

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18076007

研究課題名（和文） カルパインによる生体のモジュレーション

研究課題名（英文） Biological modulation by calpain proteolysis

研究代表者

反町 洋之 (Sorimachi, Hiroyuki)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：10211327

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、胃腸、酵素、プロテオリシス、カルシウム、メンブレン・トラフィック、骨格筋

1. 研究計画の概要

カルパインは細胞質内に存在し、厳密に基質を認識して限定分解する、Ca²⁺-要求性モジュレータ・プロテアーゼである。哺乳類のカルパイン 15 遺伝子の約半数について、その変異により疾患・致死の引き起こされることが明らかとなっている。よって、カルパインが生体の正常な維持に必須な酵素であることが明確となっている。ヒトのカルパイン不全による疾患には筋ジストロフィー、糖尿病などが含まれ、カルパインを標的とした診断・治療の期待が高まっている。一方で、カルパインの作用機序については未だにほとんどが不明である。そこで本研究では、カルパインの作用機序を個体、細胞、*in vitro* の各レベルから解析し、カルパイン不全による生体システム破綻のメカニズムを明確にし、カルパインが生体をモジュレートする分子機構の解明を目的とした。

2. 研究の進捗状況

本研究では組織機能と密接に関係する組織特異的カルパインに焦点を当て解析している。まず胃特異的カルパイン nCL-2/calpain8 については胃表層粘液分泌細胞への限局を見出し、細胞内ではゴルジ体-小胞体間の膜輸送に関与する COPI 複合体の β -COP サブユニットを基質として、膜輸送系をモジュレートする可能性を示した。さらに nCL-2 自身の活性化機構を解析するため、組換え蛋白質を発現・精製する系を確立し、この組換え nCL-2 を用いて酵素学的に解析した結果、組織普遍

的カルパインとは異なり、①自己消化速度が著しく速い、②制御サブユニットとは結合せずモノマー～オリゴマーで存在し比活性を変化させる、ことを明らかとした。これらの性質は nCL-2 の活性制御機構の本質に関わるものと考えられ、さらに遺伝子改変マウスを用いて生体での解析を進めている。

骨格筋特異的カルパイン p94/calpain3 については、これも急速な自己消化活性を見出していたが、今回、巨大筋弾性蛋白質コネクチンとの部位特異的結合により活性制御されることを明らかとした。さらに、p94 結合部位 (N2A 領域) 付近に結合する転写調節因子の筋アンキリン反復蛋白質 MARP2 が、コネクチン N2A 領域を scaffold として p94 に限定分解される事、p94 活性はコネクチン N2A 領域の局所構造に依存する事を明らかにした。一方、p94 は筋原線維内では N2A 領域の他に Z 及び M 線領域にも局在しているが、これらの存在量は筋細胞分化過程で変化することを見出した。しかも、成熟筋細胞では筋の伸縮に応じて p94 の局在が変化すること、その局在変化は自己消化活性に依存することを明らかとした。これらの結果から、p94 の生理的役割の一つは筋原線維の伸縮を監視し、過剰な伸長ストレス時の MARP2 等を介した核へのシグナル伝達系のモジュレーターであるという作業仮説を示す事ができた。これも遺伝子改変マウスを用いて *in vivo* での確認を今後進めていく。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由) 研究分担者・連携研究者をはじめ研究代表者の研究室の全員の努力のため。

4. 今後の研究の推進方策

上記のようにほぼ順調に研究計画は進んでいるので、遺伝子改変マウスを使った解析を計画通りさらに推し進める。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 12 件、全て査読有)

1. Hayashi, C., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Tagami, M., Mineki, R., Arai, T., Taguchi, H., Yanagida, M., Hirner, S., Labeit, D., Labeit, S., Sorimachi, H. Multiple molecular interactions implicate connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 283:14801-14814 (2008)
2. Ono, Y., Hayashi, C., Doi, N., Tagami, M., Sorimachi, H. The importance of conserved amino acid residues in protease sub-domain IIb and the IS2 region in p94 for constitutive autolysis. *FEBS Lett.*, 582:691-698 (2008)
3. Koyama, S., Hata, S., Witt, C. C., Ono, Y., Lerche, S., Ojima, K., Chiba, T., Doi, N., Kitamura, F., Tanaka, K., Abe, K., Witt, S., Rybin, V., Gasch, A., Franz, T., Labeit, S., Sorimachi, H. Muscle RING-finger protein MuRF1 as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *J. Mol. Biol.*, 376:1224-1236 (2008)
4. Hata, S., Doi, N., Kitamura, F., Sorimachi, H. Stomach-specific calpain, nCL-2/calpain 8, is active without calpain regulatory subunit, and oligomerizes through C2-like domains. *J. Biol. Chem.*, 282:27847-27856 (2007)
5. Ojima, K., Ono, Y., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, S., Sorimachi, H. Myogenic stage, sarcomere length and protease activity modulate localization of muscle-specific calpain. *J. Biol. Chem.*, 282:14493-14504 (2007)
6. Ono, Y., Hayashi, C., Doi, N., Kitamura, F., Shindo, M., Kudo, K., Tsubata, T., Yanagida, M., Sorimachi, H. Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics - Possible regulation of protein synthesis by p94. *Biotech. J.*, 2:565-576 (2007)
7. Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., Sorimachi, H. Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 in a genetic reporter system. *J. Biol. Chem.*, 281:18519-18531 (2006)
8. Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., Sorimachi, H. Stomach-specific calpain, nCL-2, localizes in mucus cells and proteolyzes the β -subunit of coatomer complex, β -COP. *J. Biol. Chem.*, 281:11214-11224 (2006)

[学会発表] (計 54 件)

- 1 Sorimachi, H. Roles of skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3, on

multiple molecular interactions using connectin/titin N2A region as a modulating scaffold. 11th International Symposium on PROTEINASE INHIBITORS AND BIOLOGICAL CONTROL: 2008-09-02, Portoroz, Slovenia.

- 2 Sorimachi, H. La calpaína como “proteína moduladora” en la enfermedad y la salud. (Calpain as a “modulator protease” in health and muscle disease.) UPV/EHU (Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea) Summer Course Symposium: Distrofias por Déficit de Calpaína-3: Una Visión General, 2008-07-14, San Sebastián, Spain.
- 3 Ono, Y. Analysis of structure-function relationships of p94 by proteinase-trapping system The Joint 4th AOHUP (Asian Oceania Human Proteome Organisation) and 2nd PRICPS (Pacific Rim International Conference on Protein Science), 2008-6-22, Cairns, Australia.
- 4 Sorimachi, H. Toward Understanding Relationships between Proteolytic Activity of Skeletal Muscle-Specific Calpain and Calpainopathy. 2007 Korea-Japan Joint Symposium “Protein Modification and Degradation in Human Diseases”, 2007-09-05, Seoul, South Korea
- 5 Sorimachi, H. Unconventional calpains. FASEB Summer Research Conferences – The Biology of Calpains in Health & Disease, 2007-07-15, Colorado, USA
- 6 Sorimachi, H. Novel approaches for analysis of proteolytic activity of muscle-specific calpain p94/calpain 3 Xth International Symposium on PROTEINASE INHIBITORS AND BIOLOGICAL CONTROL: From single molecules to degradomics, 2007-06-24, Portoroz, Slovenia

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ:

<http://www.rinshoken.or.jp/ER/>