

「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 蛋白質代謝研究分野
カルパインプロジェクト プロジェクトリーダー)

「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協同により制御されている。これらに直接作用してその機能・構造を変換・調節する「**モジュレータ・プロテアーゼ**」は、その作用「ペプチド鎖切断」が直接、不可逆、かつダイナミックであるため、生体制御の上で極めて重要である。**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であり、情報伝達系等を制御する。そのため、カルパイン遺伝子の変異や制御因子の機能不全等によるプロテアーゼ活性の過剰或いは不足が原因で、致死を始め、筋ジストロフィー、糖尿病、ガン等、様々な病態が生じる。これらの病態を克服するためにもカルパインの作用機序を明確にする事が必須であるが、未だに不明な点がほとんどである。そこで、本研究ではカルパインの作用機序を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

本研究では組織特異的に発現するカルパイン(特に骨格筋及び胃に特異的な **p94** と **nCL-2**)とその組織の特異的機能に注目して解析する。戦略としては、点変異不活性型カルパインを野生型の代わりに発現する**遺伝子改変マウス**を作成し、これを用いて様々な解析を行う。現在までに、p94 ノックインマウスでの筋ジストロフィー症状が確認され、蛍光二次元電気泳動解析により、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解析から、予想されていなかった内膜輸送系との関係が示され、現在、ノックインマウスを用いてその意義を検証している。今後は、プロテオーム解析を含む生化学的解析、他変異マウスとの交配による遺伝学的解析、変異マウス組織を用いた細胞生物学的解析をさらに発展させ、カルパインの作用機序解明を目指す。

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**モジュレート**する細胞内プロテアーゼ(「**モジュレータ・プロテアーゼ**」と呼ぶ)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変換/調節因子(モジュレータ)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^{2+} 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、それらの生理機能は不明な点がほとんどであり、そこには生命現象を理解する上での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 Cpl1/Rim13 に注目して解析している。

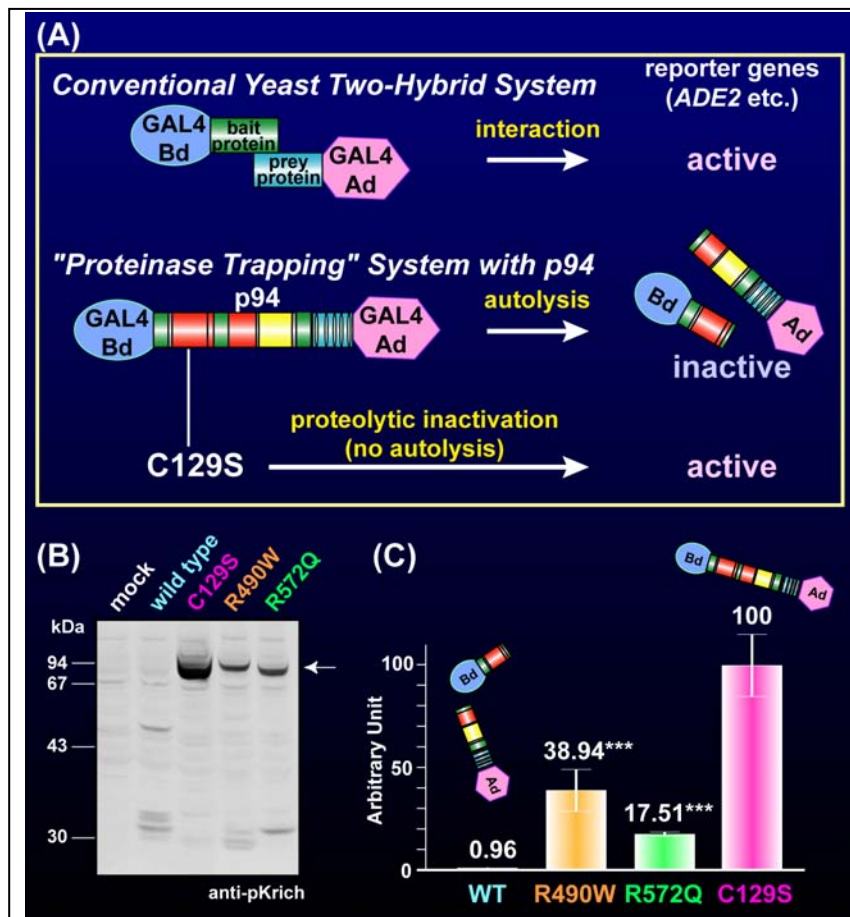


図 酵母 Two-Hybrid 系を応用した p94 の活性測定系

(A) 測定原理:酵母 Two-Hybrid 系では、二タンパク質間の相互作用により Gal4Bd-Ad を介したレポーター遺伝子の発現が起こる。そこで、Gal4Bd-Ad を一つの融合タンパク質として発現させればレポーター遺伝子の発現が起こる。ところが、そのタンパク質が p94 の場合は、急速な自己消化活性のため、直ちに Gal4Bd と Ad が解離し、発現が見られない。そして、活性中心を点変異(C129S)させるとレポーター遺伝子の発現が再び起こる。実際に野生型 p94 及び、活性がゼロの C129S 変異体、活性は弱いが存在する R490W と R572Q 変異体(COS 細胞での発現の様子が(B))を、この系で測定した結果、半定量的に活性が測定できた(C)。活性が低いほど、レポーター遺伝子(ここでは β -Gal)の発現が高くなる。

[1] 骨格筋細胞系:

昨年度までに「真性ノックインマウス」の作出とその戻し交配がほぼ完了した p94:C129S ノックインマウス(以下、p94CS マウス)は、量産を行って表現型の詳細な解析を行った。

(1) p94CS マウス及びその骨格筋を用いた解析:

プロテアーゼ活性のみを欠失した p94 を発現する p94CS マウスは、運動負荷時の表現型を解析した結果、通常飼育時よりも重篤な筋ジストロフィー症状を示すことが明らかとなり、p94 の活性は筋肉がストレスを受ける状態で、より必要とされていることが判明した。また、他の筋疾患関連遺伝子の遺伝学的解析を行うために、これらの遺伝子に変異を持つマウス(*mdm*、*mdx*、SJL、MURF1 ノックアウトマウスなど)との交配を開始した。一方、マウス組織を用い

て蛍光二次元電気泳動によるディフレンシャル解析を行った結果、いくつかの興味深い新規基質候補・相互作用タンパク質が同定された。

(2) 酵母ツーハイブリッド法を応用した p94 の活性測定システムの確立：酵母 Two-Hybrid 系は二タンパク質間の相互作用を Gal4Bd-Ad によるレポーター遺伝子発現に変換する。この応用である「プロテアーゼ・トラップ法」を改良し、p94 の活性の半定量的測定系を開発した(図参照)。この系は、p94 の構造機能相関解析、阻害タンパク質のスクリーニングなど、様々な応用が考えられ、実際に p94-コネクチン間の相互作用等について興味深い結果を得た(*J. Biol. Chem.* 投稿中)。

(3) p94 の活性化機構の解析：昨年度に見出した、p94 の興味深い生化学的性質について、本年度は培養細胞を用いた *in vivo* に近い状態で、その生理的意義を解析した。その結果、Ca²⁺チャネルなどが存在する筋小胞体にも、p94 の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 マウスを用いて検証中である。

[2] 胃腸細胞系：

胃特異的な nCL-2/-2' に関しても生化学的解析と、ノックインマウスの表現型解析を並行した。その結果、ゴルジ→小胞体の逆輸送等に関与する β -COP と nCL-2 は相互作用し、ドメイン間で切断することにより β -COP の局在を変化させる事が示唆された。これは、今まで全く予想されていなかった膜輸送系での、nCL-2 の機能を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(*J. Biol. Chem.* (2006) 印刷中)。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 Cpl1 と転写因子 Rim101 は、他の Rim タンパク質とともにアルカリ・塩ストレス応答に関与するシグナル伝達経路(Cpl1-Rim101 経路)を構成する。Cpl1 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、CPL1, RIM8, 9, 20, 21 いずれの欠損によっても阻害されるため、その抑圧変異を検索した結果、エンドソームなどの膜輸送に関与する Vps 分子群が同定された(*Mol. Cell. Biol.* (2005) 25, 9478-9490)。二重変異体の解析により、RIM 遺伝子間の上下関係も判明し、Cpl1p-Rim101p 経路のほぼ全容を明らかとした。これは、上記の nCL-2 の結果とも合わせ、「カルパインが内膜系との相互作用により活性制御を受ける」という一般原理を強く示唆するものであり、大変に興味深い。

3. 研究実施体制

「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 カルパイン PT、プロジェクトリーダー）

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: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) プロテアーゼ活性測定システムの開発と応用

「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) Cpl1-Rim101 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 Cpl1-Rim101 経路におけるシグナルフローの解明
- (3) Cpl1-Rim101 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

「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

- Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2006) Stomach-specific calpain, nCL-2, localizes in mucus cells and proteolyzes the β -subunit of coatamer complex, β -COP. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, J., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Kitamoto, K. and Abe, K. (2006) Extracellular production of a heterodimeric protein, neoculin, with sweet-tasting and taste-modifying activities by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press.
- Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Terada, T., Asakura, T., Nakajima, K., Iwata, S., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. (2006) Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity. *J. Mol. Biol.*, in press.

- Hayashi, M. and Maeda, T. (2006) Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* in press.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.-C., Park, S.-H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Kato, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., and Yamaguchi, I. (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J.* in press.
- Ojima, K., Ono, Y., Hata, S., Koyama, S., Doi, N., and Sorimachi, H. (2006) Possible functions of p94 in connectin-mediated signaling pathways in skeletal muscle cells. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, in press.
- Hayashi, M., Fukuzawa, T., Sorimachi, H., and Maeda, T. (2005) Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9478-9490.
- Maejima, T., Oka, S., Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., Aiba, A., Wu, D., Waku, K., Sugiura, T., Kano, M. (2005) Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca^{2+} -assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C β 4 signaling cascade in the cerebellum. *J. Neurosci.* **25**:6826-6835.
- Toyama-Sorimachi, N., Omatsu, Y., Onoda, A., Tsujimura, Y., Iyoda, T., Maki, A., Sorimachi, H., Dohi, T., Taki, S., Inaba, K., and Karasuyama, H. (2005) Inhibitory NK receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation- and cytokine stimulation-dependent manner. *J. Immun.* **174**, 4621-4629.
- Ohkouchi S, Saito H, Aruga F, Maeda T, Shibata H, Maki M. (2005) *Dictyostelium discoideum* requires an Alix/AIP1 homolog, DdAlix, for morphogenesis in alkaline environments. *FEBS Lett.* **579**, 1745-1750.
- Kassai, H., Aiba, A., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Xiong, W.H., Yau, K.W., Imai, H., Shichida, Y., Satomi, Y., Takao, T., Okano, T., and Fukada, Y. (2005) Farnesylation of retinal transducin underlies its translocation during light adaptation. *Neuron.* **47**, 529-539.
- 小野弥子、反町洋之 (2005) 神経細胞死の分子機構と Ca^{2+} 依存性プロテアーゼカルパイン 医学のあゆみ **215**, 811-817.
- 尾嶋孝一、反町洋之、木村澄子 (2005) 「筋弾性タンパク質の国際シンポジウム」報告記 [Report from “International Symposium on Muscle Elastic Proteins: Koscak Maruyama Memorial Meeting] 生体の科学 **56**, 157-159.