

「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) 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ー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「**モジュレーター・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ー・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/nCL-4**)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**を作出し、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、プロテオミクな生化学的解析により、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、ノックインマウスを用いてその意義を検証している。今年度は、特に p94 の筋原線維内局在変化の解析や、新規アッセイ系による構造機能相関解析から興味深い事実が明らかとなった。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

カルパインは細胞質内に存在する「モジュレータ(調節/変換子)プロテアーゼ」である。ヒトで 14 遺伝子が存在し、約半数は組織普遍的、他は組織特異的に発現する。基質蛋白質の除去ではなく、限定切断により基質の機能を調節・変換する。そのため、カルパインの遺伝子変異などによる活性不全により、胚性致死をはじめ、筋ジストロフィー、腫瘍等、様々な病態が引き起こされる。しかし、カルパインによる生体制御の分子機構は未知の点ばかりである。組織普遍的 m-カルパインの遺伝子欠損でマウスは胚性致死となり、生命現象の基本的かつ必須な領域に関与することが明らかとなった。一方、骨格筋特異的カルパイン p94 の遺伝子変異は、肢帯型筋ジストロフィー 2A 型 (LGMD2A) を発症する。これは、組織特異的カルパインが特化した組織機能に必須であることを示す。普遍的カルパインの機能解析がその普遍性故に難航する現在、組織機能との関連で生理機能解析が可能な組織特異的カルパインは、カルパイン研究にブレイクスルーをもたらす可能性を秘める。そこで本研究では、組織特異的カルパインに注目し、遺伝子改変マウスなどを用いて解析を行なっている。

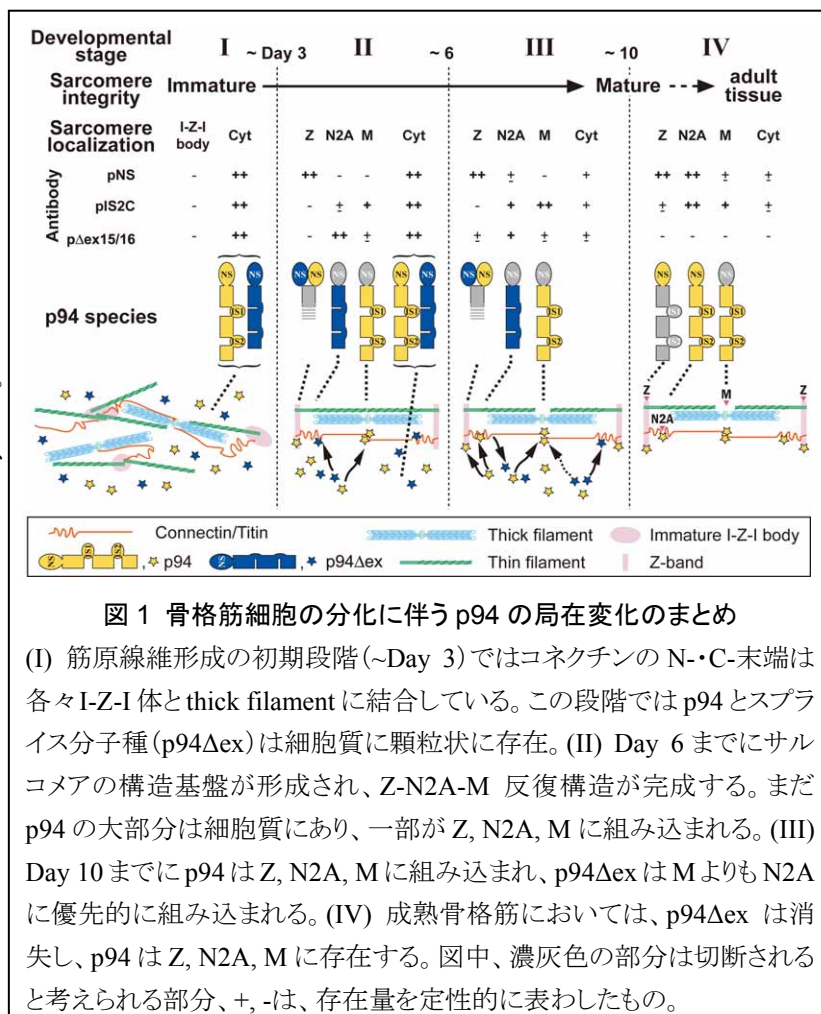
1. 胃特異的カルパイン

胃特異的カルパイン nCL-2 (CAPN8) について昨年度までに、胃表層粘液細胞に限定的に存在すること、十二指腸においても少量だが明確にゴブレット(ムチン分泌)細胞に局在すること、等を見出した。また、nCL-2 と eyes absent ホモログ、コートマー複合体 β -サブユニット (β -COP) との相互作用を同定した。このうち、 β -COP のみが基質となったため、 β -COP に注目して解析した結果、COS 細胞内で発現した nCL-2 とゴルジ体に共局在すること、免疫沈降で共沈すること、*in vitro* 及び Ca^{2+} -イオノフォア刺激の細胞内で nCL-2 に切断されること、が明らかとなった。切断位置をペプチドシーケンサーにより同定し、切断断片を発現させた結果、全長 β -COP のゴルジ体局在とは大きく異なり、細胞質に拡散して存在した。以上は、nCL-2 が胃ピット細胞内のゴルジ体~ER のメンブレントラフィックに関与し、粘液等の生成あるいは分泌に関与する事を強く示唆する。今後は、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* での解析を継続し、nCL-2 の作用点を明確にしていきたい。(Hata, S. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11214-11224.)

2. 骨格筋特異的カルパイン

(1) p94 の骨格筋内局在に関する解析

p94 は、成熟骨格筋においては筋原線維上の Z 線、N2A 領域、M 線の 3 領域(N2A 及び M ではコネクチンと結合)と細胞質に存在する。しかし、骨格筋の分化過程での細胞内局在は未知であった。そこでマウス骨格筋初代培養細胞の筋原線維形成過程での p94 の発現を解析した結果、骨格筋の最小



運動単位サルコメアの形成初期において、p94 及び p94 結合能を持つコネクチンが発現しているにも関わらず、両者は共局在せず、サルコメア形成後に p94 は Z, M, N2A に配向することが判明した(図 1)。また、p94 スプライス分子種は、全長とは異なり、主に N2A に集積した後に消滅した。これは、p94:Δex6 を発現させた Tg マウスの骨格筋が未成熟状態の表現型を示すことの、一つの説明と考えられる。

次に、GFP-p94 を発現させた結果、M, N2A に局在したが、興味深いことに両領域への局在割合は筋原線維のサルコメア長 (Z 線間距離) に依存した。即ち、p94 は筋伸張時には N2A、収縮時には M に局在する傾向が認められた。さらにその依存性は、野生型に比べ不活性型 p94:C129S で鈍かった。以上は、筋原線維伸縮を感知して p94 は局在を変化し、それに p94 活性が必要である事を示唆する。本知見は、p94 のプロテアーゼ活性不全が筋ジストロフィーを引き起こすという現象に対し、初めての直接的データである。(Ojima, K. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.*, in press)

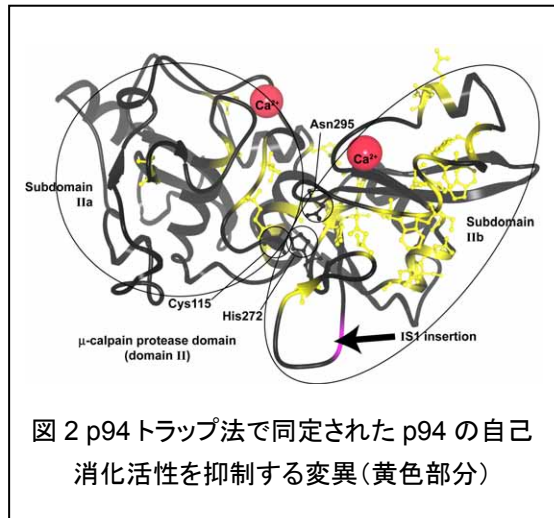


図 2 p94 トラップ法で同定された p94 の自己消化活性を抑制する変異 (黄色部分)

(2) 酵母を用いた「p94 トラップ法」による p94 の活性制御に関する解析

上述のように p94 のプロテアーゼ活性は、骨格筋機能に必須である。しかし、自己消化活性のために p94 を酵素学的に解析することは不可能であった。そこで、酵母 Two-Hybrid (以下 YTH) 系の応用である「プロテアーゼ・トラップ法」を p94 に適用し、活性の半定量的測定系を開発した(「p94 トラップ法」と呼ぶ)。この系は、LGMD2A の一次診断に応用可能である。さらにランダム変異導入と組み合わせ、p94 の構造機能相関解析を行なった。プロテアーゼドメインに対して行なった結果、LGMD2A の病原性変異と同一箇所の変異が 7 種同定された。これは、LGMD2A の病原性が p94 のプロテアーゼ活性不全によることを裏付けると共に、系の有効性を示した。他に 26 変異が見出され、これらを活性型 μCL のプロテアーゼドメインの立体構造に投影した結果、変異は、①活性中心を形成する Cys115 及び His272 を支える α-, β-鎖、②サブドメイン IIb の側表面で IS1 挿入部分に隣接する領域、に集中した(図 2)。①は活性発現に両残基の位置関係が重要な事、②は IS1 がこの領域と相互作用してその摂動により自己消化活性が抑制される事、を示唆した。今後は他のドメインについても同様の解析を行なう。

次に、p94 とコネクチンとの相互作用形式について解析を行なった。p94 の結合する N2A と M (C-末端) の 2 領域を含む断片を p94 トラップ系に共発現させた。その結果、N2A 領域断片は p94 の活性を抑制するが、M 線領域断片では抑制しないことが示された。さらに、コネクチン N2A 領域に小さな欠失を起こす変異を持つ天然の変異マウス *mdm* (muscular dystrophy with myositis) は、homozygote が重篤な筋ジストロフィーを呈するが、この微小欠失を持つコネクチン N2A 領域断片は、p94 のプロテアーゼ活性抑制作用を喪失していた。以上は、p94 の *in vivo* での安定化の理由がコネクチンとの結合であり、p94 の活性制御に重要であることを示した。(Ono, Y. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 18519-31.)

これらの例はいずれも切断活性の消失が、細胞機能不全を引き起こすが、他の分解系で見られるような未分解産物の蓄積は顕著ではない。即ち、冒頭に記したようにカルパインの作用は、他の蛋白質を切断することによりその機能・構造を変化させる、高次のモジュレーションであることを体現している。過去に、カルパインの *in vitro* での解析は数多いが、*in vivo* での作用機序の実体については未だにほとんど不明である。その最大の理由は、*in vivo* でカルパインは、化学量論的には機能しないことであろう。つまりカルパインを理解するには、量的・時空間的に極めて限定された活性化、という観点でのアプローチが重要である。情報伝達に関与する多くの酵素について、scaffold 蛋白質の存在が *in vivo* での反応を時空間的に限定することが明らかとなってきた。カルパインについて scaffold の存在は、未だ明確ではない。しかし、本年までに明らかとなってきた骨格筋・胃特異的カルパイン、そして酵母カルパインの遺伝学・生化学的解析の結果、細胞内膜系での機能が示された。そこは、細胞内において限定された時空間が確立される場、と捉えられる。これらの系に共通する点を抽出し、カルパインの普遍的分子作用機序について、さらに深く考察していきたい。

3. 研究実施体制

(1) 反町研究グループ

① 研究者名

反町 洋之（(財) 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プロジェクト プロジェクトリーダー）

② 研究項目

- ・ p94:C129S ノックインマウスの解析
- ・ nCL-2/-2':C105S ノックインマウスの解析
- ・ nCL-4 遺伝子改変マウスの作出と解析
- ・ p94 及び nCL-2 の立体構造解析
- ・ 新規同定分子の遺伝子改変マウスのターゲティングストラテジーの考案と解析
- ・ p94 及び nCL-2/-2'/-4 活性制御機構及び生体内ターゲットの解析
- ・ 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
- ・ 他の遺伝子改変マウスと p94:C129S ノックインマウスとの交配とその解析
- ・ カルパインシステムの根底に存在する作用機序原理についての考察

(2) 前田研究グループ

① 研究者名

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

- ・ Cpl1-Rim101 経路欠損変異の抑圧変異の単離と責任遺伝子の同定
- ・ 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
- ・ Cpl1-Rim101 経路の *in vitro* 再構成系の確立
- ・ Cpl1-Rim101 経路とメンブレントラフィックとの関係の解析
- ・ 哺乳類相同遺伝子の単離と相同経路の解明
- ・ 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酵母系の開発と利用

(3) 饗場研究グループ

① 研究者名

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

- ・ nCL-4 遺伝子改変マウスの作出
- ・ 新規同定分子の遺伝子改変マウスのターゲティングストラテジーの考案と作出
- ・ p94:C129S ノックインマウスと *mdm* 及び MURF1・カルパスタチンノックアウトマウスとの交配

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Ojima, K., Ono, K., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Labeit, S., and Sorimachi, H. (2007) Myogenic stage, sarcomere length and protease activity modulate localization of muscle-specific calpain. *J. Biol. Chem.*, **282**, in press.
- Ono, Y., Hayashi, C., Doi, N., Kitamura, F., Shindo, M., Kudo, K., Tsubata, T., Yanagida, M., and Sorimachi, H. (2007) Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics - Possible regulation of protein synthesis by p94. *Biotech. J.* **2**, in press.
- Aiba, A., and Nakao, H. (2007) Conditional mutant mice using tetracycline-controlled gene expression system in the brain. *Neurosci. Res.*, in press.
- Kamei, H., Saito, T., Ozawa, M., Fujita, Y., Asada, A., Bibb, J. A., Saido, T. C., Sorimachi, H., and Hisanaga, S. (2007) Suppression of calpain-dependent cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 1687-1694.
- Nakajima, K.I., Asakura, T., Oike, H., Morita, Y., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Abe, K. (2006) Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport*, **17**, 1241-1244.
- Takahara, T., Hara, K., Yonezawa, K., Sorimachi, H., and Maeda, T. (2006) Nutrient-dependent multimerization of the mammalian target of rapamycin through the N-terminal HEAT repeat region. *J. Biol. Chem.*, **281**, 28605-28614.
- Yajima, Y., Sato, M., Sorimachi, H., Inomata, M., Maki, M., and Kawashima, S. (2006) Calpain system regulates the differentiation of adult primitive mesenchymal ST-13. *Endocrinology*, **147**, 4811-4819.
- Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., and Sorimachi, H. (2006) Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 in a genetic reporter system. *J. Biol. Chem.*, **281**, 18519-18531.
- Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, J., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, 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.*, **72**, 3716-3723.
- 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.*, **359**, 148-158
- 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.*, **281**, 11214-11224.
- Hayashi, M., and Maeda, T. (2006) Activation of the HOG pathway upon cold stress in

Saccharomyces cerevisiae. *J. Biochem.*, **139**, 797-803.

- 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.*, **46**, 880-889.