

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21367

研究課題名(和文)非酵素型カルパインによるRhoA活性制御機構とその筋組織における役割の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of non-proteolytic calpain to the skeletal muscle development via RhoA activity

研究代表者

礪波 一夫(Tonami, Kazuo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：70511393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非酵素型カルパインであるカルパイン6(CAPN6)による骨格筋発達抑制の分子機構としてCAPN6によるRhoAの活性調節が重要な役割を果たしていることを明らかとした。また、CAPN6と最もタンパク質の構造的類似性が高いCAPN5が同じく低分子量Gタンパク質の活性を調節することを示唆するデータが得られ、CAPN6の新しい相互関連分子として着目するに至っている。病態との関連においては、共同研究の成果としてTNF- $\alpha$ 刺激によりマクロファージで発現誘導されるCAPN6が、Rac1の発現抑制を介してLDLの飲作用を阻害することで動脈硬化を増悪させるという新規病態生理機構を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：CAPN6 is a suppressor of skeletal muscle differentiation. In this study we elucidated the regulation of RhoA activity by CAPN6 is important as the molecular mechanism under skeletal muscle development. As a molecular mechanism of CAPN6 regulating RhoA activity, it is suggested that CAPN5 which has highest similarity to CAPN6 in the protein structure could regulate the activity of small G-protein. This result led us to focus to CAPN5 as counterpart of CAPN6 in the regulation of small G protein. In the aspect of pathological function of CAPN6, we found that macrophage CAPN6 exacerbates atherosclerotic diseases via suppressing pinocytosis of LDL. In this process the suppression of Rac1 expression by CAPN6 and CWC22 association plays a significant role. In this study we found physiological and pathological significant of the CAPN6 cellular function of regulating small G protein.

研究分野：発生医学

キーワード：カルパイン 低分子量Gタンパク質 筋分化 骨格筋 細胞骨格 アクチン 動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

これまで本研究では鰓弓形成に重要なエンドセリ-1シグナル(Kurihara et al. Nature. 1994)の下流遺伝子として同定したカルパイン6 (CAPN6)の機能解析に取り組んできた。

CAPN6はシステインプロテアーゼであるカルパインの一員であるが、ファミリーの中で唯一酵素活性に必須なCysがLysに置換したユニークな構造を持つ非プロテアーゼ型分子種であり、その機能に関する知見は殆ど無かった。本研究ではこれまで(1)培養細胞を用いた実験から、CAPN6の細胞機能として微小管の安定化および低分子量Gタンパク質の活性調節機能(参考文献1および2)、(2)遺伝子改変マウスの作出、解析から生理機能として骨格筋の発達および再生における抑制的役割(参考文献3)を明らかにしてきた。(1)については、CAPN6が細胞内において細胞骨格の主要成分である微小管を安定化し、同時に低分子量Gタンパク質Rac1およびRhoAの活性制御(Rac1は抑制、RhoAは活性化)を介してアクチン骨格を制御すること。また、微小管構築と低分子量Gタンパク質Rac1の活性制御を介したアクチン構築の相互調節機能としてCAPN6によるGEF-H1の活性・局在制御が関与していることを明かしていった。

しかしながら、CAPN6がRhoAを活性化するメカニズムや生理機能である骨格筋の発達抑制と細胞骨格制御という細胞機能との関連については不明なまま残されていた。病態との関連においては、CAPN6の欠損が骨格筋の再生を促進することから、CAPN6欠損が筋ジストロフィーにおける病態の緩和に寄与できるのではないかと考えられた。また、生後1年以上経過した*Capn6* KOの雌マウスの子宮において腫瘍様病変を示唆する所見が得られていた。また、低分子量Gタンパク質活性や微小管構築へのCAPN6の役割は様々なCAPN6の発現臓器が関わる病態と関連が期待された。

(参考文献)

- (1) Tonami et al. Mol. Cell. Biol. 2007.
- (2) Tonami et al. J. Cell Sci. 2011.
- (3) Tonami et al. PLoS Genet. 2013.

## 2. 研究の目的

上記研究背景から、本研究においてこれまで未解明であった点、即ちCAPN6による低分子量Gタンパク質RhoAの活性制御機構、CAPN6の微小管安定化や低分子量Gタンパク質活性制御機能が骨格筋の発達および再生に果たす役割、CAPN6が筋ジストロフィーやその他病態形成において果たす役割の3点を明らかにすることを目的とした。

目的の具体的な部分として、については、「CAPN6存在下ではGEF-H1はRhoAを、CAPN6非存在下ではRac1を活性化する」という仮説を検証すること。については、マウス骨格筋の発達に微小管の安定化、Rac1やRhoAの活性化のどの経路が重要かを検証すること。については、病態発現マウスと*Capn6* KOの二重変異マウスの作出、解析からCAPN6が関わる病態、特に骨格筋の再生が重要な筋ジストロフィーにおけるCAPN6の役割とCAPN6を標的とした治療の新しい方向性の検討を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、研究目的CAPN6による低分子量Gタンパク質RhoAの活性制御機構の解明について、培養細胞株を用いてCAPN6と標的分子GEF-H1(あるいは本研究により同定するその他RhoAの活性制御に關与するCAPN6関連分子)をノックダウン(KD)あるいは過剰発現(OE)し、RhoAおよびRac1の活性や局在変化、アクチン構築を解析することで、CAPN6の低分子量Gタンパク質活性調節機構を解析した。研究目的

CAPN6の微小管安定化や低分子量Gタンパク質活性制御機能が骨格筋の発達および再生に果たす役割の解明については、*Capn6* KOマウスの安定化微小管の定量やCAPN6のRhoA活性調節機能が発現組織である胎児筋の発達に機能しているのかを、主にマウス成獣骨格筋から樹立した骨格筋初代培養細胞の分化誘導実験により解析を行った。CAPN6が関わる病態の解析では、*Capn6*と筋ジストロフィーの責任遺伝子*Capn3*の二重KOの解析から、CAPN6の筋萎縮疾患治療の標的としての可能性を検討した。また、子宮における腫瘍様病変の形成を検討する目的でp53 KOとの二重変異マウスを作出した。加えて、昭和大学宮崎拓郎博士との共同研究により*Capn6*と動脈硬化病変を引き起こす*Ldlr*の二重変異マウスの解析からCAPN6と動脈硬化病変との関連を解析した。

## 4. 研究成果

CAPN6による低分子量Gタンパク質RhoAの活性制御機構の解明について、「CAPN6存在下ではGEF-H1はRhoAを、CAPN6非存在下ではRac1を活性化する」という作業仮説を、NIH3T3細胞株を用いたCAPN6とGEF-H1の過剰発現(OE)とKDの組み合わせ実験から検証した。これまでの本研究の成果(Tonami et al. J. Cell Sci. 2011)から、*Capn6* KDはGEF-H1の局在変化と活性化を介してRac1を活性化するという仮説の後半部分は支持する実験結果を得ていた。一方、仮説の前半部分、即ちCAPN6存在下ではGEF-H1はRhoAを活性化するようになるという仮説については、

CAPN6 と GEF-H1 を NIH3T3 細胞において同時に OE してもストレスファイバーの形成を亢進させなかったこと。また、*Capn6* の KD 細胞において GEF-H1 のリン酸化状態を調べたところ、*Capn6* の KD において GEF-H1 の S885 リン酸化型 (RhoA に対する活性化能が抑制された分子型) がむしろ減弱していることが示され、CAPN6 存在下の NIH3T3 細胞においては GEF-H1 は RhoA の活性化能が抑制された状態となっていることが示された。以上の結果から、CAPN6 による RhoA の活性化の分子メカニズムについて、GEF-H1 とは異なる分子経路あるいは GEF-H1 のみではなく付加的な分子が関与している可能性が示唆され、CAPN6 と細胞骨格制御機構に関して、これまで異なる新しい視点を与える結果を得ることが出来た。さらに、CAPN6 の生理機能発現に重要な相互作用タンパク質の探索を行ったが、CAPN6 と最もタンパク質の構造的類似性が高い CAPN5 が低分子量 G タンパク質の活性調節を介してアクチン骨格を制御 (一方の微小管の構築には影響を与えない) していることを示唆するデータが得られ、CAPN6 の新しい相互関連分子として着目するに至っている。今後は CAPN6 と CAPN5 との相互作用の有無やプロテオリスの観点から生理機能発現機構の解析を進めていく予定である。

次に CAPN6 の細胞機能 (微小管の安定化、Rac1 活性抑制、RhoA 活性促進) が骨格筋分化抑制のメカニズムとしてどのように関与しているかを解析した。まず、*Capn6* KO と野生型マウスの胎児筋および再生筋のアセチル化チューブリン (安定化微小管の指標) の量を比較したが、培養細胞で得られた結果 (CAPN6 は微小管を安定化する) と一致する結果は得られなかった。一方、CAPN6 の RhoA 活性抑制の骨格筋分化における役割を検証した結果、成獣マウス骨格筋から樹立した骨格筋初代培養細胞の分化誘導過程で RhoA を抑制すると骨格筋への分化が促進した。*Capn6* KO マウスから樹立した骨格筋初代培養細胞を RhoA Activator 存在下で分化誘導すると、*Capn6* KO による骨格筋分化促進を RhoA の活性化によりキャンセルすることが出来た。この結果から、CAPN6 の胎児筋や再生筋における分化調節機能が RhoA 活性を介したものであることを明らかとし、CAPN6 の RhoA 活性化という細胞機能と組織における生理機能を「RhoA の活性制御」というキーワードでリンクすることが出来た。

CAPN6 の病態発現における役割の解析について、本研究では *Capn6* と *Capn3* の二重変異マウスの作出に成功し、病変部位を切片により解析したが、*Capn3* KO において引き起こされる病変部位に *Capn6* KO による顕著な差は認められなかった。しかし、*Capn3* KO マウスの筋ジストロフィー様の表現型自体が軽微なものであるため、さらに重篤な筋

萎縮症病態モデルマウスとの二重変異マウスを用いた解析の必要性が指摘される。また、*Capn6* KO における子宮病変は *Capn6* KO の蘇生が予定より遅れてしまったことから、期間内に解析することが出来なかった。現在、生後早い段階に高度で腫瘍の発生が見られる p53 KO と *Capn6* KO の二重変異マウスを作出中であり、*Capn6* KO により子宮における腫瘍形成が促進されるか、またその病変部での細胞浸潤の様子や低分子量 G タンパク質の活性について解析し、CAPN6 と腫瘍病変の進展の相関とメカニズムについて明らかにする予定である。最後に、昭和大学医学部宮崎拓郎博士との共同研究の成果であるが、*Capn6* KO と動脈硬化病変を呈する *Ldlr* KO の二重変異マウスを用いた解析から、CAPN6 の動脈硬化病変における役割と作用機構について、次のことを明らかとした。CAPN6 が TNF- $\alpha$  刺激によりマクロファージで発現誘導されること。CAPN6 はマクロファージにおいて Rac1 の発現および活性を制御し、LDL の飲作用を阻害することで動脈硬化を増悪させること。また、CAPN6 による Rac1 の発現調節の分子メカニズムとしてエキソン接合部複合体タンパク質 CWC22 との結合を介した Rac1 遺伝子のスプライシング調節が関わっていることを明らかとした。上記共同研究では、CAPN6 が関わる新しい病態生理とその分子機構を明らかにし、病態発現においても CAPN6 の低分子量 G タンパク質の調節機能が重要な役割を果たしていることを示す成果を得ることが出来た。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takuro Miyazaki, Kazuo Tonami, Shoji Hata, Toshihiro Aiuchi, Koji Ohnishi, Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Motohiro Takeya, Hiroyuki Itabe, Hiroyuki Sorimachi, Hiroki Kurihara and Akira Miyazaki. Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *J Clin Invest.*

査読有, 2016; 126:3417-3432

DOI: 10.1172/JCI85880.

〔学会発表〕(計 3 件)

礪波 一夫、金井 政宏、戸澤 英人、牛島 俊征、田久保 直子、内島 泰信、時弘 哲治、栗原 裕基

細胞の協調動態の観察とモデリング

生命動態合同シンポジウム 2017

2017 年 3 月 17 ~ 18 日

理化学研究所 生命システム研究センター

(大阪府吹田市)

Takuro Miyazaki, Kazuo Tonami, Shoji Hata, Toshihiro Aiuchi, Koji Ohnishi, Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Motohiro Takeya, Hiroyuki Itabe, Hiroyuki Sorimachi, Hiroki Kurihara and Akira Miyazaki.

Disturbance of pre-mRNA splicing by calpain-6 aggravates macrophage cholesterol deposition in atherosclerotic lesions

第24回血管生物医学会学術集会  
2016年12月9日  
長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

Takuro Miyazaki, Kazuo Tonami, Shoji Hata, Toshihiro Aiuchi, Koji Ohnishi, Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Motohiro Takeya, Hiroyuki Itabe, Hiroyuki Sorimachi, Hiroki Kurihara and Akira Miyazaki

Calpain-6 potentiates pro-atherogenic pinocytosis in macrophages

19th International Vascular Biology Meeting  
2016年11月1日  
ボストン(U.S.A)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

礪波 一夫(TONAMI, Kazuo)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号:70511393

### (2)研究協力者

宮崎 拓郎(MIYAZAKI, Takuro)  
昭和大学・医学部・講師  
研究者番号:80398693