

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22700379
 研究課題名（和文） カルパイン系遺伝子改変マウスを用いた神経疾患病理機能の解明
 研究課題名（英文） Analysis of the neuropathological mechanism by using calpain mutant mice
 研究代表者
 高野 二郎（TAKANO JIRO）
 独立行政法人理化学研究所・神経蛋白制御研究チーム・研究員
 研究者番号：60415213

研究成果の概要（和文）：

本研究において、カルパイン-1およびカルパイン-2両欠損マウスにおける運動異常についての研究を行った。神経特異的に超カルパインを欠損させたマウスは、モリス水迷路において運動・視野能力に異常がみられた。また、神経におけるカルパインの基質を同定するために、試験管内でカルパインを活性化させた組織標本を iTRAQ 法による質量分析を用いた探索により、いくつかの機能に関連したカルパイン基質を特定した。しかし、それらの多くは、生体内では顕著なカルパインによる切断がみられなかったことから、現在は細胞にカルシウムを流入させた後に、カルパインの基質探索を行っている。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have analyzed the motor abnormality in calpain-1 and calpain-2 double knockout mice. Neuron-specific deleted knockout showed abnormalities in motor and/or visual capacity in Morris water maze test. Then, we identified several substrates of calpain-1 and calpain-2, which relate the functional abnormalities, by masspectrometric technique and the iTRAQ method. However, some of the substrates were not cleaved so much by calpain. Thus, we are trying to identify calpain substrates in cell culture system using calcium ionophores.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：カルパイン、プロテアーゼ、カルシウムシグナル

1. 研究開始当初の背景

カルパインはカルシウムによって活性化される細胞内プロテアーゼであり、単にタンパク質を消化するのではなく、基質の機能領域を切断することで活性調節や局在変化など新たな機能を付与する情報伝達の働きをもつ。これまでの研究からカルパインが細胞死や細胞運動、分化、記憶形成などの生理的機能に関与し、その過剰な活性化がアルツハイマー病や白内障、筋ジストロフィーなどの重篤な疾患を引き起こすことが示唆されている。しかしながら、その詳細な分子機構については多くが明らかにされていない。

我々の研究グループは、これまでカルパスタチン欠損および脳内過剰発現マウスを作製し解析を行い、カルパスタチンの発現は通常環境下では大きな影響を与えないものの、グルタミン酸誘導体により過剰なカルシウム細胞内流入を引き起こした病理的条件下では、カルパスタチンがカルパイン活性を負に制御し細胞死からの保護作用を確認することができた。

さらにカルパイン-2欠損マウスを作製し、他機関で作製されたカルパイン-1欠損マウスを導入することで、大部分のカルパイン活性を欠損させることに成功した。高濃度のカルパイン阻害剤はプロテアソームやカテプシンを阻害してしまうため、他プロテアーゼの影響を除外することができないため、これまでのところカルパイン欠損マウスは他分子に影響を与えずカルパイン活性のみを低下させることのできる唯一の手段である。

2. 研究の目的

本研究ではカルシウム依存性細胞内プロテアーゼ・カルパインの神経疾患への関与に着目し、1. カルパイン欠損マウスの運動失調の発生機構 2. カルパイン分解系のアルツハイマー病に与える影響 の2点を解析することを目的とした。

カルパインは、多くの神経疾患において重要性が示唆されており、その分子機構を解明することで新たな疾患治療の標的を見出すことが期待される。

3. 研究の方法

運動失調の解析では、 μ -カルパイン全身欠損マウスにCre発現遺伝子を導入したm-カルパイン条件特異的欠損マウスを作製した。神経特異的欠損のためには、Nestinプロモーター、骨格筋に発現する筋クレアチンキナーゼ・プロモーターによりCreを発現させることで、筋原性もしくは神経原性の異常であるかを判定した。

また、アルツハイマー病の解析では所属研

究室で新たに作製した新規アルツハイマー病モデルマウスとカルパスタチン欠損マウスを交配させ、病態の進行を行動解析および免疫組織化学的に調べた。

病態に寄与するカルパインの基質を同定するため、欠損マウス由来の病変組織と野生型由来の健常組織をトリプシン消化し、それぞれ別の質量タグを付加した後に混合して、質量分析計により定量的解析を行った。さらに、その結果を再検討するため、細胞や組織で発現およびカルパインによる切断を確認した。

4. 研究成果

本研究において、カルパイン-1およびカルパイン-2両欠損マウスにおける運動異常についての研究を行った。神経特異的に超カルパインを欠損させたマウスは、モリス水迷路において運動・視野能力に異常がみられた。また、神経におけるカルパインの基質を同定するために、試験管内でカルパインを活性化させた組織標本をiTRAQ法による質量分析を用いた探索により、いくつかの機能に関連したカルパイン基質を特定した。しかし、それらの多くは、生体内では顕著なカルパインによる切断がみられなかったことから、現在は細胞にカルシウムを流入させた後に、カルパインの基質探索を行っている。

また、アルツハイマー病研究ではカルパスタチン欠損マウスとアミロイド β を蓄積するアルツハイマー病モデルマウスとの交配により、アミロイド β 蓄積が促進した。これまでは、カルパインの活性化がアミロイド β 以降のシグナル伝達に関与するものとされてきたが、本研究ではカルパインがアミロイド β の産生にも深く関わることを示唆する結果となった。

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11件)

① Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). Hübener J, Weber JJ, Richter C, Honold L, Weiss A, Murad F, Breuer P, Wüllner U, Bellstedt P, Paquet-Durand F, Takano J, Saïdo TC, Riess O, Nguyen HP. Hum Mol Genet. 2013 Feb 1;22(3):508-18. 査読有

② A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis

pathology.

Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, Saido TC, Kwak S.

Nat Commun. 2012;3:130. 査読有

③ Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor.

Shanab AY, Nakazawa T, Ryu M, Tanaka Y, Himori N, Taguchi K, Yasuda M, Watanabe R, Takano J, Saido T, Minegishi N, Miyata T, Abe T, Yamamoto M.

Neurobiol Dis. 2012 Dec;48(3):556-67. 査読有

④ Calpastatin overexpression limits calpain-mediated proteolysis and behavioral deficits following traumatic brain injury.

Schoch KM, Evans HN, Brelsfoard JM, Madathil SK, Takano J, Saido TC, Saatman KE.

Exp Neurol. 2012 Aug;236(2):371-82. 査読有

⑤ Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology.

Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Takano J, Suemoto T, Maeda J, Ji B, Ono M, Staufenbiel M, Suhara T, Saido TC.

FASEB J. 2012 Mar;26(3):1204-17. 査読有

⑥ Critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death.

Ryu M, Yasuda M, Shi D, Shanab AY, Watanabe R, Himori N, Omodaka K, Yokoyama Y, Takano J, Saido T, Nakazawa T.

J Neurosci Res. 2012 Apr;90(4):802-15. 査読有

⑦ Vital role of the calpain-calpastatin system for placental-integrity-dependent embryonic survival.

Takano J, Mihira N, Fujioka R, Hosoki E, Chishti AH, Saido TC.

Mol Cell Biol. 2011 Oct;31(19):4097-106. 査読有

⑧ Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43.

Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Slegers K, Funamoto S, Mihira N, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata

N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC. Nat Neurosci. 2011 Jul 3;14(8):1023-32. 査読有

⑨ Cleavage of the vesicular GABA transporter under excitotoxic conditions is followed by accumulation of the truncated transporter in nonsynaptic sites.

Gomes JR, Lobo AC, Melo CV, Inácio AR, Takano J, Iwata N, Saido TC, de Almeida LP, Wieloch T, Duarte CB.

J Neurosci. 2011 Mar 23;31(12):4622-35. 査読有

⑩ Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25.

Sato K, Minegishi S, Takano J, Plattner F, Saito T, Asada A, Kawahara H, Iwata N, Saido TC, Hisanaga S.

J Neurochem. 2011 May;117(3):504-15. 査読有

⑪ Nicotinic acetylcholine receptor α 1 promotes calpain-1 activation and macrophage inflammation in hypercholesterolemic nephropathy.

Zhang G, Thomas AL, Marshall AL, Kernan KA, Su Y, Zheng Y, Takano J, Saido TC, Eddy AA. Lab Invest. 2011 Jan;91(1):106-23. 査読有

[学会発表] (計 5件)

① 高野二郎、遺伝子改変マウスから分かったカルパイン-1 とカルパイン-2 の機能
Conference for Biosignal and Medicine、2012年9月1日、三重

② 高野二郎、胎盤発生における細胞内プロテアーゼ・カルパインの生理機能、
名古屋市立大学産科婦人科学学生殖・遺伝セミナー、2012年7月7日、愛知

③ 高野二郎、成体における細胞内プロテアーゼ・カルパインの機能
第2回東北眼科疾患病態研究会、2012年2月28日、宮城。

④ 高野二郎、脳内カルパイン様プロテアーゼの解析
日本生化学会大会 2011年9月23日、京都

⑤ Jiro Takano, Genetic analysis of the calpain-calpastatin system using

calpain-1, calpain-2, and calpastatin knockout mice, FASEB Summer Research Conference, July 28, 2010, Carefree, Arizona

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：アルツハイマー病モデル動物およびその用途

発明者：西道隆臣、岩田修永、斎藤貴志、末元隆寛、高野二郎

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：国内出願

番号：特願 2006-170776

取得年月日：2010 年 6 月 29 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 二郎 (TAKANO JIRO)

独立行政法人理化学研究所・神経蛋白制御研究チーム・研究員

研究者番号：6 0 4 1 5 2 1 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし