

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16081

研究課題名（和文）ユビキチン結合型カルパインによる細胞接着制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by ubiquitin binding Calpain

研究代表者

野口 あや（NOGUCHI, Aya）

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・研究員

研究者番号：10836688

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：CAPN15はユビキチン結合型カルパインとして知られていたが、ユビキチン結合の意義は明らかにされておらず、基質も同定されていなかった。本研究はCAPN15がユビキチン修飾依存的にE-cadherin/catenin複合体に結合し、E-cadherinを切断することを明らかにした。切断されたE-cadherinはリソソーム分解へと誘導される。このユビキチン-カルパイン分解系はE-cadherinの新規代謝経路であり、細胞表面のE-cadherin/catenin複合体量を適切に保ち、細胞形態の維持に寄与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

本研究では、ユビキチン修飾によるカルパイン基質特異性の制御を提示した。基質認識機構の解明はカルパイン研究分野の重要課題であり、その詳細を明らかにするにあたり本研究の成果が礎となる。また、培養細胞系でCAPN15基質を網羅的かつ特異性高く同定する手法を確立できたため、今後、さまざまな時期、組織におけるCAPN15の機能解析へと発展させることが可能となり、カルパイン研究を一気に飛躍させることができる。基質同定と基質認識機構の解明が進むことで、CAPN15の生理機能全体を理解することができ、将来的には疾患の治療・診断・予防への道筋を立てることも可能になる。

研究成果の概要（英文）：Although CAPN15 was known to be a ubiquitin-binding calpain, the physiological significance of ubiquitin binding remains unclear and the substrate was not identified. In this study, we show that CAPN15 interacts with the E-cadherin/catenin complex in a ubiquitination-dependent manner, and cleaves E-cadherin leading to its lysosomal degradation. This ubiquitin-calpain degradation system is a novel metabolic pathway for E-cadherin and may contribute to the maintenance of cell morphology by maintaining the appropriate amount of E-cadherin/catenin complex on the cell surface.

研究分野：分子生物学

キーワード：カルパイン ユビキチン 細胞接着 タンパク質分解 カドヘリン

1. 研究開始当初の背景

システインプロテアーゼであるカルパインはカルシウム依存的に活性化し、基質タンパク質を特定の場所で切断することで、基質タンパク質の構造や機能、活性、安定性を不可逆的に変換させ下流シグナルを多様化させる。プロテアーゼドメインのC末端側にCBSWドメインとPEFドメインを持つのが典型的なカルパインの構造であるが、15種類の哺乳類カルパインのうち、カルパイン15(CAPN15)は唯一、プロテアーゼドメインのC末端側にSOHドメイン、N末端側にユビキチン結合モチーフNpl4 zinc fingerを5つ含んだNZFドメインを持っている。CAPN15はシヨウジョウバエの視葉形成に重要な分子の一つとして同定され、他のカルパイン分子種とは大きく異なるドメイン構造が注目されてきた。しかし、ユビキチン結合の意義は不明で、基質タンパク質は一つも同定されていなかった。

所属研究室の先行研究において、CAPN15がNZFドメインを介して細胞内でユビキチン化タンパク質と相互作用することが明らかになり、CAPN15がユビキチン化タンパク質を基質としている可能性が浮上した。また、CAPN15ノックアウトHCT116細胞の形態から細胞間接着の亢進が想定され、CAPN15が細胞接着を負に制御すると考えられた。さらに、Capn15のノックアウトマウスの表現型（小眼、無眼、水頭症 etc）から、CAPN15が発生期の脳神経系形成に重要な分子であることが示唆された。しかしながら、その実体は全く知られていなかった。

2. 研究の目的

先行研究とノックアウト細胞の表現型から、CAPN15はユビキチン化タンパク質を基質として切断することで、細胞間接着を負に制御しているというモデルが想定された。そこで本研究ではこの仮説を検証し、CAPN15の機能と制御メカニズムを細胞レベルで明らかにすることを目的とした。また近年、小眼症や眼コロボーマ、小頭症、成長・発達遅延といった脳神経系の異常を引き起こすCAPN15遺伝子の病原性変異が複数報告された。これによって、CAPN15は疾患治療の標的分子として注目されるようになり、生理機能解明の重要性がより一層増している。そこで、細胞レベルでの知見から個体レベルでのCAPN15機能理解へと発展させるために、Capn15ノックアウトマウス解析に着手した。

3. 研究の方法

（1）上皮細胞におけるCAPN15基質同定

CAPN15:WT安定発現HCT116細胞(WTtg)とCAPN15:CS(酵素不活性型)安定発現HCT116細胞(CSTg)、CAPN15:NE(ユビキチン非結合同型)安定発現HCT116細胞(NEtg)それぞれから得たCAPN15共沈降画分をプロテオミクス解析し、CAPN15相互作用タンパク質を同定した。それらの中から、CAPN15:WTに比べてCAPN15:CSとの共沈降量が多く、かつCAPN15:NEとの共沈降量が少ない分子を、ユビキチン修飾依存的にCAPN15と結合する基質候補タンパク質として選び出した。さらに基質候補タンパク質の発現や切断断片について検証し、CAPN15の基質タンパク質を同定した。

（2）新規E-cadherin分解経路

（1）でCAPN15基質として同定したE-cadherinについて、切断部位の同定、切断後の運命、切断される条件などを検討し、E-cadherinの新規分解経路を示した。

（3）ユビキチン修飾依存的な基質切断

ユビキチン非結合同型CAPN15やE1阻害剤を用いた切断アッセイによって、CAPN15によるE-

cadherin 切断にユビキチン修飾が必要か否か検証し、ユビキチン結合の意義を明らかにする。

(4) 個体解析

マウスの上皮組織および発生期胎児の脳における CAPN15 と E-cadherin の発現解析を行った。また、E-cadherin と同じクラシカルカドヘリンに属するいくつかのカドヘリンについても発生期脳での発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 上皮細胞における CAPN15 基質同定

プロテオミクス解析により、71 の CAPN15 相互作用タンパク質の中からは、ユビキチン修飾依存的に CAPN15 と結合する基質候補タンパク質として E-cadherin と α -catenin、 β -catenin を見出した。E-cadherin は α -catenin、 β -catenin と複合体を作り、細胞接着分子として機能する。

これらの接着分子の発現が CAPN15 ノックアウト細胞 (KO) と CStg 細胞、NEtg 細胞では増加し、細胞膜上に蓄積していたことから、CAPN15 がユビキチン結合能依存的に cadherin-catenin 複合体に含まれる基質を切断して細胞接着を負に制御していると推測された。

通常培養の HCT116 細胞では基質候補タンパク質の分解断片は検出されないが、CAPN15 発現量の多い Wt tg 細胞では 90 kDa 付近に E-cadherin の分解断片 (Ecad90) が検出された。そこで *in vitro* 切断アッセイを行ったところ、CAPN15 が E-cadherin を切断することが明らかになった。また、HCT116 に E-cadherin を過剰発現させると Ecad90 が生じた。一方、KO 細胞と CStg 細胞ではこの断片は生じなかったため、Ecad90 は CAPN15 のプロテアーゼ活性によって生成された断片である。E-cadherin 以外の基質候補タンパク質は、過剰発現させても CAPN15 活性依存的な分解断片が生じなかったことから、上皮細胞では cadherin-catenin 複合体のうち E-cadherin が CAPN15 の基質であることが明らかになった。

(2) 新規 E-cadherin 分解経路

削り込み変異体を用いた切断アッセイによって、CAPN15 はクラシカルカドヘリン間で保存性の高い領域で E-cadherin を切断することを明らかにした。この領域で切断された E-cadherin は catenins との結合領域を失う。このような E-cadherin は速やかに除去されるために、通常培養の HCT116 細胞では Ecad90 が検出されないと考えられた。そこで各種プロテアーゼ阻害剤の効果を検討したところ、リソソームを阻害した細胞では Ecad90 が蓄積したため、CAPN15 に切断された E-cadherin はリソソームで分解されることが明らかになった。また、CAPN15 は細胞表面に存在する E-cadherin を切断していること、EDTA 処理による細胞間接着の阻害が CAPN15 の一部を細胞膜へと移動させ、E-cadherin 切断を促進させることを明らかにした。

(3) ユビキチン修飾依存的な基質切断

ユビキチン非結合型 CAPN15:NE は E-cadherin/catenin 複合体と共沈降せず、NEtg 細胞は KO 細胞と同じ形態異常を示した。また、NEtg 細胞では Ecad90 は生じなかった。したがって、CAPN15 による E-cadherin 切断と細胞形態の維持には、CAPN15 のユビキチン結合能が必須である。また、E1 阻害剤によって細胞内のユビキチン化を阻害すると、CAPN15 と E-cadherin/catenin 複合体の相互作用が消失し、Ecad90 は生成されなかった。よって CAPN15 による E-cadherin 切断にはユビキチン修飾が必須であると結論した。

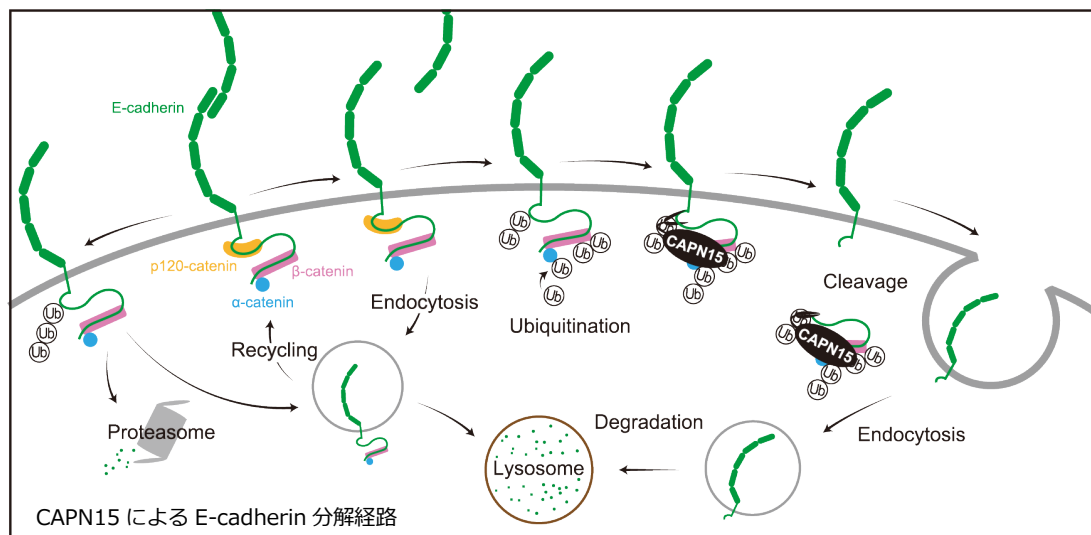
E-cadherin と β -catenin の E3 として報告されている分子についてノックダウン実験を行ったが、Ecad90 の生成に影響はなかった。CAPN15 と E-cadherin を仲介するユビキチン化タンパク質の同定は、今後の課題である。

(4) 個体解析

マウスの胃と大腸における CAPN15 発現を調べたところ、CAPN15 は基質である E-cadherin と同様に、粘膜に発現していた。大腸と胃、皮膚における E-cadherin 発現を野生型マウスと *Capn15* ノックアウトマウスで比較し、CAPN15 欠失が個体の E-cadherin 発現にも影響するか検証した。その結果、*Capn15* ノックアウトマウスの E-cadherin タンパク質発現量は 1.6~2.2 倍であったが、mRNA 発現量では差がなかった。このことから、CAPN15 による E-cadherin 分解メカニズムが上皮組織にはある程度普遍的に存在している可能性が考えられる。

CAPN15 変異によって引き起こされる疾患は、発生期の脳神経系形成の異常が原因と考えられる。胎生 12-18 日の脳神経系では CAPN15 は安定して発現していたことから、この時期には持続的に機能していることが示唆された。同時期に N-cadherin (E-cadherin と同じくクラシカルカドヘリンであり神経細胞に多く発現) の発現を解析したところ、*Capn15* ノックアウトマウスでは増加していることを見出した。この影響で、神経細胞の移動異常が疑われたが、現在までに、野生型と *Capn15* ノックアウトで大腦皮質を構成する神経細胞の移動に差は認められていない。

本研究では、CAPN15 がカルパインで唯一、ユビキチン修飾を基質認識に利用する新規タンパク質分解系であることを示した。上皮細胞では、E-cadherin による細胞間接着が解除されて E-cadherin/catenin 複合体がユビキチン化されると CAPN15 が結合し、E-cadherin を切断する(図)。切断された E-cadherin は速やかにリソソームで分解される(図)。この分解経路は、既知のリソソーム分解とユビキチン-プロテアソーム系とは別の新規 E-cadherin 代謝経路であり、細胞表面の細胞接着分子量を適切に保ち、細胞形態を維持する役割を担うと考えられる。また、CAPN15 による E-cadherin 抑制機構が個体レベルでも機能していたことから、*CAPN15* 遺伝子変異に起因する幅広い病態の一部は、E-cadherin 発現の上昇が原因とも推察される。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 野口あや、秦勝志、土屋光、設楽浩志、田中啓二、佐伯泰、小野弥子
2 . 発表標題 ユビキチン-カルパイン系による細胞接着制御
3 . 学会等名 第95回日本生化学会大会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Noguchi A, Hata S, Doi N, Saeki Y, Tanaka K, Ono Y
2 . 発表標題 Characterization of polyubiquitin binding calpain, CAPN15
3 . 学会等名 The Biology of Calpains in Health and Disease Conference (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 野口あや、秦勝志、土屋光、設楽浩志、田中啓二、佐伯泰、小野弥子
2 . 発表標題 ユビキチン-カルパイン系による新規E-カドヘリン代謝経路
3 . 学会等名 第96回日本生化学会大会
4 . 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 カルパインPJ
<https://www.igakuken.or.jp/calpain/>

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
---------	---------