

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440059

研究課題名(和文)カルパイン7が生物の環境適応で果たす役割、特に新生仔生存を支える分子機構の解明

研究課題名(英文)The role of CAPN7 in the adaptation to environmental change

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・副参事研究員

研究者番号：20392376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：カルパインは、ほぼすべての真核生物で保存されている細胞内システインプロテアーゼの一種である。ヒトでは15の遺伝子から構成されるスーパーファミリーとして存在する。その中で、カルパイン7は唯一、酵母からヒトに至るまで保存されている。カルパイン7のホモノックアウトマウスは、一見正常に出生するが生後約一日で死亡するという興味深い表現型を示す。そこで、カルパイン7の機能は出生後の環境適応に重要であるという視点から研究を行い、生理機能の解明を目標とした。本研究期間においては、致死性の完全な回避にはプロテアーゼ活性が必要であるが、非プロテアーゼとしての機能も考慮する必要があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Calpain is an intracellular calcium-requiring cysteine protease, functioning to modulate substrate structure and activity by limited proteolysis. The human genome contains 15 different calpain genes. Among them, CAPN7 (previously called PalBH or calpain-7) is most evolutionarily conserved. In the organisms such as yeast and fungi, CAPN7 homologue functions as an activator for a critical transcription factor in adaptation to an increase of environmental pH. To extend our knowledge about this diversely conserved calpain species, this study aimed to examine the role of CAPN7 in higher vertebrates using genetically modified mouse and cultured cells. In mouse, homozygous knock-out of the Capn7 gene in C57/B6J background results in neonatal lethality. The primary cause of this phenotype still remains unclear; however, it was demonstrated that CAPN7 protease activity is required for the rescue of this phenotype. Potential function of Capn7 by its structure was also suggested.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：カルパイン プロテアーゼ タンパク質相互作用 致死性

1. 研究開始当初の背景

カルパインは、ほぼすべての真核生物で保存されている細胞内システインプロテアーゼの一種である。ヒトでは 15 の遺伝子から構成されるスーパーファミリーとして存在する。カルパインによって触媒されるタンパク質分解反応の特徴は、限定的に基質タンパク質のドメイン構造に対応するかのようには分解するという点である。その結果、基質タンパク質の機能が修飾され、新たな役割を果たす可能性が与えられる。このため、カルパインは、分解によってシグナル伝達を担う分子として研究されてきた (Sorimachi *et al.*, 2012, *Cardiovasc. Res.*, 96, 11-22)。

カルパインが進化の過程で保存されており、細胞の生存に必須なシグナル伝達を担うことを端的に示したのは、出芽酵母および糸状菌のカルパイン、Rim13/Cpl1 および PalB、についての研究である。これらの生物が外部環境のアルカリ化に適応するためには、カギとなる転写因子がカルパインホモログによる限定分解を受けて活性化することが必須である (Futai *et al.*, 1999, *Mol. Gen. Genet.*, 260, 559-68; Hayashi *et al.*, 2005, *Mol. Cell Biol.*, 25, 9478-90)。一連のシグナル伝達系に関わる遺伝子群は、その多くが高等生物に至るまでよく保存されているが、ほ乳類細胞にアルカリ環境下への適応機構の存在は見出されていない点が障壁であった。しかし、Rim13/Cpl1 および PalB に相当する分子としてカルパイン 7 が存在すること、さらに、カルパイン 7 と相互作用する分子に着目した解析の結果、高等生物でもカルパイン 7 の作用機構が保存されていることが注目されるようになった。

2. 研究の目的

高等生物 (ほ乳類) カルパイン 7 は組織普遍的に発現しており、様々な組織が共通して必要とするような細胞機能の制御に関わる可能性が高い。

カルパイン 7 のノックアウトマウスにおいては、ホモノックアウトマウスが一見正常に出生するが生後約一日で死亡するという興味深い表現型を示す。このような新生仔致死の表現型は、他のカルパインについても報告がなく、多細胞生物においてもカルパイン 7 の機能なしでは生存できない状況・時期が存在することを示す初めての例である。

そこで、カルパイン 7 の機能は出生後の環境適応に重要であるという視点から研究を行い、カルパイン 7 を含むシグナル伝達系がどのような刺激に反応して活性化するのか、カルパイン 7 の標的分子はどのような生命現象に関わるのか、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 表現型に注目した解析。培養細胞でのタンパク質発現系と、遺伝子改変マウス

(カルパイン 7 ノックアウトマウス、及び野生型・活性欠失型カルパイン 7 導入マウス) の系を用いて、カルパイン 7 の有無が細胞や組織にどのような変化をもたらすか、を検討した。

(2) 分子間相互作用に注目した解析。カルパイン 7 の活性制御において、相互作用タンパク質の重要性に着目した。既に報告されている結合タンパク質に加えて、独立のスクリーニングを行って新規相互作用タンパク質を同定し、その分子の挙動を参考にしてカルパイン 7 の細胞内での局在や活性発現との関係を考察した。

(3) プロテアーゼ活性及びプロテオミクスの手法に着目した解析。カルパイン 7 のプロテアーゼ活性については、現状では確定した評価法がないため、特定の基質ではなく、発現細胞におけるプロテオームレベルでの活性の評価を試みた。

4. 研究成果

(1) 個体レベル・細胞レベルでの表現型とプロテアーゼ活性との関係について
通常の飼育条件で、カルパイン 7 ホモノックアウトマウス (以下、KO マウス) が得られなかったため、出生前後の胎児・新生仔について、遺伝子型の解析を詳細に行った。その結果、ホモノックアウトによって生後約一日で死亡する新生仔致死の表現型を確定した。

この時点で、外見上の明らかな異常は認められなかった。また、各臓器切片の HE 染色による観察によっても、形態の明らかな異常は認められなかったため、具体的にどの臓器・細胞におけるカルパイン 7 の機能不全が原因となっているかについては、明らかにできなかった。そのため、別のアプローチを試みて、今後解明に努める。

一方、野生型カルパイン 7 及び、活性欠失型変異体 (カルパイン 7 : CS) トランスジェニック (Tg) マウスとの交配により、ホモノックアウトマウスの表現型のレスキューを試みた。まず、各トランスジェニックマウスにおいて、発育や、体重あたりの臓器重量の変動がないことを確認した。その後、ホモノックアウトマウスに各トランスジェニックを導入した個体では、致死性が回避されていることが見出された。

実験に用いたノックアウトマウスは、ジャクソン研究所から市販されているもので、遺伝的背景が研究目的に即したものでなかった。上記の実験は、10 代以上のバッククロスを行い、表現型の解釈に影響が出ない状態にした後に得られた結果であり、初めてマウスについてカルパイン 7 欠損の影響を確定したものである。

(2) ライン間での表現型の違いと発現タン

パク質量の関係について

(1)の成果に関連して、トランスジェニックマウスの各臓器で発現しているカルパイン7の活性及びタンパク質量が及ぼす影響を検討した。これは、野生型カルパイン7だけでなく、活性欠失型変異体カルパイン7:CSによっても、致死性が回避される場合がわずかではあるがあったためである。

複数のカルパイン7:CSマウスを用いて比較検討した結果、発現量が多いラインにおいて、致死性回避の効果がもたらされる傾向が見受けられた。一方で、致死性は回避されるものの、個体発育の正常性という点では、野生型と同程度の体重増加や臓器重量の増加は観察されなかった。このことから、致死性の回避、と、その後の個体レベルでの発育、二層に分けて、機能部位を検討する必要があると考えられる。

カルパイン7については、組織普遍的に発現している分子種であるため、トランスジェニックマウス作製においても、組織普遍的なプロモーターを用いた。今後、一般的に出生直後の個体生存に重要性が指摘されている臓器・細胞に適した特異的プロモーターを用いて、トランスジーン発現を試みることで、その条件下でホモノックアウトマウスの表現型回復が見られるのかどうかを検討する予定である。

(3) プロテオーム解析手法利用による成果

大腸菌由来のビオチン化酵素変異体(BirA)と、質量分析装置によるタンパク質の同定を利用して、目的タンパク質の近辺に存在するタンパク質を検索する実験法(BioID)をカルパイン7について応用した。この方法では、従来の酵母ツーハイブリッド法などによるスクリーニングと比較して、タンパク質レベルでの情報が非常に大量に得られるという利点があるが、バックグラウンドとの差分を取るための基準設定が重要であった。

今回のスクリーニングの結果、既報のカルパイン7結合タンパク質が含まれる条件を基準として、新たに複数の新規タンパク質を同定することができた。再現性を確認した後、手技の簡便化や条件検討の閾値設定などを行う。細胞染色などの実験手法と相補的に、カルパイン7の挙動を評価する実験法として、有効ではないかと考えられる。

これまでに、定法での(試験管内での)活性測定ができないカルパイン分子種(カルパイン3など)については、野生型及び活性欠失変異型を培養細胞に発現させた後、活性依存的なプロテオーム変化の定量比較解析が有効であるとの結果を得ている。そこで、カルパイン7についても同様の解析を行った。今回の測定結果では、強制発現させたカルパイン7について、そのプロテアーゼ活性によって自身の量の減少が起きていることが示唆された。これまでに、タグタンパク質と融

合させたカルパイン7については、弱い自己分解活性が報告されている。細胞での発現時に、カルパイン7の濃度が高い状態が保たれたために、ペプチドレベルでもプロテアーゼ活性に依存した減少が検出できたのではないかと考えられる。

得られたペプチド配列は、分子内での位置を考察しつつカルパイン7に分解されやすいモデル基質を設計することに非常に有効ではないかと考えている。

(4) 機能様式の多様性に関する示唆

カルパインについて、そのプロテアーゼ活性だけでなく、タンパク質としての構造が機能に必須である、という例が、近年報告されてきている(例:カルパイン3, 6, 9など)。カルパイン7についても、個体レベルのごく限られた例ではあるが、プロテアーゼ活性の欠損が発現量によって相補できる可能性がゼロではないかもしれず、その閾値を検討できるような着眼点を見つける必要がある。

本研究報告の期間内に得られた他の知見として、ノックアウトマウスより確立したMEF細胞では、カルパイン7のプロテアーゼ活性がEGFRのダウンレギュレーションに対して、必須ではないがその効率を修飾するような因子であることが示されている。現在すすめている新規相互作用タンパク質の検索結果をもとに、その作用点を明らかにすることが今後の課題の1つである。

酵母の遺伝学で行われたカルパインの機能解析と同等の情報量には至っていないが、本研究成果により、高等生物では同じカルパイン7のホモログが、類似点を残しながらもより多重に機能調節を受けていることが現実に示された。現在行っているスクリーニングも含めて、活性化因子の検索という方向性も今後有効ではないかと考えられる。

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)

Ono Y, Saito DC, Sorimachi H, Calpain research for drug discovery: Challenges and potential. Nature Reviews Drug Discovery, 2016, 15, 854-876, 10.1038/nrd.2016.212. (査読有)

Shinkai-Ouchi F, Koyama S, Ono Y, Hata S, Ojima K, Shindo M, duVerle D, Ueno M, Kitamura F, Doi N, Takigawa I, Mamitsuka H, Sorimachi H, Predictions of Cleavability of Calpain Proteolysis by Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis Using Newly Determined Cleavage Sites and Catalytic Efficiencies of an Oligopeptide Array. Mol

Cell Proteomics, 2016, 15, 1262-1280,
10.1074/mcp.M115.053413. (査読有)

Ono Y, Ojima K, Shinkai-Ouchi F, Hata S, Sorimachi H, An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3. Biochimie, 2016, 122, 169-187, 10.1016/j.biochi.2015.09.010. (査読有)

Maemoto Y, Ono Y, Kiso S, Shibata H, Takahara T, Sorimachi H, Maki M, Involvement of calpain-7(CAPN7) in EGF receptor(EGFR) degradation via the endosomal sorting pathway. FEBS J, 2014, 281, 3642-3655, 10.1111/febs.12886. (査読有)

〔学会発表〕(計 1件)

小野弥子、カルパイン3の自己分解と活性化について、2017年度日本農芸化学会大会、2017年3月19日、京都女子大学(京都府京都市)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔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・副参事研究員

研究者番号：20392376

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし