

「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、および胃特異的nCL-2/-2'）に焦点を当て、遺伝子改変マウス及びその組織などを用いて様々な解析を行っている。現在までに、p94ノックインマウスでのミオパチー症状が確認され、DNAチップ・蛍光二次元電気泳動による解析により、その分子基盤が明らかになりつつある。nCL-2についても生化学的・分子生物学的解析から、今まで予想もされていなかったカルパインの機能、即ち、膜輸送系における機能が強く示唆され、現在、ノックインマウスを用いてその検証を行っている。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。Ca<sup>2+</sup>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'**、消化管特異的**nCL-4**などの組織特異的カルパイン

や酵母カルパインCp11/Rim13に注目し、以下の3つの系（骨格筋・胃腸・酵母）に焦点を当てて解析を行っている。

### **[1] 骨格筋細胞系：**

昨年度までに「真性ノックインマウス」の作出が完了した94:C129Sノックインマウス（以下、p94CSマウス）は、ホモマウスの量産を行い、表現型の詳細な解析を行った。

(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マウスは、さらに他の疾患モデルマウス（*mdm*マウス、MURF1ノックアウトマウスなど）との交配を開始し、また、DNAチップや二次元電気泳動を用いた網羅的解析を行った。解析の過程で、新規に見出した「組織普遍型」p94バリエーションについては、その抗体の作製を行い、詳細な解析を開始した。

(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 $\mu$ -及びm-カルパインをモデルとし、これらの良い基質となるオリゴペプチドを選択し、これらを用いて解析を行った。HPLCの定量性にやや問題があるものの、内部標準などにより克服が可能と考えられた。

(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チップ解析や二次元電気泳動解析、あるいはTwo-Hybrid解析により、筋RINGフィンガータンパク質(MURFs)、筋アンキリン反復タンパク質(MARPs)、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、その分子実体を明らかにしたい。

(4) **p94の活性化機構の解析：** 昨年度に見出した、p94の興味深い性質、 $\text{Na}^+$ -依存性について、その生理的意義を含めて、詳細に検討した。その結果、p94は $\text{Ca}^{2+}$ チャネルやアセチルコリン受容体( $\text{Na}^+$ チャネル)が複合体を形成する筋小胞体に局在する可能性が強く示唆され、筋収縮に関与することが考えられた。さらにp94CSマウスを用いてその検証を行っている。

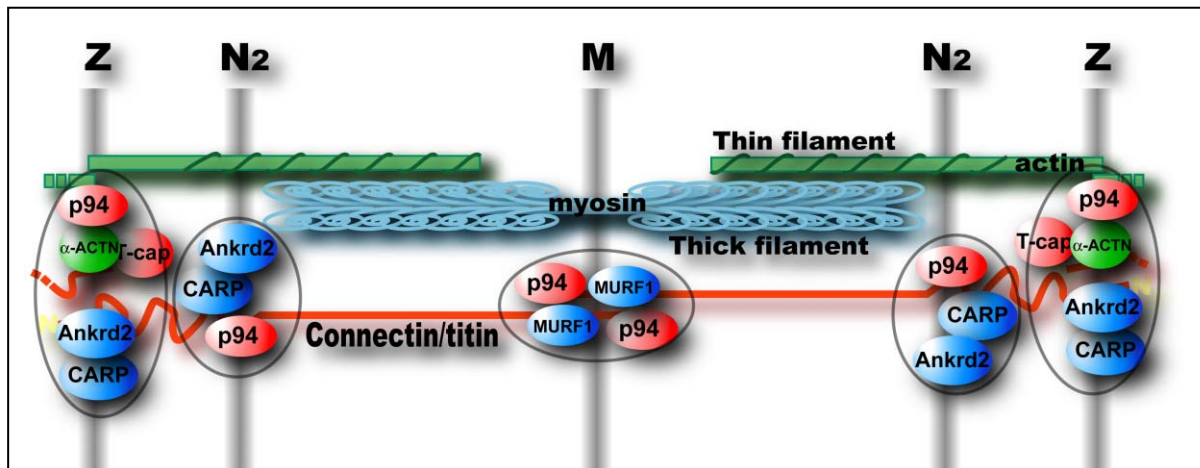


図 コネクチンを土台タンパク質とした筋原線維中のシグナル複合体

筋原線維はZ線と呼ばれる構造体が約 $3\mu\text{m}$ おきの繰返し構造をとる。2本のZ線の中央にあるM線を軸に分子レベルでも対称な構造をとり、主にアクチン重合体のthin filamentと主にミオシン重合体のthick filament、そして、一分子でZ-M線間を結合する巨大弾性タンパク質コネクチンの、3種の線維から構成される。Thick filament終端とZ線間にある高密度部位をN2線と呼び、*mdm*マウスではこの部分のコネクチンに変異を持つ。図のようにコネクチンのZ, N2, M線領域には数種のシグナル分子が複合体を形成して筋細胞の恒常性維持に寄与する。

## [2] 胃腸細胞系 :

胃特異的なnCL-2/-2'に関しては分子レベルでの生理機能解析を重点的に行った。その結果、ゴルジ膜の逆輸送などに関与する $\beta$ -COPとnCL-2は結合し、基質とすることが明らかとなった。これは、nCL-2の、今まで全く予想されていなかった膜輸送系での機能を強く示唆する結果となり、nCL-2の生理機能、またカルパインの生理機能全般に、新しい視点を導入した。現在、nCL-2ノックインマウスを用いて、その生理的意義をさらに詳細に解析している。

## [3] 酵母系 :

酵母のカルパインホモログCp11と転写因子Rim101は、*RIM8, 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(Cp11-Rim101経路)を構成する。Cp11はストレス刺激に応答してRim101を限定的に切断し、活性化する。この切断は、*RIM8, 9, 20, 21*いずれの欠損によっても阻害されるため、今年度はそのサプレッサーをスクリーニングした結果、エンドゾームなどの膜輸送系と関係するVps分子群の関与が明らかとなった。これは、上記のnCL-2の結果とも合わせ、大変に興味深いものである。また、*RIM8, 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。

### 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（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ノックインマウスを用いた解析
- (3) nCL-4遺伝子改変マウスの作成と解析
- (4) 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
- (5) p94活性制御機構及び生体内ターゲットの解析
- (6) 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) Cpl1p-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Cpl1p-Rim101p経路におけるシグナルフローの解明
- (3) Cpl1p-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

#### [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

#### (1) 論文（原著論文）発表

- Sato, K., Hattori, S., Irie, S., Sorimachi, H., Inomata, M. and Kawashima, S.: Degradation of fodrin by m-calpain in fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel. *J. Biochem.* **136**, 777-785, 2004.
- Shirasuka, Y., Nakajima, K., Asakura, T., Yamashita, H., Yamamoto, A., Hata, S., Nagata, S., Abo, M., Sorimachi, H., Abe, K.: Neoculin as a New Taste-modifying Protein Occurring in the Fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1403-1407, 2004.