

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04014

研究課題名(和文) 運動ストレス応答にカルパインの酵素活性はなぜ必要なのか？

研究課題名(英文) The significance of calpain protease activity in skeletal muscle cells

研究代表者

尾嶋 孝一 (Koichi, Ojima)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：60415544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタンパク質切断酵素であるカルパイン3に着目し、骨格筋への運動ストレス負荷によりカルパイン3が活性化する理由を探求した。骨格筋細胞では骨格筋特異的に発現するカルパイン3、組織普遍的に発現するカルパイン1およびカルパイン2が発現するため、カルパイン間での相互関係を検討した結果、カルパイン1、2および3において、タンパク質切断酵素-基質の関係があることを明らかにした。骨格筋細胞内でカルパイン3が活性化することで、カルパイン1および2の活性化を誘起していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルパインは組織普遍的あるいは組織特異的に発現するタイプがあり、ヒトでは15種類存在する。骨格筋細胞でカルパイン1、2、および3が発現することが知られていたが、3種類のカルパインが同一細胞内に存在する意義は不明であった。本研究では、骨格筋細胞内に共存するカルパイン1、2、3間には切断酵素と基質の関係があることを示し、骨格筋細胞内に異なる種類のカルパインが発現する意義を説明することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Calpains are Ca<sup>2+</sup>-requiring intracellular proteases. Skeletal muscle cells express three types of calpain, calpain-1 and calpain-2, ubiquitously expressed in mammalian cells, and skeletal muscle-specific calpain-3. It is known that the protease activity of calpain-3 is required for muscle stress response. However, the physiological significance of calpain-3's proteolysis in response to muscle stress is not fully understood. We demonstrated that the N-terminal region of calpain-3 was cleaved by calpain-1 and calpain-2. Meanwhile, calpain-3 preferentially cleaved the N-terminus of calpain-1 over that of calpain-2. These results indicate the reciprocal relation among calpain-1, -2, and -3 in skeletal muscle cells. Our findings suggest that calpain-3 proteolysis against muscle exercise is involved in the inter-calpain network to prime proteolysis of calpain-1 and/or calpain-2.

研究分野：骨格筋細胞生物学

キーワード：骨格筋 カルパイン

## 1. 研究開始当初の背景

カルパインは細胞質内に存在し、活性が  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に制御されるタンパク質切断酵素である。カルパインは消化酵素など他の酵素とは大きく異なり、基質を限定的に切断し、その基質の構造を変換することで、切断した基質に新たな機能を付与するモジュレータプロテアーゼである(文献)。ヒトにおいて 15 種類のカルパインが存在し、骨格筋には組織普遍的に発現するカルパイン 1 および 2 の他に、骨格筋組織特異的に発現するカルパイン 3 が発現する。カルパイン 3 の機能不全により骨格筋萎縮および筋変性が起きるため、カルパイン 3 は骨格筋細胞が正常に機能するためには必要不可欠なタンパク質切断酵素である(文献)。しかし、カルパイン 3 の自己切断活性が極めて高いため、生化学的な解析が困難であり、カルパイン 3 のモジュレータプロテアーゼとしての全容を明らかに出来ていない。一方、骨格筋は運動を司る最も重要な組織であるため、収縮・弛緩といった機械的なストレスに常にさらされている。運動負荷をかけた野生型マウスの骨格筋ではカルパイン 3 が活性化する。しかし、酵素活性を欠損させたカルパイン 3 を発現する遺伝子改変マウスに運動負荷をかけると骨格筋線維の変性・壊死が悪化する。そのため、運動ストレスへの防御機構としてカルパイン 3 が活性化することが必要である。しかし、その生理的な意義は未だに不明である。

## 2. 研究の目的

カルパインは  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に活性化するタンパク質切断酵素である。一方、骨格筋は運動刺激に常に曝されるが、その刺激に正常に応答することで筋変性を防いでいる。しかし、骨格筋細胞が運動ストレスを感知した後、どのような応答機構を発動することで、筋変性を防いでいるのかについてはコンセンサスが得られていない。本研究はタンパク質切断酵素であるカルパイン 3 の酵素活性に着目し、運動ストレスに対する骨格筋細胞の応答機構を解明することを目指した。骨格筋細胞への運動ストレスとカルパイン 3 活性化の関連を明らかにするために、培養骨格筋細胞、および骨格筋組織への運動負荷モデルを構築し、カルパイン 3 が活性化する至適の運動負荷条件を明らかにすることを目的の 1 つとした。さらに、骨格筋細胞には骨格筋特異的に発現するカルパイン 3 の他に、組織普遍的に発現するカルパイン 1、および 2 が存在するため、カルパイン間の相互作用の観点からも、骨格筋細胞におけるカルパイン 3 活性化の意義を追究した。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨格筋細胞培養

野生型マウス骨格筋組織より骨格筋細胞を調製した。カルパイン 3 酵素活性不全マウス由来の骨格筋細胞も同様に調製した。骨格筋細胞を GM (10%FBS in DMEM) で 2 日培養後、DM (5%HS in DMEM) に切り替えて筋管形成を促した。

### (2) HEK 細胞培養、遺伝子導入、およびノックダウン

HEK 細胞の培養には GM (10%FBS in DMEM) を用いた。HEK 細胞にカルパインの各発現ベクターを遺伝子導入した。用いた発現ベクターは緑色蛍光タンパク質を融合したカルパイン 1 (GFP-C1)、酵素活性不全型カルパイン 1 (GFP-C1CS)、カルパイン 2 (GFP-C2)、酵素活性不全型カルパイン 2 (GFP-C2CS)、カルパイン 3 (GFP-C3)、酵素活性不全型カルパイン 3 (GFP-C3CS)、赤色蛍光タンパク質を融合したカルパイン 3 (Cherry-C3) および酵素活性不全型カルパイン 3 (Cherry-C3CS) である。遺伝子導入 48 時間後に細胞を回収した。カルパイン 1 および 2 をノックダウンするために、カルパイン 1 および 2 の siRNA (Santa Cruz 社製) をトランスフェクションした。次の日に各コンストラクトを遺伝子導入し、その 48 時間後に細胞を回収した。

### (3) 培養骨格筋細胞への電気刺激

分化誘導後 6 日以上経過した筋管を試料とし、電気刺激を負荷することで強制的に収縮・弛緩を繰り返し、培養骨格筋細胞への運動モデルを構築した。C-Pace EM (Ion Optiplex 社製) を用いることで、電気刺激の周期(Hz)、パルス幅(msec)、刺激ステップ数を組み合わせることで、異なる運動刺激を培養骨格筋細胞に負荷した。

### (4) 骨格筋組織への電気刺激

マウスから長趾伸筋の腱を保持したまま採取し、シリコンゴム製のホルダーに装着した。ホルダーごと培養用ディッシュに入れ、(3)と同様の電気刺激を骨格筋組織へ負荷し、強制的に収縮・弛緩を繰り返した。

### (5) 電気泳動・イムノプロットング

培養骨格筋細胞および HEK 細胞をタンパク質分解酵素阻害剤の入ったバッファーで回収し、電気泳動用試料を作成した。骨格筋組織は電気刺激後に液体窒素で凍結させた後、電気泳動用試料を作成した。イムノプロットングには各種カルパインに対する抗体、緑色蛍光タンパク質(GFP) およびローディングコントロールとしてアクチンに対する抗体を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 培養骨格筋細胞における運動モデル

in vitro 培養骨格筋細胞レベルで運動モデルを再現するため、培養骨格筋細胞を強制的に収縮させる電気刺激モデル構築を行った。マウス由来骨格筋細胞を分化させ筋管を形成させ、電気刺激システム C-Pace を用いて筋管へ収縮刺激を負荷した。カルパイン 3 が活性化しやすい収縮パターンを探るために、負荷する電気刺激のパターン（電気刺激の周期(Hz)、パルス幅 (msec) 刺激ステップ数）を変え実験した。各パラメータの組み合わせでおよそ 20 通りの刺激パターンで行った。電気刺激中に筋管が収縮することは顕微鏡下で確認した。電気刺激負荷後に培養細胞をサンプリングし、カルパイン 3 に対する抗体を用いてイムノブロットングし、カルパイン 3 の自己切断断片を指標として、カルパイン 3 の酵素活性を評価した。各電気刺激パターンで実験し、運動刺激直後にサンプリングした結果、いずれの場合にもカルパイン 3 が顕著に活性化する電気刺激パターンは見出すことが出来なかった。次に、電気刺激負荷後に、30 分、1 時間後にサンプリングした試験区においても同様の実験を行った。しかし、カルパイン 3 の断片が顕著に検出される電気刺激パターンは見出せなかった。培養骨格筋細胞では筋管を形成するものの、マウス個体レベルの筋線維と比較すると筋原線維構造等が成熟していないため、電気刺激を負荷してもカルパイン 3 の応答性が低かった可能性が考えられた。

### (2) 骨格筋組織レベルでの運動負荷モデル

培養骨格筋細胞への電気刺激負荷ではカルパイン 3 の有意な活性化が認められなかったため、マウス骨格筋組織に ex vivo で電気刺激を負荷し、骨格筋組織レベルでの運動負荷モデルを構築することを目指した。野生型マウス、および対照として酵素活性不全のカルパイン 3 を発現するマウスから長趾伸筋 (EDL) を取り出し、筋に付着している腱をシリコンゴムに挟み込むことで骨格筋を保持し、培養液存在下で電気刺激を負荷した。骨格筋組織を試料としてイムノブロットングを行い、カルパイン 3 の自己切断断片を検出することで、カルパイン 3 の酵素活性を評価した。電気刺激パターンは培養骨格筋細胞へのパターンに準じた。その結果、カルパイン 3 の活性化による自己消化断片が検出された電気刺激パターンはあったもののサンプル間におけるバラツキが大きかった。カルパイン 3 が活性化する電気刺激パターンの最適化にはさらなる条件検討が必要である。

### (3) カルパイン間の相互作用

骨格筋細胞にはカルパイン 3 の他にもカルパイン 1 および 2 が発現し、運動負荷後の骨格筋細胞ではカルパイン 3 以外にもカルパイン 1 が活性化することも知られている(文献 )。一方、カルパイン 1 とカルパイン 2 の間には基質-タンパク質切断酵素としての関係がある(文献 )。そこで、カルパイン 3 が同一細胞内で共存するカルパイン 1 および 2 と基質-タンパク質切断酵素としての関係があるのか否かを検討した。HEK 細胞内に GFP-C3CS を強制発現させ、HEK 細胞内の内在性カルパイン 1 および 2 を活性化させた結果、GFP-C3CS がカルパイン 1 および 2 により切断を受けることが判明した。カルパイン 1 あるいは 2 のいずれがカルパイン 3 を切断するのかを明らかにするために、HEK 細胞内の内在性カルパイン 1 あるいは 2 をノックダウンした細胞で遺伝子導入した GFP-C3CS を切断させた。その結果、カルパイン 1、および 2 のいずれもカルパイン 3 を切断する結果を得られた。カルパイン 3 の切断個所のアミノ酸をペプチドシーケンサー等で決定した結果、カルパイン 3 が自己消化する部分と同一部位であった。さらに、カルパイン 3 がカルパイン 1 および 2 を切断するのか否かを検討した。すなわち、HEK 細胞に Cherry-C3、および GFP-C1CS、あるいは GFP-C2CS を発現するコンストラクトを遺伝子導入し、その細胞抽出液を試料として C3 を活性化させた。その結果、カルパイン 3 がカルパイン 1 および 2 の N 末端付近を切断することが明らかとなった。これらの切断断片はカルパイン 1 および 2 が自己消化活性の際に切断されるサイズと同一であった。一連の結果から、カルパイン 1~3 間において基質-切断酵素としての関係を持つことが示された。各カルパインが活性化するための  $Ca^{2+}$  要求量を考慮すると、まずカルパイン 3 が活性化し、活性化したカルパイン 3 がカルパイン 1 の N 末端付近を切断し、カルパイン 1 の活性を誘起する。次にカルパイン 1 がカルパイン 2 の N 末端付近を切断し、カルパイン 2 の活性を誘起する。このように骨格筋細胞内ではカルパイン 3 の活性化が引き金となり、次々と他のカルパインが活性化していく機構があると考えられる(図 1)(文献 )。骨格筋細胞内カルシウムイオンのホメオスタシスが崩れるとカルパイン間の基質-切断酵素の相互関係も崩れ、運動刺激に適切に応答できない可能性が示唆された。

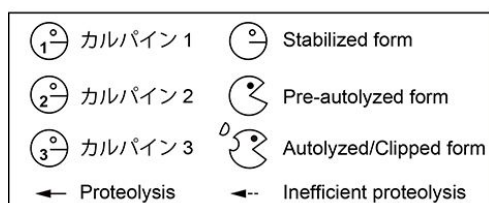
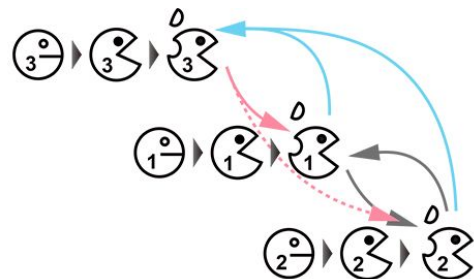


図 1 カルパイン間相互作用のモデル

灰色矢印は従来までの研究で報告されたカルパイン間の相互作用。水色矢印、およびピンク色

矢印が本研究で見出したカルパイン間相互作用。骨格筋細胞質内での  $\text{Ca}^{2+}$  量が極めて低濃度に保たれていること、各カルパインが活性化するために必要な  $\text{Ca}^{2+}$  量はカルパイン 3 カルパイン 1 カルパイン 2 の順に高くなることを考慮すると、通常の骨格筋細胞内ではピンク色矢印の向きにカルパイン間の相互作用が進むと考えられる。水色矢印の作用は骨格筋細胞内カルシウムイオンのホメオスタシスが崩れた場合に起きると考えられる。

<引用文献>

- Y. Ono, et al., *Biochimie*. 2016,122:169-187.  
K. Ojima, et al., *J Clin Invest*. 2010,120:2672-2683.  
K. Kanzaki, et al., *J Muscle Res Cell Motil*. 2014, 35:179-89.  
F. Shinkai-Ouchi, et al., *Biosci Rep*. 2020,40:BSR20200552.  
P. Tompa, et al., *J Biol Chem*.1996, 271:33161-33164  
K. Ojima, et al., *J Biochem*. 2023,174:421-431.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ojima Koichi, Hata Shoji, Shinkai-Ouchi Fumiko, Ono Yasuko, Muroya Susumu	4. 巻 174
2. 論文標題 Calpain-3 not only proteolyzes calpain-1 and -2 but also is a substrate for calpain-1 and -2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 421 ~ 431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ojima Koichi, Hata Shoji, Shinkai-Ouchi Fumiko, Oe Mika, Muroya Susumu, Sorimachi Hiroyuki, Ono Yasuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Developing fluorescence sensor probe to capture activated muscle-specific calpain-3 (CAPN3) in living muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio048975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.048975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koichi Ojima, Shoji Hata, Fumiko Shinkai-Ouchi, Yasuko Ono, Susumu Muroya
2. 発表標題 Reciprocal proteolysis among calpain-1, -2, and -3
3. 学会等名 Cell Bio 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾嶋孝一
2. 発表標題 骨格筋線維の中はどうなっているのか?
3. 学会等名 骨格筋シンポジウム「骨格筋の量と質を制御する分子機構と畜産学への応用」日本畜産学会第131回大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾嶋孝一, 秦勝志, 大内史子, 小野弥子, 室谷進
2. 発表標題 骨格筋特異的に発現するカルパイン3は組織普遍的なカルパイン1および2を基質とする
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾嶋孝一
2. 発表標題 骨格筋萎縮 - タンパク質分解酵素 カルパイン の観点から -
3. 学会等名 日本畜産学会第126回大会 日本畜産学会若手企画委員会主催 ランチョンセミナー みんなで筋肉勉強 -筋肥大と筋萎縮- (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Ojima, S. Hata, F. Shinkai-Uchi, M. Oe, S. Muroya, H. Sorimachi, Y. Ono.
2. 発表標題 FRET-based probes capture muscle-specific calpain-3 (CAPN3) activity in myotubes.
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference, The Biology of Calpains in Health and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾嶋孝一、秦勝志、室谷進、小野弥子
2. 発表標題 組織普遍的に発現するCAPN1はCAPN3を部分切断する
3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾嶋孝一、秦勝志、大内史子、小野弥子、室谷進
2. 発表標題 骨格筋特異的なカルパイン3 は組織普遍的なカルパインと切断酵素 基質の関係をもつ
3. 学会等名 第8回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------