

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名：細胞内モジュレータプロテアーゼの生理機能の解析

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

反町 洋之 ((財)東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所 プロジェクトリーダー)

主たる共同研究者

前田 達哉 (東京大学分子生物学研究所 准教授)(平成14年11月～)

饗場 篤 (神戸大学大学院医学系研究科 教授)(平成14年11月～)

### 3. 研究内容及び成果

細胞の生命活動を担うタンパク質に直接作用して、その機能を調節するタンパク質切断酵素「モジュレータ(調節/変換子)プロテアーゼ」は、ペプチド鎖切断が直接的、不可逆的かつ大きな構造変化を誘起するため、生体制御上極めて重要である。カルパインは細胞内モジュレータ・プロテアーゼの代表であり、情報伝達系や細胞形態などを制御する。しかしカルパインの *in vivo* の機能及び制御機構は未だ不明な点ばかりである。ヒトは15のカルパイン遺伝子を有し、発現は組織普遍的及び特異的に二分される。遺伝学的解析は、組織普遍的 m-カルパインを欠損したマウスは胚性致死となる一方、骨格筋特異的 p94/カルパイン3の遺伝子変異で肢帯型筋ジストロフィー2A型(LGMD2A)が発症する事を明らかにした。これは、前者が生命現象の基本的必須な領域に関与すると同時に、後者は特化した組織機能に必須であることを明示する。つまり、組織機能との関連で機能解析可能な組織特異的カルパインを対象とすることにより、カルパイン研究にブレイクスルーをもたらさう。そこで本研究では、組織特異的カルパイン(p94 及び胃・腸特異的 nCL-2, -4/カルパイン 8, 9)に注目し、既成概念には捕らわれずにカルパインの真の生理的作用機序を分子レベルで明らかにすることを目的とした。具体的には、活性中心の Cys に点変異を持つ不活性型カルパインを野生型の代わりに発現する遺伝子改変「ノックイン」マウスを作出し、プロテアーゼ活性の有無に関連する現象の同定や比較解析を行った。ノックアウトと異なりノックインマウスはタンパク質の正常発現が見られるため、ノックインしたカルパインの生化学的解析が可能なことも大きな特色である。一方、カルパイン作用機序を明確にするために、最も単純なカルパイン系をもつ酵母を用いて遺伝学的に解析した。その結果をフィードバックすることにより哺乳類での解析だけでは見えなかった部分にもメスを入れ、新たなパラダイムの創出を目指した。

#### [1] カルパインをはじめとするプロテアーゼを解析するための新規方法論の開発(反町 T)

上述のように根本的に既成概念とは異なる観点から解析し、急速な自己分解活性を持つ p94 や nCL-2 の解析を行うため、他のプロテアーゼにも応用可能な独自の方法論の開発を行った。

(1) ノックインマウス:p94 及び nCL-2 について上述のノックインマウスを作出し、解析に用いた。

(2) FRET 基質:p94 の特異的基質と蛍光タンパク質による蛍光共鳴エネルギー遷移(FRET)基質を開発し、p94 活性を初めて検出した(Y.Ono *et al.*(2004)*J.Biol.Chem.***279**:2761-71)。

(3) p94トラップ法:酵母遺伝学を用いた p94 の活性測定系「p94トラップ法」を開発し、構造機能相関や有用変異体検索に応用した(Y.Ono *et al.*(2006)*J.Biol.Chem.***281**:18519-31; Y.Ono *et al.*(2008)*FEBS Lett.* **582**:691-698)。

(4) 活性スペクトル測定:単一ではなく多数のペプチドを同時に用いた活性検出系を、非放射性同位体ラベル(iTRAQ™)法とマスマスペクトルを用いて構築しつつあり、現在までにカルパインの基質特異性に関する新規知見を得た(Y.Ono *et al.*(2007)*Biotech.J.*2:565-76 及び投稿中)。

## [2] 骨格筋特異的カルパイン p94/カルパイン 3 の解析(反町 T+饗場 T)

急速な自己分解や遺伝子変異による LGMD2A 発症など興味深い特徴を持つ p94 は、骨格筋中で巨大タンパク質コネクチンに結合し、同じくコネクチンに結合する MuRFs, -アクチニン, MARPs などと協働している。そこで上記ノックインマウスや、コネクチンの p94 結合部位(N2A)に欠失を持ち、重篤な筋ジストロフィーを呈す *mdm* マウスを用いて p94 の生理機能を解析した。

(1) 発現様式:p94 遺伝子から普遍的に発現する分子種を発見し、血球分化やレンズ機能への関与が示唆された(Y.Kawabata *et al.*(2003)*FEBS Lett.*555:623-30)。

(2) 骨格筋内局在:サルコメア長及びプロテアーゼ活性依存的な局在を見出し、p94 活性の筋伸長感知機構への関与を示した(K.Ojima *et al.*(2007)*J.Biol.Chem.*282:14493-504)。

(3) 変異体を用いた解析:エキソン欠失型 p94 を用い酵素学的性質を明らかにし(Y.Ono *et al.*(2004)*J.Biol.Chem.*279:2761-71)、p94:N386D を用い自己消化過程などを明らかにした。

(4) 構造機能相関:p94 トラップ法で解析(Y.Ono *et al.*(2006)*J.Biol.Chem.*281:18519-31)。

(5) 差分プロテオームによる機能解析:iTRAQ™ 解析により、p94 の基質候補として翻訳伸長因子(eEF-2)、解糖系酵素などを同定した(Y.Ono *et al.*(2007)*Biotech.J.*2:565-76)。

(6) p94CS ノックインマウスの筋組織:筋障害症状を見出し、p94 のプロテアーゼ活性が正常な筋肉の恒常性維持に必須であることを明らかにし、プロテアーゼ以外の活性の存在も示唆された。

(7) p94-コネクチン関連分子:*mdm* マウスの解析から、p94 に隣接結合する MARPs の N2A への集積(C.C.Witt/Y.Ono *et al.*(2004)*J.Mol.Biol.*336:145-54)と *mdm* 型 N2A コネクチンの p94 安定化能喪失(Y.Ono *et al.*(2006)*J.Biol.Chem.*281:18519-31)を見出し、MARPs/コネクチン/p94 の相関解析からコネクチンを巨大 scaffold とした「シグナル複合体」が核へ情報伝達するモデルを得た(C.Hayashi *et al.*(2008) *J.Biol.Chem.*283, in press)。一方、M 線領域に結合する MuRF1 は筋萎縮時にクレアチンキナーゼなどをユビキチン化して恒常性維持に関与することを明らかにした(S.Koyama *et al.*(2008)*J.Mol.Biol.* 376:1224-1236)。

## [3] 胃・腸特異的カルパイン nCL-2 及び nCL-4 と胃機能の解析(反町 T)

胃・腸特異的カルパインの生理機能は一切が不明であった。そこで p94 同様の nCL-2CS ノックインマウスや、nCL-2, -4 ノックアウトマウスを作出し、解析した。また、基質との相互作用や酵素としての存在形態についても生化学的に検討した。

(1) nCL-2 の胃局在:nCL-2 の表層粘液細胞への限局を見出し、-COP が nCL-2 によって切断され、局在変化を起こす可能性を示した(S.Hata *et al.*(2006)*J.Biol.Chem.*281:11214-24)。

(2) 酵素学的解析:nCL-2 は 30K とは結合せずに C2 様ドメイン(III)を介してホモ二~多量体も形成し活性を示すことを明らかにした(S.Hata *et al.*(2007)*J.Biol.Chem.*282:27847-56)。

## [4] 酵母カルパインの解析(前田 T)

酵母カルパイン Cpl1 は、環境のアルカリ pH に応答して転写因子 Rim101 を切断することで活性化し、アルカリ適応的転写プログラムを誘導する(Cpl1-Rim101 経路)。生理的な基質(Rim101 唯一)と活性化条件(アルカリ環境)が明確なため、Cpl1 は活性制御機構の解析に好適である。Cpl1-Rim101 経路は Rim8,9,20,21 などから構成され、いずれを欠損しても Rim101 切断が不全と

なる。本研究では逆に、MVB ソーティングに関わる Vps2,4,24 のいずれかの欠損で、Rim101 のプロセシングの恒常的活性化を見出した。この経路活性化変異を用いて、今まで不明であった経路構成因子間シグナルフロー[アルカリ刺激] [Rim8, 9, 21] [Rim20, Cpl1] [Rim101 切断]を解明した。さらに包括的遺伝学的解析から、ESCRT 複合体(リソソーム/液胞内腔へと輸送されて分解されるべき膜タンパク質のエンドソーム膜上での仕分けに参与する)が、アルカリストレス条件下では Cpl1 を含む活性プロテアーゼ複合体集積のための scaffold を提供し、Rim101 の切断を引き起こすという機構を明らかとした(M.Hayashi *et al.*(2005)*Mol. Cell. Biol.***25**:9478-90)。

#### 4. 事後評価結果

##### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表：国内 9 件、海外 49 件、口頭発表：国内 46 件、海外 21 件、特許出願：国内・海外 0 件であり、質、量ともレベルは高い。さらに未発表論文が多くある。多くの疾患にカルパインが関与することを考えると、将来の薬剤開発や治療法開発を念頭に、必要最小限の特許出願は必要と考えられる。後述のように企業と連携して技術開発を行っており、今後に期待したい。

代表的論文：

- 1) Ono, Y. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 2761-71.: p94 というスプライスバリエントを用いることで今まで全く不明であった p94 の酵素活性の一部を明らかにした。
- 2) Hayashi, M. *et al.* (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9478-90.: 酵母カルパイン Cpl1 の生理機能を分子レベルで遺伝学的に解明した。
- 3) Ono, Y. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 18519-31.: p94 トラップ法を開発し構造機能相関や相互作用蛋白質との関係を明確にした。
- 4) Hata, S. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11214-24.: nCL-2 の胃表層粘液細胞への局在を明らかとし、-COP を介した細胞内膜輸送系への関与を示した。
- 5) Hata, S. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 27847-56.: ホモ多量体形成など nCL-2 の酵素学的性質を初めて明らかにした。
- 6) Ojima, K. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 14493-504.: 筋原線維形成過程の p94 局在を明らかとし局在変化の筋原線維長及びプロテアーゼ活性依存性を発見した。
- 7) Ono, Y. *et al.* (2007) *Biotech. J.*, **2**, 565-76.: プロテオーム解析により p94 の新たな基質候補分子を見出した。*Biotech. J.*の月間最多被アクセス論文 12 傑に 5、6、7 月と 3 ヶ月連続で選出された。

##### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

ノックインマウスの作出も含め、ほぼ計画通りに研究を進め、細胞内モジュレーター・プロテアーゼとしての位置付けを明白にして、当初の研究計画(提案内容)に対して、妥当な成果がでている。敢えて注文を付けると、予想外の飛躍がないことや提案では蛋白質の立体構造解析を行うことになっているが、様々な結晶化の試みを行ってはいるものの最終的な結果に結びついていない点が惜しい。全体的には、カルパインの生理的機能について、独自の系を創出し国際級の成果を出している。

カルパイン研究は日本が発信した注目される研究の一つで、国際的にも評価の高い成果を挙げつつあり、現時点では詳細な基礎研究成果だが、得られた研究成果の科学的・技術的インパクトは高く、今後の一層の発展が期待される。国内外の類似研究成果と比較しても研究成果のレベルや重要度は高く、カルパイン研究では世界の第一人者であり、国内外をリードしている。現在進行中の様々なノックインマウスの機能解析、酵母を用いたカルパインホモログの機能解析、カルパインと病態との関連分析等の研究成果がまとまれば、

カルパインの生理機能の全体像が明らかになると期待される。

#### 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

小山傑は、2004年FASEB Summer Research Conferences”Biology of the calpains in Health and Disease”で故村地孝博士を記念した”Murachi Award”を、尾嶋孝一は2007年CPIPT学会の第12回学術奨励賞を受賞した。また、KYA社とABJ社と協力し、DiNa-2D及びSpotterを使ったナノLC-MALDIの超高密度スポットティング(1 plate [12 x 8 cm]あたり現在は最大384 spotsのところを1,700 spotsに拡張した)技術の開発を行い、実用化した。