

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 6 月 4 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770139

研究課題名（和文） 骨格筋特異的なカルパインシステムの機能と制御機構の解析

研究課題名（英文） Functional aspect of skeletal muscle-specific calpain system

研究代表者

小野 弥子 (ONO YASUKO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：20392376

研究成果の概要（和文）：筋ジストロフィー（LGMD2A）の責任遺伝子産物であるカルパイン3(p94/calpain3)について、活性の発現と抑制に関わる分子機構を解析した。その結果、カルパイン3による基質分解がCa²⁺とNa⁺による2つの活性化機構によって制御されることを明らかにした。また、サルコメア外における新規のカルパイン3安定化因子として、PLEIAD/SIMC1/C5orf25を同定した。

研究成果の概要（英文）：Regulatory mechanism of calpain3 (p94), a responsible gene product for LGMD2A, in skeletal muscle was investigated. It was demonstrated that Na⁺ as well as Ca²⁺ activates calpain3. In addition, a novel protein, PLEIAD/SIMC1/C5orf25, was found to be a potential scaffold for calpain3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：カルパイン・骨格筋・プロテアーゼ・自己消化活性・サルコメア・筋ジストロフィー

1. 研究開始当初の背景

カルパインは、細胞室内において様々な基質タンパク質の機能調節に関わるシステインプロテアーゼファミリーである。骨格筋組織においては、特にカルパイン3(p94/calpain3)の生理機能が注目を集めている。ヒトではカルパイン3のプロテアーゼ活性欠損が筋ジストロフィー(LGMD2A)を引き起こす。その一方、カルパイン3遺伝子改変マウスを用いた研究結果は、カルパイン3が一種の構造タンパク質としても

機能できることを示唆するものであった。そのため診断や治療を視野に入れてLGMD2A発症機構解明を目指す過程において、カルパイン3がプロテアーゼ及び構造タンパク質として機能する分子機構と生理的意義を明らかにすることが重要となってきた。

2. 研究の目的

(1) カルパイン3のプロテアーゼとしての特徴について構造機能相関を明らかにする。

(2) カルパイン3に相互作用するタンパク質を再検討する。

(3) 骨格筋プロテオームにおける、カルパイン3プロテアーゼ活性の位置づけを理解する。

3. 研究の方法

(1) カルパイン3が細胞内プロテオームでは例外的にNa⁺依存的に自己消化することに着目し、カルパイン3の特徴的挿入配列についての変異体を作製、その影響を検討した。

(2) 酵母ツーハイブリッドに加えて、ほ乳類細胞におけるカルパイン3相互作用タンパク質の検索と、得られた相互作用タンパク質の機能解析を行った。

(3) 定量的プロテオーム解析により、Ca²⁺及びNa⁺によって活性化されたカルパイン3が示す基質特異性を検討した。

4. 研究成果

(1) カルパイン3のNa⁺依存性はCa²⁺依存性と相補的であり、カルパインファミリーにおいても他には認められない性質である。また、カルパインのCa²⁺依存性に関与するアミノ酸にカルパイン3特異的挿入配列が作用してNa⁺依存性を生じていることが示唆された。

(2) SIMC1/C5orf25として知られていた機能未知タンパク質が、カルパイン3に結合して自己消化活性を抑制することを見出し、PLEIADと命名した。PLEIADは、主にサルコメア外におけるカルパイン3安定化機構に関わると考えられる。

(3) 筋組織ではCa²⁺とNa⁺によるカルパイン3の活性化機構が、それぞれ異なる基質特異性を実現することが示唆された。これは、プロテアーゼとしての活性化機構のユニークさを示すとともに、構造タンパク質としての機能がどのように実現されるかを今後検討するために重要な知見である。

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15件)

1. Ono, Y., Iemura, S.I., Novak, S. M., Doi, N., Kitamura, F., Natsume, T., Gregorio, C. C., Sorimachi H. PLEIAD/SIMC1/C5orf25, a Novel Autolysis Regulator for a Skeletal-Muscle-Specific Calpain, CAPN3, Scaffolds a CAPN3 Substrate, CTBP1. *J. Mol. Biol.* in press, 2013.

doi: 10.1016/j.jmb.2013.05.009. (査読有)

2. Sorimachi, H., Mamitsuka, H., Ono, Y. Understanding the substrate specificity of conventional calpains. *Biol. Chem.*, 393, 853-871, 2012. doi: 10.1515/hsz-2012-0143. (査読有)
3. Sorimachi, H., Ono, Y. Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc. Res.* 96, 11-22, 2012. doi: 10.1093/cvr/cvs157. (査読有)
4. Sáenz, A., Ono, Y., Sorimachi, H., Goicoechea, M., Leturcq, F., Blázquez, L., García-Bragado, F., Marina, A., Poza, J.J., Azpitarte, M., Doi, N., Urtasun, M., Kaplan, J.C., López de Munain, A. Does the severity of the LGMD2A phenotype in compound heterozygotes depend on the combination of mutations? *Muscle Nerve*, 44, 710-714, 2011. 10.1002/mus.22194. (査読有)
5. Ono, Y., Sorimachi, H. Calpains - an elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta - Proteins and Proteomics*, 1824, 224-236, 2011. 10.1016/j.bbapap.2011.08.005. (査読有)
6. Sorimachi, H., Hata, S., Ono, Y. Calpain chronicle-an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 87, 287-327, 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153876/>, (査読有)
7. Sorimachi, H., Hata, S., Ono, Y. Impact of genetic insights into calpain biology. *J. Biochem*, 150, 23-37, 2011. 10.1093/jb/mvr070. (査読有)
8. DuVerle, D.A., Ono, Y., Sorimachi, H., Mamitsuka, H. Calpain cleavage prediction using multiple kernel learning. *PLoS One* 6, e19035, 2011. 10.1371/journal.pone.0019035. (査読有)
9. Ojima, K., Ono, Y., Ottenheijm, C., Hata, S., Suzuki, H., Granzier, H., Sorimachi, H. Non-proteolytic functions of calpain-3 in sarcoplasmic reticulum in skeletal muscles. *J. Mol. Biol.* 407, 439-449, 2011. 10.1016/j.jmb.2011.01.057. (査読有)
10. 反町洋之, 小野弥子, 肢帯型筋ジストロフィーの発症機構, 「生体の科学」,

- 62-2, 95-99, 2011. (査読無)
11. 小野弥子, 反町洋之, 骨格筋特異的カルパイン-3 の活性制御因子は細胞内 Na⁺~例外か多様性か, 「化学と生物」, 49-4, 229-231, 2011. (査読無)
 12. 反町洋之, 秦勝志, 小野弥子, カルパインの組織機能論, 「実験医学」, 29, 1882-1890, 2011. (査読無)
 13. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. Expanding members and roles of the calpain superfamily and their genetically modified animals. *Exp. Anim.*, 59, 549-566, 2010. https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/59/5/59_5_549/_article, (査読有)
 14. Ojima, K., Kawabata, Y., Nakao, H., Nakao, K., Doi, N., Kitamura, F., Ono, Y., Hata, S., Suzuki, H., Kawahara, H., Bogomolovas, J., 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 in mice has a key role in physical-stress adaptation and is impaired in muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 120, 2672-2683, 2010. doi: 10.1172/JCI40658. (査読有)
 15. Ono, Y.*, Ojima, K.*, Torii, F.* (*: equally contributed first authors), 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.* 285, 22986-22998, 2010. doi: 10.1074/jbc.M110.126946. (査読有)
- [学会発表] (計 16 件)
1. 小野弥子, 田尾あすみ, 北村ふじ子, 反町洋之, 筋特異的カルパイン CAPN3/p94 活性化機構における分子間相補の解析 (Inter-molecular interaction involved in the activation of CAPN3/p94), 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012. 12. 14-16.
 2. Ono, Y., Takaya, E., Doi, N., Kitamura, F., Sorimachi, H. STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIP OF Na⁺-DEPENDENT ACTIVITY OF MUSCLE-SPECIFIC CALPAIN, SPIBC 2012 (第 13 回プロテアーゼおよびその阻害剤と生体制御に関する国際会議) Portoroz, Slovenia, 2012. 9. 23-24.
 3. Ono, Y., Ouchi, F., Kitamura, F., Sorimachi, H. Characterization of sodium-dependent protease activity of muscle-specific calpain, CAPN3. EMC2012 (第 41 回ヨーロッパ筋機能研究学会), Rhodes, Greek, 2012. 9. 1-5.
 4. 小野弥子, 田尾あすみ, 北村ふじ子, 反町洋之, 筋特異的カルパイン CAPN3/p94 の新奇活性化機構の解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 14.
 5. Ono, Y., Sáenz, A., Sorimachi, H., López de Munain, A. Does the severity of the LGMD2A phenotype in compound heterozygotes depend on the combination of mutations? The 7th International Proteolysis Society meeting, San Diego, USA, 2011. 10. 16-21.
 6. Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Sorimachi, H. Autolytic activity of skeletal muscle-specific calpain, CAPN3, diversifies its functions? University of Arizona, CMM, MCB, and CBC joint retreat, Biosphere 2, Tucson, USA, 2011. 9. 17-18.
 7. Ono, Y., Takaya, E., Doi, N., Kitamura, F., Sorimachi, H. Structure-Function relationship of Na⁺-dependent activity of calpain-3/p94. The 17th Symposium on Ca²⁺-Binding Proteins and Ca²⁺ Function in Health and Disease, Beijing, China, 2011. 7. 16-20.
 8. Ono, Y. Functional aspects of unique autolytic activity of CAPN3, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Arizona, Tucson, USA, 2011. 2. 11.
 9. Ono, Y. Structure-function relationship of Na⁺-dependent activity of calpain-3/p94, Korea-Japan symposium on protein metabolism, Seoul National University, Seoul, Korea, 2011. 1. 28.
 10. 小野弥子, 土井奈穂子, 高谷恵美, 北村ふじ子, 反町洋之, Calpain3/p94 自己消化機構の解析, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸, 2010. 12. 7-10.
 11. 小野弥子, Calpain-3/p94 の Na 依存性について, 平成 22 年度科学研究費補助金特定領域研究「タンパク質分解による細胞・個体機能の制御」班会議, 札幌, 2010. 11. 16-18.
 12. Ono, Y., Ojima, K., Torii, F., Takaya, E., Doi, N., Nakagawa, K., Hata, S., Abe, K., Sorimachi, H. Redundant and non-redundant effects of Ca²⁺ and Na⁺ on the activation of p94/calpain 3.

The 15th International Congress of the World Muscle Society, Kumamoto, Japan, 2010.10.12-16.

13. Ono, Y. Functions of calpain-3/p94 indicated by its unique properties. CHUV (Le Centre Hospitalier Universitaire Vaudois) Special Seminar, Lausanne, Switzerland, 2010.10.01.
14. Ono, Y., Ojima, K., Torii, F., Takaya, E., Doi, N., Nakagawa, K., Hata, S., Abe, K., Sorimachi, H. Skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain-3, is an intracellular Na⁺-dependent protease. XIIth Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portoroz, Slovenia. 2010.09.25-29.
15. Ono, Y., Ojima, K., Torii, F., Takaya, E., Doi, N., Nakagawa, K., Hata, S., Abe, K., and Sorimachi, H. Characteristics of p94/calpain-3 as an intracellular Na⁺-dependent protease. FASEB Summer Research Conferences - Biology of the calpains in Health and Disease, Carefree, AZ, USA, 2010.7.28.
16. 小野弥子, 土井奈穂子, 高谷恵美, 北村ふじ子, 反町洋之, p94/calpain3 自己消化機構の解析, Inter/Intra molecular interaction involved in the autocatalytic proteolysis of p94/calpain 3, 第10回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2010.6.16-18.

[図書] (計3件)

1. Sorimachi, H., Hata, S., Ono, Y. Chapter 471: μ -calpain, Chapter 472: m-calpain, Chapter 473: Muscle calpain, Chapter 474: Gastrointestinal calpain, Chapter 476: Other calpains. in: Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd Edition. N. D. Rawlings, G. Salvesen, editors. Elsevier Academic Press (Oxford), 1995-2022, 2027-2038, 2013. 全3932ページ.
2. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. Calpain. In "Encyclopedia of Biological Chemistry 2nd Edition" (Elsevier, Oxford; eds., M. D. Lane and W. J. Lennarz), 2013. 全3232ページ.
3. 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…<生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール>… (株式会社 LIC; 小幡

裕一, 城石俊彦, 芹川忠夫, 田中啓二, 米川博通 編), 232-248, 2011. 全671ページ.

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/calpain/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 弥子 (ONO YASUKO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号: 20392376

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし