

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成14年度採択研究代表者

反町 洋之

(財団法人 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 酵素機能制御研究部門 室長)

「細胞内モジュレータプロテアーゼの生理機能の解析」

1. 研究実施の概要

生体を構成する細胞は様々なタンパク質の機能の協同により制御されている。これらのタンパク質に直接作用してその機能・構造・活性を変換して調節する“**モジュレータプロテアーゼ**”は、その作用が直接、不可逆、かつダイナミックであり、生体を制御する上で最も重要な因子であるといっても過言ではない。**カルパイン**は細胞質内モジュレータプロテアーゼの代表の一つであり、細胞内情報伝達系を制御するため、機能不全になると筋ジストロフィー、糖尿病、ガン、アルツハイマー病など様々な病態が引き起こされる。そこで、カルパインによる生体制御の作用機序原理を、組織特異的に発現するカルパイン（骨格筋特異的p94、胃特異的nCL-2/-2'、消化管特異的nCL-4）に焦点を当て、遺伝子改変マウスを用いて解析した。その結果、p94及びnCL-2/-2'のノックインマウスでは、それぞれの発現器官に疾患表現型が見出され、モデルマウスとして利用可能であることが示された。さらに他の組織における分子動態の変動も観察され、カルパインシステムの解析にこれらのマウスが有用であることが確認された。今後はさらに詳細な解析を行い、カルパインの関与する疾患の発症分子機構を明らかにして、その診断・治療・予防方法の開発を目指すとともに、モジュレータプロテアーゼの作用機序の解明を試みる。

2. 研究実施内容

基質タンパク質を厳密に認識し限定的に切断することでその機能・構造を変換・制御する細胞内プロテアーゼ（いわゆる「**モジュレータプロテアーゼ**」）である**カルパイン**は、様々な細胞機能を実現するための細胞内情報伝達系にとって、極めて重要かつ特異なモジュレータ因子である。本研究はカルパインの生理機能を解析し、他のモジュレータプロテアーゼの知見と総合して、作用機序の原理解明を目指すものである。Ca²⁺要求性であるカルパインはヒトをはじめほぼ全生物に存在し、スーパーファミリーを形成する。ヒトでは14種存在するがその生理機能のほとんどは不明であり、そこには生命現象を理解する上で大きなヒントが隠されている。本研究では、我々が発見した骨格筋特異的カルパイン**p94**(カルパイン3)や胃特異的**nCL-2/-2'**（カルパイン8）、消化管特異的**nCL-4**（カルパイン9）などの組織特異的カルパインに注目し、3つの系（骨格筋細胞・胃腸細胞・酵母細

胞)に焦点を当てて解析を行っている。

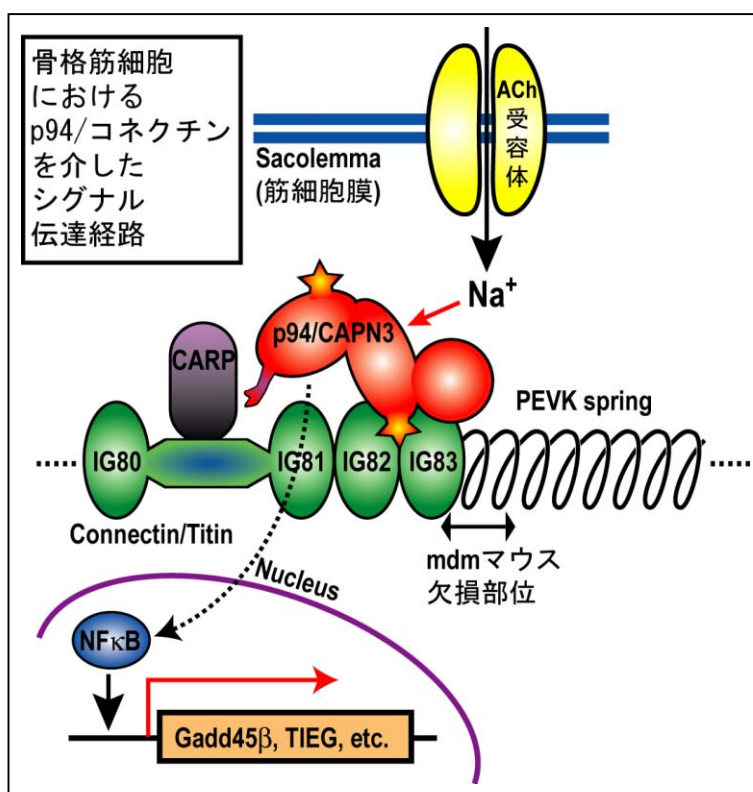
[1] 骨格筋細胞系：p94:C129Sノックインマウス(p94CSマウス)は、予定通り選択マーカー遺伝子、neoRをCre-Tgとの交配により切除し、「真性ノックインマウス」作出を完了した。本年度は、この真性p94CSマウスのホモマウスの量産を開始し、preliminaryな表現型の解析を行った。

(1) **p94CSマウスを用いた解析：**プロテアーゼ活性のみを欠失したp94を発現する真性p94CSマウスのヘテロマウスを複数匹得たため、①ホモマウスを量産し、一方で②C57BL/6系統と戻し交配を継続して、遺伝的背景を均一化させ、さらに③他の疾患モデルマウスとの交配を開始し、また、④DNAチップを用いた転写産物解析を行った。解析の過程で、組織普遍型p94バリエントを新規に見出した。これは、骨格筋特異的プロモーターとは別のプロモーターを用いて組織普遍的な発現をするもので、N末端構造、活性、発現の違いより、p94とは全く異なる生理機能を有すると考えられる。幼若幹細胞や造血細胞系で見られるC/EBP βやサイクリンAの切断に、上記の新規バリエントが関与して、細胞周期や血球分化を制御する可能性を今後検討する。

(2) **プロテアーゼ活性スペクトル測定システム構築へ：**プロテアーゼ活性スペクトル測定システムは、基質特異性の類似するカルパインホモログの活性を同時に測定するために、多数のペプチド混合物を基質として活性を「スペクトル」として測定するものである。原理的には全プロテアーゼに応用可能であり、新規基質・阻害剤の発見にもつながる極めて有用な技術と考えられる。今年度はオリゴペプチドの両端に蛍光基と消光基を付けた蛍光ペプチド基質20種類とHPLCを用いた条件検討を行った。その過程で数種類のカルパイン嗜好性ペプチド

を見出したためこれらを合成し、カルパインに対して感度の良い活性測定系や、新規阻害剤開発などへの応用を今後探求したい。

(3) **p94ターゲット(基質)の同定とその作用機序の解析：**p94CSマウスを利用したDNAチップ解析やTwo-Hybrid解析により、筋RINGフィンガータンパク質(MURF)、C末端アンキリン反復タンパク質(CARP)、アセチルコリン受容体などの興味深い分子が、p94とコネクチン上で相互作用し、



「シグナル複合体」を形成している可能性が示唆された（図参照）。この新しい概念の可能性について今後さらに検討を重ね、その分子の実体を明らかにしたい。

(4) **p94の活性化機構の解析**：今年度はp94:N358D変異体を用いて、自己消化活性をはじめ詳細な解析を行った。その結果、N末端の自己消化がp94の活性制御に関与すること、Ca²⁺のみならずNa⁺にも活性が依存することを発見した。即ちp94はアセチルコリン受容体などのNa⁺チャネルの近傍に位置してNa⁺依存的に活性化される可能性が示唆された。

[2] 胃腸細胞系：胃特異的なnCL-2/-2'はノックインマウスの表現型の解析に焦点を当てた。既にホモマウスの誕生したnCL-2/-2':C105Sノックインマウスは、さらにCre-Tgマウスとの交配によりneoR遺伝子の切除を完了させた。一方、ホモマウスの解析により、ストレス負荷時の胃出血性潰瘍、という極めて興味深い表現型が見出された。これは、nCL-2が胃の防御機構（粘膜分泌など）に密接に関与していることを強く示唆した。マイクロアレイ解析の結果、胃ガンにおいて発現が高進している分子のいくつかはノックインマウスで同様に発現が高進していることが判明した。これらの結果から、nCL-2は細胞内において膜輸送系などに働きかけ、粘液成分の分泌や細胞移動などの生理機能に関与することが示唆された。

[3] 酵母系：

(1) **分子遺伝学的手法を用いたCp11p-Rim101p経路の全容解明**：酵母のカルパインホモログCp11pと転写因子Rim101pは、*RIMS, 9, 20, 21*とともに塩・アルカリ応答反応に関わるシグナル伝達経路(Cp11p-Rim101p経路)を構成する。Cp11pはストレス刺激に応答してRim101pを限定的に切断し、活性化する。この切断は、*RIMS, 9, 20, 21*いずれの欠損によっても阻害される。今年度はこれらの遺伝子の欠損にもかかわらずRim101pのプロセシングが恒常的に起こるような抑制変異を丹念にスクリーニングした結果、膜輸送と関係する分子群の関与が明らかとなった。また、*RIMS, 9, 20, 21*の遺伝的上下関係も判明し、Cp11p-Rim101p経路の全容が明らかになりつつある。

(2) **哺乳類モジュレータープロテアーゼの研究ツールとしての利用**：今年度は、Two-Hybridを応用した方法を用いて、酵母細胞内でp94の活性を測定する系を確立することが出来た。この系を用いて、初めてコネクチンのp94活性抑制作用が確認された。今後はさらに、他の因子も導入し、酵母細胞内でコネクチン上のシグナル複合体を再構成していきたい。

3. 研究実施体制

[1] 反町研究グループ

- ① 研究分担グループ長：反町 洋之（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻生物機能開発化学研究室、助教授（現、財団法人東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所酵素機能制御研究部門、室長））

② 研究項目：

- (1) p94:C129Sノックインマウスを用いた解析
- (2) nCL-2/-2':C105Sノックインマウスの解析
- (3) nCL-4遺伝子改変マウスの作成と解析
- (4) p94及びnCL-2の立体構造解析
- (5) 新規同定分子の遺伝子操作マウスのターゲティングストラテジーの考案と解析
- (6) p94活性制御機構及び生体内ターゲットの解析
- (7) プロテアーゼ活性スペクトル測定システムの開発と応用

[2] 前田研究グループ

① 研究分担グループ長：前田 達哉（東京大学分子細胞生物学研究所生体超高分子研究室、助教授）

② 研究項目：

- (1) Cp11p-Rim101p経路欠損変異の抑圧変異の単離と原因遺伝子の同定
- (2) 抑圧変異を用いたCp11p-Rim101p経路におけるシグナルフローの解明
- (3) Cp11p-Rim101p経路のin vitro再構成系の確立
- (4) 哺乳類相同遺伝子の単離と相同経路の解明
- (5) 哺乳類モジュレータプロテアーゼの研究ツール・検索系としての酵母系の開発と利用

[3] 饗場研究グループ

① 研究分担グループ長：饗場 篤（神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻生命医科学領域分子細胞生物学講座、教授）

② 研究項目：

- (1) p94:C129Sノックインマウスの作成
- (2) nCL-4 遺伝子改変マウスの作成
- (3) 新規同定分子の遺伝子操作マウスのターゲティングストラテジーの考案と作成

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Witt, C. C.*, Ono, Y.*, Puschmann, E., McNabb, M., Wu, Y., Gotthardt, M., Witt, S. H., Haak, M., Labeit, D., Gregorio, C. C., Sorimachi, H., Granzier, H., and Labeit, S. (*equally contributed first authors) Induction and myofibrillar targeting of CARP, and suppression of the Nkx2.5 pathway in the MDM mouse with impaired titin-based signaling. *J. Mol. Biol.* **336**,

145-154 (2004).

- Ono, Y., Kakinuma, K., Torii, F., Irie, A., Nakagawa, K., Labeit, S., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H.: Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *J. Biol. Chem.* **279**, 2761-2771 (2004).
- Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., and Sorimachi, H.: Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, **53**, S12-18 (2004).
- Kawabata, Y., Hata, S., Ono, Y., Ito, Y., Suzuki, K., Abe, K., and Sorimachi, H.: Newly identified exons encoding novel variants of p94/calpain3 are expressed ubiquitously and overlap the α -glucosidase C gene. *FEBS Lett.* **555**, 623-630 (2003).
- Kimura, E., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H.: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K interacts with and is proteolyzed by calpain *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1786-1796 (2003).
- Reverter, D., Braun, M., Fernandez-Catalan, C., Strobl, S., Sorimachi, H., and Bode, W.: Flexibility analysis and structure comparison of two crystal forms of calcium-free human m-calpain. *Biol Chem.* **383**, 1415-1422 (2002).
- Welm, A. L., Timchenko, N. A., Ono, Y., Sorimachi, H., Radomska, H. S., Tenen, D. G., Lekstrom-Himes, J., and Darlington, G. J.: C/EBP α is required for proteolytic cleavage of cyclin A by calpain 3 in myeloid precursor cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 33848-33856 (2002).
- Spencer, M. J., Guyon, J. R., Sorimachi, H., Potts, A., Richard, I., Herasse, M., Chamberlain, J., Dalkilic, I., Kunkel, L. M., and Beckmann, J. S.: Stable expression of calpain 3 from a muscle transgene *in vivo*: Immature muscle in transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8874-8879 (2002).
- McElhinny, A. S., Kakinuma, K., Sorimachi, H., Labeit, S., and Gregorio, C. C.: Muscle-specific RING finger 1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein 1. *J. Cell Biol.* **157**, 125-136 (2002).
- Sato, N., Kawahara, H., Toh-e, A., Maeda, T.: Phosphorelay-regulated degradation of the yeast Ssk1p response regulator by the ubiquitin-proteasome system. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6662-6671 (2003).
- Chida, K., Hara, T., Hirai, T., Konishi, C., Nakamura, K., Nakao, K., Aiba, A., Katsuki, M., Kuroki, T.: Disruption of protein kinase C η results in impairment of wound healing and enhancement of tumor formation in mouse

skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **63**, 2404-2408 (2003).

- Kishimoto, Y., Fujimichi, R., Araishi, K., Kawahara, S., Kano, M., Aiba, A., Kirino, Y.: mGluR1 in cerebellar Purkinje cells is required for normal association of temporally contiguous stimuli in classical conditioning. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 2416-2424 (2002).
- Muto, S., Aiba, A., Saito, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Tomita, K., Kitamura, T., Kurabayashi, M., Nagai, R., Higashihara, E., Harris, P.C., Katsuki, M., Horie, S.: Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1731-1742 (2002).
- Tabata, T., Aiba, A., Kano, M.: Extracellular calcium controls the dynamic range of neuronal metabotropic glutamate receptor responses. *Mol. Cell. Neurosci.* **20**, 56-68 (2002).
- Shutoh, F., Katoh, A., Kitazawa, H., Aiba, A., Itohara, S., Nagao, S.: Loss of adaptability of horizontal optokinetic response eye movements in mGluR1 knockout mice. *Neurosci. Res.* **42**, 141-145 (2002).

(2) 特許出願

H1 5 年度特許出願件数 : 0件 (CREST研究期間累積件数 : 0件)