

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450172

研究課題名(和文)カルパインによる胃粘膜防御及び腸管免疫の作用機序解析

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of gastric defense and intestinal immunity involving calpains

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：常に異物に晒される胃腸の粘膜には複雑な防御システムが備わっている。胃腸特異的に発現する細胞内プロテアーゼ複合体G-カルパイン(カルパイン8とカルパイン9のヘテロ二量体)は、ストレス応答性の胃粘膜防御と、Th17細胞分化制御を介した腸管免疫に関与すると考えられるが、これらのメカニズムは不明である。本研究では、G-カルパインが粘液分泌細胞の移動・増殖の制御及び胃酸分泌の負の制御によって胃粘膜防御に働くことと、G-カルパイン活性と腸内細菌の腸管上皮接着との間に制御システムが存在する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：There are complex defense systems in the gastrointestinal mucosa, usually exposed to external stresses. Our previous study revealed that intracellular protease complex G-calpain (heterodimer of calpain 8 and calpain 9) expressed specifically in the gastrointestinal tract is involved in stress-responsive gastric mucosal protection, and intestinal immunity via regulation of Th17 cell differentiation, although these mechanisms are unknown. This study suggested that G-calpain acts on gastric mucosal defense by regulating migration and proliferation of mucus-secreting cells and negative regulation of gastric acid secretion, and that G-calpain activity regulates, or is regulated by, epithelial adhesion of intestinal bacteria in the intestine.

研究分野：細胞内タンパク質分解

キーワード：カルパイン 胃腸防御

1. 研究開始当初の背景

カルパイン(CAPN)は、Ca²⁺要求性の細胞内プロテアーゼで、様々な発現様式を示す 15 種類の分子種が哺乳類に存在する。これらは基質の限定分解による機能調節を通じて、各々に特徴的な機能を果たすと考えられているが、機能の詳細や疾患との関連が明確になっているのはごく一部の分子種であり、大部分は何のために存在するのかという定見が得られていない。

研究代表者は、機能未知であった2種類の胃腸特異的分子種、カルパイン 8(CAPN8)とカルパイン 9(CAPN9)についての研究に取り組んできた。その結果、これらが胃粘膜上皮の表層粘液分泌細胞と腸管上皮の杯細胞に発現し、ヘテロ二量体(G-カルパインと命名)として機能することと、G-カルパインノックアウトマウスの表現型として、アルコール溶液投与時における胃粘膜損傷の増悪と(Hata *et al.*, PLoS Genet. 2010)、ヘルパーT細胞の一種である Th17 細胞の減少を明らかにした。Th17 細胞は、炎症性サイトカイン IL-17 等を産生し感染防御や腸管免疫恒常性に重要な役割を果たすだけでなく、自己免疫疾患発症にも関わる。Th17 細胞の分化誘導には、サイトカイン IL-6 のナイーブ CD4 陽性 T 細胞への作用とそれに伴う転写因子 ROR γ t の発現誘導が必須である。腸管では Th17 細胞が多数常在しており、これには特定の腸内細菌の上皮への生着が重要であることが明らかになっているが、このメカニズムには不明な点が多い。

研究代表者は、さらなる解析を進めて、KO マウス小腸において IL-6 の発現量が低下していることと、G-カルパインのノックダウン細胞株が増殖・移動能に異常を示すことなどを予備的知見として得たところである。これらの知見は、G-カルパインが消化管防御機能に関与することと、G-カルパイン不全が関連する疾患の存在を初めて明らかにしたものであるが、その詳細は未解明である。

2. 研究の目的

本研究は、(1)CAPN8 と CAPN9 の二量体形成の意義と各遺伝子の SNPs と G-カルパインの活性との関係の解明、(2)G-カルパイン機能不全による胃粘膜防御破綻のメカニズム解明、(3)G-カルパインによる腸管 Th17 細胞分化制御機構の解明、を目的とした。

3. 研究の方法

上記(1)では、CAPN8 と CAPN9 それぞれの不活性変異体、点変異体、欠失変異体発現コンストラクトを作製し、CAPN8 と CAPN9 の各コンストラクトを様々な組み合わせで小麦無細胞発現系や培養細胞発現系においてタンパク質発現させ、これらのプロテアーゼ活性や相互作用を調べた。上記(2)では、G-カルパイン活性欠損マウスと野生型マウスの胃 RNA を用いてマイクロアレイ解析を行うことで遺伝子の発現変動を調べると共に、培養細胞を用いて CAPN8 と CAPN9 が胃粘膜防御における細胞移動・接着に関与する可能性を改めて検討した。上記(3)では、腸内細菌による CAPN8 及び CAPN9 の発現制御の可能性を調べるため、無菌マウスと SPF マウスを用いて、腸管における CAPN8 と CAPN9 のタンパク質発現量の比較を行った。

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 (Hata *et al.*, J. Biol. Chem. 2016)。また、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 では少なくとも 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。

(2)粘液分泌細胞由来の細胞株を用いたスクラッチアッセイを行うと、カルパイン阻害剤である calpeptin 作用下で細胞移動の遅延が起こること、大腸ガン由来細胞株を用いたノックダウン実験を行ったところ、CAPN8、CAPN9 いずれかをノックダウンすることで細胞増殖の遅延が見られた。さらに、マイクロアレイ解析により、G-カルパイン活性欠損マウス胃における細胞接着や移動の制御因子の発現上昇と、胃酸分泌の制御因子の発現低下を見出した。この結果から、G-カルパインが、胃粘膜の保護に、細胞の移動や接着の制御だけでなく胃酸分泌の抑制に働く可能性を見出した。

(3)腸管における CAPN8 と CAPN9 のタンパク質発現量を無菌マウスおよびSPFマウスで比較したところ違いが見られなかった。この結果から、腸内細菌によって CAPN8 と CAPN9 は発現制御を受けないことが明らかになったほか、腸内細菌の上皮接着によるカルパインの活性の制御の可能性、またはカルパインによる腸内細菌接着の制御という別の可能性が考えられた。

<引用文献>

Hata S, Abe M, Suzuki H, Kitamura F, Toyama-Sorimachi N, Abe K, Sakimura K, Sorimachi H. ‘Calpain 8/nCL-2 and Calpain 9/nCL-4 constitute an active protease complex, G-calpain, involved in gastric mucosal defense.’

PLoS Genet. (2010) 6, e1001040.

Hata S, Kitamura F, Yamaguchi M, Shitara H, Murakami M, Sorimachi H.

‘A gastrointestinal calpain complex, G-calpain, is a heterodimer of CAPN8 and CAPN9, which play catalytic and regulatory roles, respectively.’

J. Biol. Chem. (2016) 291, 27131-27322. doi: 10.1074/jbc.M116.763912

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Hata S, Kitamura F, Yamaguchi M, Shitara H, Murakami M, Sorimachi H.

‘A gastrointestinal calpain complex, G-calpain, is a heterodimer of CAPN8 and CAPN9, which play catalytic and regulatory roles, respectively.’

J. Biol. Chem. (2016) 291, 27131-27322. doi: 10.1074/jbc.M116.763912

(査読有)

Miyazaki T, Tonami K, **Hata S**, Aiuchi T, Ohnishi K, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Takeya M, Itabe H, Sorimachi H, Kurihara H, Miyazaki A.

‘Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing.’

J. Clin. Invest. (2016) 126, 3417-3432. doi: 10.1172/JCI85880. (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.

doi: 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) 122:169-87.

doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.010. (査読有)

Ojima K, Ono Y, **Hata S**, Noguchi S, Nishino I, Sorimachi H.

‘Muscle-specific calpain-3 is phosphorylated in its unique insertion region for enrichment in a myofibril fraction.’

Genes Cells (2014) 19, 830-841.

doi: 10.1111/gtc.12181. (査読有)

[学会発表](計 7 件)

秦 勝志、山本 圭、西藤泰昌、北村ふじ子、村上 誠、反町洋之

皮膚特異的カルパイン 12 の活性異常は乾癬の発症に關与する

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (2017 年)

秦 勝志、山本 圭、西藤泰昌、北村ふじ子、村上 誠、反町洋之

乾癬発症におけるカルパインの關与とその機能解析

第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(2016 年)

秦 勝志

細胞内プロテアーゼ「G-カルパイン」による対アルコール胃粘膜防御の分子機構解析

サントリーグローバルイノベーション(株)「アルコールと健康」研究会 (2016 年)

秦 勝志、山本 圭、西藤泰昌、北村ふじ子、村上 誠、反町洋之

カルパインの制御異常による乾癬発症のメカニズム解析

第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(2015 年)

秦 勝志、北村ふじ子、反町洋之

消化管特異的カルパイン CAPN8 及び CAPN9 による胃粘膜保護機能の解析

2015 年度日本農芸化学会大会(2015 年)

秦 勝志、山本 圭、西藤泰昌、北村ふじ子、村上 誠、反町洋之

カルパイン制御不全による皮膚疾患の分子機構解析

第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(2014 年)

秦 勝志

細胞内プロテアーゼ「G-カルパイン」による対アルコール胃粘膜防御の分子機構解析

サントリーグローバルイノベーション(株)「アルコールと健康」研究会(2014 年)

[産業財産権]

取得状況(計 2 件)

名称: 組換えヒト μ -カルパインの調製方法

発明者: 反町洋之、**秦 勝志**

権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所

種類: 特許

番号: 特許第 6235815 号

取得年月日: 2017 年 11 月 2 日

国内外の別: 国内

名称: 組換えヒト m-カルパインの調製方法

発明者: 反町洋之、**秦 勝志**

権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所

種類: 特許

番号: 特許第 6101442 号

取得年月日: 2017 年 3 月 3 日

国内外の別: 国内

[その他]

所属機関ホームページ

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

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