

平成21年5月29日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780080

研究課題名（和文） 遺伝子改変マウスを用いた細胞内プロテアーゼ・カルパイン系の解析

研究課題名（英文） Analysis of calpain-calpastatin system using genetically modified mice

研究代表者

高野 二郎（TAKANO JIRO）

独立行政法人理化学研究所・神経蛋白質制御研究チーム・研究員

研究者番号：60415213

研究成果の概要：様々な病態において活性化が観察される細胞内タンパク質分解酵素「カルパイン」の遺伝子改変マウスを作製し、これまでに解明されていないカルパインの生理的機能の解析を行った。カルパイン遺伝子欠損マウスが胎生期に死亡することから、カルパインが個体発生において不可欠な存在であることが分かった。また、生理的条件下でカルパインが細胞死を抑制することが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：カルパイン、プロテアーゼ、カルシウムシグナリング、個体発生、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

カルパインは、線虫からヒトに至るまで、ほとんどの組織内に発現しているカルシウム依存性プロテアーゼである。

カルパインについてはこれまでに多くの研究が報告され、分化や細胞死、細胞運動などの生理現象、その過剰な活性化がアルツハイマー病や筋ジストロフィーなどの多くの疾患を引き起こすことが示唆されてきた。しかし、カルパインが各現象の原因となるのか、その時の基質タンパク質を同定するには至っていない。さらに、遺伝子改変動物の作製の遅れや細胞膜透過性の特異的阻害剤が開

発されていないため、多くの研究が細胞レベルに留まっており、カルパインの生体における作用機序については不明な点が多い。

近年相次いでカルパイン関連遺伝子の遺伝子改変動物の作製が試みられ、カルパイン-1およびカルパイン-2共通のサブユニット（カルパイン-4）の欠損マウスは、カルパイン-1とカルパイン-2の両方の発現が抑制され、心臓形成や血球系分化異常のため胎生致死になることが報告された。さらに、カルパイン-1欠損マウスは野生型マウスとの間に大きな差は見られなかったが、リン酸化シグナルの異常が検出され、試験管内での

血液凝固に異常が見られた。一方、申請者らが作製した内在性カルパイン阻害蛋白質カルパスタチンの過剰発現および欠損マウスでは通常状態では野生型マウスと著明な差は観察されないが、興奮性神経毒により誘導した神経細胞死に対し、カルパスタチンは量依存的に保護的に機能することが示された。

2. 研究の目的

カルシウム依存性プロテアーゼ・カルパインの生理的役割を解明するためにカルパイン-2 遺伝子欠損マウスを用いて、発生学的・生化学的解析を行った。

これまでの研究から、カルパイン-2 遺伝子のホモ欠損マウスでは発生異常のため胎生期に死亡する知見を得ている。そこで、下記の点に注目して研究を行った。

(1) 胎生致死の原因となる異常組織の特定を行う。

(2) 変異マウス由来の初代培養細胞に様々な刺激を施し野生型との差異を解析することによってカルパイン-2 の欠損が如何なる細胞内情報伝達系の異常を引き起こすのかについて明らかにする。

(3) 最終的にカルパインの生理的基質を同定することを試みる。

これまで作製されたカルパイン-1 およびカルパスタチン遺伝子欠損マウスに、本研究によってカルパイン-2 遺伝子欠損マウスが加わり、カルパイン-カルパスタチンシステムの遺伝子改変マウスが揃うこととなり、カルパイン研究において重要な知見が発見されることが期待される。また、個体発生もしくは器官形成におけるカルパインの役割の解明のみならず、細胞透過性のカルパイン特異的阻害剤の開発が成されていない現時点では、培養細胞を用いた研究においてもこれらのマウス由来の細胞が解析の有力な手助けとなるであろう。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠損マウスの飼育・維持

カルパイン遺伝子欠損マウスの作製は既に成功している。ホモ欠損マウスは胎生期に死亡するため、ヘテロ欠損マウス同士の交配によりホモ欠損マウスを作製した。

また、遺伝子欠損した成体および胎仔の遺伝子型の判別は、PCR法により行った。

(2) 胎仔の組織病変部位の解析

ホモ欠損がある胎仔の病変部位を判別するため、胎仔標本をホルマリン固定後、脱水しパラフィン包埋を作製して、ヘマトキシリン-エオシン一般染色法により行った。さらに詳細な病変部位や異常な動態を示す分子を検出するために、in situ TUNEL 染色法、組織マーカー蛋白質やカルパインの基質に

対する抗体を用いた免疫組織染色を行った。

(3) 細胞レベルの解析

発生異常機構について詳細に解析するため、胎児組織由来の繊維芽細胞を初代培養した。培養液中に各種刺激因子を添加し、野生型と変異型間での反応の差を観察した。

(4) カルパイン基質の探索

カルパイン遺伝子欠損マウスおよび野生型マウス的大脑を摘出し、ホモジュナイズ後、カルシウムイオンを添加し、カルパインを活性化した。二次元電気泳動後、スポットを比較し、差の見られるスポットを質量分析計を用いて該当タンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

カルパイン-1 遺伝子欠損マウスは正常に発育するものの、カルパイン-2 遺伝子欠損マウスは受精後 15 日付近で死亡する (図 1)。

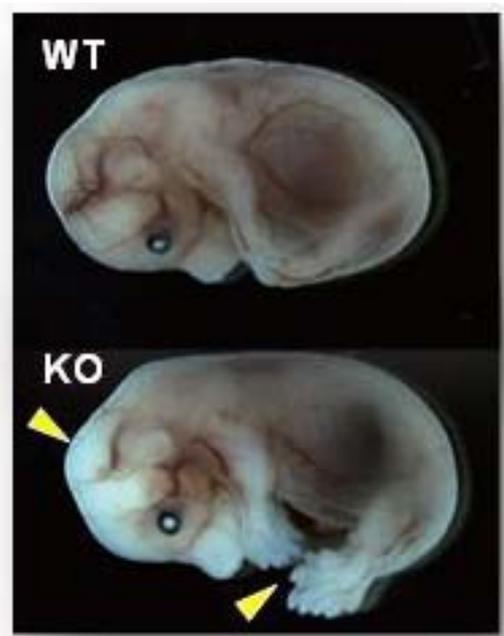


図 1 カルパイン-2 遺伝子欠損胎児の様子

これは、カルパイン-2 遺伝子が個体発生において特に重要な働きをしていることを示している。一方、カルパイン-1 遺伝子欠損単独では異常がみられないが、カルパイン-2 の両遺伝子を欠損したマウスは、さらに早期の受精後 11 日付近で死亡した (図 2)。これは、カルパイン-1 も個体発生上でカルパイン-2 と同様の働きを持ち、協調しているものと考えられる。また、カルパイン-2 遺伝子欠損による致死性は、その阻害タンパク質であるカルパスタチン遺伝子の欠損を行うことにより部分的に回復された。これは、カルパインとカルパスタチンの量的な調節

が重要であることを示している。

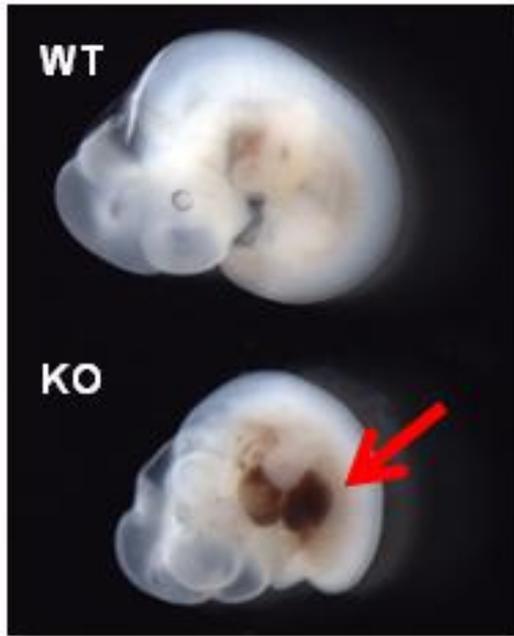


図2 カルパイン-1 & カルパイン-2 両遺伝子欠損マウスの様子

胎生致死になったマウスを各種組織染色法で解析したところ、心臓の形成異常が観察された(図3と4)。また、組織の一部で細胞死が観察された(図5)。この細胞死では、アポトーシス様のDNA断片化と、細胞死の実行因子であるカスパーゼの過剰な活性化が確認された(図6)。一方で野生型マウスでも軽度のカスパーゼの活性化が見られた。これより、カルパインが生理的レベルのカスパーゼの活性化を抑制することで、細胞を生存に導く働きがあることが推測される。

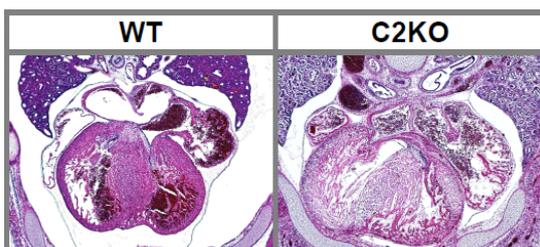


図3 カルパイン-2 遺伝子欠損胎児の心臓の様子

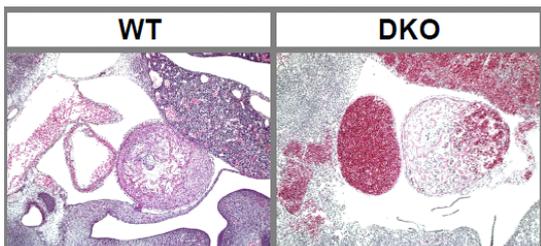


図4 カルパイン-1 & 2 両遺伝子欠損胎児の心臓の様子

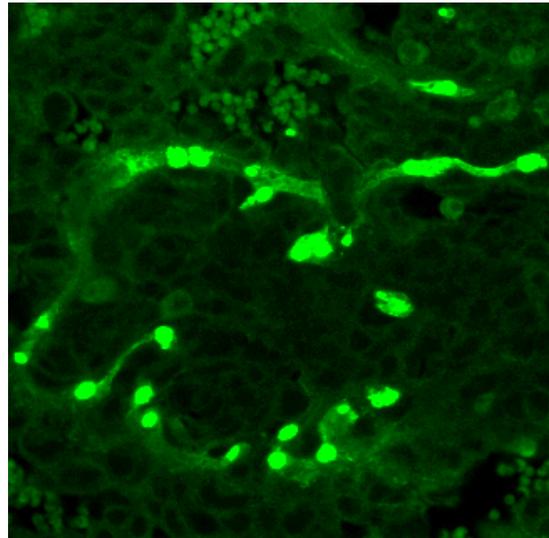


図5 カルパイン-2 遺伝子欠損マウスにおける TUNEL 染色による細胞死の検出

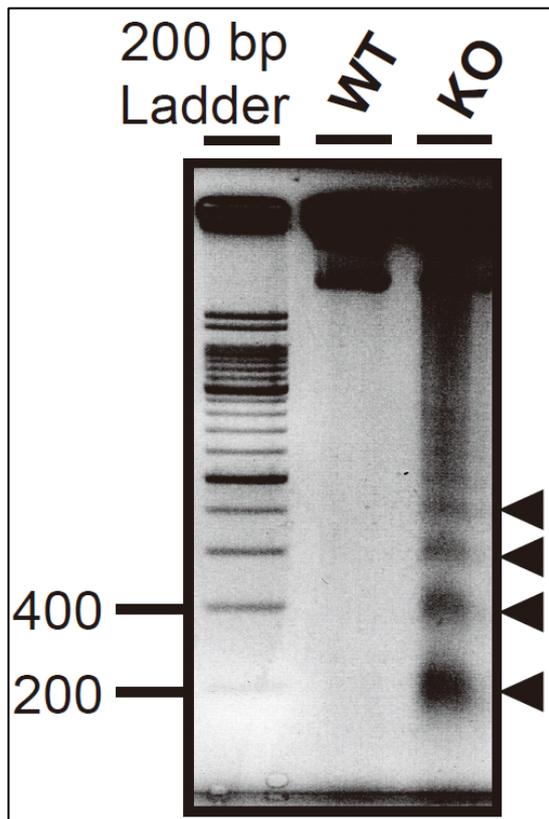


図6 カルパイン-2 遺伝子欠損マウス胎児組織の DNA 断片化の様子

繊維芽細胞を用いた実験でも、カルパイン欠損マウス由来の細胞は、野生型に比べて一部のカスパーゼ活性化誘導刺激に対しての脆弱性がみられた。

カルパインの基質探索からは、これまでに報告があるものを含め20種以上のタンパク質を同定した。今後は、これらのcDNAをクローニングし、切断部位を特定、切断が

基質に与える影響を解析していく。

以上の結果から、カルパインは過剰な活性化が病態に寄与することで知られているが、活性が完全に欠損しても生体に悪影響を与えうることが明らかになった。

今後は、組織特異的欠損マウスを作製し、脳神経における記憶や行動などの生理機能やアルツハイマー病・パーキンソン病などの神経変性疾患におけるカルパインの役割について解明していく。

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)

[学会発表] (計2件)

① 高野 二郎、The roles of calpain in surviving signaling、第80回日本生化学会大会、2007年12月13日、横浜

② 高野 二郎、Roles of calpain in survival signaling、第11回国際生化学・分子生物学会議、2008年7月1日、アテネ

[図書] (計1件)

① 高野 二郎、西道 隆臣、カルパスタチン遺伝子改変マウスを用いた神経変性および生理機構の解析、実験医学 Vol.26 No.2、(2008) 196-201頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 二郎 (TAKANO JIRO)

独立行政法人理化学研究所・神経蛋白質制御研究チーム・研究員

研究者番号：60415213