

平成22年 5月 20日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780106

研究課題名（和文） 胃腸特異的カルパインが関わる胃粘膜防御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of gastric mucosal defense mechanisms involving gastrointestinal tract-specific calpains

研究代表者

秦 勝志 (HATA SHOJI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：10392375

研究成果の概要（和文）：カルパインは、Ca²⁺によって活性が制御される細胞内システインプロテアーゼで、基質の限定分解による様々な細胞機能の制御に関わる。本研究期間において、2種類の胃腸特異的カルパイン、カルパイン8とカルパイン9それぞれのノックアウトマウスまたは遺伝子改変マウスの解析を進め、これらが活性複合体を形成し、一体となってストレスに応答した胃粘膜防御に関わることを明らかにした。様々なストレスによる胃疾患が知られているが、そのメカニズムは不明な点も多い。本研究成果は、こういった胃疾患の発症機構や治療・予防法を考える上で手がかりを与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Calpains are Ca²⁺-dependent cytosolic proteases that are indispensable for various cellular processes. Here we show that mice with mutations in the genes for two gastrointestinal tract-specific calpains 8 and 9 are susceptible to stress-induced gastric injury. Moreover, these calpains form a stable complex, in which both molecules are essential for activity. Gastric mucosal integrity depends on a complex defense system that acts in the face of a variety of irritants, including alcohol, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and *Helicobacter pylori*. The continuous or improper ingestion of these irritants often leads to serious gastropathies. Our results might therefore contribute to the development of new therapeutic strategies for human gastropathies induced by irritants.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：カルパイン、胃粘膜損傷、カルシウム

1. 研究開始当初の背景

カルパインは、細胞内においてカルシウムによって活性が制御されるシステインプロテアーゼで、基質を限定分解して、その構造や機能を制御するモジュレーターとして機能する。哺乳類には組織普遍的または特異的に発現するカルパインが存在するが、これらの活性制御不全が脳神経・筋・代謝系など種々の病態の要因になること、組織普遍的に発現するカルパインのノックアウトマウスが胚性致死であることなどから、生理機能は多様であることが明らかになっている。このことは、我々が摂取する食物の消化・吸収や免疫という生体維持の根本を担う胃腸でも例外ではなく、胃ガン発症との関連が示唆されてはいるが、胃腸におけるカルパインの機能は全く明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

我々の胃粘膜は粘液分泌など複雑な防御システムにより外的ストレスから保護されている。その際、胃粘膜の表層を覆うように並ぶ表層粘液分泌細胞が粘膜保護に大きな役割を果たす。我々は以前、2種類のプロテアーゼ、カルパイン8とカルパイン9がこの細胞特異的に存在することを見出していたが、それらの機能は不明であった。本研究は、これら2種類のカルパインの機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)カルパイン8と9それぞれの遺伝子ノックアウトマウス、不活性カルパイン8を発現するノックインマウスを作成し、それぞれのマウスを用いて、アルコール溶液を経口投与し一定時間後の胃粘膜損傷を評価した。

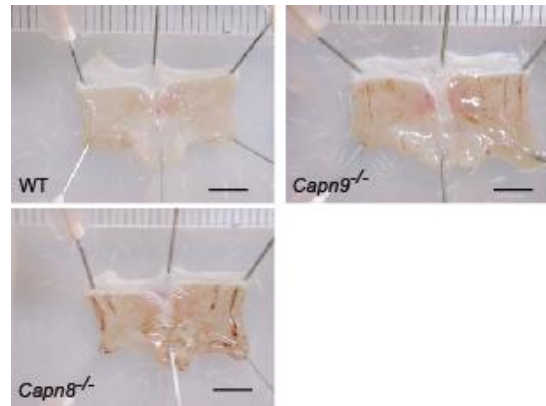
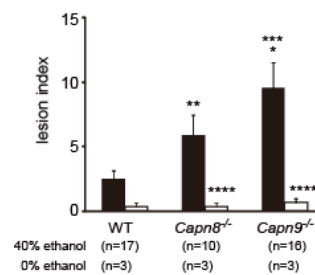
(2)マウス胃粘膜より抽出したタンパク質を用いて、ゲル濾過解析、免疫沈降解析などの生化学的解析を行った。

(3)マウス胃切片の電子顕微鏡観察、免疫染色解析を行った。

4. 研究成果

(1)カルパイン8とカルパイン9それぞれの遺伝子ノックアウトマウスに対し、40%エタノール溶液を経口投与し4時間後に抽出した胃の粘膜損傷を評価したところ、各ノックアウトマウスは、ともに野生型マウスに比べ、有意に胃粘膜に損傷を引き起こしやすいことを明らかにした(図1)。

図1 Capn8KO, Capn9KO



(2)ウエスタンブロット解析により、カルパイン8ノックアウトマウスでカルパイン9が、カルパイン9ノックアウトマウスではカルパイン8が、ダウンレギュレートすることを明らかにした。さらに、免疫沈降解析、ゲル濾過解析などを行い、カルパイン8と9が相互作用し複合体を形成すること、カルパイン8と9が複合体のシャペロンとして複合体が安定化することを明らかにした(図2)。

図2

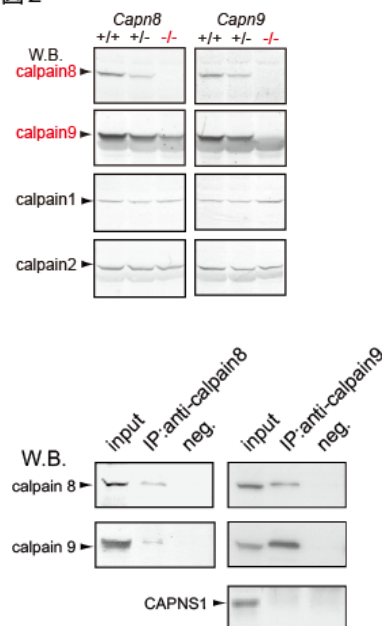
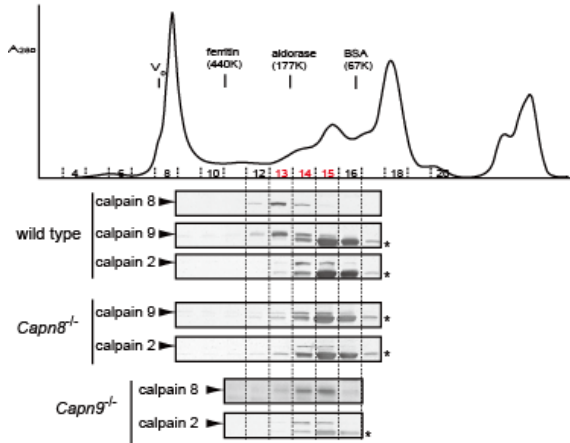
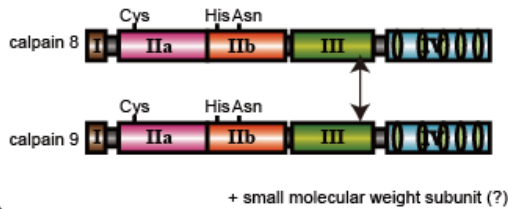


図2 続き

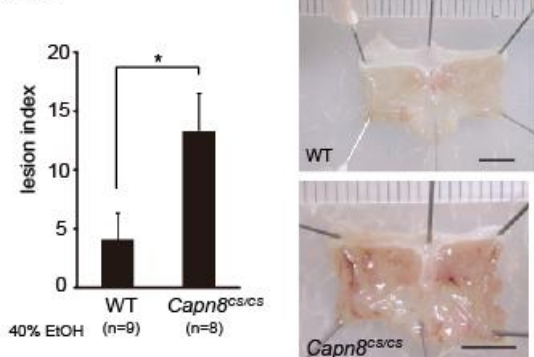


Calpains 8 and 9 form a complex, G-calpain.



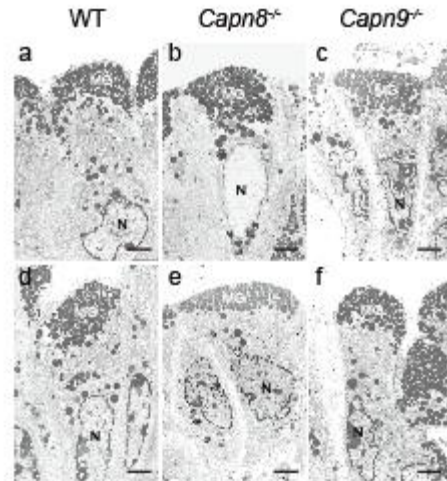
(3) カルパイン8の活性中心を変異させることで不活性カルパイン8を発現するマウスを作成し、(1)と同様にエタノール投与による胃粘膜損傷を評価したところ、ノックアウトマウスと同様に、野生型マウスに比べ有意に胃粘膜損傷を引き起こしやすくなることを明らかにした(図3)。

図3

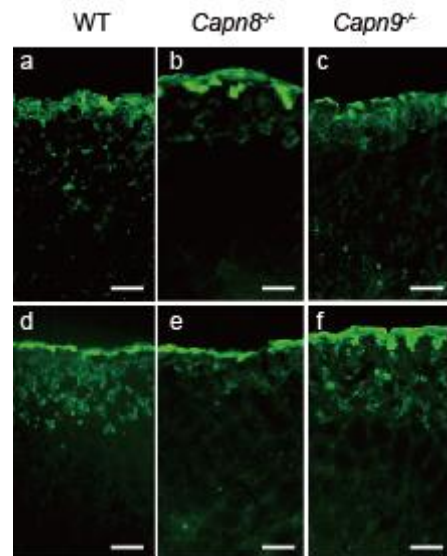


(4) ノックアウトマウスにエタノールを投与した時の、粘液産生・分泌に及ぼす影響を電子顕微鏡観察、免疫染色解析を行ったところ、野生型マウスと比較して有意な差は観察されなかった(図4)。

図4



anti-Mucin-5AC



以上より、カルパイン8とカルパイン9は活性複合体を形成し、一体となって外因ストレスに対する胃粘膜防御に関与することが明らかになった。様々なストレスによる胃疾患が知られているが、そのメカニズムは不明な点も多い。本研究成果は、こういった胃疾患の発症機構や治療・予防法を考える上で手がかりを与えるものである。

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5件)

- ① Hata S, Abe M, Suzuki H, Kitamura F, Toyama-Sorimachi N, Abe K, Sakimura K, Sorimachi H.
Calpain 8/nCL-2 and Calpain 9/nCL-4 constitute an active protease complex, G-calpain, involved in gastric mucosal defense. *PLoS Genet.* (2010) in press. (査読有)
- ② Ojima K, Kawabata Y, Nakao H, Nakao K, Doi N, Kitamura F, Ono Y, Hata S, Suzuki H, Kawahara H, Witt C, Ottenheijm C, Labeit S, Granzier H, Toyama-Sorimachi N, Sorimachi M, Suzuki K, Maeda T, Abe K, Aiba A, Sorimachi H. Dynamic distribution of muscle-specific calpain adapts to physical stress and its defects cause muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* (2010) in press. (査読有)
- ③ Ono Y, Ojima K, Torii F, Takaya E, Doi N, Nakagawa K, Hata S, Abe K, Sorimachi H. Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na⁺-dependent protease. *J. Biol. Chem.* (2010) in press. (査読有)
- ④ Sorimachi H, Hata S, Ono Y.
Expanding members and roles of calpain superfamily and their genetically modified animals. *Exp. Anim.* (2010) in press. (査読有)
- ⑤ Koyama S, Hata S(equally contributed first author), Witt C, Ono Y, Lerche S, Ojima K, Chiba T, Doi N, Kitamura F, Tanaka K, Abe K, Witt S, Rybin V, Gasch A, Franz T, Labeit S, Sorimachi H.

Muscle RING-Finger protein MuRF1 as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *J. Mol. Biol.* (2008) 376, 1224-1236. (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 秦 勝志
二種類の胃腸特異的カルパインの複合体形成と胃粘膜防御への関与 日本生化学会 2009年10月21日~24日、神戸
- ② 秦 勝志 二種類の胃腸特異的カルパインの複合体形成と胃粘膜防御への関与 日本生化学会関東支部会 2009年6月20日、筑波
- ③ 秦 勝志 胃特異的カルパイン nCL-2/calpain 8 の酵素学的解析 日本蛋白質科学会 2008年6月10日~12日、東京

[図書] (計2件)

- ① Sorimachi H., Hata S, Ono Y.
Calpain. *Encyclopedia of Biological Chemistry 2nd Edition*, (Elsevier, Oxford; eds., M.D. Lane and W.J. Lennarz) (2010) in press.
- ② 反町洋之、秦 勝志、小野弥子 「カルパイン」 モデル動物利用マニュアル (木幡裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通 編, (株) LIC) (2010) 印刷中

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
秦 勝志 (HATA SHOJI)
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員
研究者番号: 10392375
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし