

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670166

研究課題名(和文)カルパイン3遺伝子改変マウスを用いた肢帯型筋ジストロフィー2A発症の分子機構解析

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of limb-girdle muscular dystrophy through comparative analysis of calpain-3 mutant mice

研究代表者

大内 史子 (SHINKAI-OUCHI, Fumiko)

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・主任研究員

研究者番号：00435710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近位筋に変性・壊死による進行性の筋力低下を見る肢帯型筋ジストロフィーの約30%を占める2A型(LGMD2A)の責任遺伝子産物は、細胞内システインプロテアーゼ・カルパイン-3である。本研究では、2種のカルパイン-3遺伝子改変マウスを野生型と比較し、LGMD2A発症機構の解明を試みた。その結果、プロテアーゼ機能のみを欠失したモデルとカルパイン-3自体の欠失モデルは共に筋線維の成熟遅滞を呈するが、影響を受ける分子群に差があることが示された。LGMD2Aの病態では、骨格筋の壊死によって誘発される再生過程においても、カルパイン-3の機能欠損の寄与を考慮すべきと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) exhibit progressive muscle weakness accompanied by degeneration of muscle fibers in the proximal muscle. LGMD2A type accounts for about 30% of LGMD and the responsible gene CAPN3 encodes for a skeletal muscle-specific calpain, an intracellular cysteine protease. Here we tried to elucidate the pathogenic molecular mechanism of LGMD2A by comparing two different mouse models of LGMD2A established by genetic modification of CAPN3. Both model animals, one lacks protease activity of CAPN3 but not the protein, namely, knock-in mouse, and another, CAPN3 knock-out mouse, showed a delay in maturation of muscle fiber. Detailed characterization of the phenomenon suggested that molecular components affected under these two conditions were different from each other. In summary, harmful effects of functional deficiency of CAPN3 in regeneration process induced by degeneration of skeletal muscle should be considered when exploring the pathology of LGMD2A.

研究分野：プロテオーム解析を利用した病態生化学

キーワード：肢帯型筋ジストロフィー2A型 カルパイン-3 骨格筋 筋成熟遅滞

### 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは筋線維の変性や壊死を主病変とし、進行性の筋力低下を見る難病である。肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) は四肢の近位が顕著に冒される型で根本的な治療法は未だ確立されていない。LGMD 患者の約 30% を占める 2A 型 (LGMD2A) の責任遺伝子は、骨格筋特異的な細胞内カルシウム依存的 Cys プロテアーゼ、カルパイン-3 である (引用文献 1、発表論文)。

カルパインは基質タンパク質を特定の位置で切断することで、その安定性や活性などを変化させる機能調節型プロテアーゼである。骨格筋特異的なカルパイン-3 の複数の遺伝子改変マウスを用いた解析から、カルパイン-3 のプロテアーゼ活性および非酵素的機能の欠失が LGMD2A を発症させると考えられている (引用文献 2、3)。しかし、それぞれの遺伝子改変マウスの同時比較は当初行われておらずその詳細な発症分子機構は未解明であった。

### 2. 研究の目的

カルパイン-3 欠失マウス (KO) と野生型カルパイン-3 に代えて酵素活性欠失型を発現するノックインマウス (KI) を同時に比較解析して LGMD2A の発症機序の解明とその診断、治療法の方向性の策定を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) カルパイン-3-KO、KI、野生型マウスの表現型の同時比較：体重、筋量、血中クレアチンキナーゼ活性等を比較した。

(2) 骨格筋のプロテオーム解析：各遺伝子型マウスの 5 週齢、25 週齢、60 週齢の骨格筋より調製したタンパク質抽出物を定量用試薬により標識後、LC-MS (Sciex 社 5600+) を用いて比較定量解析を行った。

(3) (1)、(2)の結果をもとに、関連因子のウェスタンブロットによる解析、定量 PCR 法による mRNA の定量解析、免疫組織染色を行った。

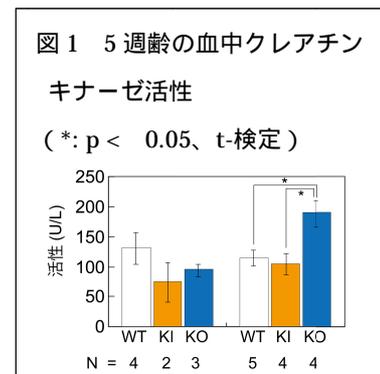
### 4. 研究成果

各遺伝子型マウスの寿命と各ヘテロ型間の繁殖能力に優位な差は認められなかった。KI ホモ型間交配では出産が確認されたものの育った仔は 5 ペアから 5 匹で、これは KI ホモ ( ) とヘテロ ( ) のペア (3.6 匹/ペア、産仔の遺伝子型はヘテロ:ホモ = 12 : 13) と比較すると有意に少なかった。

KO と KI はそれぞれ C57BL/6N 系統、C57BL/6J 系統を背景として作出されたが、本研究期間中に KI の系統を C57BL/6N とバッククロスして背景をそろえ、より正確な比較が可能になった。体重は 5 週齢において野生型に対し KO で小さく KI で大きい傾向を示していたが、有意差は認められなかった。採取した前脛骨筋の重量の比較では各遺伝子型と野生型に差を認めなかった。

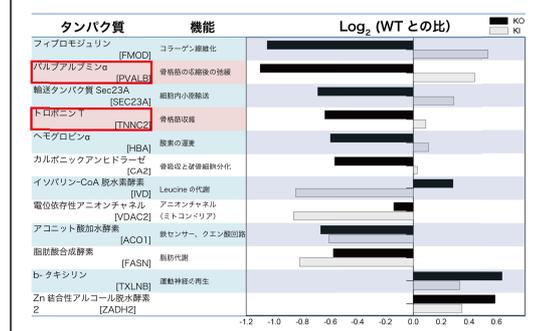
#### 血中クレアチン

キナーゼ活性は、5 週齢のにおいて野生型および KI と比較して KO で優位に大きな値を示していた (図 1)。



5, 25, 60 週齢の各遺伝子型マウス骨格筋のプロテオーム解析を行った結果、約 1000 種類のタンパク質を同定し、5 週齢ではそのうちの 837 種類でタンパク質量比を測定できた。5 週齢の骨格筋では KO で速筋線維に特徴的

図 2 前脛骨筋(5 週齢)のプロテオーム解析



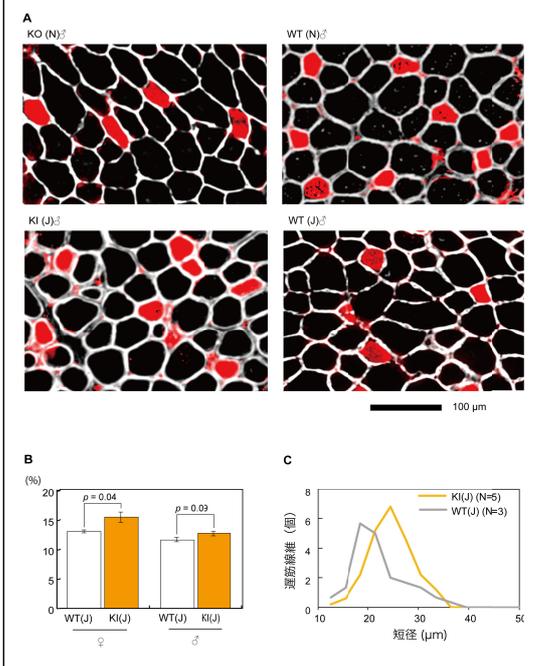
なタンパク質の減少が認められた(図2、赤棒)。そこで、筋線維型のマーカー分子であるミオシン重鎖(MYH)の発現を蛍光免疫染色(IF)および定量的PCR(qPCR)法により解析した。IFでは遅筋型MYH陽性線維がKIで野生型と比較して有意に多く、これら陽性線維の短径が太い傾向が示された(図3)。qPCR法では、周産期型MYHの発現量がKO、KIでともに有意に多いことが特徴であった。筋細胞の分化・成熟を促進する転写因子myogeninの発現量については、KOでは野生型と比較して有意に上昇、KIでは上昇する

図3 前脛骨(5週齢)の筋横断面の遅筋型MYH陽性線維

A: 抗遅筋型MYHを用いた前脛骨筋横断面の免疫染色像

B: KIマウスの遅筋型MYH陽性線維の割合

C: 遅筋型MYH陽性線維の短径の分布



ものの有意差を認めなかった。以上から KI、KO 共に筋線維の成熟が遅滞するが、影響を受けている分子群が異なることが示された。本研究結果より、LGMD2A の病態では、骨格筋の壊死によって誘発される再生過程においても、カルパイン-3 の機能欠損が関わることを考慮すべきだと思われる。また、カル

パイン-3 の酵素活性と非酵素的な活性、それぞれの欠損特異的に LGMD2A 病態へ関与する分子群を同定することを今後の重要課題としたい。

#### <引用文献>

1. Richard, I *et al* (1995) *Cell*, 81:27-40
2. Ojima, K *et al* (2011) *J Mol Biol.* 407:439-449
3. Kramerova, I *et al* (2012) *Hum Mol Genet.* 21:3193-3204

#### 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 3 件)

Sorimachi H, Ono Y, Hata S, Shinkai-Ouchi E, 2018, Elucidation of the molecular mechanism of disease development due to calpain dysfunction - CALPAIN. *Impact*, 2018(2), 74-76(3) (査読無)

DOI: 10.21820/23987073.2018.2.74.

Shinkai-Ouchi F<sup>§</sup>, Koyama S<sup>§</sup>, Ono Y, Hata S, Ojima K, Shindo M, duVerle D, Ueno M, Kitamura F, Doi N, Takigawa I, Mamitsuka H, Sorimachi H. (2016) 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* 15(4):1262-1280 (査読有) (§ These authors contributed equally.)

DOI: 10.1074/mcp.M115.053413.

Ono Y<sup>§</sup>, Ojima K<sup>§</sup>, Shinkai-Ouchi F<sup>§</sup>, Hata S, Sorimachi H. (2016) An Eccentric Calpain, CAPN3/p94/calpain-3. *Biochimie* 122: 169-187 (査読有) (§ These authors contributed equally.)

DOI: 10.1016/j.biochi.2015.09.010

[学会発表](計 12 件)

大内 史子、進藤 真由美、秦 勝志、反町

洋之、カルパイン-1および-2の機能差を示唆するプロテアーゼドメイン内の自己分解、ConBio2017 (2017年)

大内 史子、進藤 真由美、秦 勝志、反町洋之、カルパイン-1および-2の機能調節に関わる自己切断点、第22回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (2017年)

伊藤義城、大内史子、三上恭平、反町洋之、カルパイン-3の筋線維の分化への影響の遺伝子改変マウスを用いた解析、第22回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (2017年)

大内 史子、小山傑、進藤 真由美、馬見塚拓、瀧川一学、尾嶋孝一、秦 勝志、小野 弥子、反町 洋之、カルパインの特性を規定する基質特異性の定量的構造活性相関解析、日本農芸化学会 2017年度大会 (2017年)

大内史子、小山傑、小野弥子、秦勝志、尾嶋孝一、進藤真由美、duVerle D., 土井奈穂子、瀧川一学、馬見塚拓、反町洋之、カルパインの基質部位の予測、第21回日本病態プロテアーゼ学会 (2016年)

Shinkai-Ouchi F, Koyama S, Shindo M, Mamitsuka H, Ono Y, Sorimachi H. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis of calpain substrate specificity --- Can we predict cleavage by calpain?, FASEB Science Research Conferences, "The biology of Calpains in health and disease" (2016年)(招待講演)  
Shinkai-Ouchi F, Koyama S, Shindo M, Hata S, Ono Y, Mamitsuka H, Sorimachi H. Proteomic approach for elucidation of calpains' substrate specificities., 医学研国際シンポジウム Igakuken summit for Japan and Korea Science Leaders (2016年)

大内史子、進藤真由美、伊藤義城、小野 弥子、秦勝志、今西美知子、反町洋之、カルパイン-3欠損型およびプロテアーゼ

活性欠失変異型マウスの比較プロテオミクスによる肢帯型筋ジストロフィー2A型発症機序の解析、日本農芸化学会大会 (2016年)

大内史子、進藤真由美、伊藤義城、小野 弥子、秦勝志、今西美知子、反町洋之、肢帯型筋ジストロフィー2A型のモデルとしてのカルパイン-3ノックアウトおよびプロテアーゼ活性欠失変異型マウスの比較プロテオーム解析、病態プロテアーゼ学会 (2015年)

大内史子、進藤真由美、小野弥子、秦勝志、反町洋之、カルパインの基質切断部位の特異性解明に向けた網羅的解析、日本農芸化学会大会 (2015年)

大内史子、小野弥子、秦勝志、今西美知子、反町洋之、カルパイン-3ノックアウトマウス(CAPN3-KO)、プロテアーゼ活性欠失変異型マウス(CAPN3-CSKI)の表現型比較とCAPN3の非酵素的機能、病態プロテアーゼ学会 (2014年)

Shinkai-Ouchi F, Shindo M, Hata S, Ono Y, Sorimachi H. Similarity and difference of substrate selectivities between two conventional calpains, 2014 Yosnei BK21plus-CBSM International Joint Symposium (2014年)

〔その他〕  
ホームページ等

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・カルパインプロジェクト・ホームページ:

<http://www.igakuken.or.jp/calpain/>  
CaMPDB : Calpain for modulatory proteolysis DB  
<http://calpain.org/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大内 史子 (SHINKAI-OUCHI, Fumiko)

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・主任研究員

研究者番号：00435710

(2) 連携研究者

反町 洋之 (SORIMACHI, Hiroyuki)

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・分野長

研究者番号：10211327

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

進藤 真由美 (SHINDO, Mayumi)

公益財団法人 東京都医学総合研究所・基盤

技術研究センター・主席技術研究員

(5) 研究協力者

伊藤 義城 (ITO, Yoshiki)

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・研修生