

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500477

研究課題名(和文) 骨格筋細胞内で活性化したカルパイン3のリアルタイム検出システムの開発

研究課題名(英文) Developing sensor-proteins to detect CAPN3 protease activity

## 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 畜産物研究領域・主任研究員

研究者番号：60415544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用することで、骨格筋特異的に発現するタンパク質分解酵素であるカルパイン3の活性をモニターするセンサータンパク質の作出を試みた。センサータンパク質自体は細胞内で発現し、効率よくFRETを起こした。また、センサータンパク質のカルパイン3による切断もイムノブロットにより確認できた。しかし、生きた細胞内ではカルパイン3による切断を検出することは困難であった。一方、カルパイン3はリン酸化により酵素活性制御を受けていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Calpain-3 (CAPN3) is predominantly expressed in skeletal muscle and is Ca<sup>2+</sup>-requiring intracellular cysteine protease. In this study, we made sensor-proteins to detect CAPN3 protease activity using a fluorescence resonance energy transfer technique and examined whether CAPN3 protease activity was controlled by phosphorylation. Unfortunately, it was very tough to detect protease activity of CAPN3 in living muscle cells although sensor-proteins were expressed well and were cleaved by CAPN3 in vitro experiments. On the other hand, we showed that rapid and exhaustive autolysis of CAPN3 was slightly attenuated by the defect of phosphorylation of Ser residue at 629 of CAPN3.

研究分野：骨格筋

キーワード：骨格筋 カルパイン

## 1. 研究開始当初の背景

カルパインは細胞質内に存在し、Ca<sup>2+</sup>に制御されるタンパク質分解酵素である。消化酵素などとは異なり、基質を限定的に切断し、その基質の構造を変換することで、新たな機能を付加するタンパク質切断酵素である。骨格筋には組織特異的に発現するカルパイン 3 が存在する。このカルパイン 3 の遺伝子変異が原因で、骨格筋萎縮・変性・壊死が年齢と共に進行する肢帯型筋ジストロフィー 2A 型 (LGMD2A) を発症することから、骨格筋細胞には必要不可欠のタンパク質切断酵素である。

研究代表者らはカルパイン 3 の酵素活性を欠損させたカルパイン 3 を野生型カルパイン 3 の代わりに発現する点変異遺伝子改変マウスを作成・解析することで、カルパイン 3 の生理的な意義、および LGMD2A の発症機序を追究した。その結果、研究代表者らが作出した遺伝子改変マウスは筋ジストロフィー特有の症状を呈し、加齢によりその症状が重篤化した。しかも、このマウスに運動負荷を加えると骨格筋の変性・壊死が進行することから、カルパイン 3 の酵素活性は骨格筋が正常に機能するためだけでなく、運動ストレスに対する骨格筋の防御機構にも必須であることを明らかにした。これより以前に研究代表者らは、カルパイン 3 の筋線維サルコメア内での存在部位を特定し、カルパイン 3 の局在部位が骨格筋細胞の収縮・伸展に応じて変化することを示した。しかも局在変化にはカルパイン 3 の酵素活性が関与していたことから、カルパイン 3 にはサルコメア長を感知するセンサー機能があることを提唱した。

これら一連の結果は、骨格筋の運動 (収縮・伸展) 刺激に対して、骨格筋線維/細胞が正常に応答するためにはカルパイン 3 の酵素活性が必須であることを示している。

しかし、活性化したカルパイン 3 は細胞内のどの部位で活性化し、何の基質に対して酵

素活性を發揮しているのか、またどのような翻訳後修飾によりカルパイン 3 の酵素活性が調節されているのかなど、未だに不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

従来までは活性化したカルパイン 3 を検出するには、骨格筋組織あるいは培養筋細胞をすり潰し、抗体を用いたイムノブロット法しかなかったため、活性化しているカルパイン 3 の骨格筋細胞内における位置情報の取得には限界があった。そこで本研究では、*in vitro* および骨格筋細胞においてカルパイン 3 の酵素活性をモニターする系を構築するために蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)) を利用する。*in vitro* および培養骨格筋細胞において、活性化したカルパイン 3 をリアルタイムで検出する系を構築するとともに、カルパイン 3 の翻訳後修飾に着目し酵素活性制御機構の一端を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) FRET システムを利用した活性化カルパイン 3 の検出システムの構築および最適化

FRET を利用したセンサータンパク質は、蛍光タンパク質である CFP と YFP の間に *in vitro* でのカルパイン 3 の基質であるカルパスタチンの部分アミノ酸配列を挿入することで設計する。すなわち、カルパイン 3 が認識配列を切断した時に、CFP と YFP が解離し蛍光波長が変化することでカルパイン 3 の活性化を検知するしくみである。

FRET センサータンパク質の発現コンストラクトを作成し、HEK 細胞に遺伝子導入する。この細胞を試料として蛍光分光計にて FRET が起きるのかを検討する。FRET 効率が高い FRET センサータンパク質を設計するために、CFP と YFP の間に挿入するカルパスタチンの部分配列の長さを変えたコンストラクト

をいくつか作成する。さらに、FRET センサータンパク質の発現コンストラクトと共にカルパイン 3 のコンストラクトも、HEK 細胞に遺伝子導入し、HEK 細胞内で FRET センサータンパク質の切断が起きるのか検証する。

#### (2) 骨格筋細胞において活性化したカルパイン 3 の検出

野生型マウス由来の初代培養筋細胞に作成した FRET センサータンパク質のコンストラクトを導入後、イオノフォア等で処理し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させることで、カルパイン 3 を活性化させる。蛍光波長の変調を確認することで活性化したカルパイン 3 を捉える。対照としてカルパイン 3 の酵素機能不全の遺伝子改変マウス由来の培養骨格筋細胞を用い同様の実験をし、野生型マウスでは FRET の解消が起きるが、遺伝子改変マウスでは起きないことを検討する。

#### (3) カルパイン 3 の酵素活性制御機構の解明

カルパイン 3 は極めて自己消化活性が高いことが知られているが、このメカニズムは明らかになっていない。カルパイン 3 のリン酸化修飾によりカルパイン 3 酵素活性が調節されている可能性を精査するために、カルパイン 3 の組み換えタンパク質を粗精製し、リン酸化タンパク質の認識試薬である ProQ で染色する。カルパイン 3 のリン酸化を受けるアミノ酸残基をクロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせることで同定する。リン酸化を受けるアミノ酸残基の酵素活性への影響を評価するために、アミノ酸残基を置換したカルパイン 3 の変異体を作成する。その後、COS 細胞等にカルパイン 3 変異体を発現するコンストラクトを導入し、酵素活性をイムノプロット等により評価する。

## 4. 研究成果

### (1) FRET システムを利用した活性化カルパイン 3 の検出システムの構築および最適化

カルパイン 3 が認識配列を切断した時に、CFP と YFP が解離し蛍光波長が確実に変化するように設計することが最も困難な点であり、時間がかかった。しかし、この問題は CFP と YFP の間に挿入するカルパスタチンの配列、およびその長さを調節することで解決できた。FRET センサータンパク質の発現コンストラクトを導入した HEK 細胞を試料とし、蛍光分光計にて測定すると極めて良好に FRET が起きていることが観察された。

さらにカルパイン 3 のコンストラクトも、HEK 細胞に遺伝子導入し、HEK 細胞内で FRET センサータンパク質の切断が起きるのかを検証した。細胞を試料としてイムノプロットした結果、FRET センサータンパク質がカルパイン 3 により切断されていることは確認できた。

### (2) 骨格筋細胞において活性化したカルパイン 3 の検出

培養骨格筋細胞に作成した FRET センサーコンストラクトを導入した結果、骨格筋細胞質内で一様に発現した。この骨格筋細胞をイオノフォア処理し、カルパイン 3 を活性化させ、そのとき FRET センサータンパク質の蛍光波長変化の検出を行った。しかし、FRET センサータンパク質の蛍光波長変化は検出できなかった。そこで、限局的に起きるカルパイン 3 の活性化を検出するために感度を上げる工夫をした。すなわち、カルパイン 3 が局在する部位に移行するためのシグナル配列を発現コンストラクトに付加し、骨格筋細胞内で FRET センサータンパク質がカルパイン 3 の局在部位に集積するようにした。その結果、骨格筋細胞内に発現させた FRET センサータンパク質はサルコメア内でのカルパイン 3 の局在部位である Z 線、および M 線に局在した。新規に作成した FRET センサータンパク質を導入した培養骨格筋細胞を用い、イオノフォア処理することでカルパイン 3 の活性化を図り、FRET センサータンパク質

の蛍光波長変化の検出を行った。しかし、イオノフォア処理により活性化するカルパイン3が少ないためか、大きな蛍光波長変化を観察することはできなかった。

### (3) カルパイン3の酵素活性制御機構の解明

カルパイン3の組み換えタンパク質を粗精製し、リン酸化タンパク質の認識試薬であるProQで染色結果、カルパイン3がProQに反応し、リン酸化を受けていることが判明した。クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせることで、リン酸化を受けるアミノ酸残基を同定した。629および636番目のSer残基がリン酸化を受けるが、主要なリン酸化部位は629番目のSer残基であった。Ser629はカルパイン3の酵素活性に必須であるドメインに存在するため、カルパイン3の酵素活性とリン酸化の影響を精査した。すなわち、リン酸化を受けるSer629をAlaに置換したリン酸化を受けない変異体を作製し、自己消化活性を指標として、カルパイン3の酵素活性を評価した。その結果、リン酸化を受けない変異体では酵素活性がわずかに減弱していることが明らかになった。これらの結果はリン酸化の有無によりカルパイン3の酵素活性が調節されていることを示している。

## 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 1件)

1. Ojima K, Ono Y, Hata S, Noguchi S, Nishino I, and Sorimachi H. Muscle-specific calpain-3 is phosphorylated in its unique insertion region for enrichment in a myofibril fraction. *Genes to Cells* 19: 830-841, 2014. DOI: 10.1111/gtc.12181

査読有

[学会発表](計 6件)

1. 尾嶋孝一. カルパイン3-タンパク質分解酵素の活性不全による骨格筋変性. 第157回日本獣医学会学術集会【日本獣医解剖学会シンポジウム】「細胞形態ダイナミクスをリードする分子群を求めて」, 北海道・札幌市. 2014.9/10.
2. Ojima K, Ono Y, Hata S, Mika O, Nakajima I, Muroya S, Chikuni K, and Sorimachi H. Effects of phosphorylation of muscle-specific calpain-3 on its proteolytic activity. 2013 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, New Orleans, LA, USA, 2013.12/17.
3. Ojima K, Ono Y, Hata S, Mika O, Nakajima I, Muroya S, Chikuni K, and Sorimachi H. Identification of phosphorylation sites of muscle-specific calpain-3. FASEB Science Research Conferences, The Biology of Calpains in Health and Disease, Saxton River, VT, USA. 2013.7/21-26.
4. Sorimachi H, Tonami K, Shinkai-Ouchi F, Hata S, Ojima K, and Ono Y. Extended concept for calpain "activity" - non-proteolytic functions of unconventional calpains -. FASEB Science Research Conferences, The Biology of Calpains in Health and Disease, Saxton River, VT, USA. 2013.7/21-26.
5. 尾嶋孝一, 小野弥子, 秦勝志, 大江美香, 中島郁世, 千国幸一, 室谷進, 反町洋之. カルパイン3のリン酸化が酵素活性に与える影響. 日本畜産学会第117回大会. 新潟県・新潟市. 2013.9/12.
6. 尾嶋孝一, 小野弥子, 中島郁世, 大江美香, 室谷進, 反町洋之. 骨格筋特異的に発現するカルパイン3はNa<sup>+</sup>により活性化する. 日本畜産学会第115回大会. 愛知県・名古屋市. 2012.3/29.

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・畜産草地研究所畜産物研究領域・主任研究員

研究者番号：60415544

(2) 連携研究者

秦 勝志 (HATA, Shoji)

(財) 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主席研究員

研究者番号：10392375

小野 弥子 (ONO, Yasuko)

(財) 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主席研究員

研究者番号：20392376