドリア m-カルパインのウエスタンブロット解析

(A) m-カルパイン各ドメインに対する抗体を用いたウエスタンブロット解析。レーン 1 および 2 はドメイン I 抗体、レーン 3 および 4 はドメイン III 抗体、レーン 5 および 6 はドメイン IV 抗体を使用した。細胞質から部分精製した m-カルパイン (Cyt) と膜間スペースから部分精製した未知ミトコンドリアカルパイン (Mit) を各々用いた (40 μ g タンパク質/レーン)。同定されたミトコンドリアカルパインは、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。

(B) ミトコンドリア m-カルパインのミトコンドリア分布 (40 μ g タンパク質/レーン)。ミトコンドリア m-カルパインは、外膜 (OM)、膜間スペース (IMS)、マトリクス (Mat) に局在し、特に外膜に多く局在していた。

図4-6

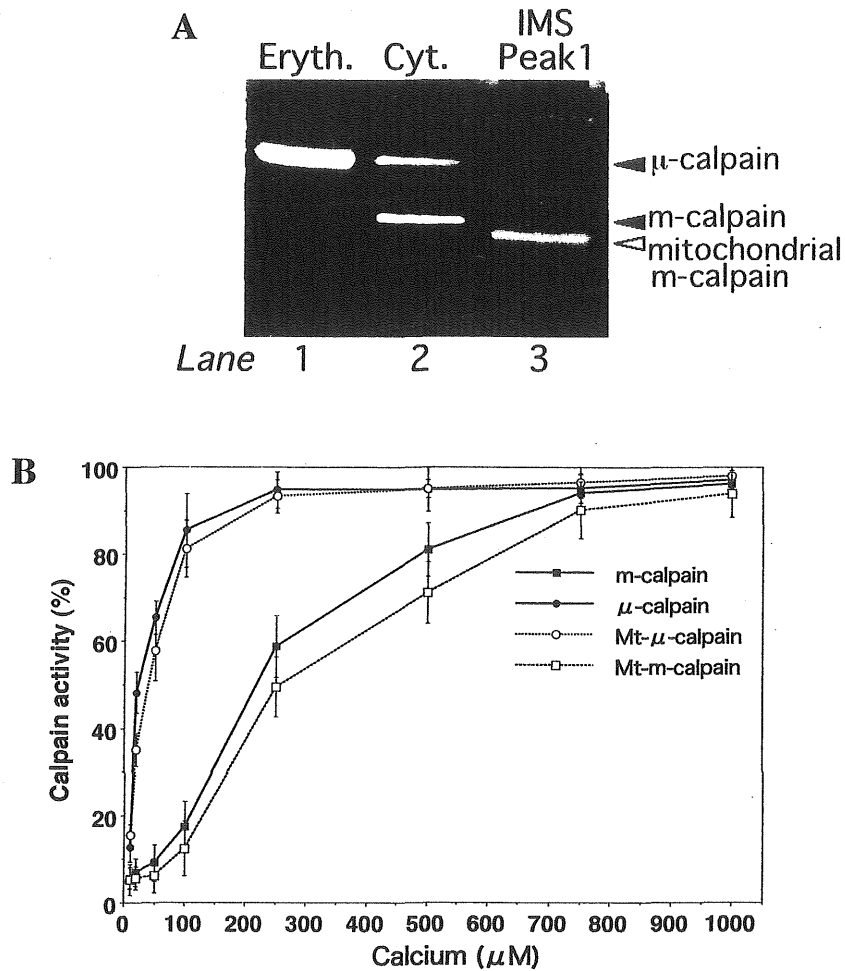


図4-6. ミトコンドリア m-カルパインの Ca^{2+} 依存性

(A) ミトコンドリア m-カルパインのカゼインゼイモグラフィ。細胞質 μ -および m-カルパイン (レーン 2) と移動度が異なり、細胞質 m-カルパインよりも移動度が大きい (レーン 3)。赤血球 (Eryth.) は μ -カルパインの陽性対照として使用した (レーン 1)。

(B) ミトコンドリア m-カルパイン活性化における Ca^{2+} 要求性。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) を用いた。結果は、 \pm 標準偏差 (検体数=4) で表す。0~1000 μ M 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 m-カルパインは細胞質 m-カルパインとほぼ同じ Ca^{2+} 依存性を示した。

図 4-7

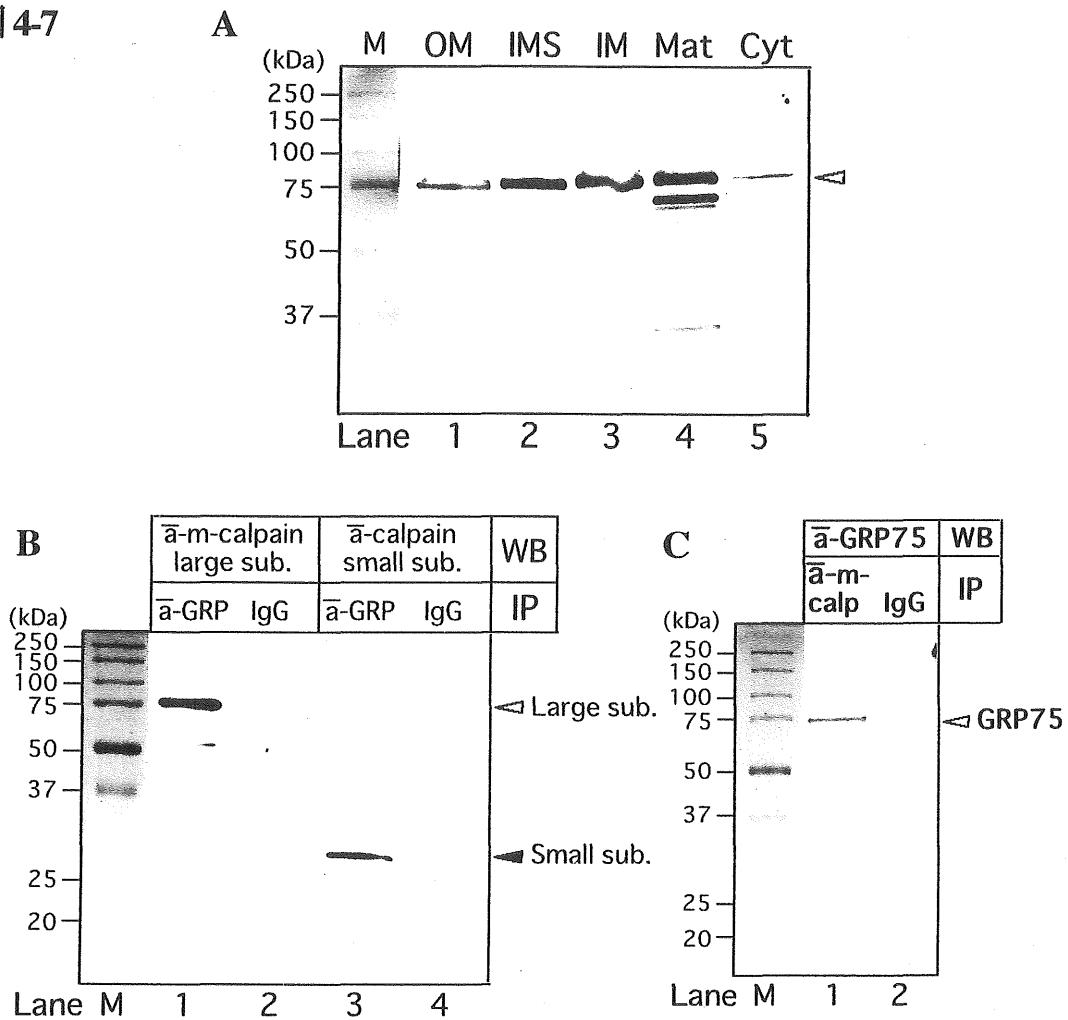


図 4-7. ミトコンドリア m-カルパインと GRP75 の相互作用

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。

(A) GRP75 のミトコンドリア分布。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する。

(B) GRP75 抗体での免疫沈降と、m-カルパイン大サブユニット抗体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。約 75 kDa ミトコンドリア 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。

(C) m-カルパイン大サブユニット抗体での免疫沈降および GRP75 抗体でのウエスタンブロット解析。GRP75 を示す約 75 kDa バンドが検出された（白矢頭）。対照として、正常ウサギ IgG を使用した。

図4-8

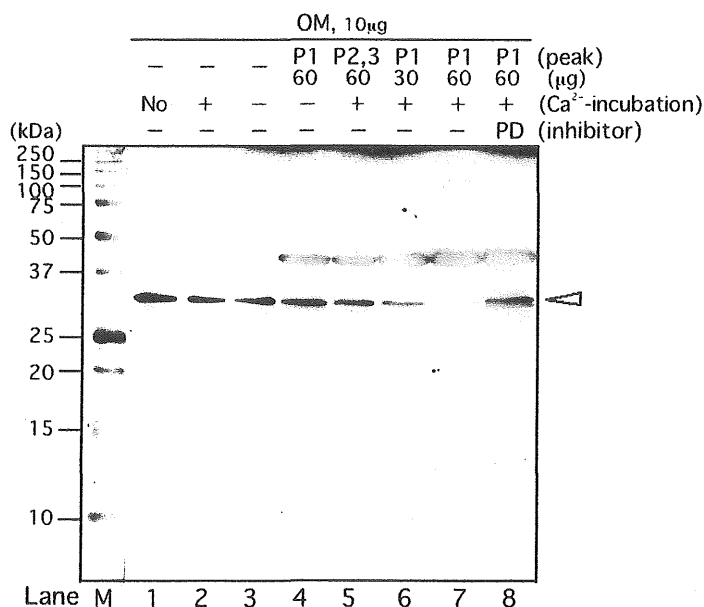


図4-8. ミトコンドリア m-カルパインによる VDAC の切断

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。レーン1、インキュベーション無しの外膜；レーン2、Ca²⁺存在下でインキュベーションした外膜；レーン3、Ca²⁺非存在下でインキュベーションした外膜；レーン4、ピーク1（60 μ g）作用下およびCa²⁺非存在下でインキュベーションした外膜；レーン5、ピーク2/3（60 μ g）の作用下およびCa²⁺存在下でインキュベーションした外膜；レーン6、ピーク1（30 μ g）作用下およびCa²⁺存在下でインキュベーションした外膜；レーン7、ピーク1（60 μ g）作用下およびCa²⁺存在下でインキュベーションした外膜；レーン8、ピーク1（60 μ g）作用下・PD150606作用下・Ca²⁺存在下でインキュベーションした外膜。

Ca²⁺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変化はない（レーン2および3）。Ca²⁺非存在下で外膜にピーク1を作用させても変化はない（レーン4）。Ca²⁺存在下ではピーク1のタンパク質量依存的にVDAC切断が起こる（レーン6および7）。その切断はカルパイン特異的な阻害剤であるPD150606で強く阻害される（レーン8）。Ca²⁺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の変化は起こらない（レーン5）。

図 4-9

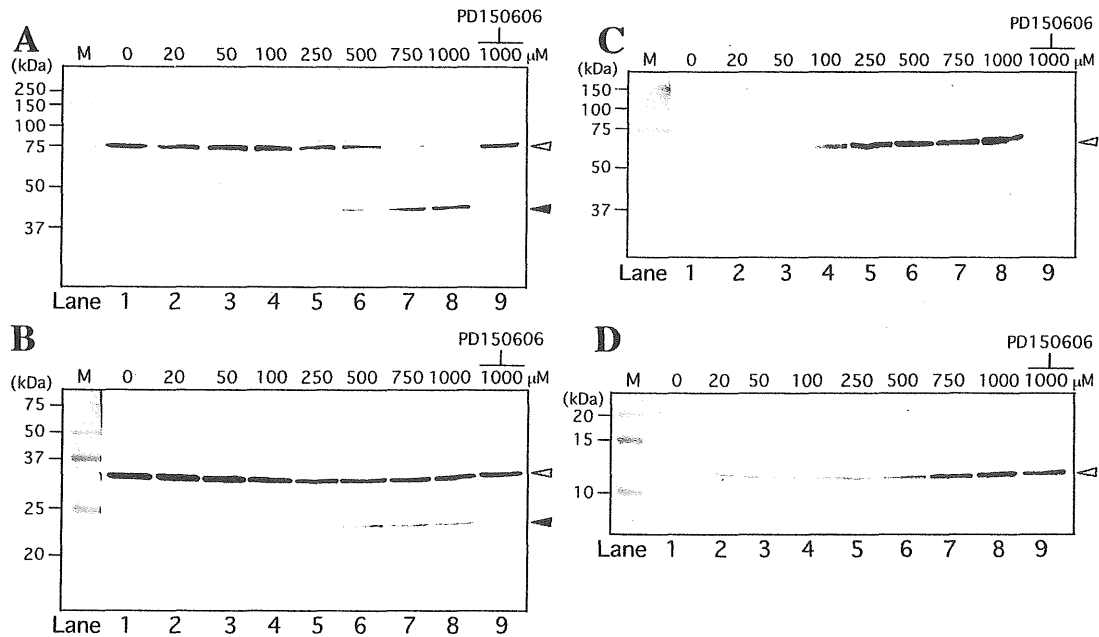


図 4-9. 単離ミトコンドリアでの VDAC 切断および tAIF/シトクロム c の遊離 (細胞質画分存在下) 実験方法の詳細は、本章第 2 節 (実験材料および方法) に記載した。

(A) ミトコンドリア m-カルパイン (80 kDa 完全長; 白矢頭) は Ca²⁺濃度依存的に活性化され、Ca²⁺濃度 100 μM 以上で自己分解産物と思われるバンドが約 40 kDa (黒矢頭) に見られる。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る (レーン9)。

(B) VDAC (28 kDa 完全長; 白矢頭) は Ca²⁺濃度依存的に切断され、Ca²⁺濃度 250 μM 以上で分解産物を示すバンドが約 23 kDa (黒矢頭) に見られた。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)。

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

(D) ミトコンドリアからのシトクロム c の放出 (白矢頭) は、Ca²⁺濃度 20 μM 以上で Ca²⁺濃度依存的に誘導された。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)。

図 4-10

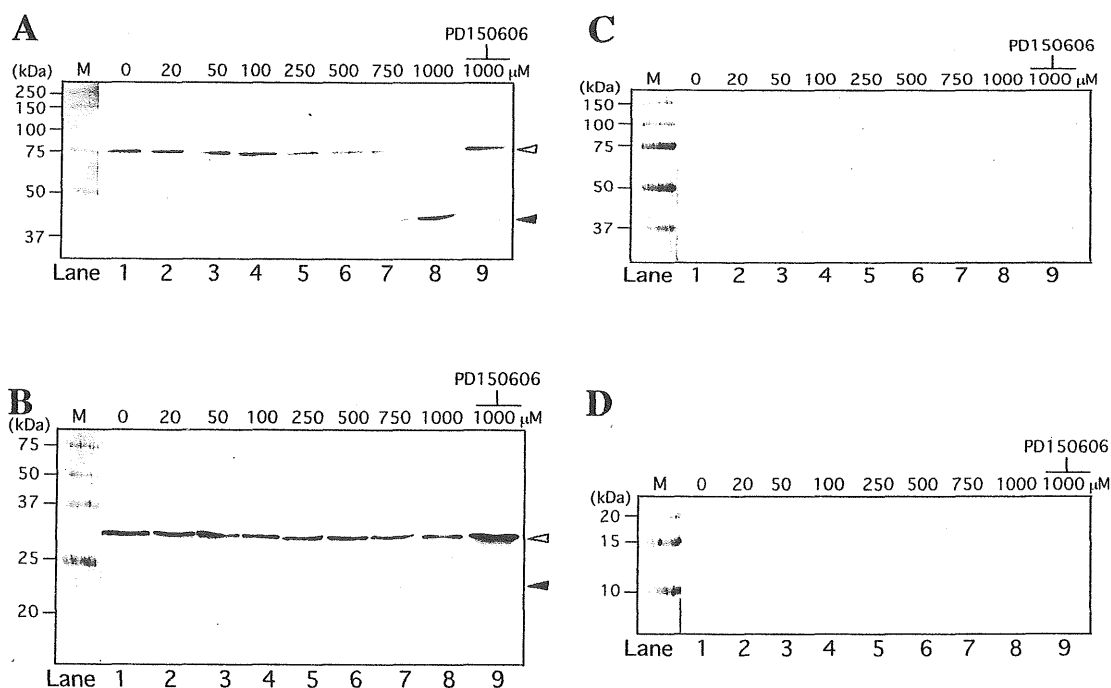


図 4-10. 単離ミトコンドリアでの VDAC 切断および tAIF/シトクロム c の遊離 (細胞質画分非存在下) 実験方法の詳細は、本章第 2 節 (実験材料および方法) に記載した。

(A) ミトコンドリア m-カルパイン (80 kDa 完全長; 白矢頭) は Ca^{2+} 濃度依存的に活性化され、 Ca^{2+} 濃度 100 μM 以上で自己分解産物と思われるバンドが約 40 kDa (黒矢頭) に見られる。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る (レーン 9)。図 4-9A とほぼ同様の結果を得た。

(B) VDAC (28 kDa 完全長; 白矢頭) は Ca^{2+} 濃度依存的に切断され、 Ca^{2+} 濃度 250 μM 以上で分解産物を示すバンドが約 23 kDa (黒矢頭) に見られた。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)。図 4-9B とほぼ同様の結果を得た。

(C) 細胞質画分非存在下では、ミトコンドリアからの tAIF の遊離は、観察されなかった。

(D) 細胞質画分非存在下では、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出は、観察されなかった。

図4-11

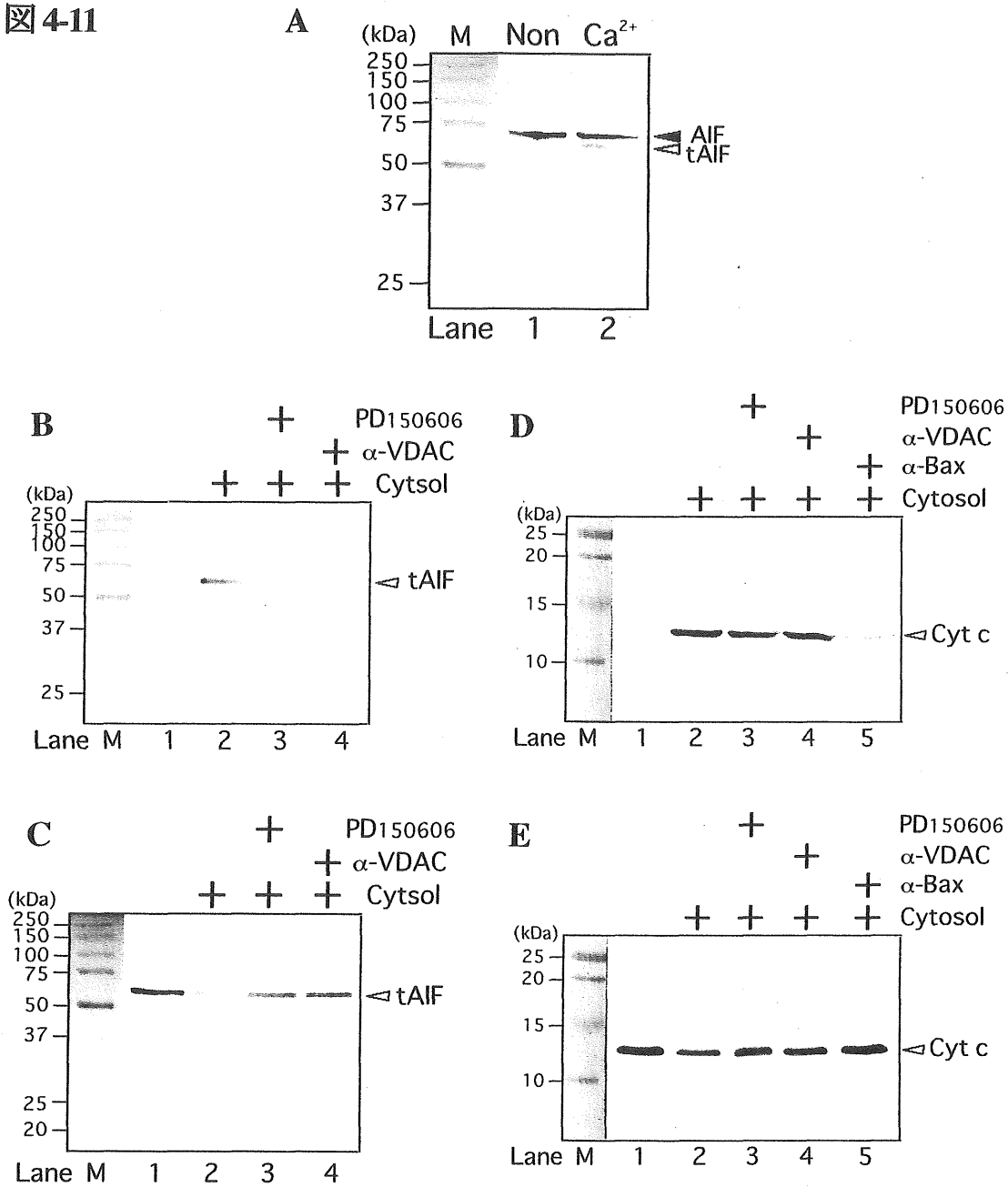


図4-11. tAIF/シトクロムc遊離に対するミトコンドリアカルパイン、VDACおよびBaxの寄与 実験方法の詳細は、本章第2節(実験材料および方法)に記載した。

(A) 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μ-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。

(B) ミトコンドリア外への tAIF の遊離。(C) 膜間スペースに残存している tAIF。

(D) ミトコンドリア外へのシトクロムcの遊離。(E) 内膜に残存しているシトクロムc。

図 4-12

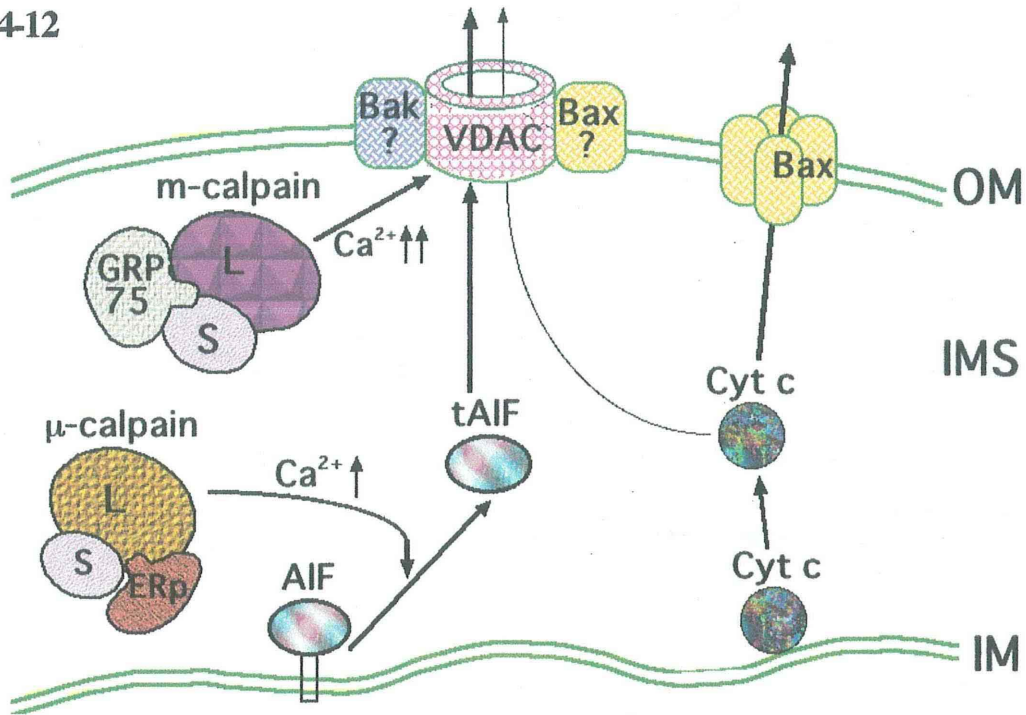


図 4-12. ミトコンドリアカルパイン機能の概略 (仮説)

本章における実験結果を基に、ミトコンドリア m-カルパインの機能に関して概略図を示す。ミトコンドリア m-カルパインは、カルパイン小サブユニットとヘテロダイマーを形成し、ミトコンドリア特異的分子シャペロンである GRP75 と相互作用している。ミトコンドリア Ca²⁺濃度の上昇に伴い、低 Ca²⁺濃度では ERp57 結合型ミトコンドリア μ-カルパインが活性化され AIF を限定分解し、内膜から遊離させる。高 Ca²⁺濃度になるとミトコンドリア m-カルパインが活性化し、VDAC を限定分解する。内膜から遊離した tAIF は、VDAC または Bax を含む VDAC 複合体を介して細胞質へ遊離する。本章ではこの VDAC の限定分解と tAIF の遊離の相関関係を証明するには至らなかったが、ミトコンドリア m-カルパインにより VDAC が限定分解されることで、Bax との相互作用/結合が促進され、より多くのそしてより大きな孔を形成し、結果として細胞質への tAIF 遊離が促進されると考えられる。AIF をはじめとするアポトーシス誘導因子のミトコンドリア放出に関しては、首尾一貫しない様々な知見が報告されており、VDAC と Bax だけでなく Bak や Bid も tAIF の遊離に関与していることが想定される。

謝辞

本研究を推進する上で、7年もの間日々懇切丁寧なご指導とご助言を頂きました弘前大学農学生命科学部 石黒誠一 教授 に心より感謝申し上げます。副指導教官として、ご指導ご助言を頂きました岩手大学農学部 山下哲郎 准教授 および弘前大学農学生命科学部 片方陽太郎 教授 に深く感謝致します。毎月1度の研究報告会の際、親身になってご助言をしてくださった弘前大学農学生命科学部 菊池英明 教授、山下哲郎 准教授と共に実験のご指導をしてくださった岩手大学農学部 平秀晴 教授、ミトコンドリア研究に関して適切なご指導をしてくださった弘前大学農学生命科学部 大町鉄雄 教授、本研究に必要な実験装置を提供してくださった弘前大学医学部眼科学教室 中澤満 教授に感謝申し上げます。また、日々ご支援くださいました当研究室の後輩に感謝申し上げます。

引用文献

- [1] T. Murachi, K. Tanaka, M. Hatanaka and T. Murakami (1980) Intracellular Ca^{2+} -dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv Enzyme Regul* **19**, 407-24
- [2] S. Ishiura (1981) Calcium-dependent proteolysis in living cells. *Life Sci* **29**, 1079-87
- [3] S. Endo, S. Ishiguro and M. Tamai (1999) Possible mechanism for the decrease of mitochondrial aspartate aminotransferase activity in ischemic and hypoxic rat retinas. *Biochim Biophys Acta* **1450**, 385-96
- [4] A. Ishikawa, S. Ishiguro and M. Tamai (1996) Changes in GABA metabolism in streptozotocin-induced diabetic rat retinas. *Curr Eye Res* **15**, 63-71
- [5] A. Ishikawa, T. Shiono, S. Ishiguro and M. Tamai (1996) Postnatal developmental expression of glutamine and related amino acids in the rat retinas. *Curr Eye Res* **15**, 662-8
- [6] T. Abe, S. Ishiguro and M. Tamai (1994) Glutamate dehydrogenase isoenzymes in the bovine retina and human leukocyte. *Jpn J Ophthalmol* **38**, 16-23
- [7] D.G. Beer, J.J. Hjelle, D.R. Petersen and A.M. Malkinson (1982) Calcium-activated proteolytic activity in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **109**, 1276-83
- [8] A. Tavares and M.C. Duque-Magalhaes (1991) Demonstration of three calpains in the matrix of rat liver mitochondria. *Biomed Biochim Acta* **50**, 523-9
- [9] G.J. Gores, H. Miyoshi, R. Botla, H.I. Aguilar and S.F. Bronk (1998) Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: A potential role for mitochondrial proteases. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 167-75
- [10] D. Arnoult, K. Akarid, A. Grodet, P.X. Petit, J. Estaquier and J.C. Ameisen (2002) On the evolution of programmed cell death: Apoptosis of the unicellular eukaryote leishmania

- major involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* **9**, 65-81
- [11] D.E. Goll, V.F. Thompson, H. Li, W. Wei and J. Cong (2003) The calpain system. *Physiol Rev* **83**, 731-801
- [12] K. Suzuki, S. Hata, Y. Kawabata and H. Sorimachi (2004) Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S12-8
- [13] N. Yoshimura, T. Kikuchi, T. Sasaki, A. Kitahara, M. Hatanaka and T. Murachi (1983) Two distinct Ca^{2+} proteases (calpain I and calpain II) purified concurrently by the same method from rat kidney. *J Biol Chem* **258**, 8883-9
- [14] H. Ma, C. Fukiage, Y.H. Kim, M.K. Duncan, N.A. Reed, M. Shih, M. Azuma and T.R. Shearer (2001) Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization. *J Biol Chem* **276**, 28525-31
- [15] H. Sorimachi, S. Imajoh-Ohmi, Y. Emori, H. Kawasaki, S. Ohno, Y. Minami and K. Suzuki (1989) Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ -types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* **264**, 20106-11
- [16] H. Sorimachi, S. Ishiura and K. Suzuki (1993) A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca^{2+} -binding domain. *J Biol Chem* **268**, 19476-82
- [17] H.J. Lee, H. Sorimachi, S.Y. Jeong, S. Ishiura and K. Suzuki (1998) Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol Chem* **379**, 175-83
- [18] J. Cong, D.E. Goll, A.M. Peterson and H.P. Kapprell (1989) The role of autolysis in activity of the Ca^{2+} -dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J Biol Chem* **264**,

10096-103

- [19] P. Tompa, Y. Emori, H. Sorimachi, K. Suzuki and P. Friedrich (2001) Domain III of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1333-9
- [20] C.M. Hosfield, T. Moldoveanu, P.L. Davies, J.S. Elce and Z. Jia (2001) Calpain mutants with increased Ca^{2+} sensitivity and implications for the role of the C2-like domain. *J Biol Chem* **276**, 7404-7
- [21] M. Azam, S.S. Andrabi, K.E. Sahr, L. Kamath, A. Kuliopulos and A.H. Chishti (2001) Disruption of the mouse μ -calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol* **21**, 2213-20
- [22] J.S. Arthur, J.S. Elce, C. Hegadorn, K. Williams and P.A. Greer (2000) Disruption of the murine calpain small subunit gene, *CAPN4*: Calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* **20**, 4474-81
- [23] I. Richard, O. Broux, V. Allamand, F. Fougerousse, N. Chiannikulchai, N. Bourg, L. Brenguier, C. Devaud, P. Pasturaud, C. Roudaut and et al. (1995) Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2a. *Cell* **81**, 27-40
- [24] Y. Horikawa, N. Oda, N.J. Cox, X. Li, M. Orho-Melander, M. Hara, Y. Hinokio, T.H. Lindner, H. Mashima, P.E. Schwarz, L. del Bosque-Plata, Y. Oda, I. Yoshiuchi, S. Colilla, K.S. Polonsky, S. Wei, P. Concannon, N. Iwasaki, J. Schulze, L.J. Baier, C. Bogardus, L. Groop, E. Boerwinkle, C.L. Hanis and G.I. Bell (2000) Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* **26**, 163-75
- [25] Y.M. Patel and M.D. Lane (1999) Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 1279-84

- [26] C.M. Hosfield, J.S. Elce, P.L. Davies and Z. Jia (1999) Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca^{2+} -dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J* **18**, 6880-9
- [27] S. Strobl, C. Fernandez-Catalan, M. Braun, R. Huber, H. Masumoto, K. Nakagawa, A. Irie, H. Sorimachi, G. Bourenkow, H. Bartunik, K. Suzuki and W. Bode (2000) The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 588-92
- [28] T. Moldoveanu, C.M. Hosfield, D. Lim, J.S. Elce, Z. Jia and P.L. Davies (2002) A Ca^{2+} switch aligns the active site of calpain. *Cell* **108**, 649-60
- [29] E. Melloni, M. Averna, F. Salamino, B. Sparatore, R. Minafra and S. Pontremoli (2000) Acyl-CoA-binding protein is a potent m-calpain activator. *J Biol Chem* **275**, 82-6
- [30] T. Murachi (1984) Calcium-dependent proteinases and specific inhibitors: Calpain and calpastatin. *Biochem Soc Symp* **49**, 149-67
- [31] T. Murachi (1989) Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem Int* **18**, 263-94
- [32] A. Wendt, V.F. Thompson and D.E. Goll (2004) Interaction of calpastatin with calpain: A review. *Biol Chem* **385**, 465-72
- [33] E. Melloni, M. Averna, R. Stifanese, R. De Tullio, E. Defranchi, F. Salamino and S. Pontremoli (2006) Association of calpastatin with inactive calpain: A novel mechanism to control the activation of the protease? *J Biol Chem* **281**, 24945-54
- [34] D.F. Parsons, G.R. Williams and B. Chance (1966) Characteristics of isolated and purified preparations of the outer and inner membranes of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci* **137**, 643-66
- [35] T. Sasaki, T. Kikuchi, N. Yumoto, N. Yoshimura and T. Murachi (1984) Comparative

- specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *J Biol Chem* **259**, 12489-94
- [36] M.M. Bradford (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54
- [37] U.K. Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5
- [38] H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4
- [39] K.J. Raser, A. Posner and K.K. Wang (1995) Casein zymography: A method to study μ -calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. *Arch Biochem Biophys* **319**, 211-6
- [40] J.S. Arthur and D.L. Mykles (2000) Calpain zymography with casein or fluorescein isothiocyanate casein. *Methods Mol Biol* **144**, 109-16
- [41] M.F. Matocha and M.R. Waterman (1984) Discriminatory processing of the precursor forms of cytochrome p-450_{scc} and adrenodoxin by adrenocortical and heart mitochondria. *J Biol Chem* **259**, 8672-8
- [42] E. Schmidt (1974). in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, U., ed), Academic press, Inc., New York 650-656
- [43] J.L. Hood, W.H. Brooks and T.L. Roszman (2004) Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Biol Chem* **279**, 43126-35
- [44] S. Hata, N. Doi, F. Kitamura and H. Sorimachi (2007) Stomach-specific calpain, nCL-2/calpain 8, is active without calpain regulatory subunit and oligomerizes through C2-like

- domains. *J Biol Chem* **282**, 27847-56
- [45] R. Ferrari (1996) The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol* **28 Suppl 1**, S1-10
- [46] K. Kohno, T. Higuchi, S. Ohta, Y. Kumon and S. Sakaki (1997) Neuroprotective nitric oxide synthase inhibitor reduces intracellular calcium accumulation following transient global ischemia in the gerbil. *Neurosci Lett* **224**, 17-20
- [47] A.N. Murphy, D.E. Bredesen, G. Cortopassi, E. Wang and G. Fiskum (1996) Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9893-8
- [48] S.A. Susin, H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger and G. Kroemer (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-6
- [49] H. Otera, S. Ohsakaya, Z. Nagaura, N. Ishihara and K. Mihara (2005) Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J* **24**, 1375-86
- [50] R.T. Uren, G. Dewson, C. Bonzon, T. Lithgow, D.D. Newmeyer and R.M. Kluck (2005) Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: Electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *J Biol Chem* **280**, 2266-74
- [51] D.D. Newmeyer and S. Ferguson-Miller (2003) Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**, 481-90
- [52] B.M. Polster, G. Basanez, A. Etxebarria, J.M. Hardwick and D.G. Nicholls (2005) Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J*

- Biol Chem* **280**, 6447-54
- [53] R. Urade, M. Nasu, T. Moriyama, K. Wada and M. Kito (1992) Protein degradation by the phosphoinositide-specific phospholipase c- α family from rat liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **267**, 15152-9
- [54] M. Molinari and A. Helenius (1999) Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* **402**, 90-3
- [55] L. Silvennoinen, J. Myllyharju, M. Ruoppolo, S. Orru, M. Caterino, K.I. Kivirikko and P. Koivunen (2004) Identification and characterization of structural domains of human ERp57: Association with calreticulin requires several domains. *J Biol Chem* **279**, 13607-15
- [56] E.M. Frickel, P. Frei, M. Bouvier, W.F. Stafford, A. Helenius, R. Glockshuber and L. Ellgaard (2004) ERp57 is a multifunctional thiol-disulfide oxidoreductase. *J Biol Chem* **279**, 18277-87
- [57] T. Tamura, T. Yamashita, H. Segawa and H. Taira (2002) N-linked oligosaccharide chains of sendai virus fusion protein determine the interaction with endoplasmic reticulum molecular chaperones. *FEBS Lett* **513**, 153-8
- [58] Y. Tomita, T. Yamashita, H. Sato and H. Taira (1999) Kinetics of interactions of sendai virus envelope glycoproteins, F and HN, with endoplasmic reticulum-resident molecular chaperones, BiP, calnexin, and calreticulin. *J Biochem* **126**, 1090-100
- [59] E.P. Feener, W.C. Shen and H.J. Ryser (1990) Cleavage of disulfide bonds in endocytosed macromolecules. A processing not associated with lysosomes or endosomes. *J Biol Chem* **265**, 18780-5
- [60] E. Kalef and C. Gitler (1994) Purification of vicinal dithiol-containing proteins by arsenical-based affinity chromatography. *Methods Enzymol* **233**, 395-403

- [61] R. Guthapfel, P. Gueguen and E. Quemeneur (1996) Reexamination of hormone-binding properties of protein disulfide-isomerase. *Eur J Biochem* **242**, 315-9
- [62] U. Hellman, C. Wernstedt, J. Gonez and C.H. Heldin (1995) Improvement of an "in-gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* **224**, 451-5
- [63] S. Ishiguro, H. Yamamoto, N. Yanai and T. Takeuchi (1986) Quantitative analysis of mouse tyrosinase by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Biochem* **99**, 1081-5
- [64] S. Ishiguro, K. Fukuda, C. Kanno and K. Mizuno (1987) Accumulation of immunoreactive opsin on plasma membranes in degenerating rod cells of rd/rd mutant mice. *Cell Struct Funct* **12**, 141-55
- [65] S.W. Taylor, E. Fahy, B. Zhang, G.M. Glenn, D.E. Warnock, S. Wiley, A.N. Murphy, S.P. Gaucher, R.A. Capaldi, B.W. Gibson and S.S. Ghosh (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* **21**, 281-6
- [66] P. Kar, T. Chakraborti, S. Roy, R. Choudhury and S. Chakraborti (2007) Identification of calpastatin and μ -calpain and studies of their association in pulmonary smooth muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **466**, 290-9
- [67] P. Kar, T. Chakraborti, K. Samanta and S. Chakraborti (2008) Submitochondrial localization of associated μ -calpain and calpastatin. *Arch Biochem Biophys* **470**, 176-86
- [68] J.M. Herrmann and W. Neupert (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* **3**, 210-4
- [69] T. Endo, H. Yamamoto and M. Esaki (2003) Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J Cell Sci* **116**, 3259-67
- [70] N. Wiedemann, A.E. Frazier and N. Pfanner (2004) The protein import machinery of

- mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 14473-6
- [71] C.M. Koehler (2004) New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 309-35
- [72] M. Naoe, Y. Ohwa, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto and T. Endo (2004) Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* **279**, 47815-21
- [73] J.G. Elliott, J.D. Oliver and S. High (1997) The thiol-dependent reductase ERp57 interacts specifically with N-glycosylated integral membrane proteins. *J Biol Chem* **272**, 13849-55
- [74] S. Pollock, G. Kozlov, M.F. Pelletier, J.F. Trempe, G. Jansen, D. Sitnikov, J.J. Bergeron, K. Gehring, I. Ekiel and D.Y. Thomas (2004) Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system. *EMBO J* **23**, 1020-9
- [75] D.R. Peaper, P.A. Wearsch and P. Cresswell (2005) Tapasin and ERp57 form a stable disulfide-linked dimer within the MHC class I peptide-loading complex. *EMBO J* **24**, 3613-23
- [76] S.G. Santos, E.C. Campbell, S. Lynch, V. Wong, A.N. Antoniou and S.J. Powis (2007) Major histocompatibility complex class I-ERp57-tapasin interactions within the peptide-loading complex. *J Biol Chem* **282**, 17587-93
- [77] R. Badugu, M. Garcia, V. Bondada, A. Joshi and J.W. Geddes (2008) N terminus of calpain 1 is a mitochondrial targeting sequence. *J Biol Chem* **283**, 3409-17
- [78] J.M. Herrmann and R. Kohl (2007) Catch me if you can! Oxidative protein trapping in the intermembrane space of mitochondria. *J Cell Biol* **176**, 559-63
- [79] D. Sanges, A. Comitato, R. Tammaro and V. Marigo (2006) Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 17366-71

- [80] G. Cao, J. Xing, X. Xiao, A.K. Liou, Y. Gao, X.M. Yin, R.S. Clark, S.H. Graham and J. Chen (2007) Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J Neurosci* **27**, 9278-93
- [81] A. Gallina, T.M. Hanley, R. Mandel, M. Trahey, C.C. Broder, G.A. Viglianti and H.J. Ryser (2002) Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J Biol Chem* **277**, 50579-88
- [82] G. Kozlov, P. Maattanen, J.D. Schrag, S. Pollock, M. Cygler, B. Nagar, D.Y. Thomas and K. Gehring (2006) Crystal structure of the bb' domains of the protein disulfide isomerase ERp57. *Structure* **14**, 1331-9
- [83] L.A. Mizzen, C. Chang, J.I. Garrels and W.J. Welch (1989) Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, Grp 75, a member of the Hsp 70 family and Hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein. *J Biol Chem* **264**, 20664-75
- [84] M. Horst, W. Oppliger, S. Rospert, H.J. Schonfeld, G. Schatz and A. Azem (1997) Sequential action of two Hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *EMBO J* **16**, 1842-9
- [85] R.B. Freedman (1989) Protein disulfide isomerase: Multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* **57**, 1069-72
- [86] W.J. Chirico, M.G. Waters and G. Blobel (1988) 70k heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**, 805-10
- [87] A.L. Fink (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* **79**, 425-49
- [88] T. Rostovtseva and M. Colombini (1996) ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **271**, 28006-8
- [89] D. Gincel, H. Zaid and V. Shoshan-Barmatz (2001) Calcium binding and translocation by

- the voltage-dependent anion channel: A possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* **358**, 147-55
- [90] T. Hodge and M. Colombini (1997) Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *J Membr Biol* **157**, 271-9
- [91] S. Shimizu, M. Narita and Y. Tsujimoto (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-7
- [92] S. Abu-Hamad, S. Sivan and V. Shoshan-Barmatz (2006) The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5787-92
- [93] M.C. Wei, W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson and S.J. Korsmeyer (2001) Proapoptotic Bax and Bak: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-30
- [94] T. Kuwana, M.R. Mackey, G. Perkins, M.H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D.R. Green and D.D. Newmeyer (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**, 331-42
- [95] O. Terrones, B. Antonsson, H. Yamaguchi, H.G. Wang, J. Liu, R.M. Lee, A. Herrmann and G. Basanez (2004) Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic Bax and tBid. *J Biol Chem* **279**, 30081-91
- [96] J.E. Chipuk, T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N.M. Droin, D.D. Newmeyer, M. Schuler and D.R. Green (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-4
- [97] M. Ott, E. Norberg, K.M. Walter, P. Schreiner, C. Kemper, D. Rapaport, B. Zhivotovsky and S. Orrenius (2007) The mitochondrial tom complex is required for tBid/Bax-induced cytochrome c release. *J Biol Chem* **282**, 27633-9

- [98] O. von Ahsen, C. Renken, G. Perkins, R.M. Kluck, E. Bossy-Wetzl and D.D. Newmeyer (2000) Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* **150**, 1027-36
- [99] D. Arnoult, P. Parone, J.C. Martinou, B. Antonsson, J. Estaquier and J.C. Ameisen (2002) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol* **159**, 923-9
- [100] J. Frydman, E. Nimmesgern, K. Ohtsuka and F.U. Hartl (1994) Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**, 111-7