

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780152

研究課題名(和文)カルパインの制御異常による胃粘膜損傷の発生機構に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of gastric mucosal damage by aberrant regulation of calpain

研究代表者

秦 勝志 (HATA, Shoji)

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：10392375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：常に外界(異物)に曝される胃腸粘膜には、複雑かつ様々な防御システムが備わっている。胃腸粘膜上皮の粘液分泌細胞に特異的に発現する細胞内プロテアーゼ、カルパイン8(CAPN8)とカルパイン9(CAPN9)は、複合体G-カルパインを形成して、外的ストレスに应答して作動する胃粘膜防御システムに働く。本研究では、CAPN8とCAPN9が複合体を形成する意義を明らかにすると共に、G-カルパインが粘液分泌細胞の移動を制御することで粘膜防御に関わる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：There are various, complex defense systems in gastrointestinal mucosae exposed usually by external stresses. Calpain-8 (CAPN8) and calpain-9(CAPN9), intracellular Ca²⁺-dependent proteases specifically expressed in mucus-secreting cells in gastrointestinal epithelia, form a complex named G-calpain, and are involved in gastric mucosal defense induced by external stresses. This study identified the significance of the complex formation by CAPN8 and CAPN9, and suggested that G-calpain is involved in mucosal defense via regulation of migration of the mucus-secreting cells.

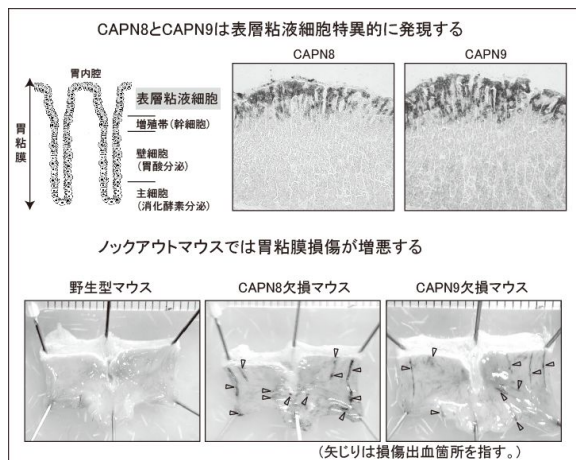
研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：食品生化学

キーワード：カルパイン 胃粘膜防御

1. 研究開始当初の背景

カルパインは、Ca²⁺によって活性制御される細胞内システインプロテアーゼであり、哺乳類には様々な発現様式を示す15種類のアイソザイムが存在する。これらは、基質の限定分解による機能調節を通じて様々な生体機能に関わると考えられているが、生理機能や関連病態が明確になっているのは、ごく一部であった。研究代表者は、全く機能が分かっていなかったCAPN8とCAPN9の解析を進め、両アイソザイムが共に胃粘膜上皮の表層粘液細胞に特異的に発現することを見出した(Hata S, *et al.* (2006) J. Biol. Chem.)。また、各々のノックアウトマウスの解析から、CAPN8とCAPN9が複合体G-カルパインを形成していることと、ストレス作動性胃粘膜防御に関わることを明らかにした(Hata S, *et al.* (2010) PLoS Genet) (下図)。



2. 研究の目的

本研究は、(1)CAPN8とCAPN9が複合体を形成する意義とメカニズム、(2)CAPN8とCAPN9が関わる胃粘膜防御の分子機序と、ストレス依存性について、(3)CAPN8とCAPN9のヒト遺伝子中の一塩基多型(SNP)とプロテアーゼ活性及び胃疾患との相関について、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

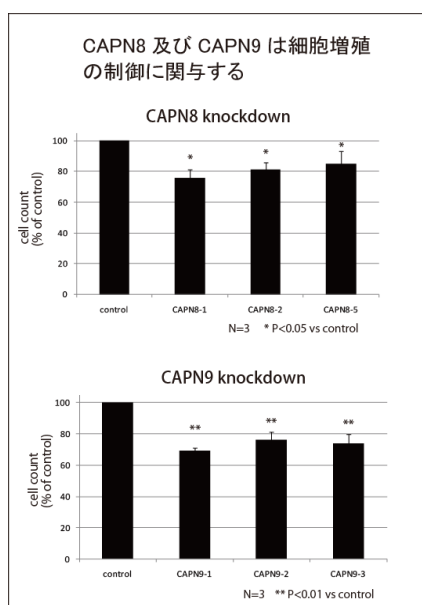
上記(1)では、CAPN8とCAPN9それぞれの欠失または点変異体を作成し、小麦胚芽無

細胞系または培養細胞発現系によってリコンビナント蛋白質を産生し、これらのプロテアーゼ活性や相互作用を検討した。上記(2)の分子機序解析では、CAPN8またはCAPN9をRNAiによってノックダウンさせた培養細胞を用いて機能解析を行った。また、ストレス依存性については、ヘリコバクター・ピロリをノックアウトマウスに経口投与させ、胃粘膜の炎症を評価した。上記(3)では、データベースで報告されている、ヒトCAPN8とCAPN9のSNPに基づき、これらSNPを有する変異体をリコンビナント蛋白質として培養細胞内で産生し、そのプロテアーゼ活性を評価した。

4. 研究成果

(1)変異体解析により、CAPN8とCAPN9の相互作用には、それぞれのN末端及びC末端が必要であることを見出した。さらに、相互作用することで、CAPN8がプロテアーゼ活性の主体として、CAPN9が複合体のシャペロンとして機能することを明らかにした(論文準備中)。

(2)表層粘液細胞は代謝回転が速い細胞であり、粘膜表層から脱落すると、細胞増殖帯から粘膜表層への速やかな移動によって補充される。すなわち、この細胞の運動能の欠陥は、損傷した粘膜の修復に大きな影響を及ぼすことから、CAPN8/9が細胞運動に関与する可能性を調べた。ヒト結腸ガン細胞株HT-29を用いて、CAPN8またはCAPN9をノックダウンしたところ、ノックダウン株はコントロール株に比べて20%程度細胞増殖が遅延することを見出した(下図)。現在さらなる表現型を調べているところである。



(3) ヒトでは CAPN8 と CAPN9 の各遺伝子上に SNP が十数種ずつ存在することがデータベース上で報告されている。これらの多型がプロテアーゼ活性に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。その結果、CAPN8 では 1 種類、CAPN9 では 6 種類の SNPs が、プロテアーゼ活性の減弱・消失をもたらすことを見出した。ヒト胃疾患生検の CAPN8 及び CAPN9 遺伝子解析とタンパク質レベルの解析が今後の課題である。

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 9 件)

- Hata S (Corresponding author), Kitamura F, Sorimachi H.
Efficient expression and purification of recombinant human μ -calpain using an *Escherichia coli* expression system.
Genes Cells (2013) 18, 753-763. (査読有)
- Tonami K, Hata S, Ojima K, Ono Y, Kurihara Y, Amano T, Sato T, Kawamura Y, Kurihara H, Sorimachi H.
Calpain-6 deficiency promotes skeletal muscle development and regeneration.
PLoS Genet. (2013) 9, e1003668. (査読有)
- Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T,

Sorimachi H, Hata S, Tomita H, Isago H, Baba A, Ishiguro S. Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa.

Biochim. Biophys. Acta (2012) 1822, 1783-1795. (査読有)

- Hata S (Corresponding author), Ueno M, Kitamura F, Sorimachi H.

High efficient expression and purification of recombinant human m-calpain using *Escherichia coli* expression system at low temperature.

J. Biochem. (2012) **151**, 417-422. (査読有)

- 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. (2011) **407**, 439-449. (査読有)

- Sorimachi H, Hata S, Ono Y.

Impact of genetic insights into calpain biology.

J. Biochem. (2011) **150**, 23-37. (査読無)

- Sorimachi H, Hata S, Ono Y.

Structure-function relationships of calpains: from CANP to CAPN.

Proc. Jpn. Acad. Ser. B, (2011) **87**, 287-327. (査読有)

- 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(増刊) (2011) **29**, 1882-1890. (査読無)

- 秦 勝志、反町洋之

胃粘膜防御に果たすカルパインの役割

日本臨床 (2011) **69**, 1116-1122. (査読無)

[学会発表](計 5 件)

- G-calpain is a heterodimer of CAPN8 and CAPN9 playing catalytic and regulatory

roles, respectively.

Shoji Hata, Fujiko Kitamura, Hiroyuki

Sorimachi

The 8th general meeting of International
Proteolysis Society 南アフリカ(ケープタ
ウン) 2013 年 10 月発表

2. (題名)胃腸特異的 G-カルパインの分子構造-機能解析

秦 勝志、北村ふじ子、反町洋之

第 86 回 日本生化学会 横浜 2013 年
9 月発表

3. G-calpain is a heterodimer of CAPN8 and
CAPN9, which mainly play catalytic and
regulatory roles, respectively.

Shoji Hata, Fujiko Kitamura, Hiroyuki

Sorimachi

2013 FASEB Summer Research
Conferences アメリカ (バーモント州)
2013 年 7 月発表

4. (題名)胃腸特異的カルパイン複合体・G-
カルパインの酵素学的解析

秦 勝志、北村ふじ子、反町洋之

第 85 回 日本生化学会 福岡 2012 年
12 月発表

5. (題名)胃粘膜防御に關与する細胞内ブ
ロテアーゼ複合体 G-カルパインの解析

秦 勝志、上野美佳、松下 剛、北村ふじ
子、反町洋之

第 84 回 日本生化学会 京都 2011 年
9 月発表

〔図書〕(計 7 件)

1. Sorimachi H, **Hata S**, Ono Y
‘Calpain.’
In *Encyclopedia of Biological Chemistry, 2nd
Edition* (Elsevier Academic Press; eds,
Lennarz W, and Lane M), (2013) p300-306.
2. Sorimachi H, **Hata S**, Ono Y.
‘Chapter 454. μ -calpain.’
In *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd
Edition* (Elsevier Academic Press; eds,

Rawlings ND, and Salvesen G), (2012)
p1995-2007.

3. Sorimachi H, **Hata S**, Ono Y.
‘Chapter 455. m-calpain.’
In *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd
Edition* (Elsevier Academic Press; eds,
Rawlings ND, and Salvesen G), (2012)
p2007-2011.
4. Sorimachi H, **Hata S**, Ono Y.
‘Chapter 456. muscle calpain.’
In *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd
Edition* (Elsevier Academic Press; eds,
Rawlings ND, and Salvesen G), (2012)
p2012-2018.
5. Sorimachi H, Ono Y, **Hata S**
‘Chapter 457. gastrointestinal calpain.’
In *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd
Edition* (Elsevier Academic Press; eds,
Rawlings ND, and Salvesen G), (2012)
p2018-2022.
6. Sorimachi H, **Hata S**, Ono Y.
‘Chapter 459. other calpains.’
In *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd
Edition* (Elsevier Academic Press; eds,
Rawlings ND, and Salvesen G), (2012)
p2027-2038.
7. 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)(2011) 232-248.

〔その他〕

1. 日本生化学会 JB/OUP ポスター賞受賞
2012 年 12 月
6. 研究組織
(1)研究代表者
秦 勝志 (HATA, Shoji)
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：10392375