

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20500369

研究課題名（和文）

骨格筋におけるコネクチンおよびカルパイン p94 を介したシグナル伝達の解析

研究課題名（英文）

Skeletal muscle specific calpain p94 mediated signal transduction system

研究代表者

尾嶋 孝一 (OJIMA KOICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 ・ 畜産草地研究所 ・ 研究員

研究者番号：60415544

研究成果の概要（和文）：

p94は骨格筋特異的に発現するプロテアーゼであり、骨格筋への運動(収縮・伸展)ストレスなどが起きた場合に、これを感知し筋アンキリン反復蛋白質2や熱ショック蛋白質の発現上昇を介して骨格筋細胞の防御反応を引き起こす。この骨格筋への運動刺激に対するp94のシグナル伝達ネットワークが正常に機能するためにはp94のプロテアーゼ活性が必須であり、ない場合は骨格筋が変性・壊死する。

研究成果の概要（英文）：

p94 is predominantly expressed in skeletal muscle and is a member of calpains that are Ca^{2+} -requiring intracellular cysteine proteases. In this study, we revealed that loss of p94 protease activity impaired adaptation to physical stress, accompanied by deficiency in exercise-dependent up-regulation of muscle ankyrin-repeat protein-2 and heat-shock proteins. Furthermore, p94 changes its localization in myocytes depending on sarcomere conditions to mediate signal transduction in response to external stress, and its protease activity maintains myocyte homeostasis, disruption of which leads to muscular dystrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：骨格筋細胞生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経筋肉生理学

キーワード：カルパイン・骨格筋・筋ジストロフィー・タンパク質分解酵素

1. 研究開始当初の背景

骨格筋において最小運動単位であるサルコメアには、アクチンを中心とした細いフィラメントおよびミオシンを中心とした太いフィ

ラメントが存在する。さらに弾性タンパク質であるコネクチンが Z 線と M 線を繋いでいる。このコネクチンに結合する分子の一つである骨格筋特異的カルパイン p94 は Ca^{2+} に制

御されるシステインプロテアーゼである。p94の酵素活性および基質認識の不全が肢帯型筋ジストロフィー2A型の直接原因となることから、p94は骨格筋細胞に必須の機能を果たしていると考えられている。しかし、骨格筋細胞においてp94がどのような機能を担っているのかはほとんど解明されていない。

骨格筋は運動を司る器官のため常に収縮・伸展といった運動刺激を骨格筋細胞が受けている。そのため、従来から収縮・伸展といった物理的な刺激に応答するしくみが存在すると考えられていたが、その詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では骨格筋細胞への物理的な刺激に対するメカノセンサーとしてコネクチン、その刺激に応答する分子としてp94に着目することにより、『骨格筋細胞の伸展刺激→コネクチン分子の伸展→コネクチン結合分子p94への伝達および応答』という、骨格筋細胞での収縮・伸展刺激に応答するシグナル伝達ネットワークの存在を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

p94の酵素活性の有無が骨格筋細胞内に存在するp94の分子動態に与える影響を検討するために、Fluorescence Recovery After Photo bleaching (FRAP; 蛍光退色後回復測定)を用いた。具体的にはGFP-p94WTの発現コンストラクトを野生型マウス骨格筋由来培養筋細胞に発現させ共焦点レーザー顕微鏡にて測定した。同様に酵素活性を持たないGFP-p94CSの発現コンストラクトも酵素活性を持たないp94を野生型p94の代わりに発現する遺伝子改変マウス(以下、p94遺伝子改変マウスと略す)由来の培養骨格筋細胞に遺伝子導入すること

でFRAPの測定を行った。

次に骨格筋線維の収縮・伸展状態に応じたp94のサルコメア内部の局在変化を*in vivo*骨格筋を用いて検討し、p94の酵素活性の有無との関連を検討した。具体的には野生型およびp94遺伝子改変マウスより採取した骨格筋を様々な長さで固定後、p94に対する抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。取得した画像からサルコメアの長さとおよびp94の局在位置の関係を野生型マウスとp94遺伝子改変マウスについて検討した。

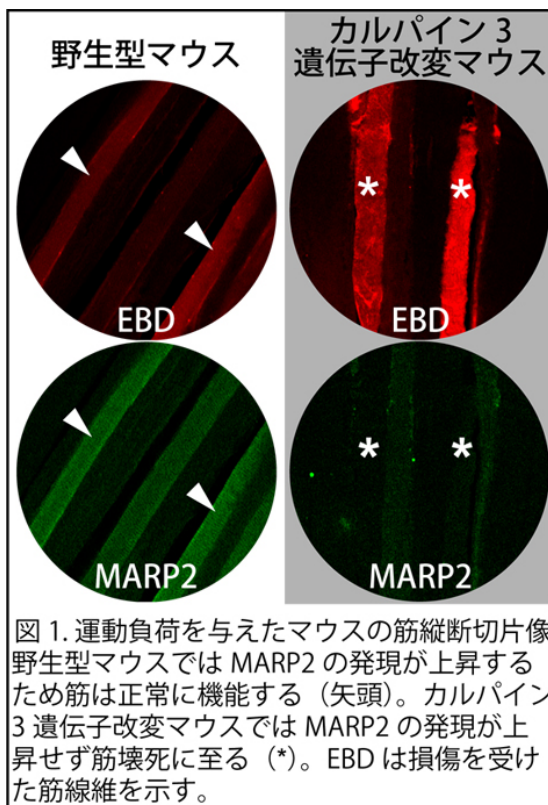
骨格筋の収縮・伸展状態によりp94が局在位置を変化させることから、骨格筋への運動負荷とp94の機能に関連があると考えた。そこで、p94遺伝子改変マウスに運動ストレスを負荷し、骨格筋に与える影響を組織学的、および生化学的に検討した。

4. 研究成果

培養骨格筋細胞に発現させたGFP-p94WT、およびGFP-p94CSはともにサルコメア内においてM線に局在した。FRAP法によりM線に局在するGFP-p94の分子動態を測定した結果、酵素活性を有するp94WTの方が、酵素活性のないp94CSよりも、およそ2倍速く分子交換が起きていることが明らかになった($t_{1/2wt}=66.5\text{sec}$, $t_{1/2cs}=129.0\text{sec}$)。この結果はコネクチンのM線からp94が迅速に解離⇄結合するためにはp94の酵素活性が必要であることを示している。

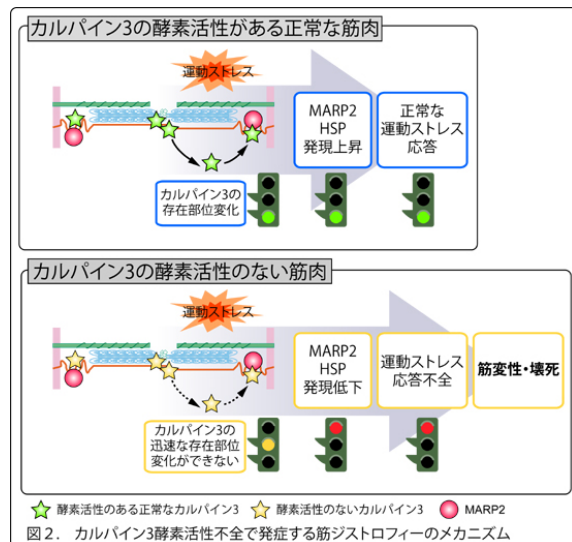
*in vivo*骨格筋線維の収縮・伸展状態に応じたp94のサルコメア内部の局在変化を検討した結果、p94はサルコメアが伸展するに連れて、M線からN2A領域に局在位置を変化させることが明らかとなった。またp94の酵素活性がある方がN2A領域に集積しやすいこと、すなわちp94の酵素活性がある方がサルコメアの伸展状態を感知しやすいことを見出した。

野生型マウス、およびp94遺伝子改変マウスに運動負荷を与えた場合、p94遺伝子改変マウスでは筋線維が変性し壊死した。その原因を探るため、野生型およびp94遺伝子改変マウスへの運動負荷の有無により変動する蛋白質をプロテオミクスの手法を用いて網羅的に同定し、定量的に解析した。その結果、運動負荷を与えたp94遺伝子改変マウスでは、野生型マウスにおいて発現上昇する筋アンキリン反復蛋白質 (MARP2) および熱ショック蛋白質 (HSP)の発現上昇が起きないことが明らかになった。組織学的に検討した結果、MARP2の発現が上昇しない筋線維は壊死することが明らかになった (図1)。



以上の結果から、p94を介した骨格筋細胞への収縮・伸張刺激にตอบสนองするシグナル伝達ネットワークの存在が明らかとなった。しかもこのシグナル伝達にp94の酵素活性が必須であり、酵素活性がない場合はMARP2およびHSPの発現上昇が起こらないため、骨格筋への運

動ストレスに対応できず筋線維が変性・壊死に至ることも明らかとなった (図2)。一連の成果はp94の遺伝子変異で発症する肢帯型筋ジストロフィー2A型の発症機構の一端を示すとともに、発症予防に対する将来的な治療戦略に大きく貢献すると考えられる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① K. Ojima, Y. Ono, C. Ottenheijm, S. Hata, H. Suzuki, H. Granzier and H. Sorimachi. Non-proteolytic functions of calpain-3 in sarcoplasmic reticulum in skeletal muscles. *J. Mol. Biol.* (2011) 407. 439-449. (査読有)

② K. Ojima, Y. Kawabata, H. Nakao, K. Nakao, N. Doi, F. Kitamura, Y. Ono, S. Hata, H. Suzuki, H. Kawahara, J. Bogomolovas, C. Witt, C. Ottenheijm, S. Labeit, H. Granzier, N. Toyama-Sorimachi, M. Sorimachi, K. Suzuki, T. Maeda, K. Abe, A. Aiba and H. Sorimachi. Dynamic distribution of muscle-specific calpain in mice has a key role in physical-stress adaptation and is impaired in muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* (2010) 120. 2672-2683. (査読有)

③Y. Ono, K. Ojima, F. Torii, E. Takaya, N. Doi, K. Nakagawa, S. Hata, K. Abe and H. Sorimachi. Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na⁺-dependent protease. *J. Biol. Chem.* (2010) 285. 22986-22998. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

①K. Ojima, Y. Kawabata, H. Nakao, K. Nakao, N. Doi, F. Kitamura, Y. Ono, S. Hata, H. Kawahara, S. Labeit, N. Toyama-Sorimachi, M. Sorimachi, K. Suzuki, T. Maeda, A. Aiba and H. Sorimachi. 「Dynamic distribution of muscle-specific calpain 3/p94 plays a key role in physical-stress adaptation and its defects by loss of activity cause muscular dystrophy.」 *The Biology of Calpains in Health and Disease. FASEB Summer Research Conference.* (Carefree, AZ, USA) 2010, 7/26 (7/25-30).

②K. Ojima, Y. Kawabata, H. Nakao, K. Nakao, N. Doi, F. Kitamura, Y. Ono, S. Hata, H. Kawahara, S. Labeit, N. Toyama-Sorimachi, M. Sorimachi, T. Maeda, A. Aiba and H. Sorimachi. 「Loss of calpain-3 protease activity impairs its distribution and muscle physical-stress adaption, resulting in muscular dystrophy.」 *The 50th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology.* (Philadelphia, PA, USA) 2010, 12/14 (12/11-15).

③尾嶋孝一, 小野弥子, 土井菜穂子, 北村ふじ子, 秦勝志, S. Labeit, H. Granzier, 千国幸一 and 反町洋之. 「骨格筋特異的カルパインの筋小胞体における機能」 *第 82 回日本生化学会大会* (神戸 (兵庫)) 2009, 10/23(10/21-24).

④K. Ojima, I. Nakajima, M. Oe, M. Shibata, H. Sorimachi and K. Chikuni. 「Quantitative mass spectrometry-based protein profiling of skeletal muscle cell differentiation in vitro.」 *The 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology* (San Diego, CA) 2009,(12/5-9).

⑤尾嶋孝一, 川畑順子, 中尾晴美, 小野弥子, 土井菜穂子, 北村ふじ子, 秦勝志, 川原裕之, C. Witt, S. Labeit, 鈴木紘一, 阿部啓子, 前田達哉, 餐場篤 and 反町洋之. 「骨格筋特異的カルパインは運動負荷による筋損傷をプロテアーゼ活性により防御する」 *第 8 回日本蛋白質科学会* (江戸川区) 2008, 6/11(6/10-12).

⑥K. Ojima and H. Sorimachi. 「Quantitative proteomic analysis of skeletal muscles subjected to exercise.」 *The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology* (San Francisco, CA) 2008, (12/13-17).

[その他]

新聞報道

- ① 朝日新聞 (科学欄) 2010 年 7 月 16 日
- ② 都政新報 (第一面) 2010 年 7 月 9 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾嶋 孝一 (OJIMA KOICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・食肉プロテオーム研究チーム・研究員

研究者番号：6 0 4 1 5 5 4 4