

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06236

研究課題名(和文) 哺乳類カルパイン7の構造特性に依存したプロテアーゼ活性の検出と解析

研究課題名(英文) Characterization of structure dependent CAPN7 activity

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・基礎医科学研究分野・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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酵母からヒトに至るまで保存されている細胞内システインプロテアーゼカルパイン7について、マウス及び培養細胞系を用いた解析を行った。カルパイン7のプロテアーゼ活性と機能の関係性を示すために、その間に存在する分子を探索しつつ、カルパイン7が属するnon-classicalカルパインの構造機能相関について解析した。

現在、新たに微小管機能に関わる複数の分子がカルパイン7の近傍に存在する可能性を見出し、カルパイン7のN末端構造を介する可能性が強い。一方、構造的に近い他のカルパインとの比較により、カルパイン7においてもC末端構造が活性化に重要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルパインは細胞内タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)であり、その欠損や異常が様々な疾患、病態に関わる。最も認知度の高いカルパインは、ヘテロダイマーとして機能するclassicalカルパインだが、進化的に良く保存されているのはカルパイン7を始めとするnon-classicalカルパインである。本研究ではカルパイン7がヒトやマウスでどのように機能を果たすのか、そのメカニズムと構造機能相関を理解するきっかけを得た。カルパインファミリーは進化の過程で多様化し、ヒトでは15のカルパイン分子種が機能分担しつつ共存するに至っているとされる。他のカルパイン分子の研究にも新たな視点を与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Calpain-7 is an intracellular cysteine protease which is evolutionary- well conserved, from yeast to human. This study aimed to explore functional importance of calpain-7 in genetically modified mouse and cultured cell systems. In terms of molecular structure, calpain-7 is categorized as a “non-classical calpain” due to its unique domain structure in the region C-terminus to protease domain.

Among the newly identified proteins by BioID screening, some proteins bear functional linkage in microtubule structure. The N-terminal domain of calpain 7 has been defined as MIT (micro tubule interacting and transport) domain suggesting its involvement in the interaction with these proteins. Domain structure C-terminus to protease domain, on the other hand, was likely to play a pivotal role in activation of calpain-7, an inference drawn from comparative analyses of non-classical calpains including calpain-7.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：プロテアーゼ 相互作用タンパク質 ドメイン ノックイン

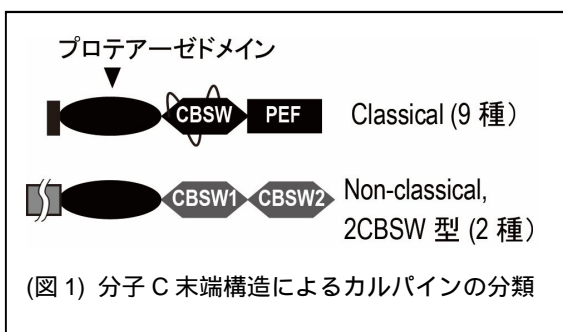
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) カルパインは細胞内に存在するタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)の一種であり、様々な基質タンパク質を限定的に分解して、それら分子の機能を調節する。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は酵母からヒトに至るまで広く保存された唯一のカルパイン分子種である。ヒトやマウスでは、ほぼすべての組織・細胞にカルパイン7の発現が認められる。カルパインファミリーの中で、カルパイン7のように、組織普遍的に発現するカルパイン分子種については、様々な組織に共通して必須な細胞機能(細胞骨格の維持、細胞増殖や細胞周期)の制御に関わることが示唆されている。

(2) カルパイン7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新生仔致死の表現型を示す。そのため、出生に伴う環境変化へのストレス対応に重要なカルパイン分子として、その基質タンパク質や制御機構が注目されている。

(3) カルパイン7は分子C末端に2つのCBSW(Calpain beta sandwich)ドメインが存在するという特徴的な構造を持っており、サブグループ(Non-classical カルパイン)に分類される(図1)。このサブグループのカルパイン分子種はカルパインのプロトタイプと考えられており、中でもカルパイン7は、進化的に保存された分子間相互作用や活性制御機構を解明するための重要な分子と位置づけられている。



2. 研究の目的

(1) カルパイン7ノックアウトマウスの表現型をレスキューするためにはCAPN7のプロテアーゼ活性が必須であることが見出されている。その実態を明らかにするため、カルパイン7(CAPN7)のプロテアーゼ活性を検出し、定量的に機能を評価できる系を確立することを目指した。

(2) カルパイン7の分子C末端に存在する2つのCBSW構造は、分子種特異的な解析手法(阻害剤、基質など)の開発や、生理機能解析を推進する重要な手がかりであると考え、その特徴とプロテアーゼ機能への関与を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) カルパイン7の不活性変異体を発現する遺伝子改変マウス(ノックインマウス)を作成し、ノックアウトマウス及び過剰発現マウス(野生型-Tg および不活性変異体-Tg)との比較解析を行う。これらマウスの組織・細胞、及び、組み換えタンパク質として発現させたカルパイン7と新規の合成ペプチド基質を用いてプロテアーゼ活性の検出法を検討する。

(2) カルパイン7の周辺に局在するタンパク質を培養細胞とBioID系を用いて探索する。得られた分子について、基質となるのかを共発現により検討する。直接的な結合が別の方法で確認できた分子については、さらに結合領域や共局在の検討を行う。

(3) カルパイン7と同様にNon-classicalカルパインと分類される分子種との比較解析を行う。C末端に存在する2つのCBSW構造の保存性やプロテアーゼ活性への影響について、培養細胞の発現系を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) カルパイン7ノックインマウスとノックアウトマウスの表現型の違い。

カルパイン7ノックアウトマウスの早期致死性に対して、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の過剰発現によっても、回避される場合がわずかに観察されていた(10%以下)。一方、活性欠失型変異体カルパイン7:CSを発現するノックインマウスでは、50%以上が出生後2週間目まで生存していた。その間、野生型よりも軽量(70%以下)であったため、個体発育の正常性という点では何らかの障害が起きていると考えられる。今後、主要組織について、カルパイン7の発現量と形態の解析を行う。また、ノックアウトマウスにおける致死性をレスキューし、野生型と同等の発育をもたらすような野生型カルパイン7の過剰発現マウスであるにも関わらず、出生後の個体ではカルパイン7の発現が検出できないラインが存在した。この現象については個体レベルでの生存がレスキューできる時期が特定できなかった。基本的な生存環境(栄養状態や衛生状態からのストレスがない状態)に適応するためにはカルパイン7は必須ではない、ということを前提に、新たに作出したノックアウト細胞を解析する予定である。

(2) カルパイン7周辺分子の同定と考察。

カルパイン7分子の相互作用分子として、分子N末端に存在するMITドメイン(微小管結合モチーフの一種)に対するものが同定されてきた。本研究期間においては、大腸菌由来のピオチン化酵素変異体(BirA)とカルパイン7を融合タンパク質として培養細胞に発現させ、カルパイン7近傍に存在するタンパク質をピオチン化し、それらを精製して質量分析で同定するBioID系を活用した。これは研究期間の初期にカルパイン7(全長またはドメイン)について酵母two-hybrid法によるスクリーニングを併用したが、酵母への毒性などにより有用ではなかったためである。

既報のカルパイン7結合タンパク質が少なくとも1つ含まれる条件下で、新たに6つのタンパク質が同定された。このうち3つは微小管の構築に関与するタンパク質であった。さらに解析を行うため、組み換えタンパク質として発現し、直接的な相互作用とカルパイン7の基質となる可能性検討を続行している。

カルパイン7を含む、Non-classicalカルパインについては微小管または微小管結合タンパク質の機能に関与する例が報告されてきている。後述(3)のカルパイン10が結合し基質とするMAP1ファミリータンパク質については、少なくとも定常状態の細胞内ではカルパイン7の基質とならなかった。一方、他のNon-classicalカルパイン分子種については、それぞれのノックアウトマウスにカルパイン7ノックアウトのような顕著な表現型が認められていない。そのため、カルパイン7ノックアウトマウスの新生仔致死という表現型から、微小管関連タンパク質とカルパイン7との関係性が胎児期出生直後の時期限定的な重要性を持つ可能性が考えられる。今後、微小管構造を足場とするカルパインの機能を進化的に良く保存されたモデルとして、カルパイン7を含むNon-classicalカルパインの解析に活用していく。

(3) CBSWドメインによる活性制御の可能性について。

カルパイン7を含むNon-classicalカルパインは、いずれも進化的に広く保存されていることから、共通したドメイン構造の機能について解析を進めた。特に、カルパイン7に近い構造を持つカルパイン10にはドメイン構造が異なる多数のスプライシングフォームが存在することに注目し、プロテアーゼ活性もしくは基質の嗜好性に関わる可能性を明らかにした。カルパイン10には、CBSWドメインを2つまたは1つ持つスプライシングフォームが存在し、基質に対する活性が異なり、前者のみが定常状態の細胞質内で活性化状態にある。カルパイン7遺伝子からは、構造上または実験的にもCBSWドメインを2つ持つ、1種類の産物が生成すると考えられる。そのため、カルパイン7も同様に定常状態の細胞質内である程度の活性を発現していると考えている。これは、モデル基質タンパク質として共発現したタンパク質に対してカルパイン7が分解活性を示したという、これまでの報告とも矛盾しない。これまでのところ、カルパイン7活性の有無は、マウス組織においてプロテオームレベルで有意な変化を引き起こしてはならず、また、様々なタンパク質発現系と使用可能な市販のカルパイン活性検出用の基質を組み合わせても、*in vitro*での活性を測定できていない。今後、今期間に作出したノックアウト細胞を用いて、注目するカルパイン7のドメインについての発現実験と特定の刺激下で変動する遺伝子群の解析を行い、上記内容と補完的な知見を取得する(研究成果(1))。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ono Yasuko, Shinkai-Ouchi Fumiko, Noguchi Aya, Hata Shoji	4. 巻 3
2. 論文標題 Enzymes Calpains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 280 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-819460-7.00330-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ono Yasuko, Doi Naoko, Shindo Mayumi, Panico Pablo, Salazar Ana Maria	4. 巻 1869
2. 論文標題 Cryptic splicing events result in unexpected protein products from calpain-10 (CAPN10) cDNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119188 ~ 119188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2021.119188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ojima Koichi, Hata Shoji, Shinkai-Ouchi Fumiko, Oe Mika, Muroya Susumu, Sorimachi Hiroyuki, Ono Yasuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Developing fluorescence sensor probe to capture activated muscle-specific calpain-3 (CAPN3) in living muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.048975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shinkai-Ouchi Fumiko, Shindo Mayumi, Doi Naoko, Hata Shoji, Ono Yasuko	4. 巻 40
2. 論文標題 Calpain-2 participates in the process of calpain-1 inactivation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience Report	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BSR20200552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hata Shoji, Doi Naoko, Shinkai-Ouchi Fumiko, Ono Yasuko	4. 巻 1868
2. 論文標題 A muscle-specific calpain, CAPN3, forms a homotrimer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140411 ~ 140411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2020.140411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ono, Y.
2. 発表標題 Unexpected protein products from calpain-10 (CAPN10) cDNA.
3. 学会等名 FASEB Summer Research Conferences; The Biology of Calpains in Health and Disease Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京都医学総合研究所カルパインプロジェクトホームページ https://www.igakuken.or.jp/calpain/</p> <p>CaMPDBホームページ http://calpain.org/</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------