

# カルシウム依存的相互作用因子から探る penta-EF-hand ファミリーの機能

牧 正敏, 高原 照直, 柴田 秀樹

典型的カルパイン分子中に見いだされたpenta-EF-hand (PEF) ドメインは、EF-handを連続して五つ持ち、C末端のEF5どうしが一対になって二量体を形成する。PEFファミリーには、sorcinやALG-2のように触媒ドメインを持たないメンバーが存在し、さまざまなタンパク質と相互作用してその機能を発揮する。動物細胞においてALG-2二量体はカルシウム依存性分子アダプターとして働き、異なる分子どうしの連結や標的複合体を安定化をする。ESCRTシステムにおける初期補助因子としての役割や、小胞体-ゴルジ体間における小胞輸送調節が注目されている。一方、PEFドメインを持たない非典型的カルパインであるcalpain-7は、N末端にMITドメインを持ち、ESCRT因子と相互作用して活性化され、エンドソーム・リソソーム経路で働いている。

## 1. はじめに

カルシウムは動物にとって主要必須ミネラルであり、その総量は成人では1000~1200グラムにも達する。大部分(約99%)は骨や歯などの硬組織にヒドロキシアパタイトの形で存在するが、残りは細胞内外にイオンとして存在する。カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )は低分子化合物やタンパク質と結合して緩衝作用を受けるが、有効な遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、細胞外液中では1~2mMであるのに対して、通常、細胞質ゾルでは100nM以下と低く、細胞膜を隔てて1万倍以上もの濃度勾配が保たれている。また、小胞体やミトコンドリア、そしてリソソームなど酸性細胞小器官(オルガネラ)にも $\text{Ca}^{2+}$ が貯蔵されている<sup>1)</sup>。さまざまな刺激によって起こる細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入やオルガネラからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出により、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は数100nMに上昇する。そして、イオンチャネル近傍の局所空間(マイクロドメ

イン)の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度はさらに高い値(数 $\mu\text{M}$ )に達する<sup>2,3)</sup>。細胞内外間で濃度差の小さい $\text{Mg}^{2+}$ と異なり、 $\text{Ca}^{2+}$ は時間的・空間的濃度変化を情報としてインプットすることができ、cAMPなどと同様にセカンドメッセンジャーとして働く<sup>1,4)</sup>。微小環境 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の一過性もしくは持続的上昇は、これを感知する $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の酵素や多種多様なタンパク質群の作用によって、筋収縮、接着、分泌、増殖、分化、細胞死、遺伝子発現といったさまざまな生理反応へと引き継がれる。 $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパク質は、動物のみならず細菌、下等真核生物から植物に至るまで幅広く生物界に存在し、結合ドメインやモチーフとしてEF-hand、C2ドメイン、アネキシン(エンドネキシン)フォールド、酸性残基クラスターなどが知られている<sup>5,6)</sup>。細胞内で $\text{Ca}^{2+}$ がタンパク質と結合することの意義は、高親和性結合による構造の安定化、構造変化の誘導、相互作用因子との結合、遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を一定に保つための緩衝作用などである。本稿では分子内で五つのEF-handを持つpenta-EF-hand (PEF) ファミリー、特に進化的に保存されているALG-2 [apoptosis-linked gene 2, 別名PDCD6 (programmed cell death 6)]を中心に、高等動物におけるPEFファミリーと代表的な相互作用タンパク質との結合様式に焦点をあて、研究の背景や構造的特徴も含めてPEFの機能を紹介する。

## 2. penta-EF-hand 構造の発見

### 1) EF-hand

EF-handの名前は、筋肉中に存在するバルブアルブミ

名古屋大学大学院・生命農学研究科・応用生命科学専攻  
(〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町)

Exploring functions of the penta-EF-hand family by searching for calcium-dependent interacting factors

Masatoshi Maki, Terunao Takahara and Hideki Shibata (Department of Applied Biosciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi-ken 464-8601, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910191

© 2019 公益社団法人日本生化学会

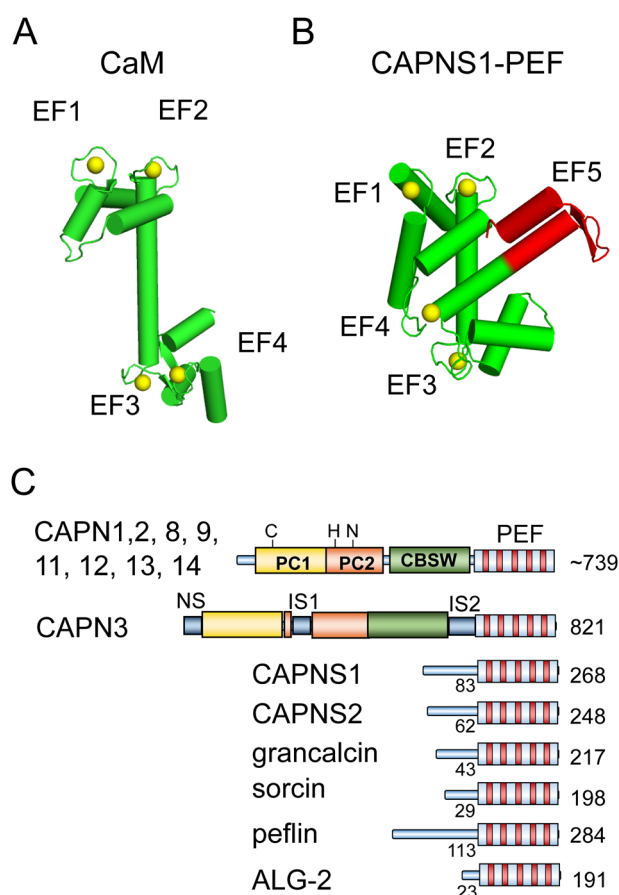


図1 penta-EF-hand (PEF) ファミリー

(A)カルモジュリン (CaM) (PDB ID: 1CLL) および(B)カルパイン小サブユニットPEFドメイン (旧名ドメインVI, PDB ID: 1ALV) 単量体の立体構造をPyMolを用いて表示する。EF5 (赤色) は二量体形成部位, 黄色球は $\text{Ca}^{2+}$ を示す。(C)ヒトPEFファミリーメンバーの構造模式図。PC: protease core (旧名ドメインII), C, H, N: 活性中心残基, CBSW: calpain-type beta sandwich (旧名ドメインIII, C2Lドメイン)。

ン (parvalbumin) のX線結晶構造解析から明らかとなった $\text{Ca}^{2+}$ 結合モジュールの構造に由来する。 $\alpha$ ヘリックスEと $\alpha$ ヘリックスFの間のループに $\text{Ca}^{2+}$ が結合するが、二つの $\alpha$ ヘリックスをそれぞれ突き出した親指と人差し指、そしてループを握りしめたその他の指になぞらえたことによる<sup>7)</sup>。このような約30アミノ酸残基からなるヘリックス-ループ-ヘリックスを持つEF-handおよびEF-hand様構造はタンパク質分子内に単独で存在する場合もあれば、多数繰り返して存在する場合もある<sup>8)</sup>。一般に、二つのEF-handは、ループ後半で逆平行 $\beta$ シートを形成し、さらにそれぞれ3残基からなる二つの疎水性クラスターが安定構造形成に寄与して、空間的にひとかたまりとなる<sup>9)</sup>。最もよく知られているEF-handタンパク質であるカルモジュリン (calmodulin: CaM) は、四つのEF-handを持ち、N末端側とC末端側でそれぞれ二つのEF-handから形成されたローブ (葉状のかたまり) を持つ (図1A)。

## 2) penta-EF-hand 構造の特徴

$\text{Ca}^{2+}$ 依存性プロテアーゼであるカルパイン (calpain) の大小サブユニットは、1980年代半ばに一次構造が明らかにされ、ともにCaM様の四つのEF-handを持つと推定されていた<sup>10, 11)</sup>。しかし、1997年、小サブユニットの $\text{Ca}^{2+}$ 結合ドメインのX線結晶構造解析の結果、予想に反して五つのEF-hand構造を持つことが明らかとなった<sup>12, 13)</sup>。推定されていた $\text{Ca}^{2+}$ 結合領域のN末端側にさらにもう一つEF-hand構造が見つかった (図1B)。規範的なEF-hand配列と比較すると、カルパイン大小サブユニットの新しく命名されたEF1領域は、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合ループ内に1残基の欠損があった。また、 $\text{Ca}^{2+}$ が配位する重要な酸素原子を持つアスパラギン酸残基がアラニンに置換されていた。このため、EF1はモチーフ検索でEF-handとは予測されていなかった。結晶構造において $\text{Ca}^{2+}$ は、置換残基であるアラニンのカルボニル基の酸素原子に配位していた。一方、C末端に位置する5番目のEF-hand (EF5) はホモ二量体の相手分子のEF5とペアとなり、二量体形成部位となっていた。カルパインの小サブユニットには他にもCaMと比較して異なる点が見いだされた。①八つの $\alpha$ ヘリックスから構成され、EF2とEF3の間、EF4とEF5の間は連続した $\alpha$ ヘリックスを共有している。②EF2-EF3を結ぶリンカーはCaMの場合柔軟であるが、7残基短いためEF2とEF3が接近し、全体としてコンパクトになっている。③EF3とEF4が閉じた格好になっている。④EF1とEF2の間のループが長い。筆者らはこのような特徴的な構造を持つ五つのEF-hand構造 (~170アミノ酸残基) をpenta-EF-hand (略称PEF) と命名した<sup>14)</sup>。

## 3) PEF ファミリー

プロテアーゼドメインを持つカルパイン大サブユニットと相同な遺伝子はヒトゲノム中に15存在し、遺伝子記号はCAPNとこれに続く数字で表記される (例、CAPN1)<sup>15)</sup>。そのうちPEFドメインを持つものは九つ存在する (図1C)。組織普遍的に存在して、*in vitro*での活性測定時の $\text{Ca}^{2+}$ 要求濃度が $\mu\text{M}$ オーダーである $\mu$ -カルパイン (大サブユニット遺伝子記号CAPN1)、mMオーダーであるm-カルパイン (大サブユニット遺伝子記号CAPN2) は、共通の小サブユニットを持つ (遺伝子記号CAPNS1、以前の表記はCAPN4)。また、小サブユニット相同遺伝子CAPNS2は、イントロンを持たないが組織特異的な発現が確認されている<sup>16)</sup>。その他、PEFファミリーにはプロテアーゼドメインを持たないサブファミリーも存在する。哺乳類ではEF1がカルパイン大小サブユニットと類似したsorcin (遺伝子記号SRI) やgrancalcin (遺伝子記号GCA)、そしてEF1にも欠損残基や重要なアミノ酸残基の置換もないALG-2 (遺伝子記号PDCD6) や全領域でALG-2と類似性が高いpeflin (遺伝子記号PEF1) が存在する (図1C)<sup>17)</sup>。ALG-2は、1996年に免疫系細胞におけるアポトーシス関連遺伝子産物として発見された<sup>18)</sup>。その後、ALG-2遺伝子のノック

表1 生物界におけるPEFタンパク質分布

PEFタンパク質とカルパイン	原生生物	植物	酵母	カビ	線虫	ハエ	哺乳類
PEFタンパク質							
ALG-2/PEF*	+	+	+	+	+	+	+
peflin	—	—	—	—	—	+	+
典型的カルパイン							
(大サブユニット)	—	—	—	—	—	+	+
(小サブユニット)	—	—	—	—	—	—	+
sorcin	—	—	—	—	—	—	+
grancalcin	—	—	—	—	—	—	+
calpain-7							
(PalB/Rim13)	—	—	+	+	+	—	+

\*ALG-2ホモログの名称は生物によって異なり、機能は下等真核生物や植物と哺乳類とは異なる。

クアウトマウスが作出されたが、対照マウスと比較して免疫系やその他の器官・組織・細胞に異常が観察されなかった<sup>19)</sup>。しかし、近年、ヒトにおいて悪性腫瘍とALG-2遺伝子(*PDCD6*)の発現異常との関連を示唆する報告が蓄積しつつあり、ALG-2は、がんのバイオマーカーとして注目され出している<sup>20-23)</sup>。ALG-2ホモログは原生生物や酵母、カビ、植物にも存在し、進化的に真核生物において広く保存されている<sup>24)</sup>。これに対して、PEFドメインを持つ典型的カルパインやsorcin, grancalcinは下等真核生物には存在しない(表1)。μ-カルパインやm-カルパインなど組織普遍的に存在する典型的カルパインは、一般に大小サブユニットがヘテロ二量体を形成する。カルパイン以外のPEFファミリーメンバーについても、生化学的解析によって二量体形成が報告されている。ALG-2の場合は、ホモ二量体および近縁のpeflinとヘテロ二量体を形成する<sup>25)</sup>。また、Ca<sup>2+</sup>依存的膜結合性もPEFタンパク質の共通した性質である<sup>25-29)</sup>。PEFドメインのN末端側に存在するグリシン、プロリン、アラニンなどに富んだ疎水性領域が関与していると推察されるが、配列の進化的保存性は低い<sup>17)</sup>。ALG-2のEF5にはCa<sup>2+</sup>が結合するが通常の配位とは異なり<sup>30)</sup>、むしろMg<sup>2+</sup>が生理的濃度で結合することにより二量体を安定化し、EF1とEF3へのCa<sup>2+</sup>の結合能が高くなると報告されている<sup>31-33)</sup>。配列比較からCAPN1とCAPN8のPEFもMg<sup>2+</sup>が結合すると予測されている<sup>32)</sup>。

### 3. PEF相互作用因子

CaMはCa<sup>2+</sup>と結合してさまざまな標的タンパク質と結合する。代表的な例としては、N末端側とC末端側のローブが特定のCaM認識モチーフを含む標的ペプチドヘリックスと結合する際、標的を取り囲むように大きく立体配置を変化させる<sup>34)</sup>。また、IQモチーフのように、Ca<sup>2+</sup>依存的・非依存的に結合するケースもある<sup>35)</sup>。PEFタンパク質の場合にもCa<sup>2+</sup>依存的だけでなく、非依存的に結合する標的タンパク質も報告されている。しかし、Ca<sup>2+</sup>センサー

としてのPEFタンパク質の機能を理解するためには、Ca<sup>2+</sup>依存的な結合あるいは解離が重要となる。

#### 1) カルパインPEF

カルパスタチン(calpastatin)はμ-カルパインやm-カルパインの内因性阻害タンパク質であり、阻害ドメインを分子内に4回繰り返し持つ(図2A, 下段)<sup>36, 37)</sup>。組織特異的な選択的スプライシングや転写開始点の違いがあり、分子多様性がある<sup>38, 39)</sup>。繰り返しドメイン間で保存された三つの領域(A, B, C)は別々のエクソンにコードされ<sup>39)</sup>、A領域とC領域のアミノ酸配列は相互に類似している<sup>40)</sup>。B領域が阻害中心であるが、A, C領域が阻害を増強させている<sup>41-43)</sup>。A領域は大サブユニットのPEFドメイン(当時の名称はCaM様ドメイン)、C領域は小サブユニットのPEFドメイン(CaM様ドメイン)にそれぞれ特異的にCa<sup>2+</sup>依存的結合することが1990年代半ばごろまでに生化学的解析によって明らかにされた<sup>42-44)</sup>。2000年代になって、カルパインとカルパスタチン複合体のX線結晶構造解析が行われ、このような3部位結合モデルが正しいことが証明された(図2B)<sup>45-47)</sup>。また、カルパスタチン以外にも、Rhoグアニンヌクレオチド交換因子( $\alpha$ PIX, 別名ARHGEG6)<sup>48)</sup>、Ras GTPase活性化因子(RasGAP)<sup>49)</sup>、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)<sup>50)</sup>が小サブユニットと相互作用すると報告されている(表2)。その相互作用が小サブユニットのPEFドメインなのか、N末端非PEF領域なのかは不明であり、Ca<sup>2+</sup>の要求性など結合の特性は明らかにされていない。相互作用の生理的意義は不明であるが、小サブユニットは大サブユニットとヘテロ二量体を形成するため、細胞内では、小サブユニットとの結合により相互作用タンパク質や複合体周辺部のタンパク質が基質となっている可能性がある。しかし、カルパイン小サブユニットが大サブユニットに依存せず、単独で何らかの生理機能を持つ可能性は否定できない。

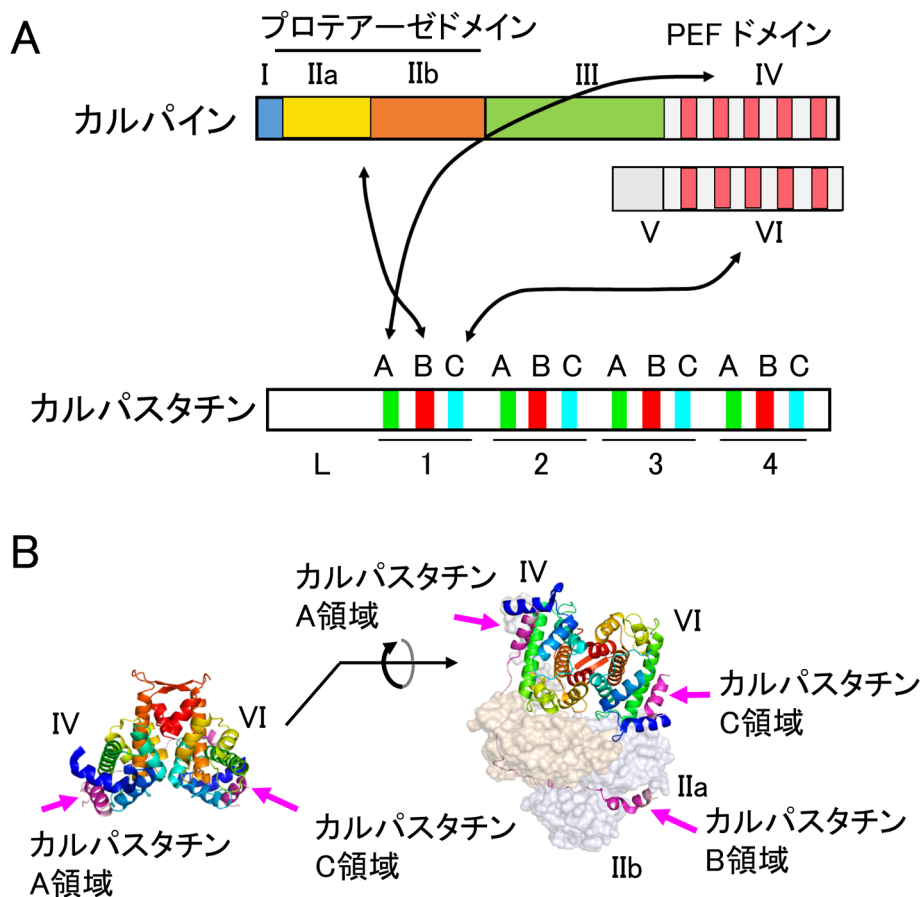


図2 カルパインとカルパスタチンの結合部位  
(A)カルパスタチンの四つの繰り返しドメイン間で保存されたA, B, C領域の生化学的解析結果による推定結合部位. (B)m-カルパイン (CAPN2・CAPNS1複合体)とカルパスタチンの阻害単位ドメインの複合体の立体構造 (PDB ID: 3BOW)をPyMolにより表示する. カルパインのドメインはI~IV (大サブユニット)とV, VI (小サブユニット)で示した. IVとVIが大小サブユニットのPEFドメイン.

表2 PEFタンパク質の機能と主な相互作用因子の一覧

PEFタンパク質の名称	ヒト遺伝子記号	主な生理機能	報告されている主な相互作用因子*
カルパイン 小サブユニット sorcin	CAPNS1 SRI	大サブユニット (CAPN1, CAPN2) とヘテロ二量体形成 Ca <sup>2+</sup> 恒常性調節, シグナル伝達, 細胞死, 細胞分裂	カルパスタチン, αPIX, RasGAP, PI3K AnxA7, AnxA11, NCX, RyR, SERCA, L型電位依存性Ca <sup>2+</sup> チャネル, プレセニリン2, PLK1, ChREBP
grancalcin ALG-2	GCA PDCD6	白血球機能調節 細胞死, ESCRT システム補助機能, 小胞体-ゴルジ体間輸送調節, RNA プロセッシング, 細胞分裂, シグナル伝達	L-プラスチン ALIX, TSG101, VPS37B, VPS37C, IST1, Sec31A, TFG, MAP1B, MISSL, CHERP, PATL1, RBM22, AnxA7, AnxA11, HEBP2, VEGFR2, PLSCR3, Scotin, MCOLN1, Ask1, Raf1, CPNE4
pefflin	PEFI	ALG-2とヘテロ二量体形成, ユビキチン修飾	TRPN1, KLHL12

\*略号は本文中における各PEFタンパク質の節を参照.

2) sorcin

sorcin はがん細胞において多剤耐性輸送体 (MDR1) に付随して増幅する遺伝子として, 1986年に発見されたが<sup>51)</sup>, その生理機能は多様であり, Ca<sup>2+</sup>恒常性調節やシグナル伝達<sup>52)</sup>, 細胞死<sup>53)</sup>, 細胞分裂<sup>54)</sup> などへの関与が報告

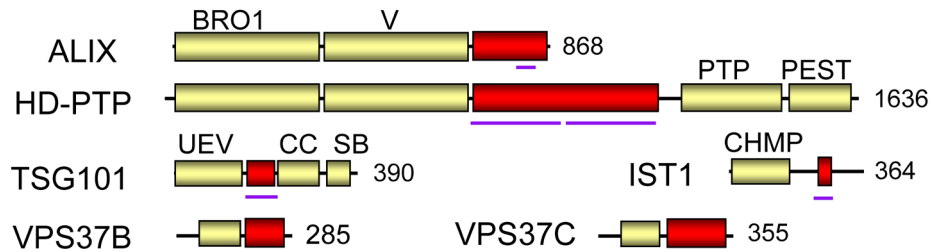
されている. ノックアウトマウスは膵β細胞からのインスリン分泌が低下し, また心室不整脈を引き起こすが, いずれもCa<sup>2+</sup>恒常性異常によると考えられている<sup>55, 56)</sup>. sorcin と相互作用するタンパク質もいくつか報告されている. アネキシンはCa<sup>2+</sup>依存性リン脂質結合タンパク質であり<sup>57)</sup>,



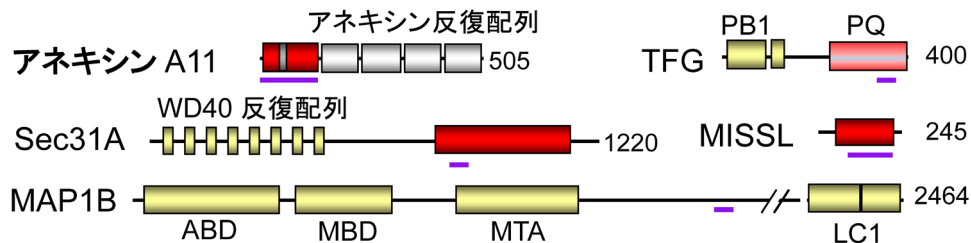
ヒトでは12のメンバー（遺伝子 *ANXA1*~*ANXA13*、ただし *ANXA12* は欠番）が存在している。アネキシンA7およびA11は、アネキシンファミリーの中でも特徴的なN末端側に長い（～180残基）制御領域を持っている。sorcinはこの制御領域のN末端領域にCa<sup>2+</sup>依存的に結合するが、

GYPPモチーフの繰り返しが重要と考えられている<sup>58)</sup>。sorcinはNa<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換因子（NCX）<sup>59)</sup>、リアノジン受容体（RyR）<sup>60)</sup>、筋小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPase（SERCA）<sup>61)</sup>、L型電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル<sup>62)</sup>、プレセニン2<sup>63)</sup>やPolo様キナーゼ1（PLK1）<sup>54)</sup>などへの結合も報告されている。詳細な機

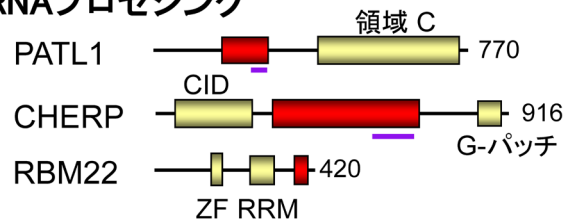
## A ESCRTシステム



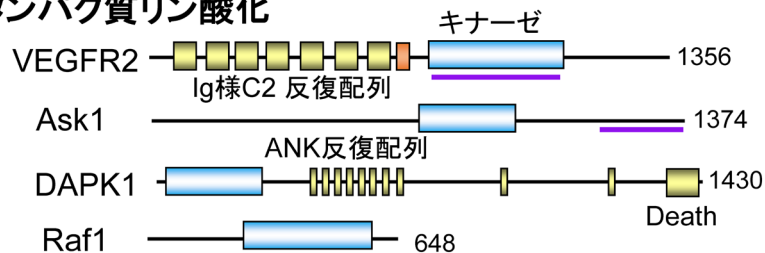
## B 小胞体-ゴルジ体間輸送



## C RNAプロセッシング



## D タンパク質リン酸化



## E その他

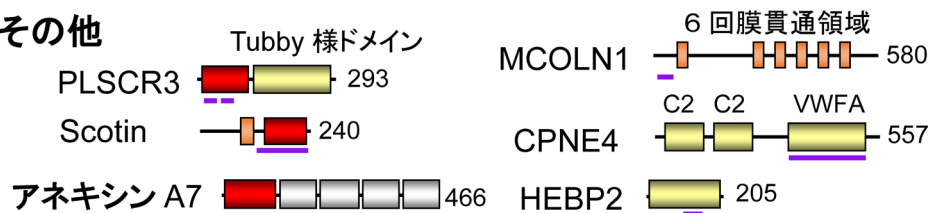


図3 ALG-2相互作用タンパク質

同定されたALG-2相互作用タンパク質の構造模式図。機能別に分類し、赤色はProに富んだ領域を表す。報告された結合領域を紫線で示す。いくつかの相互作用タンパク質は結合領域が明らかにされていない。

## A ALG-2結合モチーフ

ABM-1: PPYPX<sub>n</sub>YP, n=4

ALIX	798	-AQG <b>PPY</b> PTYPGY <b>PGYC</b> -	813
PLSCR3	13	-SPP <b>PPY</b> PVTPGY <b>PEPA</b> -	28
CHERP	562	-FER <b>PPY</b> PHRFD <b>YPQGD</b> -	577

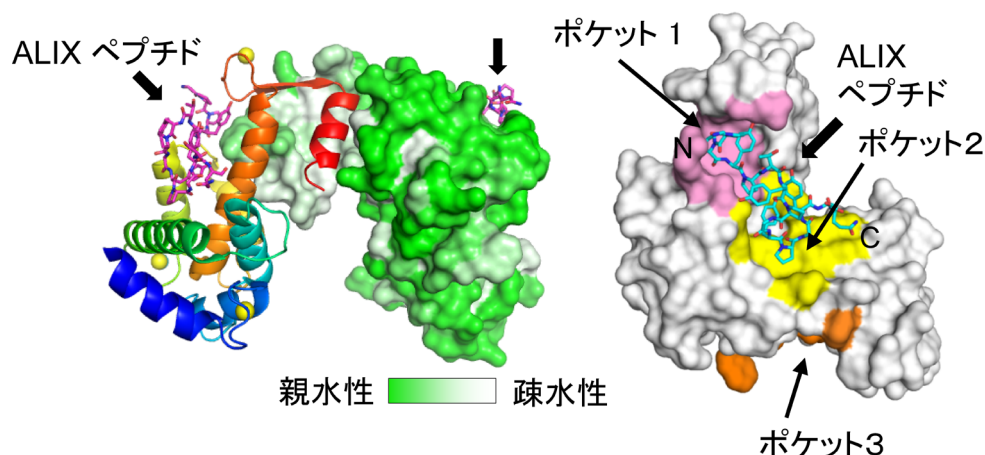
ABM-2: [PΦ]PX[PΦ]G[FW]Ω

Sec31A	834	-HGEN <b>PPP</b> PGFIMHGNV-	849
PLSCR3	40	-AQVPAP <b>APGF</b> ALFPSP-	55
PATL1	306	-GQML <b>PPAPGF</b> RAFFSA-	321

ABM-3: MP 繰返し配列

IST1	226	-GTV <b>MPMPMP</b> SANT-	241
ALIX	811	-GYC <b>QMPMPM</b> GYNPYAY-	826

## B ALG-2 / ALIX ペプチド複合体



## C ALG-2 / Sec31A ペプチド複合体

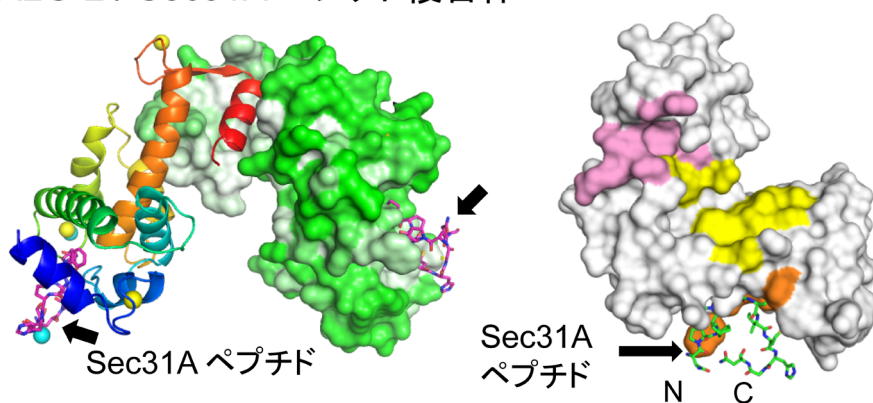


図4 ALG-2結合モチーフとALG-2・結合ペプチド複合体構造

(A)3種類のALG-2結合モチーフ(ABM)と前後のアミノ酸配列。赤色文字はモチーフとして保存されたアミノ酸残基を表す。(B)ALG-2とALIXペプチドとの複合体(PDB ID: 2ZNE)および(C)ALG-2とSec31Aペプチドとの複合体(PDB ID: 3WXA)のそれぞれの立体構造。ペプチドをスティックモデルでPyMolにより表示する。左図は二量体構造(カートゥーン表示とサーフェス表示)、右図は単量体構造(サーフェス表示)における疎水性ポケットの位置と結合ペプチドをそれぞれ矢印で示す。ポケット1(桃色)、ポケット2(黄色)、ポケット3(橙色)。文献30および113を改変。

構は不明であるが、sorcinaは細胞内Ca<sup>2+</sup>恒常性調節に関与し、sorcinaの発現を抑制すると血管内皮増殖因子（VEGF）の発現を抑え、VEGF下流のシグナル応答が低下する<sup>52)</sup>。sorcinaはグルコース応答性転写因子ChREBPのN末端領域に結合し、細胞質に転写因子をとどめ、Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇するとグルコースと結合したChREBPから離れることにより、核移行を制御している<sup>64)</sup>。sorcinaは*in vitro*結合解析でEDTA存在下、Ca<sup>2+</sup>存在下ともにALG-2との相互作用が報告され、ALG-2のN末端領域が結合部位と推定されているが<sup>65)</sup>、その生理的意義は不明である。

### 3) grancalcin

grancalcinは1992年に報告され、好中球や単球で発現が高く、生理機能として白血球機能への関与が示唆された<sup>66)</sup>。ノックアウトマウスは、目立った異常は認められなかったがエンドトキシンに対する生存率が少し上がり、好中球の付着率が低下した<sup>67, 68)</sup>。grancalcinは白血球特異的アクチン結合タンパク質L-プラスチンとCa<sup>2+</sup>非存在下で結合し、Ca<sup>2+</sup>存在下で解離するが、その生理機能との関係は不明である<sup>69)</sup>。N末端にsorcinaより長いグリシンと疎水性残基に富む領域（NLT）を持つ。このNLT領域はToll様受容体9（TLR9）と相互作用し、形質細胞様樹状細胞においてNFκB経路を正に調節していると報告されている<sup>70)</sup>。grancalcinはsorcinaと最も近縁のPEFタンパク質であり、両者のヘテロ二量体形成も報告されている<sup>71)</sup>。sorcinaは脊椎動物に存在するがgrancalcinは哺乳類にしか見いだされていない。

## 4. プロリンに富んだ領域を持つALG-2相互作用因子

ALG-2と相互作用するタンパク質は、これまでに個々の論文で25以上の因子について報告されており、PEFタンパク質ファミリーの中でその数が最も多い<sup>72)</sup>。約3分の2はALG-2側からの探索によるものだが、約3分の1は逆側からの探索による。ALG-2との相互作用解析は酵母ツーハイブリッド法（YTH）、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）融合タンパク質を用いたプルダウン法、エピトープ付加タンパク質の共免疫沈降法、標識ALG-2を用いたファウウェスタン、さらに組換えタンパク質や合成ペプチドを用いて表面プラスモン共鳴（SPR）センサーや等温滴定熱量計（ITC）による解析も行われている。ALG-2相互作用タンパク質は、プロリンに富んだ領域（Pro-rich region：PRR）を持つタイプと、持たないタイプに分けられる（図3）。PRRは一般にX線結晶解析では構造が決まらない柔軟な構造を持っており、タンパク質間相互作用領域となっている。また、SH3ドメインやWWドメインが認識するモチーフにはプロリンが複数含まれ、PRR中に存在する場合が多い<sup>73, 74)</sup>。そしてALG-2結合モチーフ（ALG-2-binding motif：ABM）がPRR中に存在するものも多く、筆者らは三つのタイプに分けている（図4A）<sup>72)</sup>。

## 5. ALG-2結合モチーフ1型（ABM-1）

### 1) ALIX

ALIX（ALG-2-interacting protein X、別名AIP1、PDCD6IP）は、ALG-2の相互作用因子として1999年に最初に報告され、ALIXへの結合が細胞死と関連づけられた<sup>75, 76)</sup>。しかし、細胞死を誘導する詳細な分子機構は明らかとなっていない。ALIXのPRR中に存在する特徴的な配列（801-PPYP-TYPGYPGY）がALG-2との結合に重要である<sup>77)</sup>。このような配列はTubbyスーパーファミリーに属し、マウス3T3-L1細胞の脂肪細胞分化誘導を負に調節するPLSCR3（16-PPYPVTPGYPEP）<sup>78-80)</sup>や選択的スプライシング制御因子CHERP（565-PPYPHRFDYPQG）<sup>81)</sup>のALG-2結合部位にも存在し、ALG-2結合モチーフ1型（ABM-1）はコンセンサス配列PPYPXnP（X、任意アミノ酸残基、n=4）を持つ。

筆者らは、ALIXのALG-2結合領域合成ペプチドH-QGPPYPTYPGYPGYSQ-OHとALG-2との複合体のX線結晶構造解析を行い<sup>30)</sup>、PPYPが疎水性ポケット1に、YPが疎水性ポケット2に入り込むことを示した（図4B）。ポケット1の底面は二量体ALG-2分子中でそれぞれ対合している相手分子の残基Y180によって形成される。Y180はEF5に存在してALG-2ホモ二量体の対合形成に重要なクラスター残基の一つでもある<sup>9)</sup>。したがってY180Aアミノ酸置換変異体は、二量体形成ができずポケット1が不完全となるためALIXとの結合能が失われる<sup>30, 82)</sup>。ALG-2の立体構造をカルシウム結合型と非結合型とで比較すると、EF3に続くループ内のR125の側鎖がCa<sup>2+</sup>非存在下ではポケット1を塞ぎ、Ca<sup>2+</sup>存在下ではポケット1を開放するスイッチとして働くことが判明した<sup>30)</sup>。哺乳類の動物細胞中には2残基（G<sup>121</sup>F<sup>122</sup>）が欠損したアイソフォーム（ΔGF122）がマイナー成分として存在するが<sup>83)</sup>、このアイソフォームはALIXと結合できない<sup>78, 83)</sup>。G<sup>121</sup>F<sup>122</sup>の欠損は、選択的スプライシングにより6塩基上流のドナー部位が使われるためである<sup>84)</sup>。このアイソフォームはEF3に続くループ主鎖の欠損により、R125に相当するR123の側鎖がCa<sup>2+</sup>存在下でもポケット1を塞ぎ、また、ポケット1とポケット2の壁の変形がALIX結合能喪失の原因と考えられる<sup>85)</sup>。

### 2) ESCRTシステム

上皮細胞増殖因子（EGF）受容体など膜タンパク質は、リガンドと結合するとエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれエンドソームに運ばれる。そして、積荷はユビキチン化されるとこれが目印となり、さらにリソソームへ運ばれて分解されるか、あるいはリサイクルされて細胞膜表面に戻されるかの選別が行われる<sup>86)</sup>。積荷がエンドソームの内部小胞に送られるとシグナル伝達が終結し、リソソーム分解経路に入る。このような内部小胞を持つエンドソームは、多胞体（multivesicular body：MVB）あるいは多胞性エンドソームと呼ばれている。MVB形成

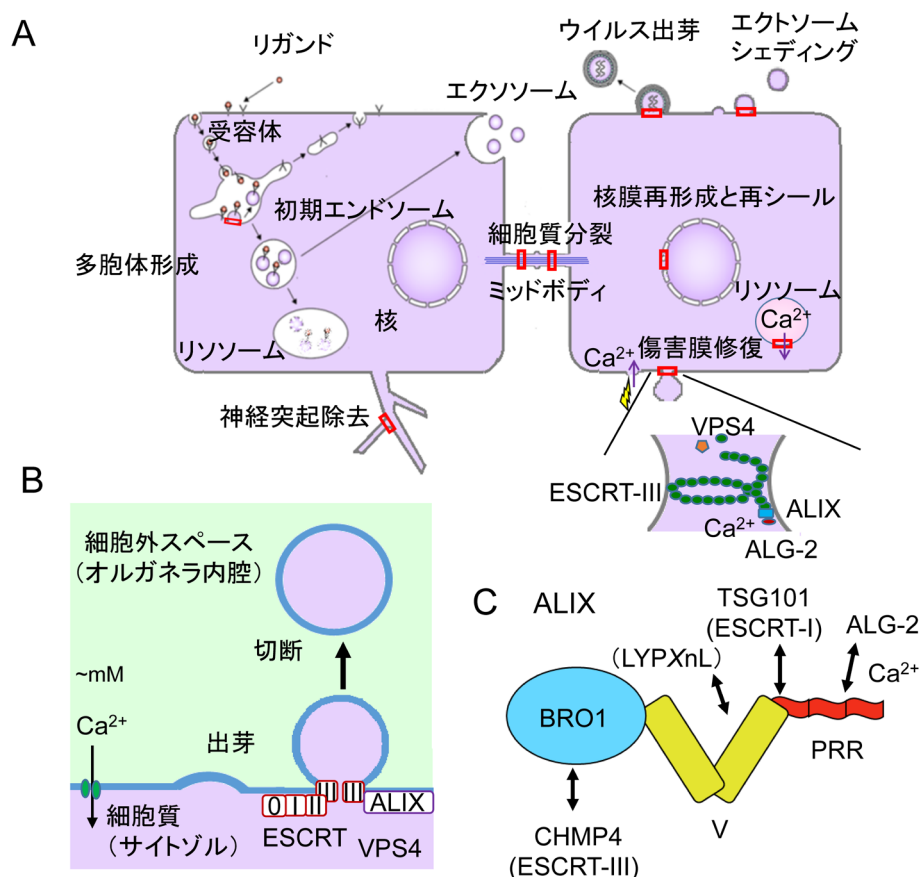


図5 ESCRT システム

(A) ESCRT 作用の概略図。赤枠は ESCRT 因子群の集積箇所。(B) 膜変形と出芽のトポロジー。ESCRT-0, I, II, III サブユニットが集積し、膜を変形する。重化した ESCRT-III は VPS4 によって解離する。(C) ALIX と直接相互作用する因子。BRO1 ドメインで CHMP4 (ESCRT-III 主要サブユニット) と結合する。PRR (Pro-rich region) で TSG101 (ESCRT-I サブユニット) および ALG-2 と結合する。V 字型の立体構造を持つ V ドメインは、相互作用因子の LYPXnL モチーフを認識する。文献 72 を改変。

には多数の因子から構成された複合体であるエンドソーム選別輸送複合体 (endosomal sorting complex required for transport: ESCRT) が働く<sup>87)</sup>。ユビキチン結合能を持つ ESCRT-0 複合体、ESCRT-I 複合体と ESCRT-II 複合体が、受容体を取り込んだエンドソーム膜に順次集積する (図 5)。そして、ESCRT-III 複合体構成因子 (charged multivesicular body protein 4, CHMP4A, B, C アイソフォームが存在) の重合により膜の変形を伴って内腔に出芽し、最後に AAA+ 型 ATPase である VPS4 の作用により ESCRT が解離し、膜の切断が起こる。ESCRT システムは MVB 選別輸送だけでなく、膜被覆ウイルスの細胞膜からの出芽、細胞外膜小胞の細胞膜からのシェディング、細胞質分裂における最終切断、核膜再形成、神経突起除去、損傷膜の修復などにおいても働き、幅広く細胞機能に関与している。使われる ESCRT サブユニットや補助因子の種類は作動場所で異なる<sup>88-90)</sup>。ABM-1 コンセンサス配列とは完全には一致しないが、類似配列がアネキシン A11、アネキシン A7、TSG101、HD-PTP、VPS37B、VPS37C、MISSL など、その他の ALG-2 相互作用因子にも見いだされている<sup>91-96)</sup>。これらのタンパク質のうち、TSG101 と VPS37B/C は ESCRT-I 複

体の構成因子であり、TSG101 がユビキチン結合ドメインを持つ。ALIX と HD-PTP そして BROX<sup>97)</sup> はともに BRO1 ドメインを持ち CHMP4 と結合する<sup>89, 94, 97-101)</sup>。ALIX と HD-PTP は ESCRT システムにおける重要な補助因子として働いている<sup>88-90)</sup>。

### 3) 損傷膜修復における ALG-2 の役割

細胞膜が損傷を受けると、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が引き金となって膜修復反応が起こるが、損傷の大小によって修復の仕組みは異なる<sup>102)</sup>。レーザー照射によって細胞膜に小さな損傷を与えると、ALG-2、TSG101、ALIX を引き寄せて ESCRT システムを作動させ、損傷部位を切り取りながらシールするモデルが考えられている<sup>103)</sup>。この場合、ALG-2 は損傷膜に早期に集積するため、損傷センサーとして働いている。初発段階に作用する因子 (ESCRT-0) は、必ずしもユビキチン化タンパク質認識因子である必要はなく、どのような状況で ESCRT システムが作動するかの使い分けがなされている<sup>90)</sup>。このため、ALG-2 も ESCRT-0 の一つと呼ぶことが提案されている<sup>103)</sup>。ALG-2 は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に膜に結合しやすい性質を持つため<sup>29)</sup>、損



傷部位に集積すると推察されるが、その詳細な分子機構は不明である。また電気穿孔（エレクトロポレーション）やジギトニン処理によって細胞膜に損傷を与えると、ALG-2遺伝子ノックアウトにより細胞の生存率が低下するが、逆にALG-2過剰発現によって生存率が高まる<sup>104)</sup>。そしてALG-2結合ALIXペプチドを添加するとALG-2による保護作用が抑制される。これは内在性ALIXとの競合によると考えられ、損傷からの回復に対してALG-2やALIXが関与していると推察される。一般に、オルガネラは損傷するとオートファジーにより隔離され、リソソームと融合して分解除去される<sup>105)</sup>。リソソーム膜自身が損傷を受けた場合にもオートファジーにより除去されるが（リソファジー）、損傷が小さい場合、リソファジーが起こる前にESCRTシステムによって膜修復が行われる<sup>106, 107)</sup>。この場合にもリソソーム内の $\text{Ca}^{2+}$ 漏出が損傷シグナルとなり、ALG-2がALIXやESCRTサブユニットとともに集積することが示されている<sup>106)</sup>。

## 6. ALG-2結合モチーフ2型（ABM-2）

### 1) Sec31A

小胞体からゴルジ体への小胞による積荷輸送の過程は、多段階のメンブレントラフィック（膜交通）システムから成り立つ<sup>108)</sup>。小胞体出芽部位（ER exit site：ERES）と称される特定部位で積荷が集積され、コートタンパク質複合体II型（coat protein complex II：COPII）小胞の出芽と離脱、そして小胞体-ゴルジ体中間区画（ERGIC）を経てゴ

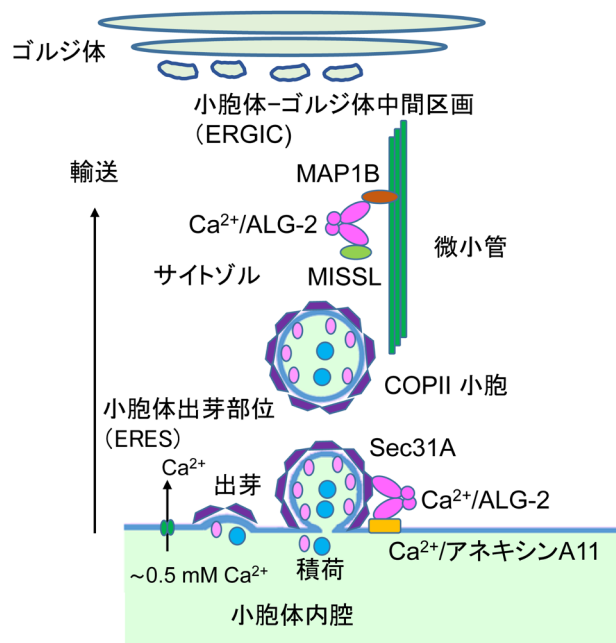


図6 小胞体-ゴルジ体間小胞輸送模式図

ALG-2はCOPII小胞外殻構成因子のSec31Aと $\text{Ca}^{2+}$ 依存性リン脂質結合タンパク質アネキシンA11のアダプター、およびMISSLと微小管結合タンパク質MAP1Bのアダプターとして積荷の小胞輸送調節に働く。

ルジ体への運搬が行われる（図6）。低分子量GTPase Sar1の活性化が引き金となって、Sec23/Sec24複合体とSec13/Sec31A複合体が順次ERESに動員され、それぞれモル比1：1の多量体が籠状のCOPII小胞の内殻と外殻を形成する。ALG-2の細胞内分布を蛍光免疫染色法により顕微鏡観察すると、核近傍に細かい斑点状にみられ、 $\text{Ca}^{2+}$ 刺激により顕著になる。この斑点にはSec31Aや他のERESマーカーも共局在する<sup>109, 110)</sup>。筆者らは、ALG-2がSec31Aに直接結合すること、そしてALIX型とは異なる新しいタイプのALG-2結合モチーフ（ABM-2）をSec31Aが持つことを明らかにした<sup>110, 111)</sup>。PLSCR3にもABM-2配列が存在し<sup>78)</sup>、ABM-2がポケット3に結合することをシミュレーション解析により前もって予測していたが<sup>112)</sup>、Sec31AのALG-2結合部位の合成ペプチドH-NPPPPGFIMHGN-OHとALG-2との複合体のX線結晶構造解析により<sup>113)</sup>、このことを直接的に証明した（図4C）。この構造モデルによって、Sec31Aとは結合しないALG-2変異体F85AがALIXと結合すること、また、ALIXとは結合しないALG-2のアイソフォーム（ΔGF122）や変異体Y180Aに対してSec31Aが結合することが矛盾なく説明できる<sup>78, 113)</sup>。筆者らはABM-2を従来PXPGFとしていたが<sup>84, 114)</sup>、Sec31A結合部位の詳細な変異体解析により[PΦ]PX[PΦ]G[FW]Ω（Φ：疎水性アミノ酸残基、Ω：側鎖が大きなアミノ酸残基、X：任意アミノ酸残基）と新たに定義した<sup>113)</sup>。ただし、Sec31Aペプチドは左巻きのII型ポリプロリンヘリックス（PPII helix）構造をとっており、Proの残基数が多いほど結合に有利と推察される。PLSCR3のABM-2類似配列（PAPAPG-FALFPSP）のΩ位はアラニンであり、強い結合のためには、さらにC末端側の数残基の寄与が必要である。相互作用因子の結合によってALG-2二量体が安定化するが、二量体によって形成されるポケット1に結合するALIX（ABM-1）ペプチドのみならずABM-2ペプチドにもその効果が示されている<sup>33)</sup>。

### 2) ALG-2による小胞体-ゴルジ体間小胞輸送調節

COPII形成に関わる因子群の組換え体と細胞抽出液を使って試験管内で出芽実験を行うと、ALG-2は $\text{Ca}^{2+}$ 依存的に出芽を抑制する<sup>115)</sup>。また、リポソームを用いた結合実験により、ALG-2のSec31Aへの結合が内殻のSec23と外殻のSec31A/Sec13との結合を促進する。筆者らはALG-2をノックダウンすると、モデル積荷タンパク質である水疱性口内炎ウイルスVSV tsO45株のGFP融合糖タンパク質（tsO45-G-GFP）のゴルジ体への輸送が早まる結果を得ており<sup>116)</sup>、ALG-2がERESからの出芽を遅らせることと矛盾しない。興味深いことにアネキシンA11のノックダウンでも同様の結果が得られた。Sec31Aが $\text{Ca}^{2+}$ /ALG-2を介してアネキシンA11と結合することから、小胞体膜上でアネキシンA11がCOPIIをとどめる働きがあると考えられる<sup>116)</sup>。小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送を行うCOPII小胞の大きさは通常60～80nmであるが、カラー

ゲン前駆体やカイロミクロンなど巨大分子を内包するためにはCOPII小胞を300~400nmに拡張する仕組みが必要となる<sup>117, 118)</sup>。TANGO1はSH3ドメインを持ち、小胞体内腔でコラーゲンVIIと結合する積荷受容体である。そして、TANGO1および構造的に類似した細胞質ドメインを持つcTAGE5は複合体を形成し、それぞれのPRRがSec23/24と結合し、COPII小胞の増大化を行ってコラーゲン分泌を調節している<sup>119, 120)</sup>。これら積荷受容体タンパク質のPRR中に繰り返し存在するProProPro配列がSec23と結合するため、二つのProProPro配列を持つSec31AがSec23に結合すると、Sec23/Sec24コートからTANGO1/cTAGE5を解離させSec31/Sec13が置き換わる<sup>121)</sup>。Sec31Aに存在する二つのProProProのうち、一つはALG-2結合部位に含まれるが、前述したようにALG-2の存在はむしろSec31AとSec23の結合を強める<sup>115)</sup>。ERESでのCOPII小胞サイズや輸送にはサブユニットやその相互作用因子群の翻訳後修飾による調節も報告されており、詳しくは別の総説を参照されたい<sup>118)</sup>。

## 7. ALG-2結合モチーフ3型 (ABM-3)

IST1はCHMPコアダメインを持ち、CHMPファミリーに所属するESCRT-III関連タンパク質である<sup>122)</sup>。分子内に脊椎動物の間で保存されたMPの繰り返し配列を持ち(ヒト, 228-VPMPMPMPMP, V→VPMアイソフォームも存在), IST1とALG-2のCa<sup>2+</sup>依存的な結合のためにはこのMP繰り返し配列が必須である<sup>123)</sup>。IST1は、ALG-2のΔGF122アイソフォームには結合しないが、Y180A変異体には結合するため、ALIXとSec31Aの両方とも一部共通した結合特性を示す。L52A変異体が結合しないという結果を支持するドッキングシミュレーションモデルでは、MP配列がポケット3の一部に入り込む<sup>123)</sup>。筆者らはMP繰り返し配列を便宜上、ALG-2結合モチーフ3型(ABM-3)と呼んでいる(図4A)。

## 8. ALG-2結合の補強

これまでに紹介したALG-2結合モチーフがプロリンを複数含みPRR中に存在することは、モチーフを構造的に柔軟な領域に位置づけることに寄与していると思われる。しかし、天然変性領域予測<sup>124)</sup>をすると、ABM-1, ABM-3の場合には必ずしも高い天然変性スコアを示すわけではない。ALG-2結合モチーフもしくは類似した配列を持っていても単独での結合は弱い。PATL1, CHERP, VPS37B, VPS37CやMISSLのように結合モチーフが分子内に複数存在することにより<sup>81, 95, 96, 114)</sup>、あるいはTrk-fused gene (TFG)のように標的タンパク質がオリゴマー化することにより<sup>125)</sup>、全体としてALG-2結合能を高めていると考えられる。また、PLSCR3のABM-2様配列のように周辺のアミノ酸残基によって結合が補強される場合もある<sup>113)</sup>。さ

らに、ABM-3様の配列はALIXにも存在し(815-MPMPM, ABM-1のC末端側に位置)(図4A), ALIXとALG-2の結合親和性を高めていると思われる。

## 9. 核内ALG-2

特異抗体を用いた蛍光免疫染色によってALG-2の細胞内分布を調べると、細胞質のみならず核内にも蛍光シグナルが観察される。ALG-2は二量体でも計算分子量が44,000で比較的小さなタンパク質であるため、核膜孔を自由拡散で通過できると思われる。しかし、蛍光タンパク質融合ALG-2を用いた場合でも核内に分散して検出され、小胞体カルシウムポンプ(SERCA)阻害剤タプシガルジン処理をして細胞質・核質Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させると、細胞質のみならず核内で斑点状に観察される<sup>81)</sup>。これはALG-2がCa<sup>2+</sup>依存的に細胞質ではSec31Aと結合してERESに集積し、そして核内ではCHERPと結合して核スペckルと称される構造物に局在するためである<sup>81)</sup>。CHERPはセリン/アルギニンに富んだ領域を持ち、スプライシング調節因子SRSFファミリーに類似した構造を持つ。そして、活性型である高度リン酸化RNAポリメラーゼIIに結合する。CHERPおよびALG-2のノックダウンはイノシトール三リン酸受容体1型(IP<sub>3</sub>R1) pre-mRNAの選択的スプライシングパターンを変化させるため、ALG-2は実際に核内でも働いていると推察される<sup>81)</sup>。また、細胞質RNA顆粒Pボディの構成タンパク質であるPATL1にALG-2はCa<sup>2+</sup>依存的に結合する<sup>114)</sup>。PATL1は核内と細胞質をシャトルして核スペckルや他の核内構造物にも局在することが知られており<sup>126)</sup>、ALG-2とRNA関連因子との関係は注目に値する。

## 10. PRRを持たないALG-2相互作用因子

特定のPRRを持たずALG-2と相互作用する因子は、タンパク質リン酸化酵素などを含めいくつか報告されている(図3)。しかし、詳細な結合部位が明らかにされているものは少なく、共通のモチーフとして類型化するには至っていない。以下、部位特異的のアミノ酸置換変異体を用いて相互作用解析が行われ、結合部位もしくは重要残基が同定されている三つのケースについて紹介する。

### 1) TRPML1

TRPML1 (transient receptor potential mucolipin 1, 別名Mucolipin-1, 遺伝子記号*MCOLN1*)は、後期エンドソーム、リソソームに局在する6回膜貫通型の陽イオンチャネルとして働き、オルガネラ内腔に貯留されたCa<sup>2+</sup>を細胞質ゾルに放出し、膜輸送調節にも関与する<sup>127)</sup>。TRPML1の機能喪失変異は、神経疾患であるムコリピドーシスIV型のリソソーム蓄積症を引き起こし、オルガネラ内にはスフィンゴ脂質、ガングリオシド、糖タンパク質な

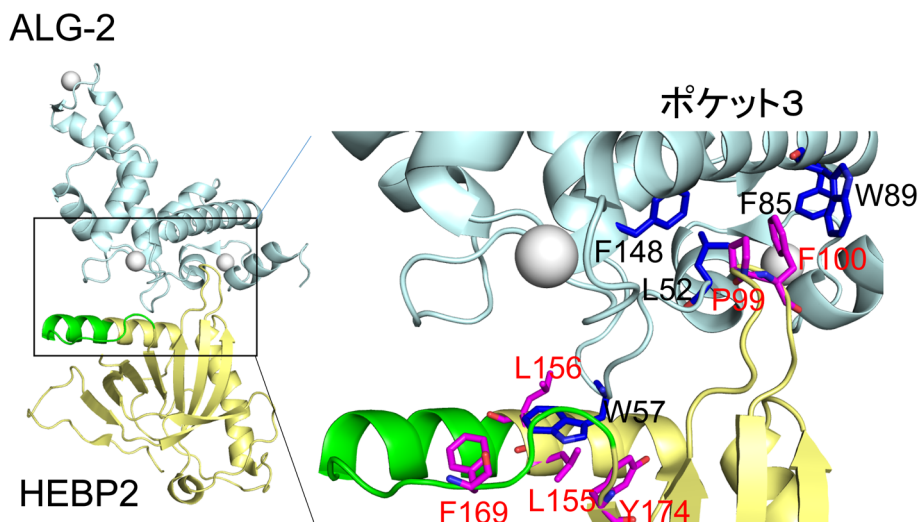


図7 ALG-2とHEBP2の複合体の立体構造

ALG-2のポケット3および近傍にHEBP2が結合する (PDB ID: 5GQQ, PyMolを用いてカートゥーン表示)。結合領域の拡大図において、結合に重要なW57 (ALG-2) およびF100 (HEBP2) とその近傍の疎水性残基をスティックモデルで表示し (ALG-2残基: 青色, HEBP2残基: マゼンタ), ALG-2残基番号を黒色文字, HEBP2残基番号を赤色文字で示す。HEBP2のBH3相同配列<sup>134)</sup> (黄緑色, アミノ酸残基番号157~172) は、全体構造中ではヘリックスおよびループを形成する。

どが蓄積する<sup>128)</sup>。TRPML1のN末端側66残基の細胞質ゾル領域が $\text{Ca}^{2+}$ 依存的にALG-2と結合するが、この領域に存在する酸性・塩基性・疎水性残基 (ABH) クラスター (37-EEEDLRRRLKYFF) が結合に重要であり、44-RLK/AAAや47-YFF/AAA変異体はALG-2との結合が消失する<sup>129)</sup>。蛍光タンパク質融合TRPML1を網膜色素上皮ARPE-19細胞に過剰に発現させ、後期エンドソーム・リソソームマーカーCD63 (Lamp 3) との共局在率を調べると、ABHクラスターの変異体で低下する現象が観察され、ALG-2結合部位がTRPML1の細胞内局在に影響を与えることが示唆された。ALG-2の直接的影響については解析されていないが、TRPML1を介したリソソームからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出がmTORC1の $\text{Ca}^{2+}$ 依存的活性化に関わっているとの報告があり<sup>130)</sup>、リソソームを介した $\text{Ca}^{2+}$ シグナルとALG-2との関係が注目される。

## 2) HEBP2

HEBP2 (別名SOUL) は網膜で発現し、肝で発現しているヘム結合タンパク質HEBP1と相同性を持つ因子として発見されたものである<sup>131)</sup>。マウスHEBP2は二量体であるが、ヘムと結合して六量体を形成するという報告がある<sup>132)</sup>。しかし、ヒトHEBP2では実験的にヘムとの結合は再現できないため、ヘム結合タンパク質としての生理機能には疑問が残っている<sup>133)</sup>。HEBP2の過剰発現はミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore: MPTP) を開き、過酸化水素刺激による細胞死を促進する報告があるが、これはHEBP2がBH3 (Bcl-2-homology 3) ドメインを持ち、抗アポトーシス因子Bcl-xLと結合することによって考えられている<sup>134)</sup>。BH3ドメインを含む合成ペプチド (HEBP2, アミノ酸残基番号147~172)

とBcl-xLの複合体のX線結晶解析結果は、BH3ドメインペプチドが $\alpha$ ヘリックスを形成して結合することを示し、また、NMRやSPR解析によっても相互作用が確認された<sup>133)</sup>。しかし、HEBP2タンパク質全体とBcl-xLの結合は検出されなかった。HEBP2タンパク質中のBH3ドメインの一部はループを形成しており (図7)、Bcl-xLとの結合のためには、疎水性相互作用部位である168-VFを含む部分がループから $\alpha$ ヘリックスをとる大きな構造変化が必要となる。このため生理的条件下でのHEBP2とBcl-xLの相互作用は疑問視されている<sup>133)</sup>。

最近、HEBP2とALG-2の相互作用について興味深い報告がなされた<sup>135)</sup>。モデル細胞実験系において、ALG-2のノックダウンはHIV-1の複製を増幅し、逆に過剰発現は抑制した。HEBP2単独の過剰発現でもHIV-1の疑似粒子産生を抑制するが、ALG-2との共発現で抑制の相乗効果が観察された。ALIXやTSG101とは結合しないALG-2変異体 $\Delta$ GF122の過剰発現ではむしろ強い抑制が起こるため、ESCRTシステムとは異なるメカニズムでHIV-1産生を抑制していると推測される。さらにHEBP2とALG-2との複合体のX線結晶構造解析が行われ<sup>135)</sup>、HEBP2のF100はALG-2のポケット3に入り込み、HEBP2が持つBH3配列および前後に位置する残基から形成される疎水性パッチは、ポケット3の外壁に位置するW57と相互作用することが示された (図7)。HEBP2自身はアポ型とALG-2結合型との間で大きな構造変化はなく、HEBP2とALG-2の結合様式は生理的条件下でも同じと考えられる。興味深いことにHEBP2二量体の結合によって、同じく二量体を形成しているALG-2各分子間の隙間の間隔が狭まる構造変化を誘導する。ALG-2・HEBP2複合体形成が他のALG-2相互作用因子との結合に対して、競合あるいは促進など対象分



子ごとに異なる効果の可能性があり、今後の研究が待たれる。マウスHEBP2 (SOUL) とマウスALG-2の組換え体を用い、ITCによる $\text{Ca}^{2+}$ 依存的な相互作用解析が行われた結果、 $K_d=32.4\text{ nM}$ と算出され、生理的にも細胞内で十分に複合体を形成すると推察される<sup>136)</sup>。また、SOULのF100A変異体はALG-2との結合が喪失するが、ポケット3内部の疎水性残基を単独で変異させてもほとんど影響がなく、ポケット3内部においてもABM-2の結合様式とは異なると考えられる。

### 3) MAP1B

MISS (MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein) は、MAPK基質タンパク質であり、マウス卵母細胞の減数分裂期においてERK2と相互作用し紡錘体を安定化する因子として発見された<sup>137)</sup>。しかし、MISS遺伝子そのものはラットやヒトには存在しないのに対して、MISSと相同な遺伝子MISSL (遺伝子記号*MAPK1IP1L*) はマウスとともにラットやヒトにも存在する。ところがMAPK結合部位は欠如している。したがってMISS遺伝子の方がマウスで特異的にMAPK結合部位を獲得して進化したと考えられる。筆者らは、ALG-2相互作用タンパク質としてMISSLを同定したが、さらにMISSLと結合する因子を共免疫沈降産物の質量分析により探索し、微小管結合タンパク質MAP1Bを見いだした<sup>96)</sup>。MISSLとMAP1Bの結合は $\text{Ca}^{2+}$ キレート剤存在下では検出されず、また、 $\text{Ca}^{2+}$ が存在してもALG-2ノックアウト細胞では検出されなかった。ALG-2二量体が $\text{Ca}^{2+}$ 存在下でMAP1BとMISSLにそれぞれ結合し、両者をつないでいると考えられる。マウスMAP1Bは2464アミノ酸残基からなる大きなタンパク質であるが、ALG-2結合部位を詳細に解析した結果、36残基(1813~1848)断片が結合に対して十分な領域であり、さらにアミノ酸置換変異体解析の結果、1825-PYGFR、特にF1828が重要であることが判明した<sup>138)</sup>。ALG-2のポケット1、ポケット3の変異体あるいはΔGF122アイソフォーム(ポケット2構造変化)のいずれとも結合が喪失あるいは顕著に減弱した。したがって、ALG-2とMAP1Bの結合は、結晶構造上で結合様式が明らかにされているALIX, Sec31A, HEBP2とも様式が異なると思われる。

GFP-MISSLは $\text{Ca}^{2+}$ 依存的に一部ERESへの局在化が観察される。しかし蛍光免疫染色法による細胞内分布解析で、MAP1BとALG-2の共局在部位とSec31AとALG-2の共局在部位は分離して観察される<sup>96)</sup>。恒常的に分泌型アルカリホスファターゼ(secretory alkaline phosphatase: SEAP)を発現するHeLa細胞を用いると、SEAPの分泌割合はMISSLあるいはALG-2のノックダウンにより低下するが、両者を同時にノックダウンしても分泌割合の加算的な低下は認められず、両者が複合体として同じ分泌経路で働いていることを示唆する<sup>96)</sup>。そして、MISSLあるいはALG-2のノックダウン効果はMAP1Bのノックダウンによって消失する。この現象は微小管依存的な小胞輸送

をMAP1Bが抑制的に調節するが、そのためにはMISSL・ALG-2複合体のMAP1Bへの結合が関わっていると解釈される。ALG-2のノックダウンが積荷輸送に与える影響は、積荷分子間では異なって観察される。VSV-tsO45-G-GFP輸送では促進し<sup>116)</sup>、SEAPとコラーゲン1前駆体輸送では抑制する<sup>96)</sup>。ALG-2はCOPII小胞間の融合を阻害するが、Sec31AとALG-2との結合に必要な $\text{Ca}^{2+}$ の供給源は小胞体由来し、小胞体内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を下げるとALG-2依存的COPII小胞間融合阻害が解除される<sup>139)</sup>。また、VSV-tsO45-G-GFP輸送はpefflinのノックダウンで促進されるが、ALG-2との同時ノックダウンで促進が解除されたとの報告がある<sup>140)</sup>。これは、ALG-2による輸送促進的機能をpefflinがALG-2を捕捉して無効にすると解釈されている。しかし、ALG-2およびpefflinの小胞体-ゴルジ体間小胞輸送調節の作用点は複数あり、ノックダウン実験でどの影響が大きくなるかは、積荷や細胞の種類、アッセイ方法など実験条件によって変わるため、解釈には注意を要する<sup>141)</sup>。ALG-2に相互作用する未同定の調節因子が重要な働きをしている可能性がある。

## 11. pefflin相互作用因子

pefflin (遺伝子記号*PEFI*) はALG-2に近縁な相同遺伝子として1999年に発見され、N末端にはA/PPGGPYGGP配列が9回繰り返した領域が存在する<sup>142)</sup>。このため、PEFファミリーの中ではN末端非PEF領域が最も長い(図1C)。通常、pefflinはALG-2とのヘテロ二量体で存在し、ホモ二量体は検出されない<sup>25, 143)</sup>。しかし、界面活性剤を含む細胞溶解液中で $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を高くするとpefflinはALG-2から解離する<sup>25)</sup>。アフリカツメガエルの一過性受容器電位チャネルTRPN1とpefflinとの相互作用が報告されている<sup>144)</sup>。pefflin単量体との結合か、ALG-2とのヘテロ二量体との結合かは不明であり、その生理的意義もわかっていない。

Sec31AのE3リガーゼ複合体CUL3・KLHL12によるユビキチン修飾(モノユビキチン化)がCOPII小胞増大化に関わっているとの報告がある<sup>145)</sup>。KLHL12はE3ユビキチンリガーゼCUL3とユビキチン化基質であるSec31Aとの間のアダプターとして働くが、このときpefflinとALG-2のヘテロ二量体が $\text{Ca}^{2+}$ 依存的補助アダプターとして働く<sup>146)</sup>。pefflinのGP繰り返し領域がKLHL12のKelchリピートに結合し、KLHL12二量体のもう一つの分子が持つKelchリピートとSec31Aの未同定部位が結合すると推測されている。ALG-2の免疫沈降産物中のSec31AとKLHL12の量は $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的に増加するが、pefflinの量は減少する。これは、pefflinはALG-2とヘテロ二量体を形成するが $\text{Ca}^{2+}$ 存在下では解離する性質<sup>25)</sup>を持つためである。設定された低 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度条件下( $\leq 136\text{ nM}$ )ではpefflin・ALG-2ヘテロ二量体が維持され、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が増加する( $\geq 375\text{ nM}$ )と解離する<sup>146)</sup>。しかし、ユビキチン化されたpefflinは $\text{Ca}^{2+}$ が



高濃度になっても ALG-2 との二量体形成を維持するため、Sec31A に結合するユビキチン化 peflin の割合は増加すると解釈されている。Sec31A のモノユビキチン化部位は未特定であり、翻訳後修飾がどのようにコラーゲン輸送調節に関わっているのか、その詳細は不明である。

## 12. ALG-2 の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性アダプター機能

ALG-2 ホモ二量体は、各項目で述べたように  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に異なる分子と結合し、両者の橋渡しをする役割がある<sup>84, 141)</sup>。同じ ALG-2 結合モチーフ (ABM) を持つ場合には、二量体 ALG-2 の各分子にそれぞれ結合すると考えられる。たとえば、ともに ABM-1 を持つ ALIX と ESCRT-I 複合体構成因子 TSG101・VPS37 との結合がその例である<sup>82, 95)</sup>。しかし、異なる ABM を持つ因子間の橋渡しの場合には、たとえば、Sec31A (ABM-2) と アネキシン A11 (ABM-1) では同一 ALG-2 分子内の異なる部位に結合するのか、あるいは、二量体の別々の分子にそれぞれ結合するのか、明らかとはなっていない。立体障害を考慮すると異なる ALG-2 分子が使われる可能性が高い。しかし、表3に示すように橋渡しをする相手には特異性があり、Sec31A と ALIX を橋渡しする活性は検出されていない<sup>116)</sup>。相互作用因子の結合によって同一 ALG-2 分子内の他の疎水性ポケットに微妙な構造的変化をもたらし、特定の因子のみ結合を許容し、他の因子の結合を排除すると考えると理解しやすい。逆に因子 X が結合すると新たに因子 Y の高親和性結合部位が形成される可能性がある。アダプターとして作用する標的分子の新規因子探索の戦略として、従来解析されてきた一対一の相互作用ではなく、特定リガンド結合条件下の工夫を施して実施するとよいかもしれない。また、前節で紹介したように ALG-2・peflin ヘテロ二量体は CUL3・KLHL12 複合体と Sec31A を連結させるアダプターとして働く<sup>146)</sup>。ALG-2 ホモ二量体および ALG-2・peflin ヘテロ二量体は、結合部位の選択によって多様な相手を標的としていると思われる。

表3 ALG-2 アダプターの標的因子

二量体構成	相互作用タンパク質		作用部位*	文献
	分子1	分子2		
ALG-2/ALG-2	ALIX	TSG101	1	82
	ALIX	VPS37B/C	1	95
	Sec31A	アネキシン A11	2	116
	TFG	TFG	2	125
	MISSL	MAP1B	2	96
ALG-2/peflin	Sec31A	KLHL12	2	146

\*1: ESCRT システム, 2: 小胞体-ゴルジ体間輸送制御。

## 13. 非典型的カルパインと ESCRT との接点

前述したように、組織普遍的に発現している典型的カルパインは PEF ドメインを持つが進化的にはむしろ新しく、カビや酵母には存在しない<sup>15)</sup>。一方、PEF ドメインを持たない非典型的カルパインサブファミリーの一つである calpain-7 (CAPN7) のオーソログは、カビ (PalB) や酵母 (Rim13) にも存在する (表1)。PalB/Rim13 は遺伝学的研究が進み、アルカリ性環境適応時に作用する転写因子 (PacC/Rim101) を限定分解して活性化することが明らかにされている<sup>147, 148)</sup>。このとき ALIX ホモログ (PalA/Rim20) が基質と結合し、一方、PalB/Rim13 は ESCRT-III 構成因子と結合するため、ESCRT システムを利用して膜上で基質を分解する。pH センサーは細胞膜上に存在するが、転写因子の限定分解場所については、細胞膜直下の皮層あるいはエンドソーム膜上のどちらが生理的条件下での作動場所なのか、まだ議論の余地が残されている<sup>147, 148)</sup>。PalB は Vps24 (CHMP3 オーソログ)、Rim13 は Snf7 (CHMP4 オーソログ) というようにどの ESCRT-III 構成因子と結合するかは、それぞれの生物種の calpain-7 オーソログ酵素によって異なり、特異性が存在する。ヒト calpain-7 は N 末端領域に明確な microtubule-interacting and trafficking (MIT) ドメインを二つ持つ (図8)。筆者らは calpain-7 の MIT ドメインが MIT-interacting motif (MIM) を二つ持つ IST1 や MIM

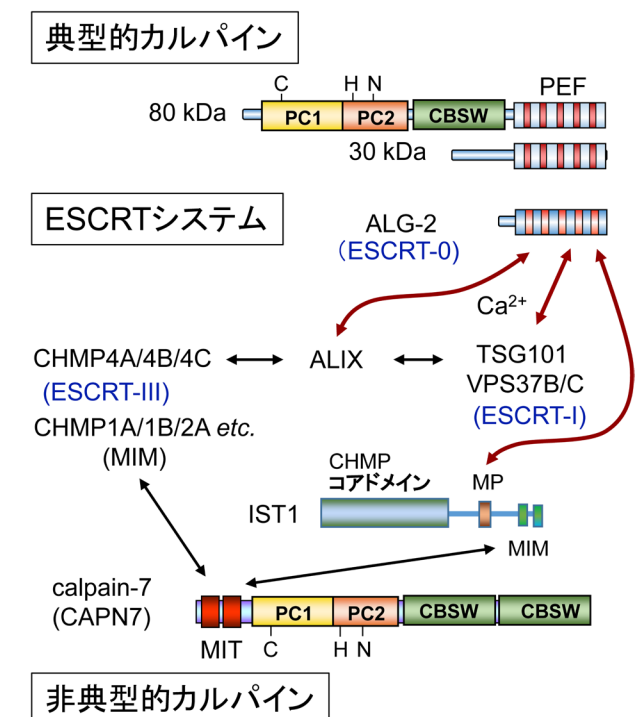


図8 カルパインと ALG-2 との接点

ALG-2 は ESCRT-0 の一つとも解釈され、ALIX および ESCRT-I サブユニットと結合し、さらに ESCRT-III サブユニットの IST1 とも相互作用する。非典型的カルパインである calpain-7 は N 末端の MIT ドメインを介して ESCRT-III サブユニット C 末端の MIM モチーフと相互作用し、ESCRT システムで働く。

を一つ持つCHMP1Bなど他のESCRT-IIIタンパク質と相互作用し、ESCRTタンパク質群によって活性化されることを見いだした<sup>149-151)</sup>。さらにIST1はALG-2結合モチーフABM-3を持ち、Ca<sup>2+</sup>依存的にALG-2とも相互作用する。calpain-7は、エンドサイトーシス経路・MVB経路におけるEGF受容体の下方制御に関わっており、calpain-7の発現を抑制するとリガンド刺激後のEGF受容体の分解速度が遅延する<sup>152)</sup>。前述したように、ALIXはN末端のBRO1ドメインを介してESCRT-IIIの主要サブユニットであるCHMP4 (アイソフォームA/B/C) と結合する<sup>98-101)</sup>。カビのALIXホモログPalAは基質分子PacCが持つYPXLモチーフを認識して結合する<sup>153)</sup>。類似のモチーフLYPXnL (n = 1あるいは3) は、ALIX分子の中央部に位置するVドメインの認識部位として使われ (図5C)、細胞膜からのレトロウイルス出芽制御に関わるGag後期ドメイン中に存在し、この部位の変異体は出芽率が顕著に減少する<sup>100, 101)</sup>。一方、シンデカンMVB内部小胞に取り込まれ、MVBが細胞膜と融合して細胞外膜小胞 (エクソソーム) の積荷として分泌される。その細胞質アダプターであるシンテニンがN末端領域にLYPX<sub>3</sub>Lモチーフを3か所持ち、ALIXとの結合がシンデカンのMVB内部小胞への輸送へ重要な働きをしている<sup>154)</sup>。また、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) であるPAR1やP2Y1はVYPX<sub>3</sub>Lを持ち、ALIXと結合することによりユビキチン非依存性のMVB選別輸送調節を受けてリソソームで分解される<sup>155, 156)</sup>。calpain-7の生理的基質は不明であるが、哺乳類においても基質認識にALIXやさらにALG-2が関与しているかもしれない。

#### 14. おわりに

典型的カルパインはPEFドメインを獲得することにより、その作用範囲をESCRT系からCa<sup>2+</sup>シグナル系へ移したと解釈できる<sup>157)</sup>。筆者らのPEFタンパク質研究はカルパイン研究に端を発しているが、酵素活性を持たないPEFファミリーメンバー個々の機能解明は遅れていた。sorcinとALG-2はその特異的相互作用因子群の同定が進み、いろいろな局面でPEFタンパク質が登場する報告が増えつつある。生理的にはPEFタンパク質はいずれもCa<sup>2+</sup>情報伝達と連動して作用していると思われるが、さらなる今後の研究展開を期待したい。

#### 文 献

- 1) Carafoli, E. & Krebs, J. (2016) Why Calcium? How calcium became the best communicator. *J. Biol. Chem.*, **291**, 20849–20857.
- 2) Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., & Pozzan, T. (1993) Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, **262**, 744–747.
- 3) Berridge, M.J. (2006) Calcium microdomains: organization & function. *Cell Calcium*, **40**, 405–412.
- 4) Berridge, M.J., Bootman, M.D., & Roderick, H.L. (2003) Cal-

cium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 517–529.

- 5) Yanez, M., Gil-Longo, J., & Campos-Toimil, M. (2012) Calcium binding proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **740**, 461–482.
- 6) Dominguez, D.C., Guragain, M., & Patrauchan, M. (2015) Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium*, **57**, 151–165.
- 7) Kretsinger, R.H. (1976) Calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 239–266.
- 8) Kawasaki, H. & Kretsinger, R.H. (2017) Structural and functional diversity of EF-hand proteins: Evolutionary perspectives. *Protein Sci.*, **26**, 1898–1920.
- 9) Denessiouk, K., Permyakov, S., Denesyuk, A., Permyakov, E., & Johnson, M.S. (2014) Two structural motifs within canonical EF-hand calcium-binding domains identify five different classes of calcium buffers and sensors. *PLoS One*, **9**, e109287.
- 10) Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M., & Suzuki, K. (1984) Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature*, **312**, 566–570.
- 11) Sakihama, T., Kakidani, H., Zenita, K., Yumoto, N., Kikuchi, T., Sasaki, T., Kannagi, R., Nakanishi, S., Ohmori, M., & Takio, K. (1985) A putative Ca<sup>2+</sup>-binding protein: structure of the light subunit of porcine calpain elucidated by molecular cloning and protein sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6075–6079.
- 12) Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J.S., Davies, P.L., Elce, J.S., & Cygler, M. (1997) Structure of a calpain Ca<sup>2+</sup>-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca<sup>2+</sup>-induced conformational changes. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 532–538.
- 13) Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K., Carson, M., Jin, L., Yuen, P.W., Takano, E., Hatanaka, M., DeLucas, L.J., et al. (1997) Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 539–547.
- 14) Maki, M., Narayana, S.V., & Hitomi, K. (1997) A growing family of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins with five EF-hand motifs. *Biochem. J.*, **328**, 718–720.
- 15) Ono, Y. & Sorimachi, H. (2012) Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1824**, 224–236.
- 16) Schad, E., Farkas, A., Jekely, G., Tompa, P., & Friedrich, P. (2002) A novel human small subunit of calpains. *Biochem. J.*, **362**, 383–388.
- 17) Maki, M., Kitaura, Y., Satoh, H., Ohkouchi, S., & Shibata, H. (2002) Structures, functions and molecular evolution of the penta-EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1600**, 51–60.
- 18) Vito, P., Lacanà, E., & D'Adamio, L. (1996) Interfering with apoptosis: Ca<sup>2+</sup>-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science*, **271**, 521–525.
- 19) Jang, I.K., Hu, R., Lacanà, E., D'Adamio, L., & Gu, H. (2002) Apoptosis-linked gene 2-deficient mice exhibit normal T-cell development and function. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 4094–4100.
- 20) Aviel-Ronen, S., Coe, B.P., Lau, S.K., da Cunha Santos, G., Zhu, C.Q., Strumpf, D., Jurisica, I., Lam, W.L., & Tsao, M.S. (2008) Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10155–10160.
- 21) Yamada, Y., Arai, T., Gotoda, T., Taniguchi, H., Oda, I., Shirao, K., Shimada, Y., Hamaguchi, T., Kato, K., Hamano, T., et al. (2008) Identification of prognostic biomarkers in gastric cancer using endoscopic biopsy samples. *Cancer Sci.*, **99**,

- 2193–2199.
- 22) Zhang, L., Chen, X., Liu, B., & Han, J. (2018) MicroRNA-124-3p directly targets PDCD6 to inhibit metastasis in breast cancer. *Oncol. Lett.*, **15**, 984–990.
  - 23) Hashemi, M., Bahari, G., Markowski, J., Malecki, A., Los, M.J., & Ghavami, S. (2018) Association of *PDCD6* polymorphisms with the risk of cancer: Evidence from a meta-analysis. *Oncotarget*, **9**, 24857–24868.
  - 24) Ohkouchi, S., Nishio, K., Maeda, M., Hitomi, K., Adachi, H., & Maki, M. (2001) Identification and characterization of two penta-EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biochem.*, **130**, 207–215.
  - 25) Kitaura, Y., Matsumoto, S., Satoh, H., Hitomi, K., & Maki, M. (2001) Peflin and ALG-2, members of the penta-EF-hand protein family, form a heterodimer that dissociates in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner. *J. Biol. Chem.*, **276**, 14053–14058.
  - 26) Teahan, C.G., Totty, N.F., & Segal, A.W. (1992) Isolation and characterization of grancalcin, a novel 28kDa EF-hand calcium-binding protein from human neutrophils. *Biochem. J.*, **286**, 549–554.
  - 27) Meyers, M.B., Zamparelli, C., Verzili, D., Dicker, A.P., Blanck, T.J., & Chiancone, E. (1995) Calcium-dependent translocation of sorcin to membranes: functional relevance in contractile tissue. *FEBS Lett.*, **357**, 230–234.
  - 28) Mellgren, R.L. (1987) Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J.*, **1**, 110–115.
  - 29) Maki, M., Yamaguchi, K., Kitaura, Y., Satoh, H., & Hitomi, K. (1998) Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface of mouse ALG-2, which is a member of the penta-EF-hand protein family. *J. Biochem.*, **124**, 1170–1177.
  - 30) Suzuki, H., Kawasaki, M., Inuzuka, T., Okumura, M., Kakiuchi, T., Shibata, H., Wakatsuki, S., & Maki, M. (2008) Structural basis for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent formation of ALG-2/Alix peptide complex:  $\text{Ca}^{2+}$ /EF3-driven arginine switch mechanism. *Structure*, **16**, 1562–1573.
  - 31) Henzl, M.T., Frey, B.B., & Wolf, A.J. (2016) ALG-2 divalent-ion affinity: Calorimetric analysis of the des23 versions reveals high-affinity site for  $\text{Mg}^{2+}$ . *Biophys. Chem.*, **209**, 28–40.
  - 32) Tanner, J.J., Frey, B.B., Pemberton, T., & Henzl, M.T. (2016) EF5 is the high-affinity  $\text{Mg}^{2+}$  site in ALG-2. *Biochemistry*, **55**, 5128–5141.
  - 33) Henzl, M.T. (2018) Ligation events influence ALG-2 dimerization. *Biophys. Chem.*, **239**, 16–28.
  - 34) Hoefflich, K.P. & Ikura, M. (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell*, **108**, 739–742.
  - 35) Bahler, M. & Rhoads, A. (2002) Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.*, **513**, 107–113.
  - 36) Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Imahori, K., & Suzuki, K. (1987) Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3590–3594.
  - 37) Takano, E., Maki, M., Mori, H., Hatanaka, M., Marti, T., Titani, K., Kannagi, R., Ooi, T., & Murachi, T. (1988) Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, **27**, 1964–1972.
  - 38) Lee, W.J., Ma, H., Takano, E., Yang, H.Q., Hatanaka, M., & Maki, M. (1992) Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8437–8442.
  - 39) Takano, J., Watanabe, M., Hitomi, K., & Maki, M. (2000) Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. *J. Biochem.*, **128**, 83–92.
  - 40) Ma, H., Yang, H.Q., Takano, E., Lee, W.J., Hatanaka, M., & Maki, M. (1993) Requirement of different subdomains of calpastatin for calpain inhibition and for binding to calmodulin-like domains. *J. Biochem.*, **113**, 591–599.
  - 41) Maki, M., Bagci, H., Hamaguchi, K., Ueda, M., Murachi, T., & Hatanaka, M. (1989) Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene. *J. Biol. Chem.*, **264**, 18866–18869.
  - 42) Yang, H.Q., Ma, H., Takano, E., Hatanaka, M., & Maki, M. (1994) Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of mu-calpain large subunit. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18977–18984.
  - 43) Ma, H., Yang, H.Q., Takano, E., Hatanaka, M., & Maki, M. (1994) Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 24430–24436.
  - 44) Takano, E., Ma, H., Yang, H.Q., Maki, M., & Hatanaka, M. (1995) Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett.*, **362**, 93–97.
  - 45) Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C.C., Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K., & Narayana, S.V. (2003) A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *J. Mol. Biol.*, **328**, 131–146.
  - 46) Moldoveanu, T., Gehring, K., & Green, D.R. (2008) Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature*, **456**, 404–408.
  - 47) Hanna, R.A., Campbell, R.L., & Davies, P.L. (2008) Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*, **456**, 409–412.
  - 48) Rosenberger, G., Gal, A., & Kutsche, K. (2005)  $\alpha$ PIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. *J. Biol. Chem.*, **280**, 6879–6889.
  - 49) Pamonsinlapatham, P., Gril, B., Dufour, S., Hadj-Slimane, R., Gigoux, V., Pethe, S., L'Hoste, S., Camonis, J., Garbay, C., Raynaud, F., et al. (2008) Capns1, a new binding partner of RasGAP-SH3 domain in K-Ras<sup>V12</sup> oncogenic cells: modulation of cell survival and migration. *Cell. Signal.*, **20**, 2119–2126.
  - 50) Beltran, L., Chaussade, C., Vanhaesebroeck, B., & Cutillas, P.R. (2011) Calpain interacts with class IA phosphoinositide 3-kinases regulating their stability and signaling activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16217–16222.
  - 51) Van der Bliek, A.M., Meyers, M.B., Biedler, J.L., Hes, E., & Borst, P. (1986) A 22-kd protein (sorcin/V19) encoded by an amplified gene in multidrug-resistant cells is homologous to the calcium-binding light chain of calpain. *EMBO J.*, **5**, 3201–3208.
  - 52) Gupta, K., Sirohi, V.K., Kumari, S., Shukla, V., Manohar, M., Popli, P., & Dwivedi, A. (2018) Sorcin is involved during embryo implantation via activating VEGF/PI3K/Akt pathway in mice. *J. Mol. Endocrinol.*, **60**, 119–132.
  - 53) Genovese, I., Fiorillo, A., Ilari, A., Masciarelli, S., Fazi, F., & Colotti, G. (2017) Binding of doxorubicin to Sorcin impairs cell death and increases drug resistance in cancer cells. *Cell Death*



- Dis.*, **8**, e2950.
- 54) Lalioti, V.S., Ilari, A., O'Connell, D.J., Poser, E., Sandoval, I.V., & Colotti, G. (2014) Sorcin links calcium signaling to vesicle trafficking, regulates Polo-like kinase 1 and is necessary for mitosis. *PLoS One*, **9**, e85438.
  - 55) Marmugi, A., Parnis, J., Chen, X., Carmichael, L., Hardy, J., Mannan, N., Marchetti, P., Piemonti, L., Bosco, D., Johnson, P., et al. (2016) Sorcin links pancreatic beta-cell lipotoxicity to ER  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Diabetes*, **65**, 1009–1021.
  - 56) Chen, X., Weber, C., Farrell, E.T., Alvarado, F.J., Zhao, Y.T., Gomez, A.M., & Valdivia, H.H. (2018) Sorcin ablation plus beta-adrenergic stimulation generate an arrhythmogenic substrate in mouse ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **114**, 199–210.
  - 57) Gerke, V., Creutz, C.E., & Moss, S.E. (2005) Annexins: linking  $\text{Ca}^{2+}$  signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 449–461.
  - 58) Brownawell, A.M. & Creutz, C.E. (1997) Calcium-dependent binding of sorcin to the N-terminal domain of synexin (annexin VII). *J. Biol. Chem.*, **272**, 22182–22190.
  - 59) Zamparelli, C., Macquaide, N., Colotti, G., Verzili, D., Seidler, T., Smith, G.L., & Chiancone, E. (2010) Activation of the cardiac  $\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$  exchanger by sorcin via the interaction of the respective  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domains. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **49**, 132–141.
  - 60) Zamparelli, C., Ilari, A., Verzili, D., Giangiacomo, L., Colotti, G., Pascarella, S., & Chiancone, E. (2000) Structure-function relationships in sorcin, a member of the penta EF-hand family. Interaction of sorcin fragments with the ryanodine receptor and an *Escherichia coli* model system. *Biochemistry*, **39**, 658–666.
  - 61) Matsumoto, T., Hisamatsu, Y., Ohkusa, T., Inoue, N., Sato, T., Suzuki, S., Ikeda, Y., & Matsuzaki, M. (2005) Sorcin interacts with sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and modulates excitation–contraction coupling in the heart. *Basic Res. Cardiol.*, **100**, 250–262.
  - 62) Fowler, M.R., Colotti, G., Chiancone, E., Smith, G.L., & Fearon, I.M. (2008) Sorcin modulates cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current by functional interaction with the  $\alpha_1\text{C}$  subunit in rabbits. *Exp. Physiol.*, **93**, 1233–1238.
  - 63) Pack-Chung, E., Meyers, M.B., Pettingell, W.P., Moir, R.D., Brownawell, A.M., Cheng, I., Tanzi, R.E., & Kim, T.W. (2000) Presenilin 2 interacts with sorcin, a modulator of the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14440–14445.
  - 64) Noordeen, N.A., Meur, G., Rutter, G.A., & Leclerc, I. (2012) Glucose-induced nuclear shuttling of ChREBP is mediated by sorcin and  $\text{Ca}^{2+}$  ions in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, **61**, 574–585.
  - 65) Ilari, A., Fiorillo, A., Poser, E., Lalioti, V.S., Sundell, G.N., Ivarsson, Y., Genovese, I., & Colotti, G. (2015) Structural basis of Sorcin-mediated calcium-dependent signal transduction. *Sci. Rep.*, **5**, 16828.
  - 66) Boyhan, A., Casimir, C.M., French, J.K., Teahan, C.G., & Segal, A.W. (1992) Molecular cloning and characterization of grancalcin, a novel EF-hand calcium-binding protein abundant in neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2928–2933.
  - 67) Roes, J., Choi, B.K., Power, D., Xu, P., & Segal, A.W. (2003) Granulocyte function in grancalcin-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 826–830.
  - 68) Xu, P., Roes, J., Segal, A.W., & Radulovic, M. (2006) The role of grancalcin in adhesion of neutrophils. *Cell. Immunol.*, **240**, 116–121.
  - 69) Lollike, K., Johnsen, A.H., Durussel, I., Borregaard, N., & Cox, J.A. (2001) Biochemical characterization of the penta-EF-hand protein grancalcin and identification of L-plastin as a binding partner. *J. Biol. Chem.*, **276**, 17762–17769.
  - 70) Kim, T.W., Hong, S., Talukder, A.H., Pascual, V., & Liu, Y.J. (2016) Grancalcin (GCA) modulates Toll-like receptor 9 (TLR9) mediated signaling through its direct interaction with TLR9. *Eur. J. Immunol.*, **46**, 712–724.
  - 71) Hansen, C., Tarabykina, S., la Cour, J.M., Lollike, K., & Berchtold, M.W. (2003) The PEF family proteins sorcin and grancalcin interact in vivo and in vitro. *FEBS Lett.*, **545**, 151–154.
  - 72) Maki, M., Takahara, T., & Shibata, H. (2016) Multifaceted roles of ALG-2 in  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated membrane trafficking. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, E1401.
  - 73) Ball, L.J., Kuhne, R., Schneider-Mergener, J., & Oschkinat, H. (2005) Recognition of proline-rich motifs by protein–protein-interaction domains. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 2852–2869.
  - 74) Ren, X. & Hurley, J.H. (2011) Proline-rich regions and motifs in trafficking: from ESCRT interaction to viral exploitation. *Traffic*, **12**, 1282–1290.
  - 75) Missotten, M., Nichols, A., Rieger, K., & Sadoul, R. (1999) Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ.*, **6**, 124–129.
  - 76) Vito, P., Pellegrini, L., Guet, C., & D'Adamio, L. (1999) Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent reaction. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1533–1540.
  - 77) Shibata, H., Yamada, K., Mizuno, T., Yorikawa, C., Takahashi, H., Satoh, H., Kitaura, Y., & Maki, M. (2004) The penta-EF-hand protein ALG-2 interacts with a region containing PxY repeats in Alix/AIP1, which is required for the subcellular punctate distribution of the amino-terminal truncation form of Alix/AIP1. *J. Biochem.*, **135**, 117–128.
  - 78) Shibata, H., Suzuki, H., Kakiuchi, T., Inuzuka, T., Yoshida, H., Mizuno, T., & Maki, M. (2008) Identification of Alix-type and Non-Alix-type ALG-2-binding sites in human phospholipid scramblase 3: differential binding to an alternatively spliced isoform and amino acid-substituted mutants. *J. Biol. Chem.*, **283**, 9623–9632.
  - 79) Inuzuka, T., Inokawa, A., Chen, C., Kizu, K., Narita, H., Shibata, H., & Maki, M. (2013) ALG-2-interacting Tubby-like protein superfamily member PLSCR3 is secreted by an exosomal pathway and taken up by recipient cultured cells. *Biosci. Rep.*, **33**, e00026.
  - 80) Inokawa, A., Inuzuka, T., Takahara, T., Shibata, H., & Maki, M. (2015) Tubby-like protein superfamily member PLSCR3 functions as a negative regulator of adipogenesis in mouse 3T3-L1 preadipocytes by suppressing induction of late differentiation stage transcription factors. *Biosci. Rep.*, **36**, e00287.
  - 81) Sasaki-Osugi, K., Imoto, C., Takahara, T., Shibata, H., & Maki, M. (2013) Nuclear ALG-2 protein interacts with  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependently and participates in regulation of alternative splicing of inositol trisphosphate receptor type 1 (IP3R1) pre-mRNA. *J. Biol. Chem.*, **288**, 33361–33375.
  - 82) Okumura, M., Ichioka, F., Kobayashi, R., Suzuki, H., Yoshida, H., Shibata, H., & Maki, M. (2009) Penta-EF-hand protein ALG-2 functions as a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent adaptor that bridges Alix and TSG101. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **386**, 237–241.
  - 83) Tarabykina, S., Moller, A.L., Durussel, I., Cox, J., & Berchtold, M.W. (2000) Two forms of the apoptosis-linked protein ALG-



- 2 with different  $\text{Ca}^{2+}$  affinities and target recognition. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10514–10518.
- 84) Maki, M., Suzuki, H., & Shibata, H. (2011) Structure and function of ALG-2, a penta-EF-hand calcium-dependent adaptor protein. *Sci. China Life Sci.*, **54**, 770–779.
- 85) Inuzuka, T., Suzuki, H., Kawasaki, M., Shibata, H., Wakatsuki, S., & Maki, M. (2010) Molecular basis for defect in Alix-binding by alternatively spliced isoform of ALG-2 (ALG-2<sup>ΔGF122</sup>) and structural roles of F122 in target recognition. *BMC Struct. Biol.*, **10**, 25.
- 86) Haglund, K. & Dikic, I. (2012) The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J. Cell Sci.*, **125**, 265–275.
- 87) 柴田秀樹, 牧正敏(2016)エンドソームでの輸送選別に働くESCRT装置, メンブレントラフィック—膜・小胞による細胞内輸送ネットワーク(福田光則, 吉森保編), pp. 80–97, 化学同人.
- 88) Henne, W.M., Buchkovich, N.J., & Emr, S.D. (2011) The ESCRT pathway. *Dev. Cell*, **21**, 77–91.
- 89) McCullough, J., Colf, L.A., & Sundquist, W.I. (2013) Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 663–692.
- 90) Campsteijn, C., Vietri, M., & Stenmark, H. (2016) Novel ESCRT functions in cell biology: spiraling out of control? *Curr. Opin. Cell Biol.*, **41**, 1–8.
- 91) Satoh, H., Shibata, H., Nakano, Y., Kitaura, Y., & Maki, M. (2002) ALG-2 interacts with the amino-terminal domain of annexin XI in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 1166–1172.
- 92) Satoh, H., Nakano, Y., Shibata, H., & Maki, M. (2002) The penta-EF-hand domain of ALG-2 interacts with amino-terminal domains of both annexin VII and annexin XI in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta*, **1600**, 61–67.
- 93) Katoh, K., Suzuki, H., Terasawa, Y., Mizuno, T., Yasuda, J., Shibata, H., & Maki, M. (2005) The penta-EF-hand protein ALG-2 interacts directly with the ESCRT-I component TSG101, and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependently co-localizes to aberrant endosomes with dominant-negative AAA ATPase SKD1/Vps4B. *Biochem. J.*, **391**, 677–685.
- 94) Ichioka, F., Takaya, E., Suzuki, H., Kajigaya, S., Buchman, V.L., Shibata, H., & Maki, M. (2007) HD-PTP and Alix share some membrane-traffic related proteins that interact with their Bro1 domains or proline-rich regions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **457**, 142–149.
- 95) Okumura, M., Katsuyama, A.M., Shibata, H., & Maki, M. (2013) VPS37 isoforms differentially modulate the ternary complex formation of ALIX, ALG-2, and ESCRT-I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1715–1721.
- 96) Takahara, T., Inoue, K., Arai, Y., Kuwata, K., Shibata, H., & Maki, M. (2017) The calcium-binding protein ALG-2 regulates protein secretion and trafficking via interactions with MISSL and MAP1B proteins. *J. Biol. Chem.*, **292**, 17057–17072.
- 97) Ichioka, F., Kobayashi, R., Katoh, K., Shibata, H., & Maki, M. (2008) Brox, a novel farnesylated Bro1 domain-containing protein that associates with charged multivesicular body protein 4 (CHMP4). *FEBS J.*, **275**, 682–692.
- 98) Katoh, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T., & Maki, M. (2003) The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J. Biol. Chem.*, **278**, 39104–39113.
- 99) Katoh, K., Shibata, H., Hatta, K., & Maki, M. (2004) CHMP4b is a major binding partner of the ALG-2-interacting protein Alix among the three CHMP4 isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.*, **421**, 159–165.
- 100) Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., & Göttlinger, H.G. (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, **114**, 689–699.
- 101) von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Müller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimbora, D.M., et al. (2003) The protein network of HIV budding. *Cell*, **114**, 701–713.
- 102) Andrews, N.W., Almeida, P.E., & Corrotte, M. (2014) Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends Cell Biol.*, **24**, 734–742.
- 103) Scheffer, L.L., Sreetama, S.C., Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K.J., Defour, A., & Jaiswal, J.K. (2014) Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat. Commun.*, **5**, 5646.
- 104) la Cour, J.M., Winding Gojkovic, P., Ambjorner, S.E.B., Bagge, J., Jensen, S.M., Panina, S., & Berchtold, M.W. (2018) ALG-2 participates in recovery of cells after plasma membrane damage by electroporation and digitonin treatment. *PLoS One*, **13**, e0204520.
- 105) Anding, A.L. & Baehrecke, E.H. (2017) Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev. Cell*, **41**, 10–22.
- 106) Skowyra, M.L., Schlesinger, P.H., Naismith, T.V., & Hanson, P.I. (2018) Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science*, **360**, eaar5078.
- 107) Radulovic, M., Schink, K.O., Wenzel, E.M., Nahse, V., Bongiovanni, A., Lafont, F., & Stenmark, H. (2018) ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival. *EMBO J.*, **37**, e99753.
- 108) Zanetti, G., Pahuja, K.B., Studer, S., Shim, S., & Schekman, R. (2011) COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat. Cell Biol.*, **14**, 20–28.
- 109) Yamasaki, A., Tani, K., Yamamoto, A., Kitamura, N., & Komada, M. (2006) The  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein ALG-2 is recruited to endoplasmic reticulum exit sites by Sec31A and stabilizes the localization of Sec31A. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4876–4887.
- 110) Shibata, H., Suzuki, H., Yoshida, H., & Maki, M. (2007) ALG-2 directly binds Sec31A and localizes at endoplasmic reticulum exit sites in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 756–763.
- 111) Shibata, H., Inuzuka, T., Yoshida, H., Sugiura, H., Wada, I., & Maki, M. (2010) The ALG-2 binding site in Sec31A influences the retention kinetics of Sec31A at the endoplasmic reticulum exit sites as revealed by live-cell time-lapse imaging. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1819–1826.
- 112) Takahashi, T., Suzuki, H., Inuzuka, T., Shibata, H., & Maki, M. (2012) Prediction of a new ligand-binding site for type 2 motif based on the crystal structure of ALG-2 by dry and wet approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 7532–7549.
- 113) Takahashi, T., Kojima, K., Zhang, W., Sasaki, K., Ito, M., Suzuki, H., Kawasaki, M., Wakatsuki, S., Takahara, T., Shibata, H., et al. (2015) Structural analysis of the complex between penta-EF-hand ALG-2 protein and Sec31A peptide reveals a novel target recognition mechanism of ALG-2. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 3677–3699.
- 114) Osugi, K., Suzuki, H., Nomura, T., Ariumi, Y., Shibata, H., & Maki, M. (2012) Identification of the P-body component PATL1 as a novel ALG-2-interacting protein by *in silico* and far-Western screening of proline-rich proteins. *J. Biochem.*, **151**, 657–666.

- 115) la Cour, J.M., Schindler, A.J., Berchtold, M.W., & Schekman, R. (2013) ALG-2 attenuates COPII budding in vitro and stabilizes the Sec23/Sec31A complex. *PLoS One*, **8**, e75309.
- 116) Shibata, H., Kanadome, T., Sugiura, H., Yokoyama, T., Yamamuro, M., Moss, S.E., & Maki, M. (2015) A new role for annexin A11 in the early secretory pathway via stabilizing Sec31A protein at the endoplasmic reticulum exit sites (ERES). *J. Biol. Chem.*, **290**, 4981–4993.
- 117) Malhotra, V. & Erlmann, P. (2015) The pathway of collagen secretion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **31**, 109–124.
- 118) Aridor, M. (2018) COPII gets in shape: Lessons derived from morphological aspects of early secretion. *Traffic*, **19**, 823–839.
- 119) Saito, K., Chen, M., Bard, F., Chen, S., Zhou, H., Woodley, D., Polischuk, R., Schekman, R., & Malhotra, V. (2009) TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell*, **136**, 891–902.
- 120) Saito, K., Yamashiro, K., Ichikawa, Y., Erlmann, P., Kontani, K., Malhotra, V., & Katada, T. (2011) cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 2301–2308.
- 121) Ma, W. & Goldberg, J. (2016) TANGO1/cTAGE5 receptor as a polyvalent template for assembly of large COPII coats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 10061–10066.
- 122) Bajorek, M., Schubert, H.L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D.M., Stubblefield, W.M., Uter, N.T., Myska, D.G., Hill, C.P., & Sundquist, W.I. (2009) Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 754–762.
- 123) Okumura, M., Takahashi, T., Shibata, H., & Maki, M. (2013) Mammalian ESCRT-III-related protein IST1 has a distinctive met-pro repeat sequence that is essential for interaction with ALG-2 in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1049–1054.
- 124) Varadi, M., Vranken, W., Guharoy, M., & Tompa, P. (2015) Computational approaches for inferring the functions of intrinsically disordered proteins. *Front. Mol. Biosci.*, **2**, 45.
- 125) Kanadome, T., Shibata, H., Kuwata, K., Takahara, T., & Maki, M. (2017) The calcium-binding protein ALG-2 promotes endoplasmic reticulum exit site localization and polymerization of Trk-fused gene (TFG) protein. *FEBS J.*, **284**, 56–76.
- 126) Marnef, A., Weil, D., & Standart, N. (2012) RNA-related nuclear functions of human Pat1b, the P-body mRNA decay factor. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 213–224.
- 127) Di Paola, S., Scotto-Rosato, A., & Medina, D.L. (2018) TRPML1: The  $\text{Ca}^{2+}$  retaker of the lysosome. *Cell Calcium*, **69**, 112–121.
- 128) Colletti, G.A. & Kiselyov, K. (2011) TRPML1. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **704**, 209–219.
- 129) Vergarajauregui, S., Martina, J.A., & Puertollano, R. (2009) Identification of the penta-EF-hand protein ALG-2 as a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent interactor of mucolipin-1. *J. Biol. Chem.*, **284**, 36357–36366.
- 130) Li, R.J., Xu, J., Fu, C., Zhang, J., Zheng, Y.G., Jia, H., & Liu, J.O. (2016) Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. *eLife*, **5**, e19360.
- 131) Zylka, M.J. & Reppert, S.M. (1999) Discovery of a putative heme-binding protein family (SOUL/HBP) by two-tissue suppression subtractive hybridization and database searches. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **74**, 175–181.
- 132) Sato, E., Sagami, I., Uchida, T., Sato, A., Kitagawa, T., Igarashi, J., & Shimizu, T. (2004) SOUL in mouse eyes is a new hexameric heme-binding protein with characteristic optical absorption, resonance Raman spectral, and heme-binding properties. *Biochemistry*, **43**, 14189–14198.
- 133) Ambrosi, E., Capaldi, S., Bovi, M., Saccomani, G., Perduca, M., & Monaco, H.L. (2011) Structural changes in the BH3 domain of SOUL protein upon interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-xL. *Biochem. J.*, **438**, 291–301.
- 134) Szigeti, A., Hocsak, E., Rapolti, E., Racz, B., Boronkai, A., Pozsgai, E., Debreceni, B., Bogner, Z., Bellyei, S., Sumegi, B., et al. (2010) Facilitation of mitochondrial outer and inner membrane permeabilization and cell death in oxidative stress by a novel Bcl-2 homology 3 domain protein. *J. Biol. Chem.*, **285**, 2140–2151.
- 135) Ma, J., Zhang, X., Feng, Y., Zhang, H., Wang, X., Zheng, Y., Qiao, W., & Liu, X. (2016) Structural and functional study of apoptosis-linked Gene-2. Heme-binding protein 2 interactions in HIV-1 production. *J. Biol. Chem.*, **291**, 26670–26685.
- 136) Mikasa, T., Kugo, M., Nishimura, S., Taketani, S., Ishijima, S., & Sagami, I. (2018) Thermodynamic characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent interaction between SOUL and ALG-2. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3802.
- 137) Lefebvre, C., Terret, M.E., Djiane, A., Rassiniere, P., Maro, B., & Verlhac, M.H. (2002) Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J. Cell Biol.*, **157**, 603–613.
- 138) Takahara, T., Arai, Y., Kono, Y., Shibata, H., & Maki, M. (2018) A microtubule-associated protein MAP1B binds to and regulates localization of a calcium-binding protein ALG-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **497**, 492–498.
- 139) Bentley, M., Nycz, D.C., Joglekar, A., Fertschai, I., Malli, R., Graier, W.F., & Hay, J.C. (2010) Vesicular calcium regulates coat retention, fusogenicity, and size of pre-Golgi intermediates. *Mol. Biol. Cell*, **21**, 1033–1046.
- 140) Rayl, M., Truitt, M., Held, A., Sargeant, J., Thorsen, K., & Hay, J.C. (2016) Penta-EF-hand protein peflin is a negative regulator of ER-To-Golgi transport. *PLoS One*, **11**, e0157227.
- 141) Shibata, H. (2019) Adaptor functions of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein ALG-2 in protein transport from the endoplasmic reticulum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83**, 20–32.
- 142) Kitaura, Y., Watanabe, M., Satoh, H., Kawai, T., Hitomi, K., & Maki, M. (1999) Peflin, a novel member of the five-EF-hand-protein family, is similar to the apoptosis-linked gene 2 (ALG-2) protein but possesses nonapeptide repeats in the N-terminal hydrophobic region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 68–75.
- 143) Kitaura, Y., Satoh, H., Takahashi, H., Shibata, H., & Maki, M. (2002) Both ALG-2 and peflin, penta-EF-hand (PEF) proteins, are stabilized by dimerization through their fifth EF-hand regions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **399**, 12–18.
- 144) Wiemuth, D., van de Sandt, L., Herr, R., & Gründer, S. (2012) Transient receptor potential N (TRPN1) from *Xenopus* interacts with the penta-EF-hand protein peflin. *FEBS Lett.*, **586**, 4276–4281.
- 145) Jin, L., Pahuja, K.B., Wickliffe, K.E., Gorur, A., Baumgartel, C., Schekman, R., & Rape, M. (2012) Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature*, **482**, 495–500.
- 146) McGourty, C.A., Akopian, D., Walsh, C., Gorur, A., Werner, A., Schekman, R., Bautista, D., & Rape, M. (2016) Regulation of the CUL3 ubiquitin ligase by a calcium-dependent co-adaptor. *Cell*, **167**, 525–538.
- 147) Maeda, T. (2012) The signaling mechanism of ambient pH sensing and adaptation in yeast and fungi. *FEBS J.*, **279**, 1407–1413.
- 148) Peñalva, M.A., Lucena-Agell, D., & Arst, H.N. Jr. (2014) *Liai-*

- son alkaline*: Pals entice non-endosomal ESCRTs to the plasma membrane for pH signaling. *Curr. Opin. Microbiol.*, **22**, 49–59.
- 149) Yorikawa, C., Takaya, E., Osako, Y., Tanaka, R., Terasawa, Y., Hamakubo, T., Mochizuki, Y., Iwanari, H., Kodama, T., Maeda, T., et al. (2008) Human calpain 7/PalBH associates with a subset of ESCRT-III-related proteins in its N-terminal region and partly localizes to endocytic membrane compartments. *J. Biochem.*, **143**, 731–745.
- 150) Osako, Y., Maemoto, Y., Tanaka, R., Suzuki, H., Shibata, H., & Maki, M. (2010) Autolytic activity of human calpain 7 is enhanced by ESCRT-III-related protein IST1 through MIT-MIM interaction. *FEBS J.*, **277**, 4412–4426.
- 151) Maemoto, Y., Kiso, S., Shibata, H., & Maki, M. (2013) Analysis of limited proteolytic activity of calpain-7 using non-physiological substrates in mammalian cells. *FEBS J.*, **280**, 2594–2607.
- 152) Maemoto, Y., Ono, Y., Kiso, S., Shibata, H., Takahara, T., Sorimachi, H., & Maki, M. (2014) Involvement of calpain-7 in epidermal growth factor receptor degradation via the endosomal sorting pathway. *FEBS J.*, **281**, 3642–3655.
- 153) Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H.N. Jr., & Peñalva, M.A. (2003) YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1647–1655.
- 154) Baietti, M.F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., et al. (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.*, **14**, 677–685.
- 155) Does, M.R., Chen, B., Lin, H., Soh, U.J., Paing, M.M., Montagne, W.A., Meerloo, T., & Trejo, J. (2012) ALIX binds a YPX<sub>3</sub>L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J. Cell Biol.*, **197**, 407–419.
- 156) Does, M.R., Grimsey, N.J., Mendez, F., & Trejo, J. (2016) ALIX regulates the ubiquitin-independent lysosomal sorting of the P2Y<sub>1</sub> purinergic receptor via a YPX<sub>3</sub>L motif. *PLoS One*, **11**, e0157587.
- 157) Maki, M., Maemoto, Y., Osako, Y., & Shibata, H. (2012) Evolutionary and physical linkage between calpains and penta-EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *FEBS J.*, **279**, 1414–1421.

## 著者寸描

### ●牧 正敏 (まき まさとし)



名古屋大学大学院生命農学研究科教授、農学博士。

■略歴 1953年愛知県に生まれる。76年京都大学農学部卒業、81年同大学院農学研究科単位取得退学、83年米国Vanderbilt大学医学部研究員、85年京都大学ウイルス研究所助手、90年同助教授を経て94年名古屋大学農学部教授、大学院配置換えを経て2019年3月定年退職。

■研究テーマと抱負 高等動物におけるPEFタンパク質の分子認識機構と機能解明、とくにカルシウムホメオスタシスおよびカルシウムシグナル応答におけるALG-2の役割を明らかにすること。

■ウェブサイト <https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~mcr/>

■趣味 ナンプレ、時代劇(日本、中国、韓国)、温泉旅行。