

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

研究課題

「細胞内モジュレータープロテアーゼの生理機能の解析」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：反町 洋之

(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

プロジェクトリーダー)

1 研究実施の概要

生体を構成する細胞は様々なタンパク質機能の協働によりモジュレートされる。これらのタンパク質に直接作用してその機能を調節/変換するタンパク質切断酵素である「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、かつダイナミックな構造変化を誘起しうるため、生体制御上極めて重要である。カルパインは細胞質内に存在し、基質タンパク質の消去ではなく、限定切断による基質機能の調節・変換を行う細胞内モジュレ

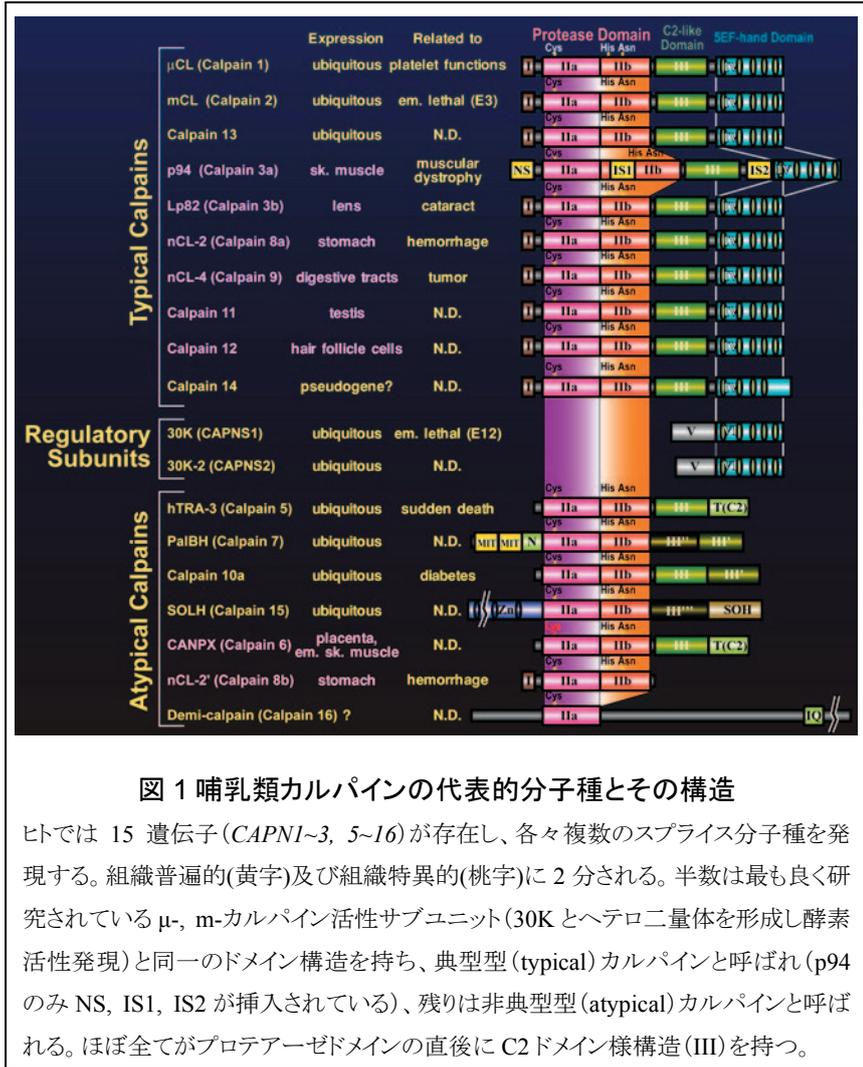


図 1 哺乳類カルパインの代表的分子種とその構造

ヒトでは 15 遺伝子 (*CAPN1*~3, 5~16) が存在し、各々複数のスプライス分子種を発現する。組織普遍的(黄字)及び組織特異的(桃字)に 2 分される。半数は最も良く研究されている μ -、m-カルパイン活性サブユニット(30K とヘテロ二量体を形成し酵素活性発現)と同一のドメイン構造を持ち、典型型 (typical) カルパインと呼ばれ (p94 のみ NS, IS1, IS2 が挿入されている)、残りは非典型型 (atypical) カルパインと呼ばれる。ほぼ全てがプロテアーゼドメインの直後に C2 ドメイン様構造 (III) を持つ。

ータ・プロテアーゼの代表であり、様々な情報伝達系や細胞形態などを制御する。しかし、特に哺乳類では多種のカルパインが様々なタンパク質と同時に相互作用するため、カルパインの *in vivo* での機能及び制御機構については、未だ不明な点ばかりである。

ヒトのカルパインは 15 の独立な遺伝子として存在し、発現は組織普遍的及び特異的に二分される(図 1)。現在約半数が遺伝学的に解析され、特に組織普遍的 m-カルパイン(活性サブユニット mCL) 及び制御サブユニット 30K のヘテロ二量体のサブユニット遺伝子のどちらかが欠損してもマウスは胚性致死となる一方で、骨格筋特異的カルパインの遺伝子変異は、肢帯型筋ジストロフィー 2A 型 (LGMD2A) を発症する。これは、前者が生命現象の基本的かつ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ものとして、特筆に値する。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って、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(骨格筋特異的 p94/カルパイン 3、胃・腸特異的 nCL-2/カルパイン 8, nCL-4/カルパイン 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。

具体的な戦略としては、活性中心の Cys 残基(図 1) 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マウス「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。これらのマウスでは、ノックアウトマウスと異なりタンパク質の正常な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である点も大きな特色である。一方、哺乳類カルパインの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た解析を行い、作用機序を遺伝学的に明確にした。これらの結果を比較解析し、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てこなかった部分にもメスを入れ、新たなパラダイムを創出することを目指した。以下、主に既発表の成果の概略を示す。

[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

上述のように既成概念を越えた解析を行うため、また、後述の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) ノックインマウスの作出:p94 及び nCL-2 の活性中心の Cys を Ser に置換した変異体を野生型の代わりに発現する「ノックインマウス」を作出し、様々な解析に用いた。

(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 の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)。

(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(iTRAQTM)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(一部 Y.Ono *et al.* (2007) *Biotech. J.* **2**:565-76 に発表)。

[2] 骨格筋特異的カルパイン p94/カルパイン 3 の解析

骨格筋特異的発現、急速な自己分解、そして遺伝子変異による LGMD2A 発症など、興味深い特徴をいくつも持つ p94 は、骨格筋中で巨大線維タンパク質コネクチンに結合している。骨格筋中で p94 は、同じくコネクチンに結合する MuRFs, α -アクチニン, MARPs などと協働して機能する(図 2)。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)に微小欠失を持つ天然変異マウス *mdm* (重篤な筋ジストロフィーを呈す; 図 17 参照)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(Kawabata, Y. *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 活性の筋伸長感知システムへの関与が示唆された(K.Ojima *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.* **282**:14493-504)。

(3) 変異体を用いた解析:IS1/IS2 欠失型 p94 Δ を用いカルパスタチン分解活性などの酵素学的性質を明らかとし(Y.Ono *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:2761-71)、ミスセンス変異体 p94:N386Dを用いて活性のイオン依存性や自己消化過程を解析した(Y.Ono *et al.* (2008) *FEBS Lett.* in press)。

(4) 構造機能相関:p94トラップ法により解析(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:iTRAQTM 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: まず *mdm* マウスの解析から、N2A で p94 に隣接結合する MARPs の N2A への集積を見出した (C.C.Witt/Y.Ono *et al.* (2004) *J.Mol.Biol.* **336**: 145-54)。さらに、p94 トラップ法により *mdm* の N2A コネクチンは p94 安定化能を失った事も見出した (Y.Ono *et al.* (2006) *J.Biol.Chem.* **281**:18519-31)。そこで、MARPs/コネクチン/p94 の相関解析の結果、コネクチンが巨大な scaffold として N2A に「シグナル複合体」を形成し、核へ情報伝達するというモデルが提唱できた (図 2)。一方、MuRF1 は UBC9 や GMEB-1 などに結合し (A.S.McElhinny *et al.* (2002) *J.Cell Biol.* **157**:125-36)、ノックアウトマウスでは筋萎縮時に CK-M をユビキチン化することで、筋恒常性維持に関与することを明らかとした (S.Koyama *et al.* (2008) *J.Mol.Biol.*, **376**:1224-36)。

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

胃・腸特異的カルパインについてはその生理機能の一切が不明である。そこで、p94 と同様の nCL-2CS ノックインマウスや、さらに nCL-2 及び-4 のノックアウトマウスも作出して、解析を行った。

(1) nCL-2 の胃局在: nCL-2 は胃の表層粘液(ピット)細胞に局限し、小腸ではゴブレット細胞に存在することを明らかにした。さらに、 β -COP が nCL-2 とゴルジ体で相互作用し、nCL-2 による切断を受けて細胞質に拡散する可能性を示した (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 (図 1、S.Hata *et al.* (2007) *J.Biol.Chem.* **282**:27847-56)。

[4] 酵母カルパインの解析

酵母カルパインホモログ Cp11 (Rim13) 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経路 (Cp11-Rim101 経路) で機能する。生理的基質 (Rim101 唯一) とプロテアーゼとしての生理的

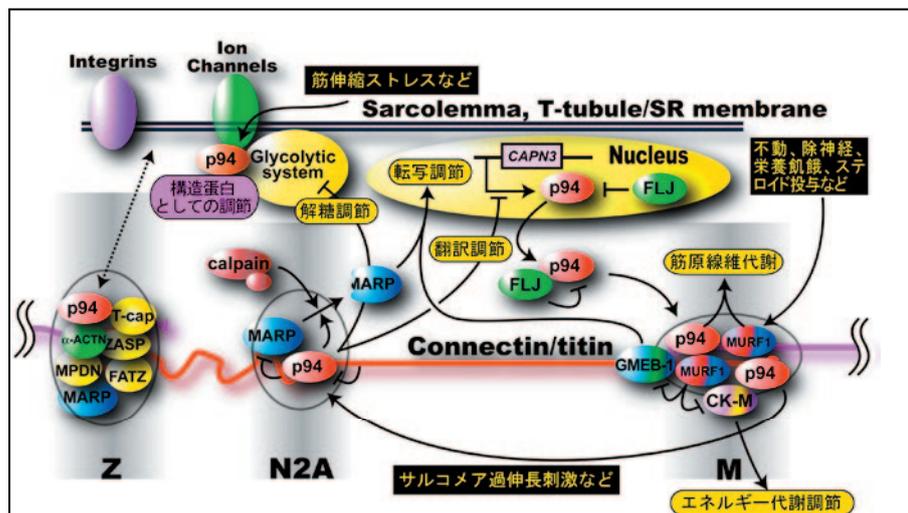


図 2 細胞外と核をつなぐコネクチンを足場とした"Signal Complex"仮説
コネクチンは一分子でサルコメア(骨格筋の伸縮を担う筋原線維の最小単位 Z-M-Z の構造)の半分(1~1.5 μ m)をつなぐ超巨大線維状弾性タンパク質である。p94 は N2A, M でコネクチン、Z で α -アクチニンに結合する。コネクチン Z, N2A, M には他にも多種タンパク質が結合する。これらの分子間相互作用がコネクチンを足場として維持・調節され、筋ストレス発生時はこれを感じて核へと情報伝達する"Signal Complex"が構成されると予測される。ここに示したネットワークが、本研究の重要な結論の一つである。

活性化条件(アルカリ環境)が明確であるため、Cpl1 はカルパイン・ファミリーの中でも活性制御機構の解析に好適である。Cpl1-Rim101 経路構成因子として Rim8, 9, 20, 21 があり、いずれを欠損しても Rim101 の切断が不全となる。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、不明であった経路構成因子間シグナルフローが、**アルカリ刺激**→**Rim8, 9, 21**→**Rim20, Cpl1**→**Rim101 切断**であることを明らかにした。さらに包括的な遺伝学的解析から、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関与する)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足場を提供し、Rim101 の切断を引き起こすという機構を明らかとした(図 25 参照、M.Hayashi *et al.* (2005) *Mol.Cell.Biol.* **25**:9478-90)。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

情報伝達を含めた様々な細胞機能を実現するために、細胞内では多くの分子が協働しているが、その中で、厳密に基質を認識し限定分解することでその機能を制御・変換する細胞質内プロセシングプロテアーゼは、その反応の不可逆性ゆえに、極めて重要かつ特異なモジュレータ因子となっている。以下に述べるように、申請者らは、このようなプロテアーゼの重要性を各々の研究の過程・分野で痛感するに至った。そこで、本提案ではこれを「モジュレータ(調節/変換子)プロテアーゼ」と捉え、その生理機能について生化学・構造生物学・細胞生物学・遺伝学などの多方面からアプローチして、その作用機序の根本原理を分子のレベルで明らかとすることを目指した。

「モジュレータ・プロテアーゼ」の代表的分子として Ca^{2+} 依存性システインプロテアーゼ「カルパイン」があげられる。カルパインはヒト(15 遺伝子存在)をはじめとして、昆虫、線虫、カビ、植物、酵母など様々な生物に存在してスーパーファミリーを形成している。その生理機能については、主に哺乳類の 2 つのカルパイン(μ -, m -カルパイン)の活性が様々な細胞機能の発現に必須であるという報告は多いが、残念ながら作用機序の根本原理を明らかにするには遠く至っていない。

カルパインは'64年に Guroff(米)及びノーベル賞受賞者の Fischer & Krebs(米)らによって初めて記述されたが、'78年に石浦・鈴木らによって酵素として精製されて以降、研究が爆発的に発展した。鈴木ら及び村地らの 2 グループによる詳細な生化学的解析、大野・鈴木らによる世界初のカルパイン一次構造決定など、日本における研究が常に世界を先導した。'91年には無脊椎動物のカルパインが Anderson(米)らによって、その後カビ、植物、酵母のカルパインが、各々 Denison(英)ら、Lid(諾)ら、前田らによって生理機能とともに見出された。ここに至ってカルパインがほぼ全生物で普遍的に機能していることが明らかとなり、カルパイン研究が世界的に拡充するとともに、関連生物学分野を大きく拡大した。

カルパインの活性制御メカニズムは、重要な研究課題であり長い研究の歴史がある。'80~'90年代に、鈴木ら、Goll(米)ら、Mellgren(米)ら、Elce(加)らなどのグループが、カルパインの Ca^{2+} 依存

性や制御サブユニットの機能についての生化学的解析を多数報告した。'99 及び'00 年に初めてカルパイン(非活性型)の全立体構造が、Elce 及び鈴木を含むグループによって独立に報告された。'02 年には活性型プロテアーゼドメインの立体構造が Davies(加)らのグループによって解明され、これらの知見に基づく構造-機能相関解析によって活性化機構の一部が明らかとなった。一方、Tompa(洪)らは既報の基質を網羅的に解析することで、今まで明確でなかったカルパインの作用部位のアミノ酸配列特異性の一部を明らかとした。さらに、活性制御について、Melloni(伊)ら、Friedrich(洪)らにより Ca^{2+} 以外にリン脂質、リン酸化、阻害・活性化タンパク質など様々な因子が提唱された。中川らはサブユニット解離や自己消化が活性を制御することを見出し、新たな方向性を示した(Nakagawa, K. *et al.* (2001) *J. Biochem.* **130**, 605-11)。しかしながら、未だに全貌の解明には程遠く、現在も活発な研究が継続している。

疾患との関連では、'95 年に初めて Beckmann(仏)らが骨格筋特異的カルパイン p94 の遺伝子変異が筋ジストロフィーLGDM2A の原因となること、小野らはその直接原因が p94 の活性・基質認識不全であることを示した(Ono, Y. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 17073-78)。その後、堀川らがカルパイン 10 遺伝子の多型と 2 型糖尿病の関連を報告し、Elce(加)ら、Greer ら(加)、Wang(米)ら、西道らはマウス逆遺伝学によりカルパインが生体の維持に必須であることを明確にし、カルパインを標的とした疾患治療・診断の可能性を示した。一方、杉田ら、西道ら、Spencer(米)らは後天的なカルパインの過剰活性化が筋ジストロフィーや虚血性疾患の病態増悪の主因である事を示し、カルパイン阻害剤の治療への応用性を示した。

本研究チームにおいて、反町らは長年カルパイン研究に従事してきたが、'89 年に骨格筋特異的カルパイン p94(カルパイン 3)を見出し(Sorimachi, H. *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20106-11)、カルパインには組織普遍的なものと特異的な分子種の 2 クラスが存在することを明確にした。その後、「組織特異的カルパイン」という新しい概念を確立するために広く検索を行い、胃特異的 nCL-2/-2'、消化管特異的 nCL-4 を同定した(Sorimachi, H. *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19476-82 他)。この頃から、国内外においても主に遺伝子レベルでの組織特異的カルパインの同定が相次いだ。組織普遍的カルパインが基本的細胞機能に関与するのに対し、組織特異的分子種の機能は各組織の生理と強く連関すると予想された。予想通り、上述のように p94 の遺伝子欠損は LGMD2A を発症することが報告されたのである。つまり、発症の分子機構の解析から、正常組織におけるカルパインの生理機能を明らかにするというアプローチが可能となった。そこで、本研究課題では、組織特異的カルパインに焦点を当てて研究を行なうもので、対象の切り取り方と解析手法の組み合わせという点で極めて独創的な位置づけとなる。そのような方向性の重要性を意識するに至ったきっかけとして、これも世界的に活発な研究対象となっている巨大筋タンパク質「コネクチン(タイチン)」と p94 との関係性を '95 年に見出した(Sorimachi, H. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 31158-62) ことの意義は大きいと考えられる。コネクチンは、'76 年に丸山らが発見した分子で、その後も木村らが独創的な研究を発表している。奇しくも '95 年には Labeit(独)らが 3 MDa に及ぶコネクチンの全アミノ酸配列を決定して研究のパラダイムをシフトし、その後現在に続く我々との共同研究が始まったのである。

一方、前田らは酵母をモデル系としたストレス応答性情報伝達経路の研究から、真核生物にお

ける浸透圧センサー分子を世界で初めて同定し、その作用機序を明らかにした(Maeda, T. *et al.* (1994) *Nature* **369**, 242-45; Maeda, T. *et al.* (1995) *Science* **269**, 554-58; Posas, F. *et al.* (1996) *Cell* **86**, 865-75)。この研究を推進する過程で、酵母の塩・アルカリストレス応答に関与する、モジュレータ・プロテアーゼの典型的事例を発見した。即ち、酵母のカルパインホモログ Cpl1 が、転写因子 Rim101 のプロセッシングを通じてこれらのストレス応答反応をモジュレートするというものである(Futai, Y. *et al.* (1999) *Mol. Gen. Genet.* **260**, 559-68)。糸状菌のアルカリ応答カスケードに相同分子の関与が報告され、我々も哺乳類の Cpl1 ホモログとして PalBH を同定し、モジュレータ・プロテアーゼによる転写因子のプロセッシングという経路は真核生物に広く保存されていることが明らかとなった。

また、饗場らはマウス遺伝学、発生工学を専門とし、脳機能について主に代謝型グルタミン酸受容体に焦点を当て、様々な先進的遺伝子操作マウス技法を用いた極めて独創的かつインパクトある研究を続けている(Aiba, A. *et al.* (1994) *Cell*, **79**, 365-75; Aiba, A. *et al.* (1994) *Cell*, **79**, 377-88; Kano, M. *et al.* (1995) *Cell*, **83**, 1223-31; Ichise, T. *et al.* (2000) *Science*, **288**, 1832-35)。上記のモジュレータ・プロテアーゼの機能解析にとって遺伝子操作マウスの手法は必要不可欠なものであり、同時に、脳機能研究においてもモジュレータ・プロテアーゼの作用機序の解明は極めて有効な鍵となる。

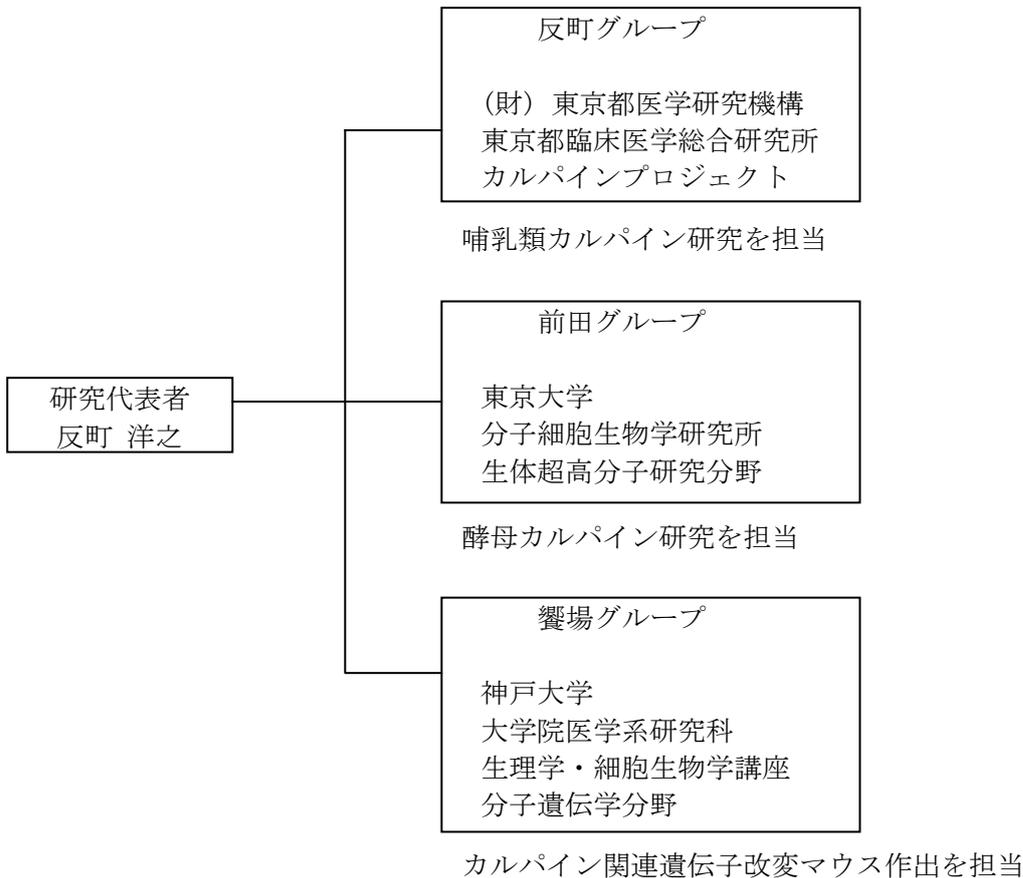
そこで我々は研究に大いなる接点を見出し、従来からの共同研究をさらに強力に推進するために、本研究計画を構想し提案するに至った。全く異なる分野・手法を持つ研究者が手を組み、各々の創造的アイデアを各所に生かして応用技術開発を並行しつつ、モジュレータ・プロテアーゼという新規概念の確立とその原理解明を目指した。

当初計画した方向性に比較しての現状はほぼ想定内であるが、本研究期間中に見出した、p94 のイオン依存性、p94 及び nCL-2 ノックインマウスの予想外の軽度な表現型、nCL-2 のゴルジ膜輸送との関連、Cpl1 のエンドソーム・液胞機能との関連などは、極めて興味深い重要な知見である。現時点では、カルパインの作用機序解明に大きな一歩を踏み出したと考えられる一方、さらに既存の概念には捕らわれない発想による解析の必要性を強く感じている。特に、複数のカルパインについて膜系との機能関連が示されたことや、カルパインがプロテアーゼ以外の機能を発揮する可能性については、ほぼ未開拓の分野であった。さらに多くの新奇な知見が埋もれていると考えられ、今後大きく展開していきたい。

ノックインマウスという方法論は、上記のようにカルパイン研究にとって有効であったが、この方法論はキーとなる少数のアミノ酸が確定している機能タンパク質全てについて有効となるはずである。本研究はその先駆的研究の一つとも考えられる。一方で、カルパインの「機能」の定義が未知のため、解析対象や方法についてゼロから構築しなくてはならないという大変さがいつも存在した。この点は、酵母カルパインの成果のフィードバックや分子種特有の性質(自己消化活性、コネクチンとの結合、C2 ドメインでの会合など)を利用して、新たな道の開拓を目指した。

(2) 実施体制

反町らが哺乳類の系において生化学的・構造生物学的解析に熟達し、前田らが酵母遺伝学、及び分子生物学的解析に通暁し、饗場らがマウス発生工学に卓越している、という利点を最大限に生かし、哺乳類 *in vitro* 系の結果の遺伝子操作マウス系での確認・発展、酵母系で得られた新規因子・モデルを基にした哺乳類 *in vitro* 系実験の立案、遺伝子操作マウス系での知見のフィードバック、という過程を繰り返すことで、効率的な新知見の発見を目指した。もちろん、各グループは独立して深く研究するだけでなく、学生や研究員の人的交流も積極的に行い、チーム全体の **vision up** も達成された。具体的には、①哺乳類カルパイン系の解析、②酵母カルパイン系の解析、③遺伝子改変マウス作出、の 3 つの系を軸として、モジュレータ・プロテアーゼとしてのカルパインとその関連分子の詳細な解析を行い、多くの細胞系に適用できるカルパインの作用機序原理を明らかにすることを目的とした。



3 研究実施内容及び成果

細胞質内のタンパク質に直接作用してその機能を調節/変換するCysプロテアーゼであるカルパインは、細胞内の代表的な「モジュレータ・プロテアーゼ」である。即ち、基質タンパク質の消去ではなく、限定切断による基質機能(活性、特異性、構造、細胞内局在、寿命など)の調節・変換を行う。その作用「ペプチド鎖切断」は、直接的かつ事実上不可逆的にダイナミックな構造変化を基質に誘起しうる。そのため様々な情報伝達系や細胞形態の制御に関与するが、特に哺乳類では、カルパインの *in vivo* での機能及び制御機構については、未だ不明な点ばかりである。

哺乳類は 15 のカルパイン遺伝子、2 つのカルパイン制御サブユニット遺伝子、1 つの内在性特異的阻害タンパク質カルパスタチン遺伝子を有し、組織普遍的及び特異的分子種が存在する(図 1 参照)。遺伝学的解析から、致死性や病態との関連が明確にされ、特に組織普遍的 m-カルパインの両サブユニットの遺伝子欠損マウスが胚性致死となる一方で、骨格筋特異的カルパイン p94/カルパイン 3 の遺伝子変異は、筋ジストロフィーを発症する。これは、前者が基本的かつ必須な生命現象に関与すると同時に、後者は各組織の特異的な機能に必須であることを明示する。よって、組織機能との関連で組織特異的カルパインを解析することにより、閉塞感のあるカルパイン研究にブレイクスルーをもたらしようと考えた。そこで本研究では、組織特異的カルパイン(骨格筋特異的 p94/カルパイン 3、胃・腸特異的 nCL-2/カルパイン 8, nCL-4/カルパイン 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。

そのために、まずノックインマウスの作出をはじめとして独自の方法論の開発を試み、これと並行して、3つのカルパイン系、骨格筋特異的カルパイン、胃・腸特異的カルパイン、及び酵母カルパイン、に注目した解析を行った。酵母カルパインは、哺乳類カルパインの作用機序を明確にするために、最も単純なカルパイン系としてとらえ、主に遺伝学的に解析した。そして、これらの結果を比較解析し、フィードバックすることにより、新たなパラダイムの創出を目指したものである。なお、本文中で引用した論文は全て本チームメンバーが関与したものである。

3.1 新規プロテアーゼ方法論の開発、応用、適用(東京都臨床医学総合研究所 反町グループ、神戸大学 饗場グループ 及び 東京大学 前田グループ)

(1)研究実施内容及び成果

カルパインは基質配列特異性が明確ではなく、ペプチド基質に対しては活性も特異性も低いことが経験的に示されている。つまり、クルードな系において、カルパインの活性だけを抽出して測定することは困難ということである。また、従来から良く研究されてきた μ -、m-カルパインが活性サブユニット(μ CL 及び mCL)と制御サブユニット(30K)のヘテロ二量体として活性を発現するのに対し、我々の対象となる組織特異的カルパイン(骨格筋特異的 p94/カルパイン 3、胃・腸特異的 nCL-2/カルパイン 8 及び nCL-4/カルパイン 9)は、その構造、活性、どのような状況で何を基質としているのか、についてほとんどが不明である。特に、p94 は他のカルパインあるいは他の全てのプロテアーゼと比較しても極めてユニークな性質、即ち、非常に強力かつ徹底的な自己分解活性を有する。

そのため、*in vitro* で生成した p94 は 10 分未満の半減期で消滅し、安定にタンパク質を精製したり解析したりすることは不可能であった。さらに、*in vivo* (骨格筋)での検出も安定化条件が不明だった

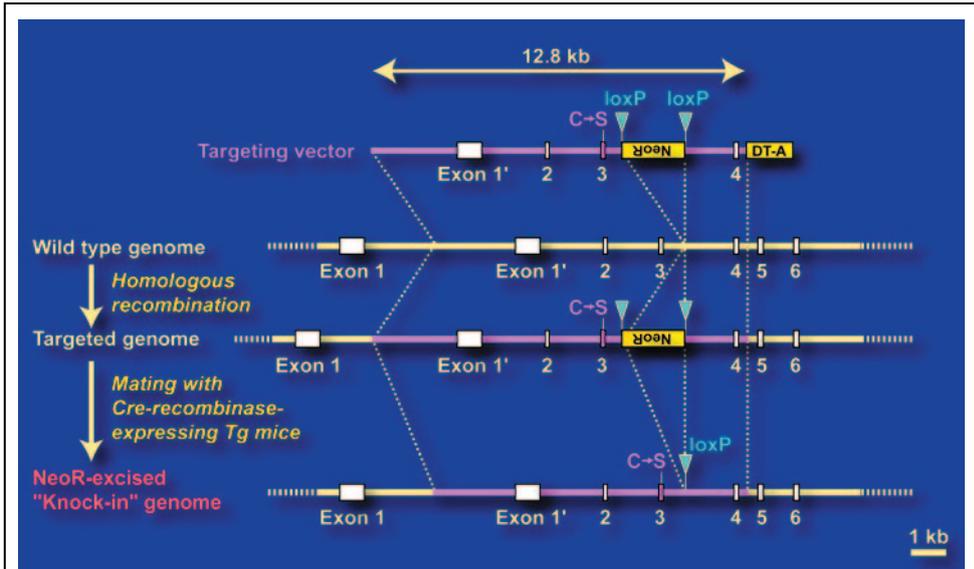


図 3 p94:C129S ノックインマウスの作出ストラテジー

変異の導入と Cre-Tg との掛け合わせによる neoR の削除の二段階により、C129S 変異以外は最小の変異配列しかないゲノムを持つマウスを作出した。nCL-2 の遺伝子構造もほぼ同様で、同様のストラテジーで nCL-2:C105S ノックインマウスを作出した。

ため、想定しうる限り万事に対して注意深く行っても、すぐに分解してしまう、という状況であった。即ち、通常の生化学的解析は現状の知見に立脚しては不可能であった。そして、p94 のみならず、nCL-2 についても、古典的なカルパイン対する方法論では不十分であった。

表 1 本研究課題で作出または使用した遺伝子変異マウス

マウス	変異遺伝子	コードされるタンパク質	変異	作出	表現型
p94:C129S ノックイン	<i>Capn3</i>	p94/calpain 3	C129S 点変異	川畑、饗場	ミオパチー他
nCL-2:C105S ノックイン	<i>Capn8</i>	nCL-2/calpain 8	C105S 点変異	秦、共同研究	解析中
nCL-2 ノックアウト	<i>Capn8</i>	nCL-2/calpain 8	欠失変異	秦、共同研究	(作出中)
nCL-4 ノックアウト	<i>Capn9</i>	nCL-4/calpain 9	欠失変異	秦、共同研究	(作出中)
PalBH ノックアウト	<i>Capn7</i>	PalBH/calpain 7	挿入変異	Jackson 社、購入	解析中
<i>mdm</i>	<i>Ttn</i>	connectin/titin	transposon 挿入	天然、共同研究	重度筋ジストロフィー
MuRF1 ノックアウト	<i>Trim63</i>	MuRF1	欠失変異	共同研究	筋萎縮耐性
Calpastatin ノックアウト	<i>Cstn</i>	calpastatin	欠失変異	共同研究	神経細胞脆弱性
<i>mdx</i>	<i>Dmd</i>	dystrophin	non-sense 変異	天然、共同研究	軽度筋ジストロフィー
SJL/J	<i>Dysf</i>	dysferlin	欠失変異	天然、共同研究	炎症ミオパチー
FVB/N-TgN(Ella-cre)C5379Lmgd		Cre-recombinase	Tg	BMS 社、購入	(Neo ^R 切除に利用)
二重変異マウス					
	<i>Capn3</i> ^{C129/C129S} , <i>Ttn</i> ^{mdm/mdm}			小野、饗場	<i>mdm</i> に類似
	<i>Capn3</i> ^{C129/C129S} , <i>Trim63</i> ^{-/-}			小野、饗場	p94CS マウスに類似
	<i>Capn3</i> ^{C129/C129S} , <i>Cstn</i> ^{-/-}			小野、林	p94CS マウスに類似
	<i>Capn3</i> ^{C129/C129S} , <i>Dysf</i> ^{-/-}			尾嶋、共同研究	解析中

そこで、これらの問題を克服して p94、nCL-2 をはじめカルパインの解析を行うために、また、さらに他のプロテアーゼ系にも応用するために、以下のような新しい手法の開発を試みた。

[1] カルパインの活性中心の Cys 残基を Ser に置換させた変異体を野生型の代わりに発現する遺伝子改変マウス(ノックインマウス)の作出

以前に明らかとしたマウス p94 及び nCL-2 遺伝子 (*Capn3* 及び *Capn8*) の構造 (Sorimachi, H. *et al.* (1996) *Biol. Chem.*, **377**, 859-64; Hata, S. *et al.* (2001) *J. Mol. Evol.* **53**, 191-203) をもとにして、活性中心の Cys129 及び Cys105 をコードする exon 3 に Cys→Ser の点変異と intron 4 に loxP 配列で挟んだ *neoR* 遺伝子とを導入し、ES 細胞にターゲティングした(図 3)。得られたマウスは C57BL/6 と 10 回以上の戻し交配を行い、以下の実験に用いた。この複雑かつ煩雑な作出戦略は、マウス遺伝学を熟知した饗場グループとの共同により初めて可能となった。

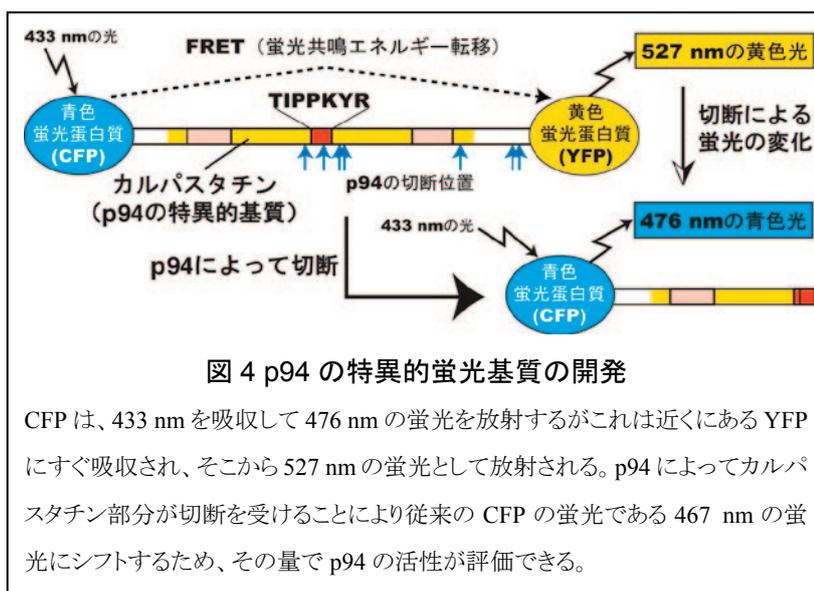
さらに、他のカルパイン分子、カルパイン関連分子などについても遺伝子改変マウスの作出、相互交配などを行い、各分子の関係について遺伝学的な解析を行った。本研究で作出・使用したマウスを表 1 にまとめた。

[2] 蛍光共鳴エネルギー遷移(FRET)技術による高感度かつ特異的な p94 の活性検出系

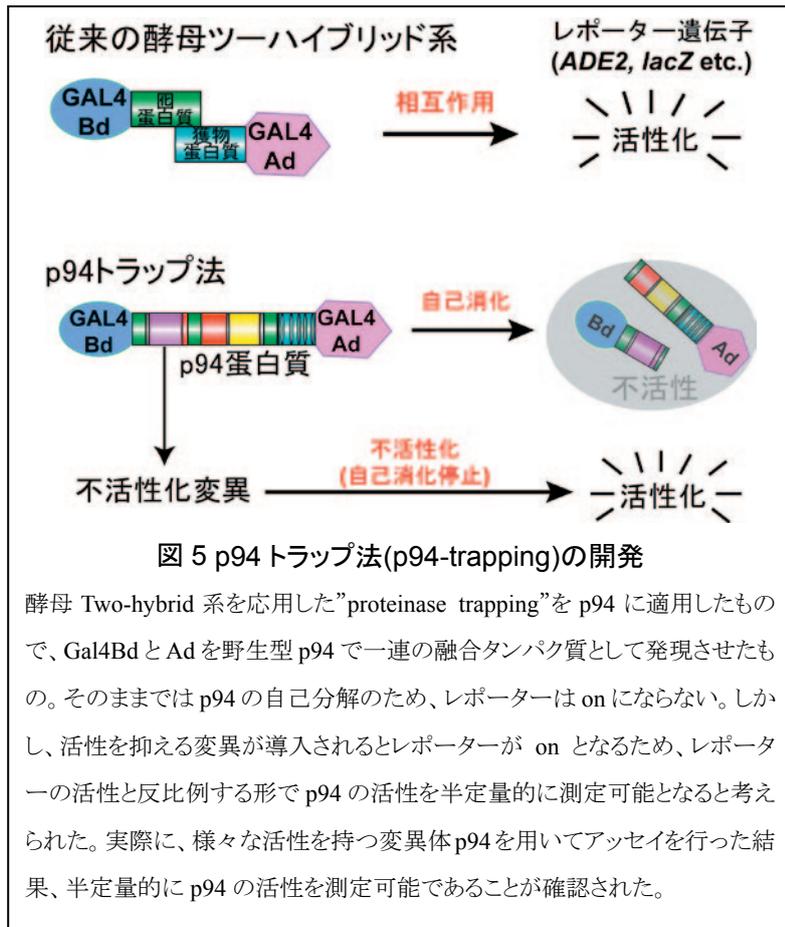
野生型 p94 を COS7 細胞に発現させると、細胞の内在性のタンパク質のいくつかが切断されることが初期の実験で見出されていた。その一つを同定した結果、p94 は μ -、m-カルパインの内在性特異的阻害タンパク質であるカルパスタチンを特異的基質とすることを見出した。そこで、カルパスタチンの阻害ユニットの N-及び C-末端に、YFP 及び CFP を融合させ、p94 がカルパスタチン部分を切断することにより蛍光波長が変化する基質をデザインした(図 4)。この基質は予想通り p94 によって特異的に切断を受け、蛍光波長の変化としてその活性を測定できることが明らかとなった。この系を用いて、COS7 細胞に発現させた野生型 p94 の活性を世界で初めて測定することに成功した (Ono, Y. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 2761-71)。

[3] 酵母遺伝学を用いた p94 活性測定系「p94 トラップ法」の開発

酵母 Two-hybrid 系では、2 タンパク質間相互作用により Gal4Bd-Ad を介したレポーター遺伝子発現が起こる。よって、Gal4Bd と Ad を一連の融合タンパク質として発現させればレポーター遺伝子が常に on となる。両者を



プロテアーゼで連結したものが”proteinase trapping”と呼ばれるものでウイルスプロテアーゼの解析に用いられた。我々はこれを p94 に応用し、「p94 トラップ法 (p94-trapping)」と名付けた。野生型の p94 で両者をつないだ場合、急速な自己分解のため、直ちに Gal4Bd と Ad が解離しレポーター遺伝子は on にならないと予想される。しかし、C129S などの活性を損なう変異が導入されるとレポーター遺伝子が on となる。よって、p94 の活性はレポーター遺伝子活性の逆数で求められると考えた(図 5)。実際に、野生型 p94、不活性化変異体 C129S、活性減弱型



酵母 Two-hybrid 系を応用した”proteinase trapping”を p94 に適用したもので、Gal4Bd と Ad を野生型 p94 で一連の融合タンパク質として発現させたもの。そのままでは p94 の自己分解のため、レポーターは on にならない。しかし、活性を抑える変異が導入されるとレポーターが on となるため、レポーターの活性と反比例する形で p94 の活性を半定量的に測定可能となると考えられた。実際に、様々な活性を持つ変異体 p94 を用いてアッセイを行った結果、半定量的に p94 の活性を測定可能であることが確認された。

変異体 R490W 及び R572Q をこの系で測定し、半定量的に活性測定可能なことを確認した (Ono, Y. et al. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 18519-31; Ono, Y. et al (2008) *FEBS Lett.*, **582**, 691-8)。この系の優れた点は、単に p94 の活性を測定するだけでなく、酵母の系における相同組み換えなど酵母の多彩な遺伝学的テクニックが利用できるため、p94 の様々な変異体のスクリーニングが可能であったことである。これは、バイアスなしの構造機能相関解析を可能とした。また、他のプロテアーゼにも応用可能なことも強調したい。これらの解析は、酵母遺伝学を熟知した前田グループとの共同により初めて可能となった。

[4] 多数のペプチド基質を同時に用いた活性検出系

従来からプロテアーゼの活性測定法としてよく使われている「特異的」ペプチド基質を用いた方法には大きな盲点がある。つまり、特異性が完全に解析されていないプロテアーゼ(実際にはほとんどのものがそうである)については、他のプロテアーゼも共存する系においては目的とするプロテアーゼ以外の活性も一緒に測定してしまうことになる。即ち、哺乳類に存在する 500 以上のプロテアーゼは、多くの未解析のものも含め、基質の嗜好性はあるものの、どのような基質に対しても活性が 1 か 0 ということはありません、そこには活性の強弱が存在するのみである。そこで、単一ペプチドをあるプロテアーゼの「特異的基質」とするのではなく、複数のペプチドを同時に切らせて、その活性を多変量(イメージとしては「スペクトル」)によって表すことで、「特異的」活性を定義すべきである、というのがアイデアである。原理

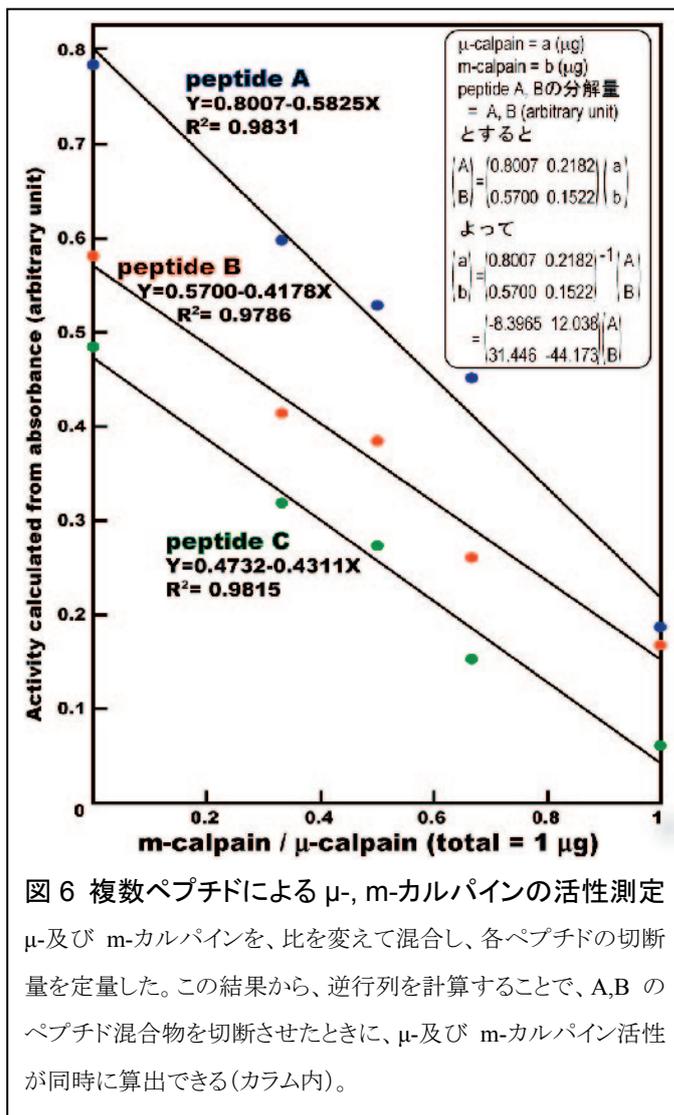


図6 複数ペプチドによるμ-, m-カルパインの活性測定
μ-及び m-カルパインを、比を変えて混合し、各ペプチドの切断量を定量した。この結果から、逆行列を計算することで、A,B のペプチド混合物を切断させたときに、μ-及び m-カルパイン活性が同時に算出できる(カラム内)。

的には、測定対象となるプロテアーゼの種類以上の数の基質を同時に用いれば、測定可能である(n 元一次方程式を解くには最低n 個の式が必要)ため、最終的にはペプチドアレイ等の手法で対象を全プロテアーゼにまで拡張可能と考えられるだけでなく、基質ペプチド情報をもとに新規阻害剤のデザインなども網羅的に可能となることを考慮した。

ここで、我々の第一の焦点は十数種のカルパインである。そこでまず、基質特異性の非常に類似する μ-及び m-カルパインと十数種のペプチドを用いてこのアイデアが可能かどうかを検証した。市販の 475 種類の蛍光ペプチド基質ライブラリーを用いて、良く切断される基質 8 種とあまり切断されない基質 3 種の計 11 種を選び、これらの混合物を用いて定量実験を行なった。反応溶液中に存在するペプチドについて HPLC による分離条件を確立し、内部標準による定量解析の条件を整えた。μ-及び m-カルパインを作用させた結果、微小な違いではあるが、各分子種の活性は 2 種の基

質の分解量の組み合わせとして記述可能であると考えられた(図6)。

しかしながら、内部標準を使用しても HPLC による定量の誤差が予想以上に大きく、基質特異性の非常に類似するプロテアーゼの同時定量にはかなりの困難が伴うことも判明し、測定法の改善が求められた。そこで、ディファレンシャル解析に用いられる iTRAQ™ 法を応用し、HPLC 測定毎の誤差を小さくすることを考えた。この方法ではナノ LC とマススペクトルを用いるため、極微量かつ高分解能の測定が可能となる(3. 2-[5]-②参照)。そこで、カルパインの基質として報告されているタンパク質から切断部位前後 10 残基の配列を選び、コントロール(ランダム)ペプチドと合わせて 20mer ペプチドを数十本合成した。これらを混合し、経時的に μ-カルパインで切断させ、iTRAQ™ により各時間のサンプルを標識した後、再び混合して解析した。その結果、切断断片は時間経過と共に定量的に増加しており、しかも、驚くべきことに、検出された断片の過半数は報告されている切断部位と同一箇所を切断を受けていた。これは、実は重要な事実を浮き彫りにしていたのである。即ち、従来「カルパインはペプチド配列を認識していない」という通念が一般的であったが、それを全く否定するものである。そのルールはまだ解明できてはいないが、カルパインは配列も認識して

いるという厳然たる事実が明らかとなった。本方法論は、カルパインはもとより、様々なプロテアーゼの活性測定に関して、従来とは全く異なる角度からの解析を可能にした。例えば、昨今取り上げられている阻害ペプチドの短い配列が特異性に及ぼす影響などについても、今後興味深い結果が得られると期待される。

(2)研究成果の今後期待される効果

以上は、研究の手法に関することについてまとめた。基本的にはカルパインをターゲットとしたものであるが、どれも他の様々なプロテアーゼの解析に寄与できる価値を有する。p94 および nCL-2 のノックインマウスは、その病態のモデルマウスになることはもとより、他の病態モデルマウスとの比較や交配によって、さらに多くの知見をもたらすであろう。FRET-基質や p94 トラップ法は生化学実験用としても重要であるが、p94 の場合は筋ジストロフィーの簡便かつ正確な診断方法としても重要になってくると考えられる。複数ペプチドによる活性測定系は、まだ未完成の段階ではあるが、マスペクトルとの組み合わせで、既に多くの応用が可能であることが示され、今後はさらに様々な方向に応用され発展されていくことが期待できる。

3. 2 骨格筋特異的カルパインの生理機能の解析

(東京都臨床医学総合研究所 反町グループ 及び 神戸大学 饗場グループ)

(1)研究実施内容及び成果

15 種あるヒトカルパイン遺伝子の中で、唯一疾患との関係が遺伝学的に明確にされているのが骨格筋特異的カルパイン p94/カルパイン 3 である。即ち、p94 遺伝子 *CAPN3* の病原性変異により肢帯型筋ジストロフィー-2A 型(LGMD2A)を発症する。この点は、p94 の解析が筋ジストロフィーの診断・治療に極めて重要であることを意味するが、これ以外にも p94 は、以下のような興味深い特徴を持つことが明らかとなっている。

① 骨格筋特異的発現を示し、心筋をはじめ他の臓器発現レベルは非常に低い(Sorimachi, H. *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20106-11)。

② IS1 及び IS2 領域(図 7)に依存した急速かつ徹底的な自己分解により *in vitro* では半減期 10 分未満で消失する(Sorimachi, H. *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10593-605)。

③ 骨格筋中ではコネクチン(後述)に IS2 領域付近で結合し、安定化している(Sorimachi, H. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 31158-62)。

これらの特徴は、p94 を他のカルパインのみにならず全てのプロテアーゼの中でユニークな存在としており、その生理機能には大きな興味が寄せられている。一方で、p94 の一次構造は、従来のカルパイン μ -及び m -カルパインと非常に類似しており、大きな違いは NS, IS1, IS2 と呼ぶ挿入的存在する領域の有無だけである(図 1, 7)。しかし、実はこれらの領域が、上記のユニークさを p94 に与えていることが明らかとなっている。そこで、従来のカルパインとの共通点と相違点を明確にしつつ、p94 の生理機能の解析を行った。

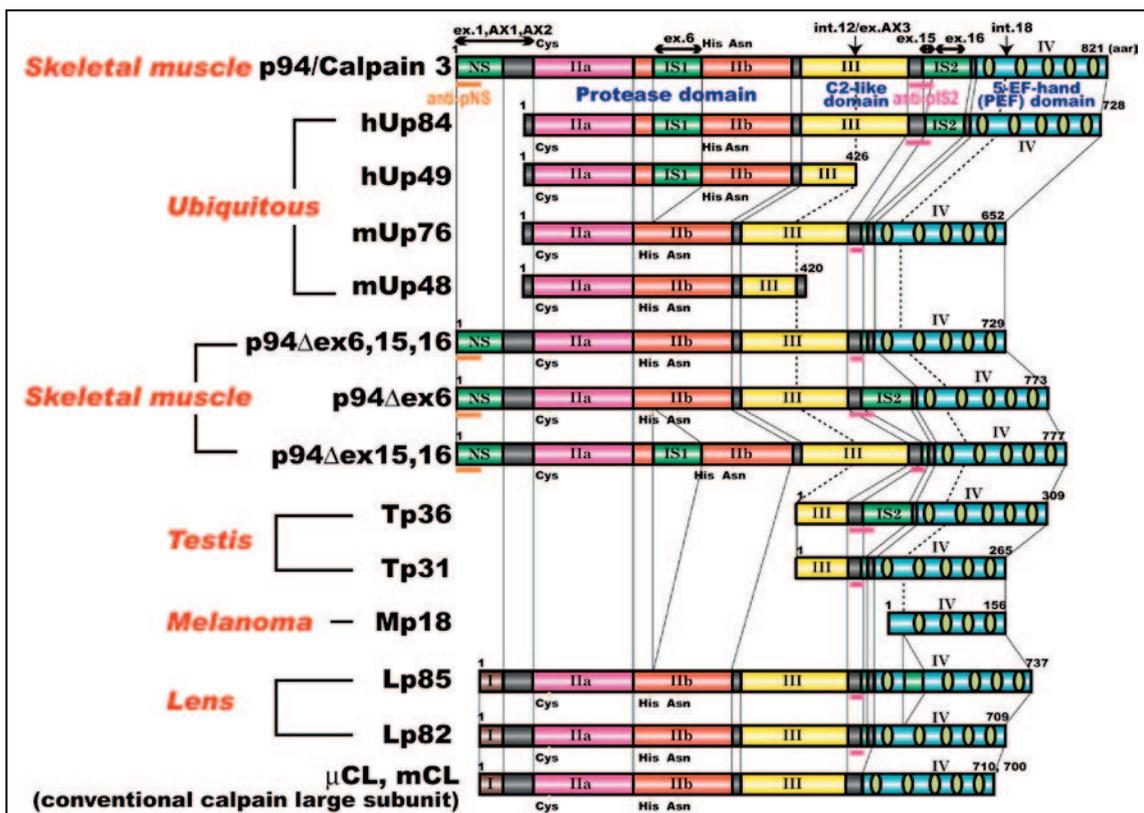


図7 骨格筋特異的カルパイン及びスプライス分子種の構造

骨格筋特異的に発現する p94/カルパイン 3 をコードする遺伝子は、少なくとも 3 種以上のプロモーターを持っており、主にエクソン 6, 15, 16 の取捨選択による多彩な構造を持つ分子種を様々な臓器に発現している(図 8 参照)。最も量の多いものが p94 であり、構造的には第 2 エクソン以降全てのエクソンを含む。Up 分子種は今回我々が初めて同定した普遍的に発現するものであり、第一エクソンの違いにより N 末端の構造が大きく異なっている。骨格筋にも、主に骨格筋の発生段階において、エクソン 6, 15, and/or 16 を欠損した分子種の発現が一過的に見られる。精巣やメラノーマではプロテアーゼドメインを含まない分子種の存在が EST から明らかとなった。レンズ特異的に発現する Lp 分子種は、霊長類では発現しておらず、げっ歯類以前の動物に発現する。ヒトでは Lp82 の代わりに hUp84 が果たしている可能性がある。Lp82 や mUp76 は μ -及び m-カルパイン活性サブユニットとほぼ同一の構造である。

また、p94 が結合するコネクチン(タイチンとも呼ばれる)は、単一鎖として地上最大かつ筋原線維の構造維持に必須のタンパク質で、分子量が 3,000 kDa 以上、長さが 1 μ m 以上もあるポリペプチドである(図 2, 17 参照)。コネクチンについて以前からの共同研究により、p94 以外にも、T-cap (Titin-capping protein (テレソニンとも呼ばれる)、Gregorio, C. C. *et al.* (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 1013-27), MuRF1 (Muscle RING-finger protein 1、Centner, T. & Yano, J. *et al.* (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 717-26; McElhinny, A.S. *et al.* (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 125-36), α -アクチニン-2 (Sorimachi, H. *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* **270**, 688-95), Myopalladin (Bang, M. L. *et al.* (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 413-28), MARPs (Muscle ankyrin-repeat protein 1-3 (各々 CARP, ANKRD2, DARP と呼ばれる)、Witt, C. C. & Ono, Y. *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* **336**, 145-54) など様々な興味深い分子と部位特異的に結合することを見出してきた。興味深いことに、p94、T-cap、コネクチンはその変異により筋ジス

トロフィーを発症し、MARPI, 2, MuRF1 は筋ジストロフィーなどの筋萎縮過程で発現が昂進する事も明らかとなった。特に、コネクチンの p94 結合部位(N2A 領域)に微小欠失を持つ天然の変異マウス *mdm* は、重篤な筋ジストロフィーを呈し、野生型と比較して体重半分以下、寿命 1/10 程度である(図 17 参照)。

そこで本研究では、この興味深い分子 p94 の作用機序や生理機能を明らかにするため、p94 及び関連分子に関して、以下のように遺伝改変マウスを中心として多面的な解析を行った。

[1] p94 の発現様式に関する解析

p94 は骨格筋特異的カルパインとして見いだしたものであるが、PCR など転写産物の検出方法の高感度化に伴い、他の臓器でも微量の発現が見られることが明らかとなってきた。また、げっ歯類にはレンズ特異的に発現する代替プロモーターと第一エクソンが存在し、Lp82(L は lens を表わす)などのスプライス分子種が発現していることも知られている(ヒトには発現していない)。そこで、骨格筋以外で発現する p94 の生理的意義を解析するため、血球系の細胞(MEL: mouse erythroleukemia 細胞、フレンド白血病細胞とも呼ばれ、薬剤刺激により赤芽球様細胞に分化する)を用いて、p94 の転写産物を検索した。その結果、第一エクソンが骨格筋に発現する p94 のも

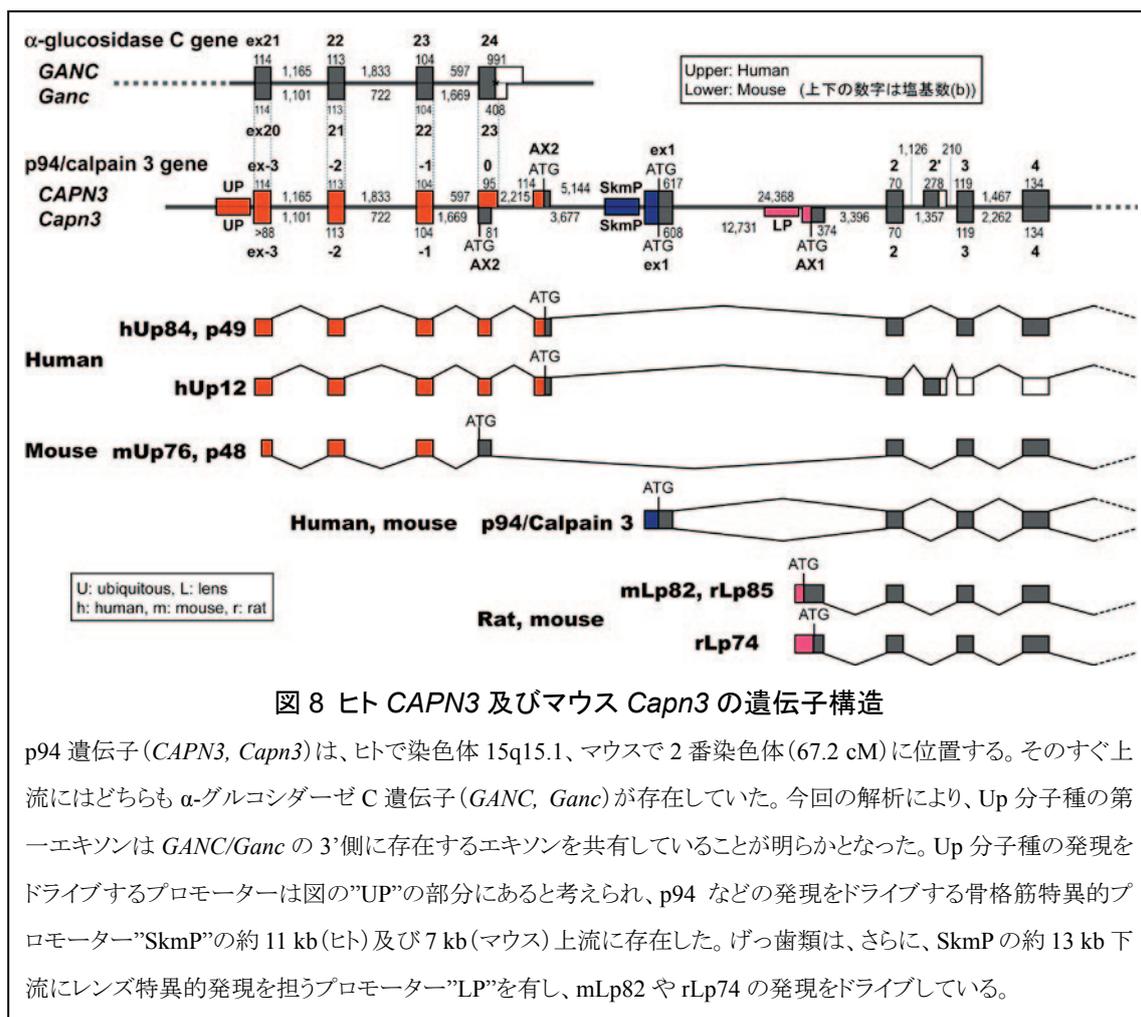


図 8 ヒト *CAPN3* 及びマウス *Capn3* の遺伝子構造

p94 遺伝子 (*CAPN3*, *Capn3*) は、ヒトで染色体 15q15.1、マウスで 2 番染色体 (67.2 cM) に位置する。そのすぐ上流にはどちらも α -グルコシダーゼ C 遺伝子 (*GANC*, *Ganc*) が存在していた。今回の解析により、Up 分子種の第一エクソンは *GANC/Ganc* の 3' 側に存在するエクソンを共有していることが明らかとなった。Up 分子種の発現をドライブするプロモーターは図の "UP" の部分にあると考えられ、p94 などの発現をドライブする骨格筋特異的プロモーター "SkmP" の約 11 kb (ヒト) 及び 7 kb (マウス) 上流に存在した。げっ歯類は、さらに、SkmP の約 13 kb 下流にレンズ特異的発現を担うプロモーター "LP" を有し、mLp82 や rLp74 の発現をドライブしている。

のとは全く異なる配列を持つ分子種が同定された。

詳細に解析した結果、新しく見出した第一エクソンは、p94 遺伝の 5'側に隣接して存在する α -グルコシダーゼ C 遺伝子 *Ganc* 内に存在していた。そこで、ヒトの相当する遺伝子構造を同定し、解析した結果、ほぼ同様のエクソン構造と転写産物の発現が、ヒト p94 遺伝子でも保存されていることが明らかとなった(図 8)。さらに、転写産物の発現を検討した結果、全ての血球系細胞をはじめ、解析した限り全ての臓器に発現が見出された。よって、この転写産物に ubiquitous の U をとり、Up84 などと命名した。第二エクソン以降にも数種類のスプライスバリエントが存在し、様々な構造の分子種が発現していることが明らかとなった(Kawabata, Y. *et al.* (2003) *FEBS Lett.* **555**, 623-30)。

同定した転写産物の中で、最も長い分子種、ヒト hUp84 及びマウス mUp76 の cDNA を用いて COS7 細胞に発現させた結果、予想通りの分子量のタンパク質の発現が確認された。さらに、活性中心の Cys を Ser に換えた不活性型変異体も同時に発現させた結果、野生型との間に発現量の差は見られなかった。hUp84 は、NS 領域を欠くが IS1 及び IS2 領域は有している。よって、これらの結果は、p94 の急速な自己分解には NS 領域も関与することを明らかとした。

Up 分子種の活性や生理的意義に関しては、今後の重要な課題の一つであるが、血球系細胞では未分化なものほど発現が多いこと、また、Lp82 の発現がないヒトのレンズでは、hUp84 の発現が代わりに見られたこと、などの事実は Up 分子種の生理機能に興味深いヒントを与えるものと考えられる。同時に、EST サーチなどにより、主に精巣やガン細胞において、プロテアーゼドメインを欠く C 末端の構造のみを有するスプライス分子種の存在も明らかとしており、p94 の多彩な生理機能の一端を垣間見たものと考えられる。

[2] p94 の骨格筋内局在に関する解析

p94 は、成熟骨格筋においては筋原線維上の Z 線、N2A 領域、M 線の 3 領域と細胞質に存在し、N2A 及び M ではコネクチンに特異的に結合している(図 1, 16 参照)。しかし、骨格筋の分化過程での細胞内局在と Z での結合ターゲットは未知であった。そこでマウス骨格筋初代培養細胞を用いて、*in vitro* で分化させた筋原線維形成過程での p94 の発現を解析した。その結果まず、骨格筋の最小運動単位サルコメアの形成初期において、p94 及び p94 結合能を持つコネクチンが発現しているにも関わらず、両者は共局在せず、サルコメア形成後に p94 は Z, M, N2A に配向することが判明した。また、p94 スプライス分子種は、全長とは異なり、主に N2A に集積した後に消滅した。これは、p94: Δ ex6 を発現させた Tg マウスの骨格筋が未成熟状態の表現型を示す事実(Spencer, M.J. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8874-79)と合わせると、発現時期に応じた p94 の局在やスプライシング分子種の変化は、各時期に存在する p94 の制御機構・因子に対する感受性に対応している、と考えることができる。

また、p94 の様々なドメインを用いた酵母 Two-hybrid 法により Z 線結合ターゲットを検索した結果、p94 の N 末端の NS 領域と Z 線の主成分である α -アクチニン-2 のロッド反復部分が特異的に結合することを見出し、*in vitro* での結合も確認した。これに関連して、p94 の抗 NS 抗体により Z 線部分が良く染色されるものの、抗 IS2 抗体では薄くしか染まらないことから、Z, N2A, M での p94 は、

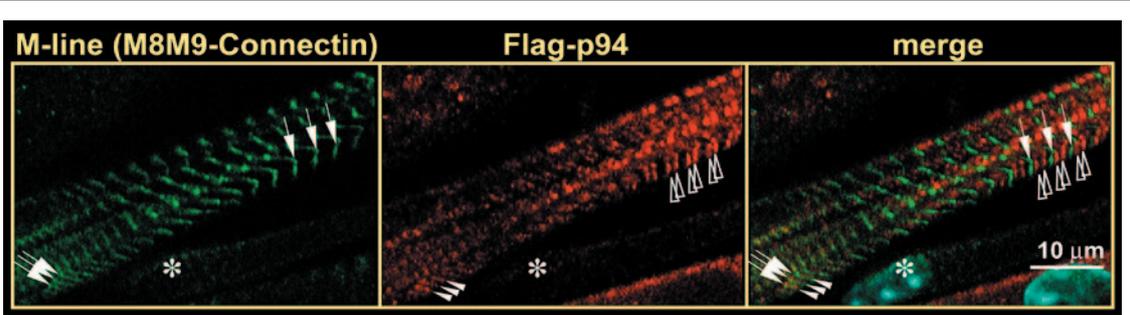


図 9 p94 の局在とそのサルコメア長依存性

骨格筋初代培養細胞に p94 を発現させると、p94 は M(緑)及び N2A に配位した。サルコメア長(左、緑線の間隔)が狭い部分(左下)では、p94 は M に位置し(白矢頭)、広い部分では 2 本の M 間に二重線として存在する(N2A と考えられる、白抜矢頭)。

必ずしも全長ばかりではなく、分解断片も含まれることが示唆された。

さらに、GFP-p94 融合タンパク質を骨格筋初代培養細胞に発現させた結果、主に M 及び N2A に局在が見られたが、興味深いことに両領域への局在割合は筋原線維のサルコメア長(Z 線間距離)に依存した(図 9)。即ち、p94 は筋伸張時(>2.6 μm)には N2A、収縮時には M に局在する傾向が認められた。さらにその依存性は、野生型に比べ不活性型 p94:C129S では鈍くなっていた(>2.8 μm)。以上の結果は、p94 が筋原線維の伸縮を監視しており、過剰な伸長などのストレスが

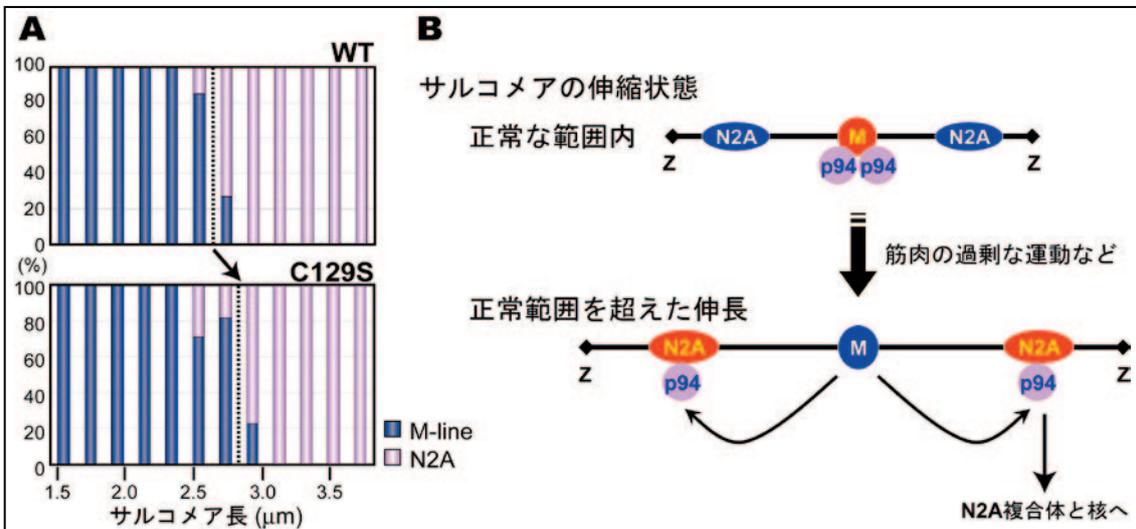


図 10 p94 のサルコメア長依存的な局在とその生理的意義(仮説)

A. 骨格筋初代培養細胞での p94 の局在(図 9 参照)を定量した結果、野生型 p94 を発現させたものでは、サルコメア長が 2.6 μm を越えると M 線での局在はほぼ見られなくなり、N2A 領域に局在することが明らかとなった。その閾値が、C129S 不活性型変異体の場合には、約 2.8 μm と、長い方へシフトしていた。B. これらの結果は、p94 はサルコメア長監視機構の一端を担っており、それが正常範囲を超えてしまうようなストレスが生じたときに M から N2A へと変位し、N2A 上にある他のシグナル分子(図 2 参照)と協働して核へと緊急信号を伝えることが考えられた。そして、M から解離する時、あるいは、N2A に結合する時に、p94 は自身あるいは M または N2A に存在する基質に対してプロテアーゼ活性を発揮することで変位をスムーズに達成していることが考えられた。

生じたときにこれを感知して p94 は局在を変化することを示唆した(図 10)。そして、そのスムーズな局在変化には、p94 を自己切断する、あるいは、結合部位にある他のタンパク質を切断するなどのための、p94 のプロテアーゼ活性が必要である事が示された。その具体的なターゲットは未だ不明ではあるが、本知見は、p94 のプロテアーゼ活性不全が筋ジストロフィーを引き起こすという現象に対し、初めての直接的データであり、その分子メカニズムに大きなヒントを与える(Ojima, K. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 14493-504)。

[3] p94 の変異体を用いたプロテアーゼとして性質の解析

先述のように野生型 p94 は強い自己分解活性により直接生化学的解析を行うのは不可能である。実際、骨格筋・培養細胞発現系からの p94 の精製は悉く失敗に終わっている。そこで、以下の 3 種類の p94 変異体・スプライズバリエーションを用いて p94 のプロテアーゼとしての性質を解析した。

① IS1 及び IS2 を持たない exon6,15,16 欠失型 p94 (p94Δ) :

p94 の最大の特徴である Ca^{2+} 非依存的活性は得られなかったが、精製可能であり、これを用いて基本的な酵素学的性質を明らかにした。それは μ -、m-カルパインに非常に類似していたが、これらのカルパインの特異的阻害タンパク質カルパスタチンを極めて良い基質とすることを明らかとした(Ono, Y. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 2761-71)。

② 活性中心を形成する Asn386 を Asp に変異した p94:N386D 変異体:

部分精製可能で、 Ca^{2+} 非依存的活性を再現することができた。自己消化活性以外は極めて活性が低かったが、自己消化の過程について詳細に解析でき、IS1 のみならず IS2 にも自己切断部位が存在することを明らかとした(一部 Ono, Y. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 18519-31 に発表)。

③ p94 トラップ法などにより同定・解析した弱活性型変異体 p94:D607A:

p94:N386D 同様に Ca^{2+} 非依存的な自己消化活性に加え、基質分解活性も示し、p94 がコネクチンを足場タンパク質として MARP2 などの基質と相互作用することを明らかとした。今後の p94 の生化学的解析にと

っても大きな意味のあるツールになると考えられた([4] 参照、Ono, Y. *et al.* (2008) *FEBS Lett.*, in press)。

[4] p94 トラップ法を用いた p94 の活性

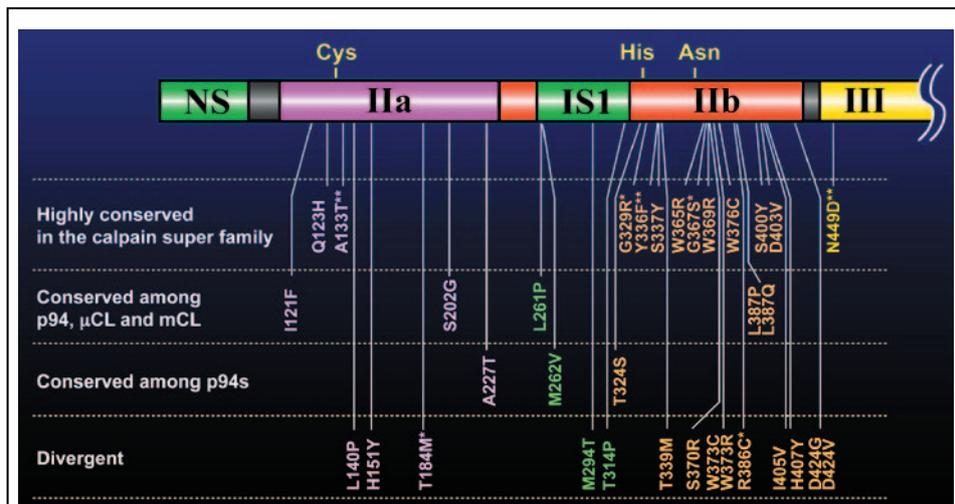
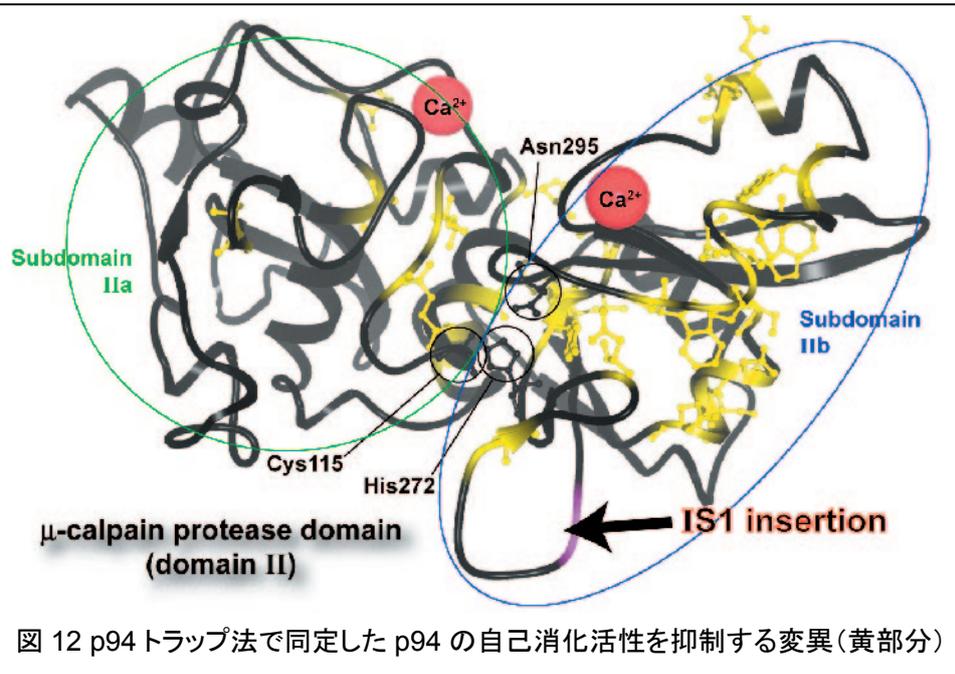


図 11 p94 トラップ法による p94 構造-機能相関解析

*(**)は LGMD2A で見出された変異と同一(位置)のものであり、この方法論の妥当性を示している。変異は必ずしも保存された残基に落ちるとは限らなかった。

制御機構に関する解析

p94 トラップ法を用いて、ランダム変異導入による p94 の構造機能相関解析を行なった。まず、プロテアーゼドメインに注目して行なった結果、LGMD2A の



病原性変異と同一あるいは同一箇所の変異が 7 種同定された(図 11)。これは、LGMD2A の病原性が p94 のプロテアーゼ活性不全によることを裏付けると共に、本解析の有効性を示した。その他新規に 26 変異を見出し、これらを活性(Ca^{2+} 結合)型 μCL のプロテアーゼドメインの立体構造(p94 のプロテアーゼドメインの構造に、IS1 を除いて良く一致していると考えられる)に投影した結果、変異は以下の 2 箇所に集中した(図 12)。

①活性中心を形成する Cys115 及び His272 を支える α -及び β -鎖

②サブドメイン IIb の側表面で IS1 挿入部分に隣接する領域

①は活性発現に両残基の位置関係が重要な事、②はおそらく、IS1 がこの領域と相互作用しており、その摂動により自己消化活性が抑制される事、を示唆する(Ono, Y. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 18519-31)。

次に、制御ドメイン(ドメイン III~IV)に注目して同様の解析を行ない、さらに多数の変異体を同定した。この中で、 Ca^{2+} 濃度の高い選択培地では生育が遅くなるもの(=活性の回復するもの)として、再び、LGMD2A の病原性変異と同一な変異 2 種を含む 22 種の変異が同定された。これらの変異体の中から、さらに Na^+ 濃度の高い培地では生育が悪いもの(= Na^+ 濃度の上昇で活性が回復するもの)を選択し、実際に COS7 細胞に発現して解析した。その結果、野生型と異なり安定に発現を示し、p94:C129S とは異なり Ca^{2+} 依存的な自己消化活性を示すものを得た。さらに、p94:N386D とも異なり、コネクチンなどの基質に対する基質分解活性も有していた。これらの変異体は、p94 の生化学的解析に極めて有用であると考えられた([3]-③参照、Ono, Y. *et al.* (2008) *FEBS Lett.*, **582**, 691-8)。

さらに、p94 とコネクチンとの相互作用形式について解析を行なった。既述のように p94 はコネクチンの N2A と M の 2 領域と相互作用する。これらの領域を含むコネクチン断片を p94 トラップ系に共発現させると、N2A 領域断片は p94 のプロテアーゼ活性を抑制すること、M 線領域断片ではほと

んど抑制効果が検出できないこと、が明らかとなった。さらに、上述したコネクチン N2A に変異を持つ重篤な筋ジストロフィーマウス *mdm* の、微小欠失を持つコネクチン N2A 領域断片は、p94 のプロテアーゼ活性抑制作用を喪失していた([7]-<a>及び図 17 参照)。以上は、p94 の *in vivo* での安定化の理由がコネクチンとの結合であること、コネクチンが p94 の活性制御に重要な役割を果たしていること、を示した(Ono, Y. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 18519-31)。

[5] ディファレンシャルプロテオーム解析による p94 の機能解析

(柳田光昭博士(順天堂大)、工藤憲一博士(KYA社)、進藤真由美博士・津幡卓一博士(ABJ社)との共同研究)

以上からも明らかのように、p94 のプロテアーゼ活性の解析と基質の同定は、p94 の生理機能研究の上で根幹をなすものである。プロテアーゼ基質の同定は、その重要性と裏腹に古来多くの研究者が苦心してきた課題でもある。今回、プロテアーゼ活性のみ消失した p94:C129S などを用いて、野生型 p94 との差分プロテオーム解析を様々な方向から試みた。

COS7 細胞に p94:C129S あるいは野生型 p94 を発現させ非放射性同位体ラベル(iTRAQ™)法

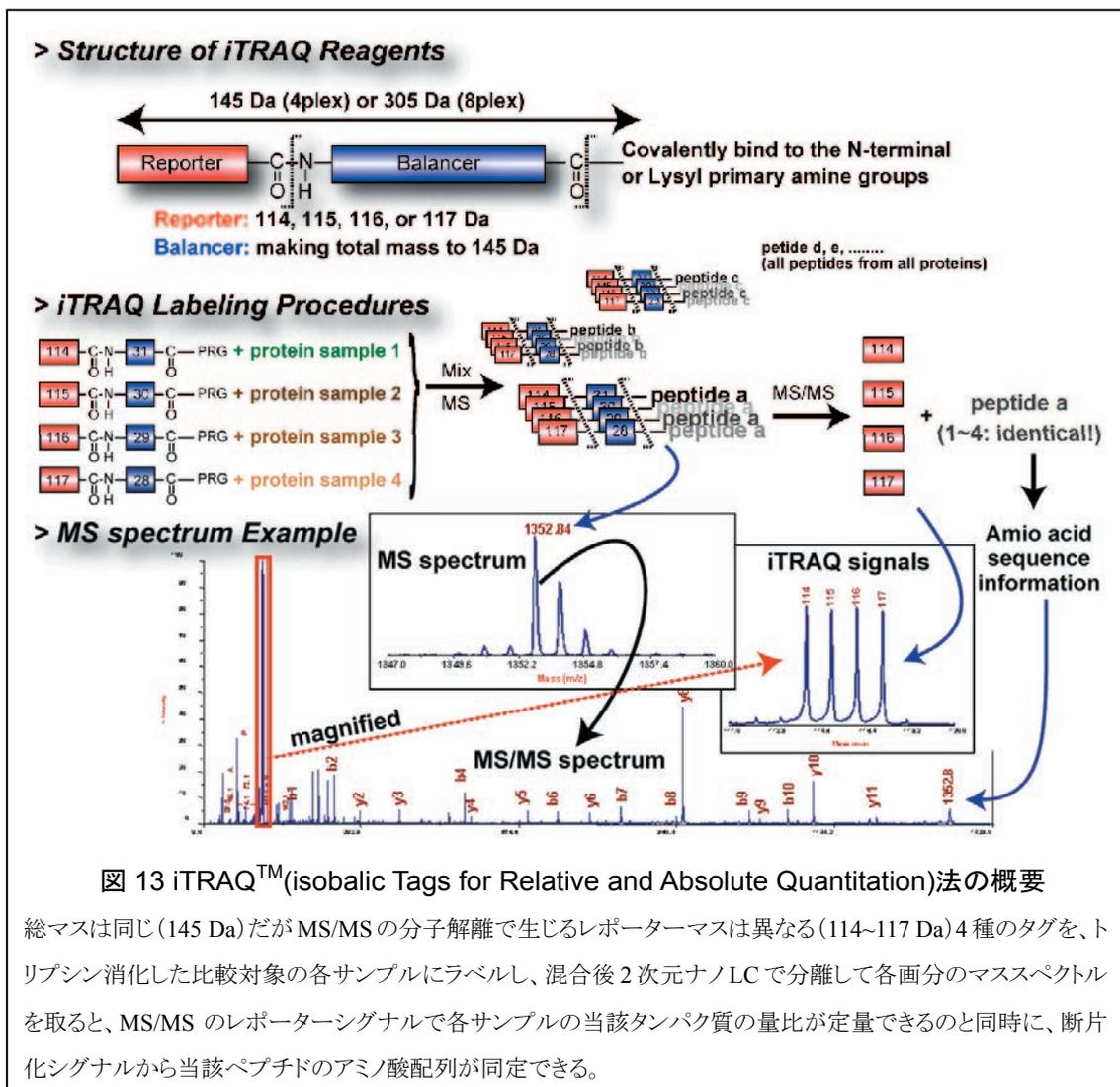


図 13 iTRAQ™(isobalic Tags for Relative and Absolute Quantitation)法の概要

総マスは同じ(145 Da)だが MS/MS の分子解離で生じるレポーターマスは異なる(114~117 Da)4 種のタグを、トリプシン消化した比較対象の各サンプルにラベルし、混合後 2 次元ナノ LC で分離して各画分のマスペクトルを取ると、MS/MS のレポーターシグナルで各サンプルの当該タンパク質の量比が定量できると同時に、断片化シグナルから当該ペプチドのアミノ酸配列が同定できる。

(図 13)を用いて差分解析を行なった。野生型 p94 は発現させるだけで、細胞内で活性化し基質を切断するのに対し、p94:C129S ではそれが起こらない。両発現細胞全抽出物の低速遠心上清を完全トリプシン消化し、異なるレポーターマシグナルを与える iTRAQ™ タグを N-末端及び Lys の ε-アミノ基に付加した。両者を混合し、2 次元 nL スケール液体クロマトグラフィーで約 1,400 の画分に分取してマスマスペクトル解析を行った。その結果、5,197 の MS/MS スペクトルを得て、そのうちの 2,926 でペプチドを同定し、タンパク質としては 593 種を同定した。iTRAQ™ シグナルの比較から、野生型 p94 を発現した細胞で顕著に量が減少するタンパク質として翻訳伸長因子(eEF-2)やアネキシンなど数種が同定され、

表 2 iTRAQ™ 法で同定された p94 の基質候補分子

順位	Protein Name	Swiss Prot Ac.No.	CS/WT (最小変化)	過去の報告	
				p94	μ-, m-calpain
1	p94/calpain3	P20807	3.02	+	
2	Eukaryotic elongation factor 1-α2 (eEF-1α2)	Q05639	1.65		+
3	eIF-3 subunit 7	O15371	1.48		
4	26S proteasome regulatory sub. 6A	P17980	1.34		
5	Filamin-A	P21333	1.31	+	++
6	Importin-7	O95373	1.28		
7	eEF-2	P13639	1.28		
8	Vimentin	P08670	1.25		++
9	Annexin A1	P04083	1.23		++
10	eEF-1α1	P68104	1.22		+
11	Annexin A7	P20073	1.21		?
12	Annexin A2	P07355	1.19		?
13	Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	1.18		?
14	Thioredoxin	P10599	1.16		
15	GAPDH	P04406	1.15		
16	Triosephosphate isomerase	P60174	1.14		

+ : 報告有り, ++: 切断サイトまで報告有り, ?: 基質かもしれないとの報告

一部はウェスタンブロット解析によって量の減少を確認した。これらの一部は既に p94 あるいは μ-, m-カルパインの基質として同定されており、本解析の妥当性を示すとともに、これらが細胞内で p94 の基質となることを示唆した(表 2)。in vitro 翻訳系を用いて p94 自身の翻訳を調べた結果、自己消化によるタンパク質生成量増加の停止だけでなく、おそらく翻訳系を p94 がダウンレギュレートすることによるタンパク量の減少が観察された。これら 2 つの独立した系での結果を合わせて、p94 が骨格筋においても翻訳伸長因子などの切断を介して翻訳の調節に関与すること、が示唆された(Ono, Y. et al. (2007) *Biotech. J.*, **2**, 565-76)。

[6] p94CS ノックインマウスを用いた解析

1998 年に他のグループから、リアノジン受容体(筋 Ca²⁺-チャネル)を含む複合体に p94 様プロテアーゼの存在を示唆する報告がなされていた。今回我々もこれを指示するデータを得た(図 14)。SR が N2A 領域に沿って密集していることを考え合わせると、p94 は SR においても調節的な役割を果たしている可能性が示唆された。つまり、細胞外からのシグナルを受け取ることができる部位に p94 は位置し、筋原線維上のシグナル装置まで、コネクチンとの相互作用などによって、そのシグナルを伝達する役割を果たすのかもしれない。そこで、我々は、これらの作業仮説の正誤を確認す

るために、p94CS ノックインマウスを用いて、個体レベル、組織レベル、細胞レベル、そして分子レベルの様々な角度から解析を行った。

① p94CS ノックインマウスの表現型

まず、p94CS ノックインマウスの筋抽出液中では、p94 が自己消化しないことを確認した。興味深いことに、野生型もノックインマウスもほぼ同量の p94 を発現していた。このことは、ノックインマウス作出の成功を示すだけでなく、*in vivo*において、p94の活性・量は厳密にコントロールされていることを示唆した。さらに筋肉の組織像を解析した結果、筋障害(ミオパチー、中心核や断裂線維像など)症状を見出して、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初めて明示的に示すことができた(図 15)。一つ特筆すべき点は、その症状が共同研究により作出・解析されたノックアウトマウス(Richard, I. *et al.* (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 1583-90)に比較すると極めて軽微であったという事実である。筋細胞中に壊死像は観察されず、筋肉の外観なども野生型と顕著な差が見られなかった。この結果は、p94 がプロテアーゼ以外の機能、例えば Ca^{2+} を感受して構造変化を起こす「機能構造タンパク質」としての機能の存在も示唆した。同時に、モジュレータ・プロテアーゼのノックインマウスによる解析の有効性を印象づけるものであった。

この点は極めて重要な示唆、即ち、p94 不全の筋ジストロフィーの治療には不活性型の

p94:C129S タンパク質が利用できるかもしれないという可能性、を与える。p94 は活性の強いプロテアーゼであるため、これを遺伝子治療などで直接用いることは、かなりのリスクを伴うと考えられる(トランスジェニックマウスの系で野生型 p94 を強発現しても全く毒性がないという報告もあるが、p94 は培養細胞に発現させただけで、細胞骨格系タンパク質の過剰な分解によって細胞が瀕死の状態になるくらいであるため、人間への適用は慎重の上に慎重を期す必要がある)。しかし、不活性型の p94:C129S では、その毒性は全くなく、多少のミオパチー症状は残るが、ジストロフィー(壊死)症状は改善され

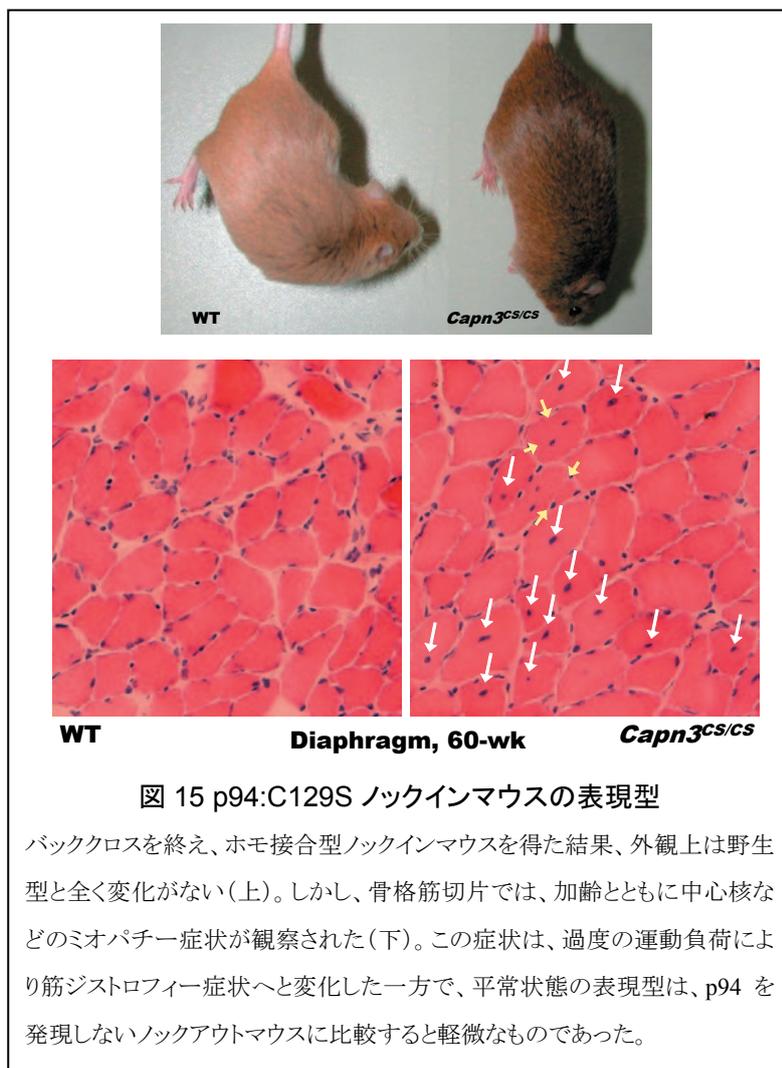


図 15 p94:C129S ノックインマウスの表現型

バッククロスを終え、ホモ接合型ノックインマウスを得た結果、外観上は野生型と全く変化がない(上)。しかし、骨格筋切片では、加齢とともに中心核などのミオパチー症状が観察された(下)。この症状は、過度の運動負荷により筋ジストロフィー症状へと変化した一方で、平常状態の表現型は、p94 を発現しないノックアウトマウスに比較すると軽微なものであった。

る可能性が高い。今後、p94 ノックアウトマウスへの transgene などにより実効性を検討したい。

さらにこの p94CS マウスに過度の運動負荷をかけた場合どのようなようになるかを解析した。その結果、平常状態では軽微な筋障害症状であったものが、運動後は明確な筋ジストロフィーを呈した。この結果は、特に筋肉使用によるストレス(負荷)のかかる状況で p94 の活性が重要であることを示している(投稿準備中)。この点は、個体レベルでの運動は、即ちサルコメア長の収縮・伸長であり、既述した *in vitro* でのサルコメア長に依存した p94 の局在変化([2]及び図 9, 10 参照)の生理的意義、また、p94 の活性によってその境界長に変化が生じることと本質的に関係すると考えられる。

② p94CS ノックインマウスの筋抽出液を用いた生化学的解析

既述したディフレンシャルプロテオームの方法論を用いて、p94CS ノックインマウス(CS)と野生型マウス(WT)との比較解析を行った。WT 及び CS のそれぞれから調製した骨格筋抽出物をインキュベートし、WT のみで量が減少するタンパク質を iTRAQ™ 法により探索した。その結果、予想外に少数のタンパク質のみに変動を見出した。これらのタンパク質には、トロポミオシンや α -アクチニンなどの筋原線維タンパク質や解糖系の酵素が含まれていた。注目すべきなのは、これらのタンパク質と p94 との相互作用が他の手法でも見出されていることであり、p94 の *in vivo* での基質の強力な候補となると考えられた。

[7] p94-コネクチン関連分子に注目した解析

(Dr Siegfried Labeit, Dr Christian C. Witt(マンハイム大)との共同研究)

既述のように p94 はコネクチンの M 線及び N2A 領域に部位特異的に結合する(図 2, 17 参照)。さらに、p94 のみでなく、コネクチン Z 線領域に結合する T-cap 及びコネクチン自身の変異により筋ジストロフィーを発症することが明らかとなっている。また、M 線領域でコネクチンと結合する MuRF1 は、筋萎縮過程での発現昂進が明らかとなった。そこで、p94 と筋機能との関係をより深く理解するため、これらのコネクチン相互作用分子についても p94 との関連を考えながら解析した。

<a> N2A 領域: コネクチン変異マウス *mdm* と MARPs に注目した解析

既述のように *mdm* マウスはコネクチン N2A 領域に小欠失変異を有し、ホモ接合型は重篤な筋ジストロフィーを呈す(図 17 参照)。そこで *mdm* マウスの骨格筋を、DNA マイクロアレイ解析を含め、詳細に解析した結果、コネクチンの N2A 領域上で p94 に隣接して結合する MARP1(主に心筋に発

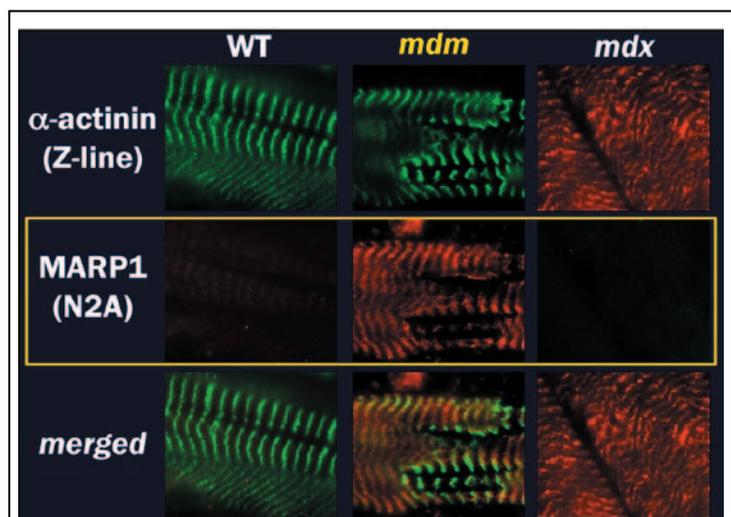
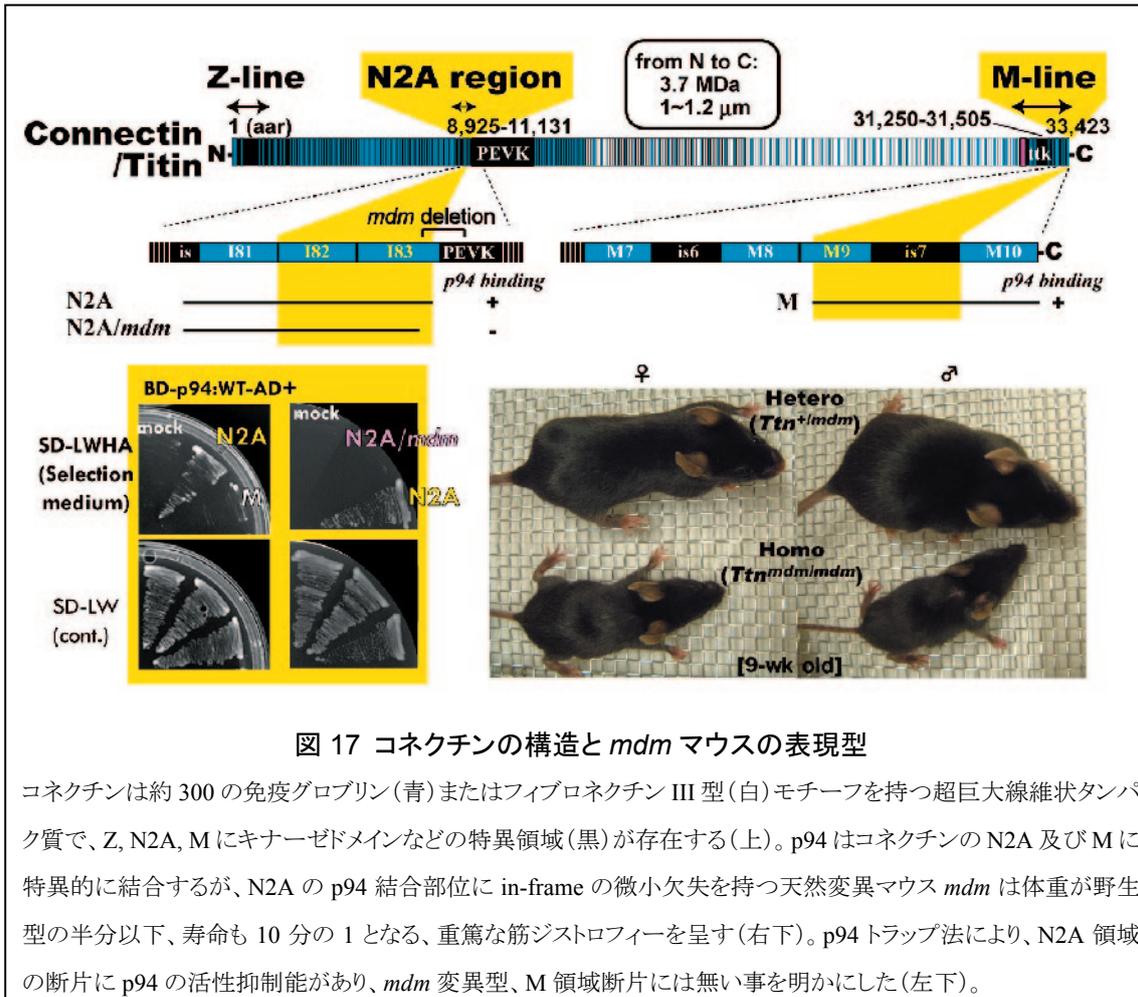


図 16 *mdm* マウスにおける MARP1 の集積

mdm マウスでは野生型に比較して MARP1, 2 の量が増加し、N2A への集積も見られる。*mdx* マウスも筋ジストロフィーを呈すが、MARPs の集積は見られない。



現) 及び MARP2 (主に骨格筋に発現) の発現が昂進し、N2A 領域に集結していることが判明した (図 16)。MARP1 と 2 は各々ホモダイマーを形成するのみならず、YB-1 や p53 などの転写因子を含めた他の分子とも相互作用して核へ移行することが知られている。おそらく *mdm* 骨格筋における筋ジストロフィーのストレスを感知し、コネクチンを介して情報を核へと伝達する過程を観察していると考えられた (Witt, C. C. & Ono, Y. *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* **336**, 145-54)。また既述のように、p94 トラップ法による解析により、この *mdm* 型コネクチンは p94 との結合・安定化能を失っていることも明らかとなった (図 17、[4]参照)。

さらに、MARPs とコネクチンと p94 の三者の関係を解析するため、これらを培養細胞に共発現させて、相互作用の多変量解析を行なった。結果は複雑であったが、以下のことが明らかとなった。

① コネクチン N2A-PEVK 領域は p94、 μ -カルパイン、及び細胞内未知プロテアーゼにより数カ所で切断を受け、その結果、MARPs は結合サイトごと切り出される。

② ①の中で最も重要な切断部位は *mdm* 型コネクチンの欠失領域に存在し、*mdm* 型欠失を持つ N2A-PEVK コネクチンは切断に抵抗性を示す。

③ p94 は Two-hybrid 法などで同定した領域以外にも、コネクチンの局所構造に依存して複数箇所で直接コネクチン N2A-PEVK 領域断片と結合する。

④ M 線領域と同様に、PEVK 領域も p94 の全長構造を認識して結合する (*cf.* N2A 領域は p94

の IS2 付近の短い配列のみで結合可能)。

⑤ コネクチン N2A 領域は MARP1, 2, 3 のいずれとも結合して、その強さは以下の通りである。

$$\text{MARP1} \approx \text{MARP3} \gg \text{MARP2}$$

⑥ MARP2 は μ -カルパイン及び p94 により N-末端の切断を受け、おそらくコネクチン以外の分子との相互作用様式に変化を生じる。

⑦ p94 及び MARP1 のコネクチンへの結合は MARP2 とコネクチンの結合と競合する。

これらの結果は、*mdm* マウスにおける MARP2 の N2A 領域集積の分子の実体を明確にするとともに、コネクチンが筋原線維中で巨大な scaffold として機能し、p94 の結合する N2A 領域に「シグナル複合体」を形成して、筋細胞膜外からの情報を核へと伝達していることを示唆した(図 2 参照)。そして、この分子ネットワークは、コネクチンの局所構造、p94 のプロテアーゼ活性、p94 及び MARPs の結合サイトの競合などにより、巧妙かつダイナミックにモジュレートされており、最終的に MARPs が核へのメッセンジャーとして機能する可能性を示した。特に、*mdm* マウスにおける欠失は、コネクチンの局所的構造変化と p94 結合サイトの 1 つの欠損を引き起こすため、この分子ネットワークのバランスを狂わせ、その結果として重篤な筋ジストロフィーを引き起こしている可能性が考えられた(Hayashi, C. *et al.* revised manuscript submitted)。

 M-line 領域: 筋特異的 RING タンパク質 MuRFs に注目した解析

MuRFs は、RING-finger/B-box/coiled-coil/酸性領域(RBCC)構造を持つ TRIM ファミリーの一員である。コネクチン M-線領域のキナーゼ領域(ttk)に隣接して結合し、その位置は逆方向のコネクチンの p94 結合部位と一致する(図 2 参照)。既に、MuRF1 の結合分子として MuRF1, 2, 3, UBC9, PIAS1, ISOT3, グルココルチコイド調節因子結合タンパク質 1(GMEB-1)を同定してきた(Centner, T. & Yano, J. *et al.* (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 717-26; McElhinny, A.S. *et al.* (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 125-36)。一方、MuRF1 が筋萎縮時に発現昂進し、心筋トロポニン I に対するユビキチンリガーゼ(E3)であること、MuRF1 遺伝子破壊マウスでは筋萎縮耐性を示すことが他グループから報告された。我々は野生型(WT)及び MuRF1 遺伝子破壊マウス(KO)に対して、アミノ酸欠乏条件下(グルコース及び水は自由摂取できる条件)での飼育(7日間)を行って筋萎縮を誘導し、以下の点を確認した。

- ① WT における MuRF1 の発現昂進
- ② WT, KO 両マウスでの MAFbx/Atrogin-1(筋萎縮に関与するもう一つの E3)の発現誘導
- ③ KO における筋萎縮抵抗性
- ④ 絶食(水のみ)などに比べ非常に穏やかな体重減少傾向

これらは、除神経や尾部懸垂による不動などが原因の筋萎縮と、同様の個体レベル、分子レベルでの反応であり、我々の実験系の妥当性を示すものである。さらに新規知見として、以下の点を明らかにした。

- ⑤ 血清中の分岐鎖アミノ酸量が KO で有意に低下していた。
- ⑥ 野生型ではタンパク質の *de novo* 翻訳抑制が引き起こされたのに対し、KO ではこの抑制は脱抑制されていた。

⑦ MuRF1 は筋型クレアチンキナーゼ(CK-M、MuRF1 と同様に M 線に存在する)と B-box 領域を介して相互作用する。

⑧ CK-M は MuRF1 によってユビキチン化を受ける。

⑨ アミノ酸欠乏時に CK-M の筋細胞内量が KO に比べ、WT で有意に減少する。

さらに、筋肉ではグルココルチコイド受容体のアゴニスト投与により MuRF1, MAFbx の発現が昂進することが報告されている。上述のように我々は共同研究により、MuRF1 がグルココルチコイド調節因子結合タンパク質(GMEB-1)とも相互作用することを見出していたが、今回 GMEB-1 も MuRF1 依存的にユビキチン化を受けることを明らかとした。また、Val の代謝の重要な酵素であるヒドロキシインドロキソ酪酸脱水素酵素(HIBADH)に関しても、酵母 Two-hybrid 系において相互作用が示唆されていたが、この酵素も実際に MuRF1 でユビキチン化されることを見出した。

これらの結果は、MuRF1 が CK-M を介したエネルギー代謝、翻訳系を介したタンパク質代謝、グルココルチコイドを介した筋増殖系などに多面的に働きかけて筋肉の恒常性を維持するのに機能していることを明らかとした(図 18) (Koyama, S. *et al.* (2008) *J. Mol. Biol.*, in press)。今回は、MuRF1 や CK-M と同じく M 線に存在している p94 との関係を見出すことはできていない。しかし、これらの分子が他の M 線構造タンパク質も含め、既述の N2A 領域におけるものと同様な「シグナル複合体」を M 線領域に形成し、例えば最終的に GMEB-1 を介して核へと情報を伝達している可能性が示された。一方、Z 線については不明な点が多いが、p94- α -アクチニン/FATZ-コネクチン

クチン
-T-cap/ ミ
オチリンな
ど多様な
分子間相
互作用は
既に見出
されており、
ここでも同
様な複合
体の存在
が示唆さ
れる。よっ
て、Z、
N2A、M
の 3 領域
からのシ
グナル複
合体の協
働性を視

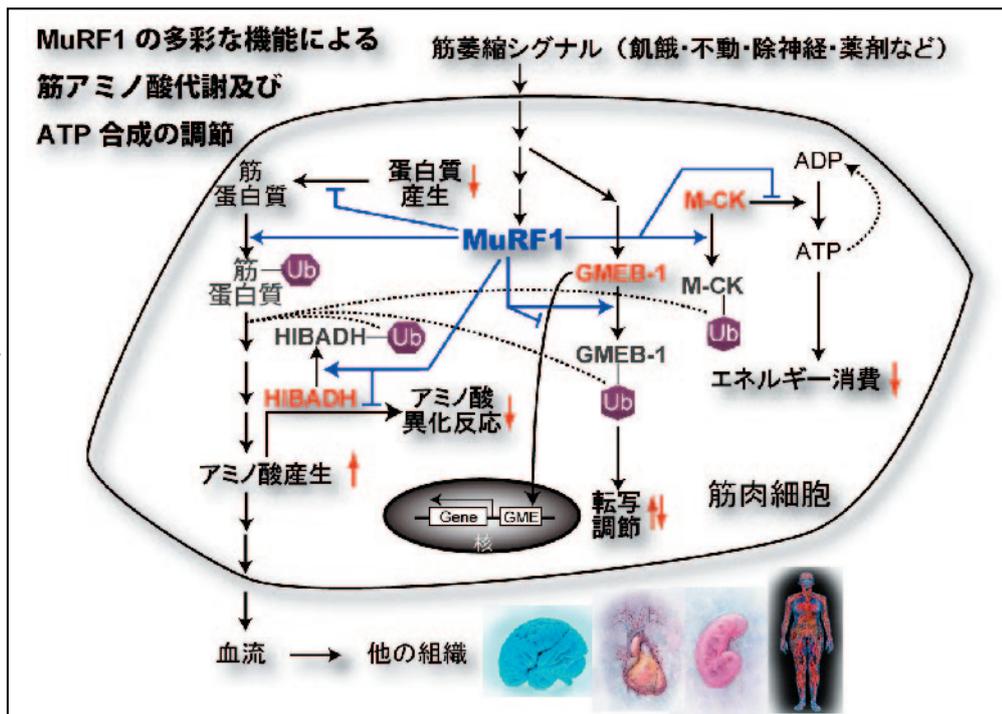


図 18 明らかとなった MuRF1 の多彩な生理機能

筋萎縮シグナルに応じ、MuRF1 は M-CK(筋型クレアチンキナーゼ)の E3 としてエネルギー代謝に、GMEB-1(グルココルチコイド調節因子結合タンパク質-1)の E3 として転写調節に、また、HIBADH の E3 としてアミノ酸代謝に関与し、*de novo* タンパク質合成抑制と筋原線維タンパク質分解によりアミノ酸産生を増加させる。

野に入れ、今後さらに解析していきたい(図 2 参照)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

p94 の細胞生物学的な解析と合わせて、p94 と機能的・物理的に相互作用する分子群の同定し、その解析を進めた結果、骨格筋内にはどうやらコネクチンを scaffold として、細胞外から核までをつなぐ、巨大かつ多数のメンバーを含むシグナル伝達系が存在することが明確になってきた(図 2 参照)。具体的には、p94 はそのプロテアーゼ活性と未知の機能を併せ持っており、MARPs, MuRFs, FLJ などと相互作用することでこのシグナル系の伝達力をモジュレートしている、ということを考えている。これらの分子は、今後の p94 生理機能解析においても中心的な役割を果たすだけでなく、筋ジストロフィーLGMD2A の診断・治療方法を考える上でも大きな知見となるだろう。また、前節でも述べたが、p94 の解析の過程で開発・使用した様々な手法は他のカルパインやプロテアーゼに広く応用可能である。特に iTRAQ™ を用いたディファレンシャル解析は、設備さえあれば、極めて簡単に実験できる方法として、今後も広く活用されると考えられる。

3. 3 胃・腸特異的カルパインの生理機能の解析(東京都臨床医学総合研究所 反町グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1993 年及び 1998 年に我々が見出した胃特異的カルパイン(nCL-2/カルパイン 8; Sorimachi, H. *et al.*, (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19476-82) 及び消化管特異的カルパイン(nCL-4/カルパイン 9; Lee, H. J. *et al.* (1998) *Biol. Chem.* **379**, 175-83) についても p94 と同様に興味深い性質、そして、胃腸疾患との関連が示唆されている。そこで、ノックインマウスを用いた遺伝学・生化学的解析を中心として、その生理機能の解明を目指した。

[1] nCL-2CS ノックインマウス及びノックアウトマウスの作出とその解析

(田中啓二博士・千葉智樹博士・村田茂穂博士(臨床研)、崎村建司博士(新潟大)との共同研究)

nCL-2 の生理機能を個体レベルで解析するため、p94 と同様の活性中心変異(C105S)体ノックインマウス(nCL-2CS マウス)を作出し、これを用いて実験を行った。nCL-2CS マウスは、野生型と同様に生殖可能であり、平常の状態では、解析したかぎり特に

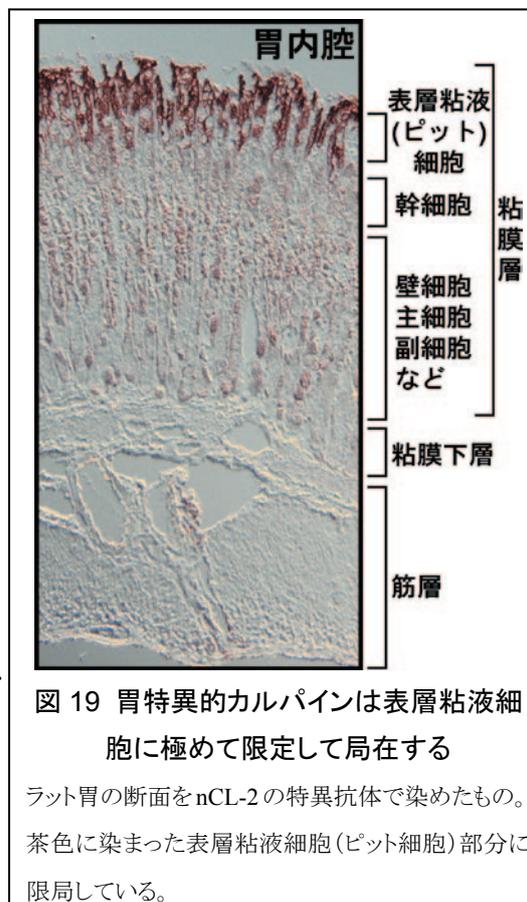


図 19 胃特異的カルパインは表層粘液細胞に極めて限定して局在する

ラット胃の断面を nCL-2 の特異抗体で染めたもの。茶色に染まった表層粘液細胞(ピット細胞)部分に局限している。

顕著な表現型を示さなかった。胃は精神的ストレスの影響を強く受ける器官として知られているため、様々なストレス下での胃の状態を現在解析中である。また、コントロールとして、nCL-2 を全く発現しないノックアウトマウスも解析に必要であると考え、こちらの作出も計画している。今後野性型及び nCL-2CS ノックインマウスとの比較解析を行っていきたい。

[2] nCL-2 の局在解析

胃組織の切片を *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 及び免疫染色した結果、nCL-2 は胃の表層粘液細胞 (食物と接触し、胃酸から胃を保護する粘液を分泌する細胞で、ピット細胞と呼ばれる) に極めて限定的に存在することを明らかとした (図 19)。組織普遍的な発現を示す μ -及び m -カルパインについては、このような局在は観察されず、量の多少はあるが胃細胞全体に分布していた。興味深いことに nCL-4 も nCL-2 と同様に表層粘液細胞への局在が観察された。さらに、小腸、大腸に関しても解析した結果、胃に比較すると極めて弱い明確な小腸ゴブレット細胞 (ムチン分泌細胞) への局在が確認されたが、大腸では検出限界以下であった (Hata, S. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11214-24)。

[3] nCL-2 相互作用タンパク質の同定

さらに、分子レベルで nCL-2 の生理機能を解析するため、酵母 Two-hybrid 法によるスクリーニングを行った。その結果、

TOM70 (Tranlocase of outer membrane, ミトコンドリア前駆体タンパク質インポート受容体)、nucleoside diphosphate (NDP) キナーゼ (NM23-M2, -M3)、eyes absent ホモログ (Eya1, Eya2)、 β -COP (coatamer 複合体 (COPI) β サブユニット)、Gタンパク質経路サブレッサー 1 (GPS1)、ビメンチン、デスミンが相互作用タンパク質候補として同定された。こ

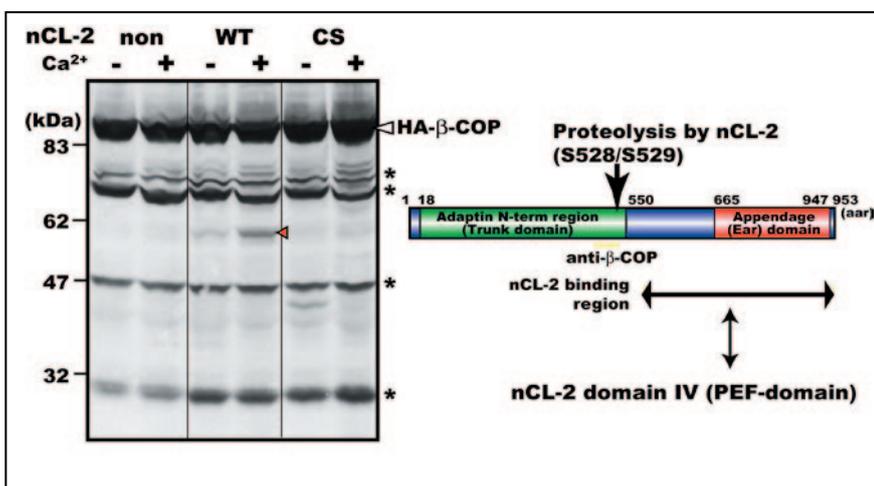


図 20 胃特異的カルパインは β -COP をドメイン間で限定的に分解する (左) 野生型 (WT) あるいは C105S 変異体 (CS) の nCL-2 と HA タグ β -COP を COS7 細胞に発現し、 Ca^{2+} の有り (+) または無し (-) の状態でインキュベートして、anti-HA 抗体でウェスタンブロットしたもの。WT のみに Ca^{2+} 依存的な切断断片の増加が見られた (赤三角)。同じ大きさの断片は、精製した組換え nCL-2 を用いた場合、 Ca^{2+} -イオノフォアを用いた場合にも観察された。(左) *in vitro* で β -COP を切断したものの N 末端の配列を決定した結果、S528 と S529 の間、即ち、N 末端のアダプチンドメインの C 末端付近で切断されることが明らかとなった。 β -COP の nCL-2 結合領域は C 末端の Ear ドメインであり、nCL-2 のドメイン IV (PEF ドメインと結合することも明らかとした。

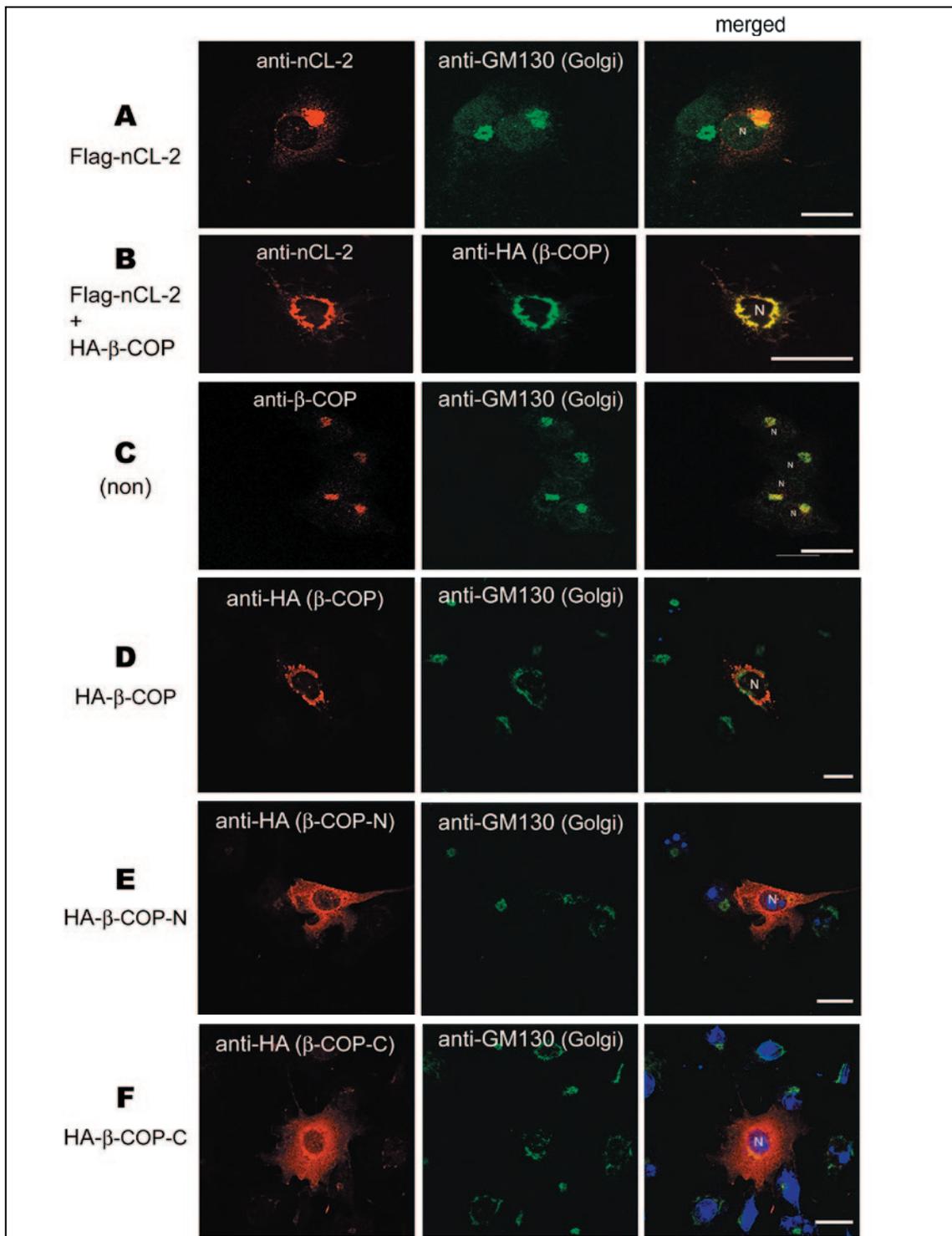


図 21 nCL-2 と β -COP の COS7 細胞内局在

発現させた nCL-2 はほぼ全てゴルジ体に局在を示した (A)。さらに β -COP を共発現させるとゴルジ体で完全に共局在した(B)。nCL-2 の発現の有無、 β -COP の強発現の有無で β -COP の局在に変化はなかった (A~D)。nCL-2 に切断された断片と同じ構造の β -COP 断片 (HA- β -COP-N 及び-C) を発現させると、全長とは異なり、細胞質に拡散して存在するようになった (E, F)。

のうち少なくとも TOM70、 β -COP、NM23-M2、GPS1 については *in vitro* での結合が確認された。これらの胃での局在を ISH 及び免疫組織染色で解析した結果、NM23-M2 は検出感度以下、TOM70 及び GPS1 は主に増殖帯で発現、 β -COP 及び Eya2 がピット細胞～増殖帯に発現していた。

そこで、 β -COP に注目してさらに解析した結果、COS7 細胞に nCL-2 と共発現するとゴルジ体～小胞体 (ER) に共局在すること、免疫沈降で共沈することを見出した。さらに、活性ある nCL-2 を、大腸菌 cold-shock 系により高比活性な組換えタンパク質として大量に発現・精製する系を確立し、これを用いて様々な *in vitro* の解析を行なった。その結果、 β -COP は、組織普遍的な μ -カルパインよりも nCL-2 により、N 末端のアダプチンドメインを切り離すように速やかに切断されること (図 20)、 γ -COP (β -COP のホモログで COPI のサブユニット) や β 1AP2 (ゴルジ体からの分泌 (クラスリン) 小胞を覆うアダプチン複合体のサブユニット) も基質となることを見出された。さらに培養細胞系で、 Ca^{2+} -イオノフォアによる nCL-2 の活性化により、 β -COP の切断を確認した。また、nCL-2CS ノックインマウスの胃ピット細胞における β -COP をウェスタンブロットで解析した結果、切断断片と考えられる 60 kDa のバンドが、野生型に比べてわずかに減少していることが明らかとなった。

この切断の生理的意義をさらに検討するため、 β -COP の nCL-2 により切断される位置をアミノ酸

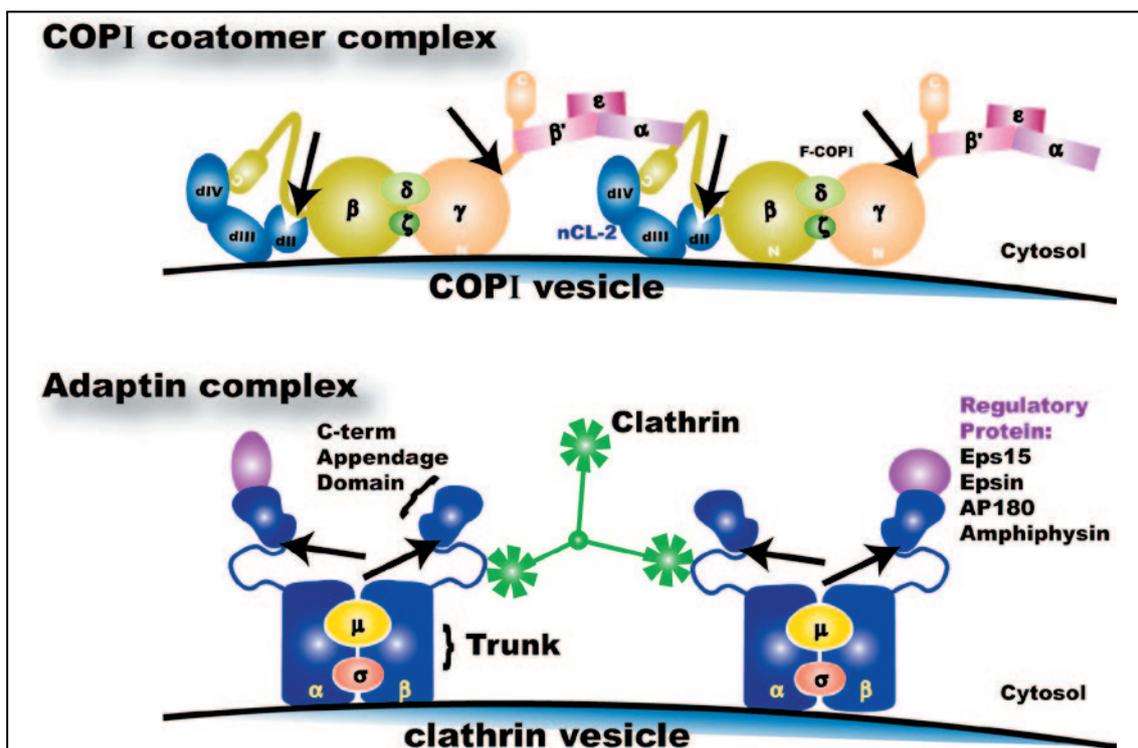


図 22 β -COP の構造と COPI 及び clathrin 小胞複合体

γ -COP 及びアダプチン AP 2 は、 β -COP と同様に N-末端側に Trunk ドメイン、C-末端側に Ear ドメインを持ち、リンカーで接続されている。さらに、他のサブユニットが結合し、小胞膜上を覆う巨大な複合体 COPI coatomer 及びアダプチン複合体を形成する。nCL-2 は、これらのリンカーにごく近い位置 (矢印) を切断し、これらの複合体を速やかに解離させる可能性が考えられた。

配列分析によって同定し、切断断片を培養細胞に発現させた。その結果、全長 β -COP がほぼゴルジ体に局在するのと対照的に、N 末及び C 末端断片の両方とも細胞質に拡散して存在することを見出した(図 21)。よって、nCL-2 は COPI 複合体やアダプチン複合体解離の新しいメカニズム、即ち、 β -COP、 γ -COP、AP2 などの”ear”ドメインと呼ばれるヒンジ構造部分を切断して、COPI 複合体全体のゴルジ膜からの解離を促進する、という可能性が考えられた(図 22、Hata, S. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11214-24)。

以上のデータは、nCL-2 が胃ピット細胞内のゴルジ体～ER のメンブレントラフィックに関与し、粘液等の生成あるいは分泌に関与する事を強く示唆する。今後は、ノックインマウスの解析を継続し、nCL-2 の作用点を明確にしていきたい。ここで見出されたカルパインと細胞内膜系との関係は、後述する酵母カルパイン(3. 4参照)においてもより詳細に明らかとなっており、今後のカルパイン研究の新しい方向性を示すものと考えられる。

[4] nCL-2 の酵素学的解析

上述の大腸菌で発現させた組換え nCL-2 を酵素学的に詳細に解析した結果、以下の興味深い事実を明らかにした。まず、nCL-2 は mCL と高い同一性 (>60%) を持つにもかかわらず 30K 及び 30K-2 とは結合せず、30K 非共存下で活性を発現する。 μ -, m-カルパイン及び nCL-4 は、通常 30K 非共存下では不活性であることと対照的である。さらに、nCL-2 の存在・機能様式についてゲルろ過クロマトグラフィーを用いて検討した結果、活性の主体は単量体であり、かつホモ二～多量体も形成しうることが示された(図 23 参照)。これは、 μ CL, mCL, nCL-4 と 30K とは、いずれも C 末端の EF-ハンドを介してヘテロ二量体を形成することと対照的である。nCL-2 のどのドメインが多量体形成に必要なかを解析した結果、PEF ドメイン(IV)ではなく、C2 様ドメイン(III)

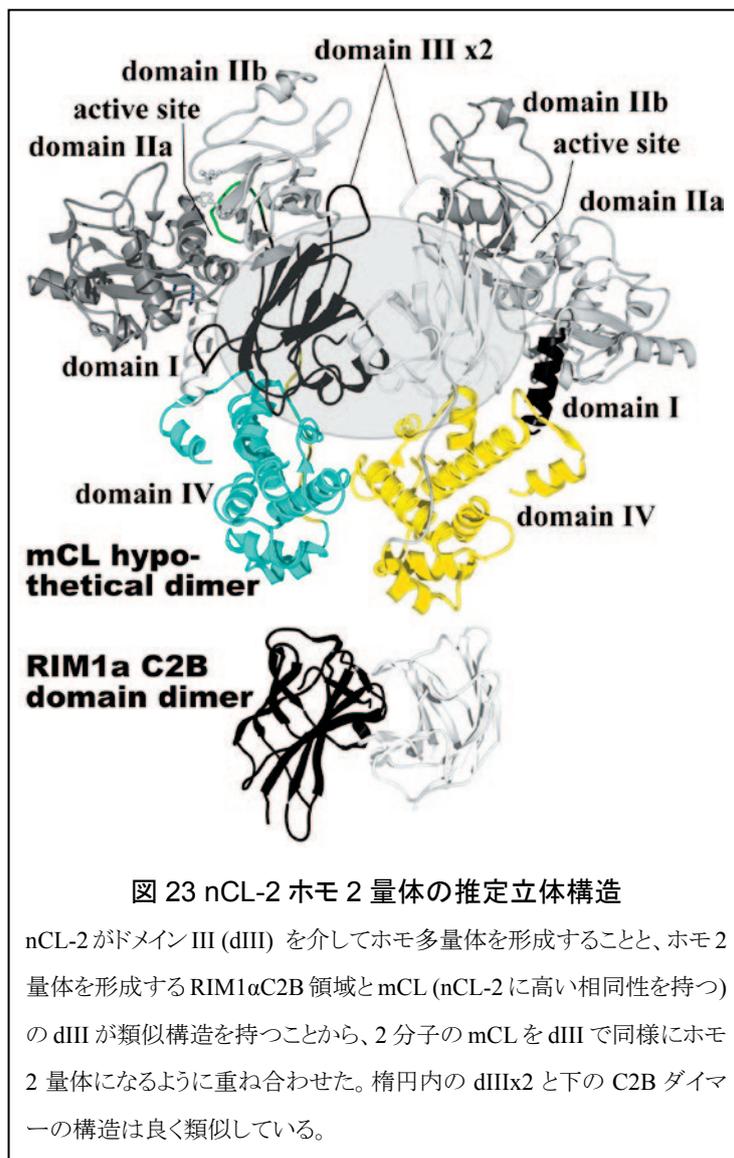


図 23 nCL-2 ホモ 2 量体の推定立体構造

nCL-2 がドメイン III (dIII) を介してホモ多量体を形成すること、ホモ 2 量体を形成する RIM1aC2B 領域と mCL (nCL-2 に高い相同性を持つ) の dIII が類似構造を持つことから、2 分子の mCL を dIII で同様にホモ 2 量体になるように重ね合わせた。楕円内の dIIIx2 と下の C2B ダイマーの構造は良く類似している。

を介することが判明した。 μ CL, mCL の C2 様ドメインは、膜との結合に機能すると考えられていることをふまえると、nCL-2 の C2 様ドメインは、膜成分を介した多量体形成という新たなカルパインの存在様式の可能性が示唆される。これらの知見は nCL-2 の細胞内膜系での作用機序に大きなヒントを与える。今後はさらに解析を行なってその生理的意義に迫りたい(Hata, S. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 27847-56)。

[5] nCL-4 ノックアウトマウスの作出 (新潟大: 崎村建司博士との共同研究)

既述のように胃には、nCL-2 及び組織普遍的カルパインの他、消化管特異的カルパイン nCL-4 (CAPN9)も発現し、その発現部位はnCL-2と重なる。nCL-2CS ノックインマウスの表現型が軽微であるのは、nCL-4 による機能代替のためだという可能性も考えられる。一方で nCL-4 の生理機能については、胃ガンとの関連が示唆されているのみで、ほぼ不明である。そこで、nCL-4 遺伝子 *Capn9* 破壊マウスの作出を計画した。今回は、新潟大学の崎村建司博士の開発した、C57BL/6N 純系 ES 細胞を用いており、作出したマウスはバッククロスが必要がないため、すぐに実験に使用できることが大きなメリットである。

(2) 研究成果の今後期待される効果

胃特異的カルパイン nCL-2CS ノックインマウスは、ストレス性の胃出血が、野生型よりも強い傾向にあるようだが、その差の有意性を示すのが困難な状況である。このような軽微な表現型の理由は nCL-2 がプロテアーゼ活性以外の機能も持つこと、nCL-4 and/or μ -, m-カルパインが機能相補していること、などが考えられ、それぞれ、nCL-2 ノックアウトマウス、nCL-4 ノックアウトマウスを比較解析したり、 μ -, m-カルパインノックアウトマウスとの交配などにより検証していく必要があるだろう。逆に、このような軽微な表現型は、まさに何年もかけて発症するヒト疾患に極めて近いものとする事もでき、その病態の表現型を確立すれば、ノックインマウスは非常によい疾患モデルマウスとなるであろう。

3. 4 酵母カルパインの生理機能の解析 (東京大学 前田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

本研究グループは、酵母カルパインホモログ Cpl1 に注目し、Cpl1 の関与するアルカリストレス応答経路に焦点を当てて解析を進めた。酵母という遺伝学的解析手法を強力に利用できるモデル生物を用いることに加え、カルパインが活性化される生理的刺激が明らかで、かつ、生理的基質が同定されている系であるという利点を活かして、高等生物の解析では明確な解答が得られにくい、カルパインによる生理機能の制御機構を明確にするのが、本研究グループのねらいであった。もちろん、ここで得られた結果は直ちに哺乳類カルパイン研究にフィードバックされ、逆もまたしかりである。さらに、哺乳類細胞では様々な因子に多数のホモログが存在するために解析が困難であるような系について、酵母の系を *in vitro* よりはずっと *in vivo* に近い「試験管」として用いることで哺

乳類カルパイン研究におけるブレイクスルーを見出そうとする反町グループの試みを、技術面からもサポートした。

酵母のカルパインホモログ Cpl1 (Rim13とも呼ばれる)と転写因子 Rim101 は、アルカリ応答反応に関わるシグナル伝達経路 (Cpl1-Rim101 経路)を構成している。Cpl1 はアルカリストレス刺激に応答して活性化され、Rim101 の C 末端側にある制御領域をプロセッシングすることによって Rim101 を活性化することを、我々は以前の研究から明らかにしている(Futai, E. *et al.* (1999) *Mol. Gen. Genet.* **260**, 559-68)。生理的な基質 (Rim101 唯一)が明確であることと、プロテアーゼとして活性化される生理的条件 (環境のアルカリ pH) が明瞭であるという二点において、Cpl1 はカルパイン・スーパーファミリーの中でも活性制御機構の詳細な解析に好適な分子種である。Cpl1 によってプロセッシングされ活性化された Rim101 は核へと移行し、アルカリ応答に必要な種々の転写調節を行う。このプロセッシングには、Cpl1 以外にも、Rim8、Rim9、Rim20、Rim21 というタンパク質の全てを必要とすることから、これらの因子もまた Cpl1-Rim101 経路を構成していると考えられてきた。しかしながら、これらの因子は Rim8 がアレチンホモログであること、Rim9、21 が膜タンパクと考えられることを除いては、機能を示唆する構造上の特徴に乏しく、その上、いずれの欠損変異株の表現型も共通して Rim101 プロセッシング不能のみで、これらの因子がどのように経路を構成しているかは不明であった。そこで、これらの因子の作用機序を明らかにするために、膜タンパク質であるため Cpl1-Rim101 経路の上流に位置すると考えられる Rim9 や Rim21 に注目し、これらが欠損していても、Rim101 のプロセッシングが回復するようなサブレッサー変異株の大規模なスクリーニングを行った。

[1] スクリーニングストラテジー

大規模なスクリーニングには、表現型に対する簡便で再現性の良いアッセイが不可欠であるため、その条件検討から始めた。様々な条件を検討した結果、0.21 M LiCl を含む培地条件での生育が、Cpl1-Rim101 経路の活性化に依存し、かつ、アルカリストレス条件より安定した表現型を得られる、ということが明らかとなった。親株である *rim9Δ* もしくは *rim21Δ* 破壊株はこの培地条件では生育することができないが、これらの株でプロセッシングを模した C 末端領域欠失型の Rim101 を発現すると生育が回復することから、この培地条件を用いたスクリーニングの有効性が確認できた。これらの破壊株にランダムに変異を誘起し、0.21 M LiCl を含む培地で生育を回復したサブレッサー変異株を多数単離した。しかしながら、得られた変異株はいずれも Rim101 のプロセッシングを回復していなかった。このことは、得られた変異株が、Cpl1-Rim101 経路とは無関係に LiCl 耐性を回復したバイパス・サブレッサーであったことを意味する。

そこで、バイパス・サブレッサーを排除するための工夫として、*rim9Δ* もしくは *rim21Δ* 破壊株に *RIM101* をプラスミドとして導入し、このプラスミドを保持した場合にのみ LiCl 耐性を回復することを指標とすることを試みた。その結果、LiCl 耐性の回復が Rim101 の存在に依存した真のサブレッサー変異株を単離することに成功した。最終的には、実際に Rim101 のプロセッシングが回復していることを得られた変異株で確認した。

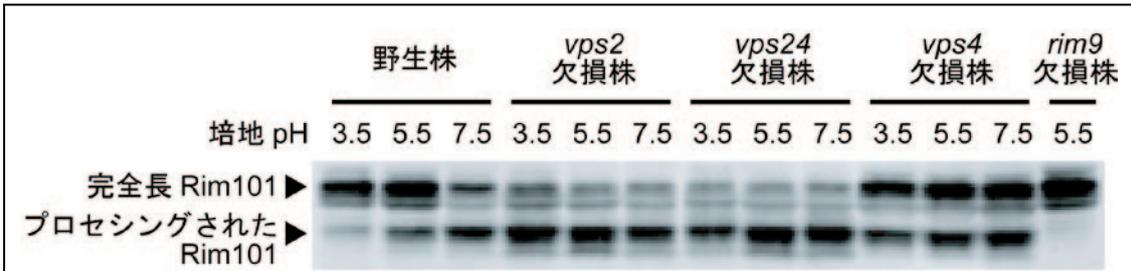


図 24 Cpl1-Rim101 経路が恒常的に活性化され

Rim101 プロセシングが環境 pH の変化によらず恒常的に活性化された変異株

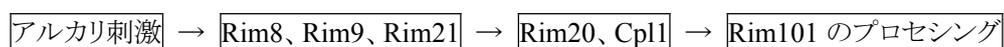
野生株では、酸性条件下 (pH3.5) では Rim101 はほとんどが完全長であるが、環境 pH の上昇に伴って Rim101 の C 末端領域のプロセシングが活性化され、アルカリ条件下 (pH7.5) では大部分がプロセシングされたものになる。これに対して、*vps2* 欠損株と *vps24* 欠損株では、環境 pH に関わらず Rim101 のプロセシングが常に活性化されている。*vps4* 欠損株では、程度は劣るものの、やはり環境 pH に関わらず Rim101 のプロセシングが進行する。これに対して、Cpl1-Rim101 経路に欠損を持つ株 (図では *rim9* 欠損株を代表としてあげた) では、pH によらず Rim101 のプロセシングは起こらない。

[2] 相補性試験によるグルーピングと責任遺伝子の同定

次に、単離された全ての劣性変異体を掛け合わせて相補性試験を行い、相補性群に分類した上で、責任遺伝子の同定を試みた。これら変異体は、いずれも最少培地での生育能が低下していた。そこでこの最少培地での生育能を目安として、野生株遺伝子ライブラリーをこれらの変異体に形質転換し、生育の回復するものとしてサプレッサー変異の責任遺伝子を同定した。

rim9Δ を用いたスクリーニングでは、 5.6×10^6 のコロニーから 19 の劣性サプレッサー変異株が得られ、相補性試験の結果、2 種の遺伝子に分類された。同様に *rim21Δ* を用いたスクリーニングでは、 1.5×10^7 に及ぶコロニーから 9 の劣性サプレッサー変異株が得られ、3 種の遺伝子に分類された。最終的に責任遺伝子を決定したところ、前者は *VPS2/DID4* と *VPS24*、後者は、*VPS2*、*VPS4*、と *VPS24* であった (これらの遺伝子のコードするタンパク質については後述)。

同定した計 3 種の責任遺伝子の遺伝子破壊を行い、いずれの破壊株においても培地 pH によらずに Rim101 が恒常的にプロセシングを受けていることを確認した (図 24)。Rim101 のプロセシングが恒常的に昂進する変異株は、相同経路も含めてこれが唯一の報告である。得られた恒常的プロセシング変異と上記プロセシング不能変異 (*rim8Δ*、*rim9Δ*、*rim20Δ*、*rim21Δ*、あるいは *cpl1Δ*) との二重変異株を全ての組み合わせで構築し、二重変異株における Rim101 のプロセシングの有無を検討することで遺伝学的順位を決定し、これまで全く不明であった経路構成因子間のシグナルフローを次のように明らかにした。



すなわち、Rim101 のプロセシングに必要なことが知られていた Rim タンパク質群は、経路上

流で機能する Rim8、Rim9、Rim21 と、経路下流で機能する Rim20、Cpl1 とに分類することができることになる。膜タンパク質であるためアルカリストレスセンサーの候補と目される Rim9、Rim21 が経路上流に位置付けられていること、Rim101 と結合することが知られていた Rim20 と、Rim101 をプロセッシングするプロテアーゼの実体である Cpl1 が経路の下流に位置付けられていることは、このモデルの妥当性を支持するものである。

[3] 同定したタンパク質の遺伝学的解析

同定した責任遺伝子にコードされる Vps2、Vps4、Vps24 の 3 つのタンパク質はいずれも、リソソーム/液胞の内腔へと輸送されて分解される膜タンパク質を、エンドソーム膜上で仕分けする過程である MVB (multivesicular body) ソーティングに関わるクラス E Vps タンパク質群に属し、しかもその中でもソーティングの最終ステップで機能する因子であることが知られている。このことから、Cpl1-Rim101 経路と MVB ソーティングとが密接に関係していることが明らかになった。そこで、他のクラス E Vps タンパク質の欠損変異についても、Rim101 のプロセッシングに対する影響を包括的に検討した。

クラス E Vps タンパク質全てについて欠損変異株を得て、Rim101 のプロセッシングを検討したところ、ESCRT-I と呼ばれるタンパク質複合体の構成因子である Stp22 と Vps28、ESCRT-II 構成因子である Snf8、Vps25、Vps36、ESCRT-III 構成因子である Snf7 と Vps20 の欠損変異株で Rim101 プロセッシング不能が観察された。このことは、ESCRT 複合体の構成因子の多くが、MVB ソーティングに加えて Cpl1-Rim101 経路の活性化にも必須の役割を果たしていることを示している。

Rim 欠損変異の場合と同様に、プロセッシング不能を示すこれらの Vps 欠損変異と、プロセッシングが恒常的に活性化される Vps24 欠損変異との二重変異株を構築し、Rim101 のプロセッシングの有無について検討した。その結果、ESCRT-I 構成因子の変異の場合にはプロセッシングが回復し、ESCRT-II、-III 構成因子の変異の場合にはプロセッシングが回復しなかった。ここで明らかになった各二重変異株におけるプロセッシングの回復の有無は、ESCRT-III サブ複合体である Snf7-Vps20 のエンドソーム膜上への蓄積の有無と完全に一致した。すなわち、Snf7-Vps20 サブ複合体の蓄積が起これない変異株では Rim101 のプロセッシングが起これず、蓄積される変異株では Rim101 のプロセッシングが恒常的に起こるようになる。

Cpl1 と Rim20 とが Snf7 とそれぞれ結合するという以前の知見をも踏まえ、変異株における Rim101 プロセッシング活性化の機構を次のように考えることができる。変異株において Snf7-Vps20 サブ複合体がエンドソーム膜上で蓄積すると、さらに Cpl1 と Rim20 がその場にリクルートされることにより活性なプロテアーゼ複合体が形成される。Rim101 は Rim20 との結合を介して活性プロテアーゼ複合体にリクルートされプロセッシングを受けるといものである。この知見をもとに、野生株におけるアルカリ刺激に応答した経路の活性化機構についても以下のようなモデルを提唱した(図 25)。アルカリ刺激は細胞膜に存在するセンサーである Rim9 と Rim21 により検知され、これがアレスチンホモログである Rim8 を介した何らかの機構で ESCRT 複合体をエンドソーム膜上に集積させる。このエンドソーム膜表面の ESCRT 複合体集積は、通常の MVB ソーティングにおけるものとは異なって、AAA タイプ ATPase である Vps4 による解離を受けずに集積されたままに留まる。集積している

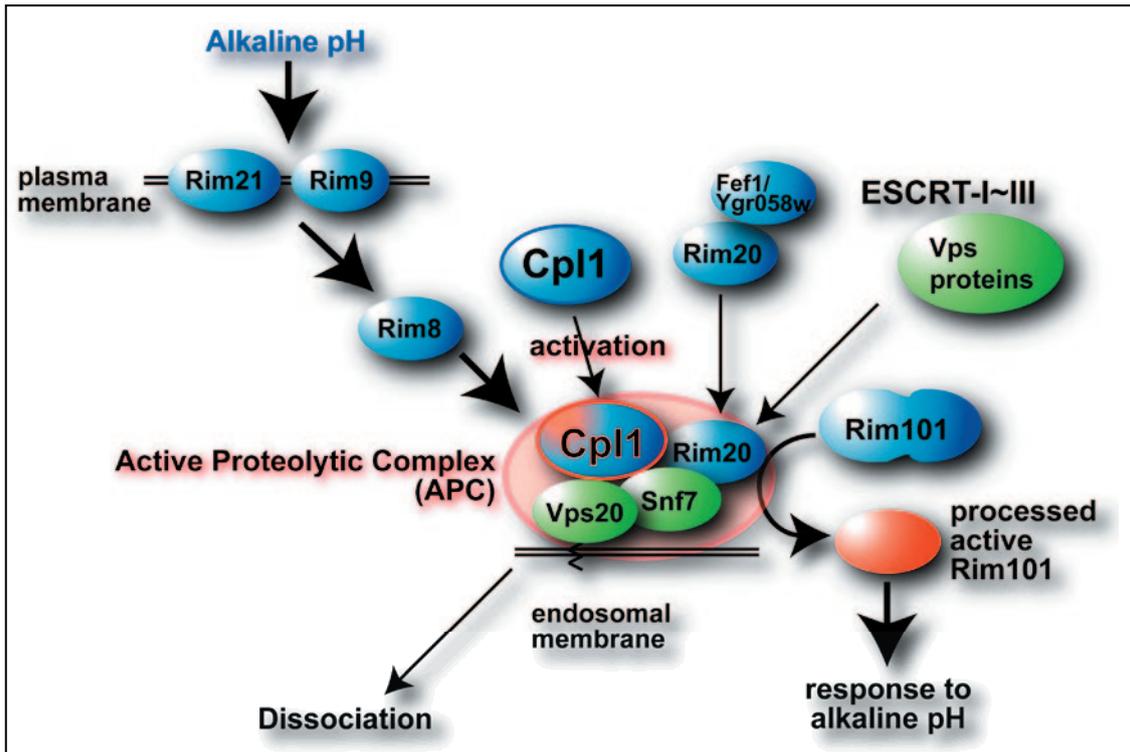


図 25 明らかとなった酵母カルパインホモログ Cpl1 によるアルカリストレス応答経路 (含仮説)

細胞外のアルカリ性環境(酵母の至適生育 pH は酸性なので、実際にはほぼ中性の pH である環境がアルカリ性環境となる)は、膜タンパク質である Rim9 或いは Rim21 によって感知され、Rim8(アレスチンに相同性を持ちアダプタータンパク質と考えられる)を介した過程により、エンドソーム膜表面に ESCRT 複合体を集積させる。ESCRT-III サブ複合体である Snf7-Vps20 が集積すると、酵母カルパイン Cpl1 及び Rim20 が Snf7 との結合を介してエンドソーム膜にリクルートされる。こうしてエンドソーム膜上に形成された活性プロテアーゼ複合体 (APC) は、Rim20 との結合を介して転写因子 Rim101 をリクルートし、その C 末端をプロセシングして活性化する。活性化型 Rim101 はアルカリ環境への適応に必要な遺伝子発現をコントロールする。

ESCRT 複合体のうち、ESCRT-III サブ複合体 Snf7-Vps20 に対して Cpl1 と Rim20 とがリクルートされ、Cpl1-(Snf7-Vps20)-Rim20 という活性プロテアーゼ複合体がエンドソーム膜表面に形成される。Rim101 は Rim20 との結合を介してこの活性プロテアーゼ複合体にリクルートされプロセシングされる。

[4] タンパク質レベルでの生化学的解析

活性プロテアーゼ複合体の構成因子間の相互作用を、免疫共沈法により確認した。構成因子の内 2 つずつを選び、その各々を異なったエピトープタグで標識した一連の株を作製した。エピトープの付加が構成因子の機能を損なっていないことを、Rim101 のプロセシング能を指標に確認した後共沈実験に供した。その結果、Snf7-Vps20、Cpl1-Snf7、Rim20-Snf7 の間に共沈が確認され、さらに前2者はアルカリストレス刺激で共沈が促進された。また、これら活性プロテアーゼ複合

体構成因子の細胞内局在を、スクロス密度勾配遠心法で確認した。Snf7とVps20は主に細胞質画分に局在したが、アルカリストレス条件下では Snf7 は一部がエンドソーム画分へと移行した。これに対し、Cpl1、Rim20 は細胞質のみならず広い密度の画分に渡って分布が見られ、アルカリストレス条件下でも顕著な変化が認められなかった。このことは、活性プロテアーゼ複合体を形成するのが、細胞内の Cpl1 と Rim20 のプールのうちのごく一部であることを示しているのかもしれない。上述の共沈実験においても、共沈の効率が著しく低かったこともこのことを示唆するものであると考えられる。このことは、今後、活性プロテアーゼ複合体を精製し、その性状を解析する上で克服されなくてはならない課題である。検出感度の問題は克服されるべき点ではあるものの、共沈実験と局在解析からは、アルカリストレス刺激で活性複合体形成が促進されること、その場がエンドソーム膜上であろうことと矛盾しない結果を得ることができた。

本研究によって、これまで想定されていなかった、カルパイン活性制御機構と膜タンパク質ソーティング機構の密接な関連が明らかになった。カルパインの活性化因子として膜に存在するチャンネルを通して流入する Ca^{2+} イオンや膜を構成するリン脂質などが古くより知られていたことから、カルパイン研究において生体膜との密接な関連は常に考慮されてきたことではあった。しかしながら、本研究で明らかにしたような、プロテアーゼ複合体が、膜表面で膜近傍の分子を scaffold として形成され、これが活性化機構となり得るとする知見は、今のところ特定の分子種に限られるとはいうものの、カルパインの活性制御を考える上で新しい可能性を提案するものである。今後は、他の分子種の内にもいずれかの生体膜表面へ集積されるものがあるか否かを検討する必要がある。

ESCRT 複合体の構成因子の多くが Cpl1-Rim101 経路の活性化に必要であるという知見は、長年この経路の解析を行っている A. P. Mitchell らによっても独立に報告された。しかしながら彼らの報告は、MVB 経路の最後期で機能する Vps2、Vps4、Vps24 の欠損により、Cpl1-Rim101 経路の恒常的な活性化が引き起こされるという決定的な表現型を見落としており、そのため Cpl1-Rim101 経路活性化における ESCRT 複合体の役割に対して有効なモデルを提案していない。また、糸状菌の相同経路において、アルカリストレスに応答して Rim8 ホモログがリン酸化とユビキチン化を受けることが最近報告された。Rim8 に起こるこれらの修飾に Rim21 ホモログが必要であるのに対し、下流の Rim タンパク質ホモログは不要であるという知見は、我々の見出したシグナルフローが糸状菌でも同様であることを示すものである。Rim8 ホモログが、哺乳類において 7 回膜貫通型受容体に結合してシグナル伝達や脱感作に機能するアレクチンと相同性を示すことから、Rim8 ホモログも同様に 7 回膜貫通型センサーである Rim21 ホモログに共役してシグナルを伝達しているというモデルをこの論文の筆者らは提出している。我々も、Rim タンパク質のいくつかについてユビキチン化が起こることを観察しており、ユビキチン化が経路活性化に果たす役割を明らかにしつつある。

(2)研究成果の今後期待される効果

今回の結果により、カルパイン活性制御機構と膜タンパク質ソーティング機構の密接な関連が明らかになったことは、カルパインの生理機能を考える上で新しい概念を提供するものである。反町グループの哺乳類 nCL-2 の解析からも、カルパインが小胞輸送の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになり、「カルパインの制御」と「カルパインによる制御」という両面において、細胞内

の膜トラフィック系がにわかにクローズアップされて来た。この新しい概念が、哺乳類カルパイン研究に大きなブレイクスルーをもたらすことが大いに期待できるだろう。

また本研究は、カルパインの機能調節が、Ca²⁺やリン脂質のような低分子の活性化因子を介した機構に加え、scaffold 依存的な活性プロテアーゼ複合体の構築を介して起こる可能性を具体的に示した。このカルパイン複合体の全ての構成因子はヒトにもホモログが存在し、相同な系がヒトでも機能していることが期待される。Cpl1 の哺乳類ホモログである PalBH は、数あるカルパインの中で特に注目されて来なかったが、今回の研究結果を元に相同機能を探ることで、哺乳類カルパインの今までまったく知られていなかった生理機能が明らかにできる可能性がある。

酵母や糸状菌にとって、取り巻く環境の pH が最適値から酸性やアルカリ性に傾くことは大きなストレスとして作用する。そのためこれらの真菌は、pH 変化に抗して恒常性を維持する適応機構を備えており、本研究で対象としたアルカリストレス応答経路である Cpl1-Rim101 経路も真菌に広く保存されていることが判明している。そして、病原性真菌の感染においても、Cpl1-Rim101 経路の相同経路が重要な役割を果たしていることが知られている。エイズなどの免疫不全症で問題となる日和見感染症の髄膜炎・食道炎や水虫などの原因ともなる真菌類(酸性が生育に最適)は、宿主体内(ほぼ中性)に感染を成立させる際に、この Cpl1-Rim101 経路の相同経路を活性化して体内環境への適応や、菌型の変換を行っている。今回の結果は、Cpl1 や Rim タンパク質をターゲットとして、抗菌活性ではなく抗感染性を作用機序とする全く新しいコンセプトの抗真菌剤開発に発展させ得るもので、副作用が少なく効果的な治療薬の新たな可能性を開くものである。

さらに、本研究で得られた知見をもとに相同経路の活性を制御できるようになれば、発酵産業や微生物による物質生産にも応用できる。相同な経路が、*Aspergillus* 属では産業利用されている多くの菌体外酵素の産生に、*Penicillium chrysogenum* ではペニシリンの産生に関与していることが知られており、相同経路を標的とした分子育種により、広く類似の物質生産において生産性の向上と安定化とに資することが期待できる。

4 研究参加者

①反町グループ(哺乳類カルパインの研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
反町 洋之	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 カルパイン プロジェクト	プロジェクト リーダー	研究総括	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
小野 弥子		主任 研究員	p94CS ノックインマウスの 解析など	平成 15 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
秦 勝志		研究員	nCL-2CS ノックインマウス の解析など	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
北村ふじ子		研究員	nCL-4 ノックアウトマウスの 作出など	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
尾嶋 孝一		CREST 研究員	p94CS ノックインマウスの 解析など	平成 16 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
土井 奈穂子		研究 補助員	研究全般の補助(細胞培 養、ウェスタンブロット etc.)	平成 16 年 5 月～ 平成 20 年 3 月
上岡 寿子		研究 補助員	チーム事務	平成 16 年 9 月～ 平成 20 年 3 月
楠畑かおり		特別 研究員	p94 及び関連分子遺伝子 改変マウスの解析など	平成 19 年 5 月～ 平成 20 年 3 月
林 智佳子	東京理科大学大 学院理工学研究 科応用生物科学 専攻	D3	カルパスタチンノックアウト マウスと p94CS ノックイン マウスの交配実験など	平成 17 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
門山 裕美子	東京理科大学理 工学部応用生物 科学科	学士卒業	胃特異的カルパインの解 析補助	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
小山 傑	東京大学 大学院農学生命 科学研究科	D2	MuRF1 ノックアウトマウス の解析など	平成 15 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
嶺田 志乃	応用生命化学専 攻	研究 補助員	研究の補助	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 8 月
吉岡 克英	生物機能開発化 学研究室	修士課程 修了	p94トラッピング法による解 析	平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 3 月

木村 映一	東京大学 大学院農学生命	博士課程 修了	カルパイン特異的相互作用因子の検索	平成14年11月～ 平成16年3月
川畑(勝井) 順子	科学研究科 応用生命化学専攻	博士課程 修了	p94CS ノックインマウスの 作出など	平成14年11月～ 平成16年5月
鳥居 福代	生物機能開発化学研究室	修士課程 修了	カルパイン測定系の開発 など	平成14年11月～ 平成16年3月
山室 芳剛		学士課程 修了	カルパインの精製など	平成15年4月～ 平成16年3月
浦部 健太	東京バイオテクノロジー専門学校	卒業	カルパインの精製など	平成19年4月～ 平成20年2月
田上 麻衣		卒業	カルパインの精製など	平成18年4月～ 平成19年2月
眞田 明		卒業	カルパインの精製など	平成17年4月～ 平成18年2月

②前田グループ(酵母カルパインの研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
前田 達哉	東京大学 分子細胞生物学 研究所 生体超高分子研究分野	准教授	グループ研究総括	平成14年11月～ 平成20年3月
富岡 茂雄		助教	酵母 pH 応答系のタンパク 質レベルでの解析など	平成14年11月～ 平成20年3月
林 道夫		CREST 研究員	酵母 pH 応答系の遺伝学的 解析など	平成14年11月～ 平成20年3月
谷川(堀江) 美頼		博士 研究員	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成14年11月～ 平成20年3月
大根 陽一郎		博士 研究員	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成18年4月～ 平成20年3月
寺島 農		博士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成18年4月～ 平成20年3月
島山 理広		修士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成18年4月～ 平成20年3月
宮崎 隆幸		修士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成18年4月～ 平成20年3月

賓 範浩	東京大学 分子細胞生物学 研究所 生体超高分子研 究分野	修士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
米山 京		博士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
金子 雅昭		博士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成 15 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
上原 亜樹		修士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
福澤 孝昭		修士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
佐藤 直人		博士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成 15 年 4 月～ 平成 15 年 12 月
阿部 友照		博士課程 修了	酵母 pH 応答系の解析補 助など	平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月

③饗場グループ(カルパイン関連遺伝子改変マウスの作出)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
饗場 篤	神戸大学 大学院医学系研 究科 生理学・細胞生物 学講座 分子遺伝学分野	教授	グループ研究総括	平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月
原田 武志		助教	ノックインマウス、ノックア ウトマウスの解析など	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
葛西 秀俊		助教	ノックインマウス、ノックア ウトマウスの解析など	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
中尾 晴美		博士課程 修了	ノックインマウス、ノックア ウトマウスの解析など	平成 14 年 11 月～ 平成 19 年 3 月
松田 育雄		助手	ノックインマウス、ノックア ウトマウスの設計	平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 6 月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Prof. Siegfried Labeit (マンハイム医科大学医学部、教授)	共同研究、セミナー 開催及びディスカッ ション	東京	平成16年1月13日～ 1月16日
Dr. Boris Turk (スロベニア・ジョセフ・ステファン研究 所、部門長)	セミナー開催	東京	平成16年9月28日～ 9月29日
Prof. Carol C. Gregorio (アメリカ・アリゾナ大学、教授)	ディスカッション	東京	平成16年11月18日 ～11月22日
Prof. Nektarios Tavernarakis (ギリシャ・分子生物バイオテクノロジー 研究所、室長)	セミナー開催及び ディスカッション	東京	平成17年7月29日～ 7月31日
Prof. Suthat Fucharoen (タイ王国・マヒドール大学・科学技術研 究所・サラセミア研究センター、所長)	セミナー開催及び ディスカッション	東京	平成17年9月8日～9 月9日
Dr. Boris Turk (スロベニア・ジョセフ・ステファン研究 所、部門長)	セミナー開催	東京	平成18年6月30日～ 6月31日
Prof. James G. Tidball (カリフォルニア大学ロサンジェルス校 (UCLA)、教授、 デュシェンヌ型筋ジストロフィー研究セ ンター(DMDRC)、所長)	セミナー開催及び ディスカッション	東京	平成18年12月1日～ 12月2日
Prof. Roy Bickerstaffe (ニュージーランド・リンカーン大学・農 学生命科学研究科、教授)	セミナー開催及び ディスカッション	東京	平成18年8月10日～ 8月11日
Dr. Miren Ametsa Sáenz (スペイン・サンセバスチャン病院研究 所、主任研究員)	共同研究、セミナー 開催及びディスカッ ション	東京	平成19年4月19日～ 5月11日

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国際誌 38 件、国内誌 0 件)

- 1) Kawabata, Y., Hata, S., Ono, Y., Ito, Y., Suzuki, K., Abe, K., and Sorimachi, H. (2003) Newly identified exons encoding novel variants of p94/calpain3 are expressed ubiquitously and overlap the α -glucosidase C gene. *FEBS Lett.* **555**, 623-630.
- 2) Kimura, E., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2003) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K interacts with and is proteolyzed by calpain *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1786-1796.
- 3) Chida K, Hara T, Hirai T, Konishi C, Nakamura K, Nakao K, Aiba A, Katsuki M, and Kuroki T. (2003) Disruption of protein kinase C η results in impairment of wound healing and enhancement of tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.*, **63**, 2404-2408.
- 4) Ojima, K., Uezumi, A., Miyoshi, H., Masuda, S., Morita, Y., Fukase, A., Hattori, A., Nakauchi, H., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2004) Mac-1(low) early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 1050-1061.
- 5) Ono, Y., Kakinuma, K., Torii, F., Irie, A., Nakagawa, K., Labeit, S., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2004) Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *J. Biol. Chem.* **279**, 2761-2771.
- 6) Sato, K., Hattori, S., Irie, S., Sorimachi, H., Inomata, M. and Kawashima, S. (2004) Degradation of fodrin by m-calpain in fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel. *J. Biochem.* **136**, 777-785.
- 7) Shirasuka, Y., Nakajima, K., Asakura, T., Yamashita, H., Yamamoto, A., Hata, S., Nagata, S., Abo, M., Sorimachi, H., Abe, K. (2004) Neoculin as a New Taste-modifying Protein Occurring in the Fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1403-1407.
- 8) Witt, C.C.*, Ono, Y.* (*equally contributed first authors), Puschmann, E., McNabb, M., Wu, Y., Gotthardt, M., Witt, S. H., Haak, M., Labeit, D., Gregorio, C.C., Sorimachi, H., Granzier, H., and Labeit, S. (2004) Induction and myofibrillar targeting of CARP, and suppression of the Nkx2.5 pathway in the *MDM* mouse with impaired titin-based signaling. *J. Mol. Biol.* **336**, 145-154.
- 9) Kuwajima, M., Hall, R.A., Aiba, A., and Smith, Y. (2004) Subcellular and subsynaptic localization of group I metabotropic glutamate receptors in the monkey subthalamic nucleus. *J. Comp. Neurol.*, **474**, 589-602.
- 10) Nakamura, M., Sato, K., Fukaya, M., Araishi, K., Aiba, A., Kano, M., and Watanabe, M. (2004) Signaling complex formation of phospholipase C β 4 with metabotropic glutamate receptor type 1 α and 1,4,5-tris-phosphate receptor at the perisynapse and endoplasmic reticulum in the mouse brain. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2929-2944.
- 11) Hayashi, M., Fukuzawa, T., Sorimachi, H., and Maeda, T. (2005) Constitutive activation of the

- pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9478-9490.
- 12) Ojima, K., Ono, Y., Hata, S., Koyama, S., Doi, N., and Sorimachi, H. (2005) Possible functions of p94 in connectin-mediated signaling pathways in skeletal muscle cells. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26**, 409-417.
 - 13) Ono, Y., Schwach, C., Antin, P. B., and Gregorio, C. C. (2005) Disruption in the *Tmod1* gene compromises cardiomyocyte development in murine embryonic stem cells by arresting myofibril maturation. *Dev. Biol.*, **282**, 336-348.
 - 14) Ohkouchi, S., Saito, H., Aruga, F., Maeda, T., Shibata, H., and Maki, M. (2005) *Dictyostelium discoideum* requires an Alix/AIP1 homolog, DdAlix, for morphogenesis in alkaline environments. *FEBS Lett.* **579**, 1745-1750.
 - 15) Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., Abe, K. (2005) *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signaling pathway in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* **56**, 1246-1261.
 - 16) Maejima, T., Oka, S., Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Aiba, A., Wu, D., Waku, K., Sugiura, T., Kano, M. (2005) Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca²⁺-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C β 4 signaling cascade in the cerebellum. *J. Neurosci.*, **25**, 6826-6835.
 - 17) Toyama-Sorimachi, N., Omatsu, Y., Onoda, A., Tsujimura, Y., Iyoda, T., Maki, A., Sorimachi, H., Dohi, T., Taki, S., Inaba, K., and Karasuyama, H. (2005) Inhibitory NK receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation- and cytokine stimulation-dependent manner. *J. Immun.* **174**, 4621-4629.
 - 18) Kassai, H., Aiba, A., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Xiong, W.H., Yau, K.W., Imai, H., Shichida, Y., Satomi, Y., Takao, T., Okano, T., Fukada, Y. (2005) Farnesylation of retinal transducin underlies its translocation during light adaptation. *Neuron*, **47**, 529-539.
 - 19) Tomemori Y, Ichiba M, Kusumoto A, Mizuno E, Sato D, Muroya S, Nakamura M, Kawaguchi H, Yoshida H, Ueno S, Nakao K, Nakamura K, Aiba A, Katsuki M, and Sano A. (2005) A gene-targeted mouse model for chorea-acanthocytosis. *J. Neurochem.*, **92**, 759-766.
 - 20) Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., and Sorimachi, H. (2006) Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 in a genetic reporter system. *J. Biol. Chem.*, **281**, 18519-18531.
 - 21) Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2006) Stomach-specific calpain, nCL-2, localizes in mucus cells and proteolyzes the β -subunit of coatamer complex, β -COP. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11214-11224.
 - 22) Takahara, T., Hara, K., Yonezawa, K., Sorimachi, H., and Maeda, T. (2006) Nutrient-dependent multimerization of the mammalian target of rapamycin through the N-terminal HEAT repeat region. *J. Biol. Chem.*, **281**, 28605-28614.

- 23) Yajima, Y., Sato, M., Sorimachi, H., Inomata, M., Maki, M., and Kawashima, S. (2006) Calpain system regulates the differentiation of adult primitive mesenchymal ST-13. *Endocrinology*, **147**, 4811-4819.
- 24) Nakajima, K.I., Asakura, T., Oike, H., Morita, Y., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. (2006) Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport*, **17**, 1241-1244.
- 25) Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, J., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Kitamoto, K., and Abe, K. (2006) Extracellular production of a heterodimeric protein, neoculin, with sweet-tasting and taste-modifying activities by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3716-3723.
- 26) Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Terada, T., Asakura, T., Nakajima, K., Iwata, S., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. (2006) Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity. *J. Mol. Biol.*, **359**, 148-158
- 27) Hayashi, M., Maeda, T. (2006) Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.*, **139**:797-803.
- 28) Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., Yamaguchi, I. (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J.* **46**, 880-889.
- 29) Hata, S., Doi, N., Kitamura, F., and Sorimachi, H. (2007) 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.
- 30) Ojima, K., Ono, Y., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Labeit, S., and Sorimachi, H. (2007) Myogenic stage, sarcomere length and protease activity modulate localization of muscle-specific calpain. *J. Biol. Chem.*, **282**, 14493-14504.
- 31) Ono, Y., Hayashi, C., Doi, N., Kitamura, F., Shindo, M., Kudo, K., Tsubata, T., Yanagida, M., and Sorimachi, H. (2007) Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics - Possible regulation of protein synthesis by p94. *Biotech. J.*, **2**, 565-576.
- 32) Kamei, H., Saito, T., Ozawa, M., Fujita, Y., Asada, A., Bibb, J. A., Saido, T. C., Sorimachi, H., and Hisanaga, S. (2007) Suppression of calpain-dependent cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **282**, 1687-1694.
- 33) Nakao H, Nakao K, Kano M, Aiba A. Metabotropic glutamate receptor subtype-1 is essential for motor coordination in the adult cerebellum. (2007) *Neurosci. Res.*, **57**, 538-543.
- 34) Tabata, T., Kawakami, D., Hashimoto, K., Kassai, H., Yoshida, T., Hashimotodani, Y., Fredholm, B. B., Seikno, Y., Aiba, A., and Kano, M. (2007) G protein-independent neuromodulatory action of adenosine on metabotropic glutamate signaling in mouse cerebellar Purkinje Cells. *J. Physiol.*, **581**, 693-708.
- 35) Yoshikawa, Y., Satoh, T., Tamura, T., Wei, P., Bilasy, S. E., Edamatsu, H., Aiba, A., Katagiri, K.,

- Kinashi, T., Nakao, K., and Kataoka, T. (2007) The M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 pathway mediates tumor necrosis factor- α -dependent regulation of integrin activation in splenocytes. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2949-2959.
- 36) Wei, P., Satoh, T., Edamatsu, H., Aiba, A., Setsu, T., Terashima, T., Kitazawa, S., Nakao, K., Yoshikawa, Y., Tamada, M., and Kataoka, T. (2007) Defective vascular morphogenesis and mid-gestation embryonic death in mice lacking RA-GEF-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **363**, 106-112.
- 37) 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., and Sorimachi, H. (2008) Muscle RING-finger protein MuRF1 as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *J. Mol. Biol.*, **376**, 1224-1236.
- 38) Ono, Y., Hayashi, C., Doi, N., Tagami, M., and Sorimachi, H. (2008) 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.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

- 1) Sorimachi, H., and Beckmann, J. S. (2002) Defects of non-lysosomal proteolysis: Calpain 3 deficiency. in "Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases" (ISN Neuropath. Press, Basel; ed., Karpati, G.), pp. 148-153.
- 2) Sorimachi, H., and Ono, Y. (2004) Calpain. in "Encyclopedia of Biological Chemistry" (Elsevier, Oxford; eds., W.J. Lennarz and M.D. Lane), vol. 1, pp. 300-306.
- 3) Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., and Sorimachi, H. (2004) Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, **53**, S12-18.
- 4) Matsuda I, Aiba A. (2004) Receptor knock-out and knock-in strategies. *Methods Mol. Biol.*, **259**, 379-390.
- 5) Sorimachi, H., Ono, Y., Ojima, K., Kawabata, Y., Witt, C., Nakao, H., Kawahara, H., Hata, S., Koyama, S., Granzier, H., Gregorio, C. C., Labeit, S., Aiba, A., Abe, K., and Suzuki, K. (2005) Calpain and connectin/titin in health and disease of skeletal muscle. *FEBS J.* **272** Suppl., 177-178.
- 6) Ono, Y., Ojima, K., Kawabata, Y., Doi, N., Witt, C., Witt, S., Labeit, D., Granzier, H., Gregorio, C. C., Labeit, S., Suzuki, K. and Sorimachi, H. (2005) Functional properties of p94/calpain3 and connectin/titin in *mdm* mouse skeletal muscle. *FEBS J.* **272** Suppl., 182.
- 7) Sorimachi, H., Ojima, K., Yanagida, M., Ogawa, H., Hayashi, C., Doi, N., and Ono, Y. (2006) How do defects in proteolytic functions of skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3, cause calpainopathy/LGMD2A? *Neuromuscul. Disord.*, **16**, S148.
- 8) Ono, Y., Ojima, K., Doi, N., Hayashi, C., Torii, F., Yoshioka, K., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., and Sorimachi, H. (2006) Relationships between p94/CAPN3 and N2A

connectin/titin in skeletal muscle under the normal and dystrophic conditions. *Neuromuscul. Disord.*, **16**, S72.

- 9) Ojima, K., Ono, Y., Doi, N., Labeit, S., and Sorimachi, H. (2006) Spatio-temporal expression of muscle-specific calpain, p94/calpain 3, during myogenesis. *Neuromuscul. Disord.*, **16**, S56.
- 10) Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T. and Sorimachi, H. (2006) Effect of N2A connectin/titin on disassembly of p94/CAPN3 caused by autoolysis in IS2. *FEBS J.* **273**, Suppl., 50.
- 11) Aiba A, Nakao H. Conditional mutant mice using tetracycline-controlled gene expression system in the brain. (2007) *Neurosci. Res.*, **58**, 113-117.
- 12) Aiba A, Inokuchi K, Ishida Y, Itohara S, Kobayashi K, Masu M, Mishina M, Miyakawa T, Mori H, Nakao K, Obata Y, Sakimura K, Shiroishi T, Wada K, Yagi T. (2007) Mouse liaison for integrative brain research. *Neurosci. Res.* **58**, 103-104.
- 13) 反町洋之、川畑順子 (2003) カルパインと病態—構造活性相関からの考察— “Calpain and pathology in view of structure-function relationships.” *薬理学会誌* **122**, 21-29.
- 14) 小野弥子、反町洋之 (2004) カルパインの機能制御と筋ジストロフィー “Calpain physiology under the context of muscular dystrophy.” *実験医学* **22**, 198-204.
- 15) 小野弥子、川畑順子、反町洋之 (2004) 骨格筋特異的カルパイン p94/カルパイン 3 と肢帯型筋ジストロフィー “Skeletal-muscle-specific calpain, p94/calpain 3, and limb-girdle muscular dystrophies.” *ゲノム医学* **4**, 27-34.
- 16) 小野弥子、反町洋之 (2005) 神経細胞死の分子機構と Ca^{2+} 依存性プロテアーゼカルパイン ” Ca^{2+} -dependent proteolytic system in the molecular mechanism of neurodegeneration.” *医学のあゆみ* **215**, 811-817.
- 17) 尾嶋孝一、反町洋之、木村澄子 (2005) 「筋弾性タンパク質の国際シンポジウム」報告記 “Report from “International Symposium on Muscle Elastic Proteins: Koscak Maruyama Memorial Meeting.” *生体の科学* **56**, 157-159.
- 18) 秦勝志、反町洋之 (2007) 「モジュレータ・プロテアーゼ」カルパインと細胞内膜系との新しい展開 *生化学* **79**, 46-50.
- 19) 反町洋之 (2008) 「今話題の重要なプロテオリシス」概論 *実験医学* **26**, 294-299.
- 20) 小野弥子、反町洋之 (2008) カルパインの生理機能とその不全による病態「カルパインノパチー」 *実験医学* **26**, 306-315.
- 21) 尾嶋孝一、反町洋之 (2008) カルパイン 3 異常症(カルパインノパチー) *Clinical Neurosci.* **26**, 154-155.

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

- ① 招待講演 (国際会議 19 件、国内会議 35 件)
(国際会議)

- 1) Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,2}, Hata, S.¹, and Sorimachi, H.^{1,2} (¹Calpain PT, Rinshoken (東京都臨床医

- 学総合研究所・カルパインPT); ²CREST, JST (1,2: 以下同様)) 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
- 2) Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,2}, Hayashi, C.^{1,6}, Doi, N.^{1,2}, Kitamura, F.¹, Koyama, S.^{1,3}, Hata, S.¹, Labeit, S.⁴, Yanagida, M.⁷, Maeda, T.^{2,5}, and Sorimachi, H.^{1,2} (³Graduate School of Agricultural and Life Science, The Univ. of Tokyo (東京大学・大学院農学生命化学研究科); ⁴Inst. für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum (マンハイム大学・医学部); ⁵Inst. of Mol. and Cell. Biosciences, The Univ. of Tokyo (東京大学・分子細胞生物学研究科); ⁶Dept. of Applied Biological Science, Faculty Science and Technology, Tokyo Univ. of Science (東京理科大学・理工学部); ⁷Inst. for Environment. Gender Specific Med., Juntendo Univ. (順天堂大学・環境医学研究所) (3~7: 以下同様)) Unconventional calpains. *FASEB Summer Research Conferences – The Biology of Calpains in Health & Disease*, 2007-07-15, Colorado, USA
 - 3) Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,2}, Hayashi, C.^{1,6}, Doi, N.^{1,2}, Kitamura, F.¹, Koyama, S.^{1,3}, Hata, S.¹, Labeit, S.⁴, Yanagida, M.⁶, Maeda, T.^{1,5}, and Sorimachi, H.^{1,2} 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
 - 4) Ono, Y.¹ Skeletal Muscle Specific Calpain, p94/calpain 3, as a Modulator Protease for Muscle Functions *The American Society for Cell Biology, the 46th Annual meeting., Special Interest Subgroup L: Muscle Cytoskeletal Protein Assembly* 2006-12-9, San Diego, CA, USA.
 - 5) Ono, Y.¹, Fukuyo Torii³, Ojima, K.^{1,2}, Hayashi, C.^{1,6}, Doi, N.^{1,2}, Yoshioka, K.³, Kawabata, Y.^{2,3}, Labeit, D.⁴, Labeit, S.⁴, Koichi Suzuki⁸, Keiko Abe³, Maeda, T.^{1,5}, Hata, S.¹, Koyama, S.^{1,3} and Sorimachi, H.^{1,2} (⁸New Frontiers Research Lab., Toray Ind. Inc. (東レ・先端融合研)(8: 以下同様)) A novel genetic assay system for a rapidly autolyzing muscle-specific calpain p94/calpain 3. *5th International Conference on Cysteine Proteinases and Their Inhibitors: From Structure to Regulation and Biology*. 2006-9-4, Portoroz, Slovenia.
 - 6) Sorimachi, H.^{1,2}, Ojima, K.^{1,2}, Yanagida, M.⁷, Ogawa, H.³, Hayashi, C.^{1,6}, Doi, N.^{1,2}, and Ono, Y.¹ How do defects in proteolytic functions of skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3, cause calpainopathy/LGMD2A? *XIth International Congress on Neuromuscular Diseases*. 2006-7-6, İstanbul, Turkey.
 - 7) Sorimachi, H.^{1,2}, Maeda, T.^{1,5}, Koichi Suzuki⁸ Novel function of calpain at the membranes. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. 2006-6-22, Kyoto, Japan
 - 8) Ono, Y.^{1,2}, Ojima, K.^{1,2}, Kawabata, Y.^{1,2}, Witt, C.⁴, Witt, S.⁴, Nakao, H.⁹, Kawahara, H.¹⁰, Doi, N.^{1,2}, Hayashi, C.^{1,6}, Sanada, A.¹, Labeit, D.⁴, Hata, S.¹, Koyama, S.^{1,3}, Gregorio, C. C.¹¹,

- Granzier, H.^{1,2}, Labeit, S.⁴, Aiba, A.^{2,9}, Abe, K.³, Suzuki, K.⁸, and Sorimachi, H.^{1,2} (⁹Graduate School of Medicine, Kobe Univ. (神戸大学・大学院医学系研究科); ¹⁰Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Univ. (北海道大学・大学院薬学研究科); ¹¹Med. Sch., Univ. Arizona (アリゾナ大学・医学部); ¹²College of Veterinary Medicine, Washington State Univ. (ワシントン州立大学・獣医学部)(9~12: 以下同様)) Functions of p94/calpain 3 in skeletal muscle. *The 78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (第78回日本生化学会大会 in English) Mini-Symposium "Pathology of calpain"*, Kobe, Japan, 2005-10-20.
- 9) Hayashi, M.^{1,2}, Fukuzawa, T.^{1,2}, Sorimachi, H.^{2,3}, and Maeda, T.^{1,5} Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in mutants defective in late components of the MVB/ESCRT pathway. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Yeast Cell Biology"*, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2005-8-20.
- 10) Sorimachi, H.^{1,2}, Ono, Y.^{1,2}, Ojima, K.^{1,2}, Kawabata, Y.^{1,2}, Witt, C.⁴, Nakao, H.^{2,4}, Kawahara, H.⁵, Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,3,6}, Granzier, H.^{1,2}, Gregorio, C. C.¹¹, Labeit, S.⁴, Aiba, A.^{2,9}, Abe, K.³, and Suzuki, K.⁸ Calpain and connectin/titin in health and disease of skeletal muscle. *30th FEBS Congress & 9th IUBMB Conference "The Protein World- Proteins and Peptides: Structure, Function and Organization"*, Budapest, Hungary, 2005-7-7.
- 11) Sorimachi, H.^{1,2}, Ono, Y.¹, Hata, S.¹, Ojima, K.^{1,2}, Koyama, S.^{1,3}, Hayashi, C.^{1,2,6}, and Suzuki, K.⁸ Physiological roles of intracellular modulator protease calpain. IXth International Symposium on PROTEINASE INHIBITORS AND BIOLOGICAL CONTROL, Brdo, Slovenia, 2005-6-27.
- 12) Sorimachi, H.^{1,2} Connectin/titin, calpain, and muscular dystrophies. *International Symposium on Muscle Elastic Proteins: Koscak Maruyama Memorial Meeting*, Chiba, Japan, 2004-11-19.
- 13) Sorimachi, H.^{1,2}, Kawabata, Y.^{1,2}, Ono, Y.¹, Nakao, H.⁹, Ojima, K.^{1,2}, Hata, S.², Koyama, S.^{1,3}, Witt, C.⁴, Labeit, S.⁴, Kawahara, H.¹⁰, Abe, K.³, Suzuki, K.⁸, and Aiba, A.^{2,9} Ubiquitous function of "skeletal muscle-specific" calpain, p94/calpain 3. *The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (第77回日本生化学会大会 in English) Symposium "タンパク質分解の謎に迫る"*, Yokohama, Japan, 2004-10-15.
- 14) Koyama, S.^{1,2,3}, Hata, S.^{1,3}, Ono, Y.^{1,3}, Witt, C.⁴, Abe, K.², Labeit, S.⁴, and Sorimachi, H.^{1,3} Analysis of functions of muscle specific RING finger protein, MuRFs, and its relationships with calpain system. (Oral). *FASEB Summer Research Conferences – Biology of the calpains in Health and Disease*, Tucson, AZ, USA, 2004-6-17.
- 15) Ono, Y.¹, Kakinuma, K.³, Torii, F.³, Irie, A.³, Kawabata, Y.^{1,2}, Nakagawa, K.³, Witt, C.⁴, Labeit, S.⁴, Abe, K.³, Suzuki, K.⁸, and Sorimachi, H.^{1,2} Deciphering the functional properties of p94/calpain 3 in skeletal muscle. *FASEB Summer Research Conferences – Biology of the calpains in Health and Disease*, Tucson, AZ, USA, 2004-6-14.
- 16) Hata, S.¹, Koyama, S.^{1,3}, Kawahara, H.¹⁰, Abe, K.³, Suzuki, K.⁸, and Sorimachi, H.^{1,2} Physiological functions of stomach-specific calpain, nCL-2/calpain 8 revealed by genetically

modified mice. *FASEB Summer Research Conferences – Biology of the calpains in Health and Disease*, Tucson, AZ, USA, 2004-6-14.

- 17) Sorimachi, H.^{1,2}, Kawabata, Y.^{1,2}, Nakao, H.⁹, Ojima, K.^{1,2}, Ono, Y.¹, Hata, S.¹, Koyama, S.^{1,3}, Labeit, S.⁴, Abe, K.³, Aiba, A.^{2,9}, and Suzuki, K.⁸ Novel functions of skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3, shown by p94:C129S knock-in mice. *FASEB Summer Research Conferences – Biology of the calpains in Health and Disease*, Tucson, AZ, USA, 2004-6-14.
- 18) Sorimachi, H.^{2,3}, Ono, Y.¹, Hata, S.¹, Kimura, E.^{1,2}, Kawabata, Y.^{1,2}, Torii, F.³, Yoshioka, K.³, Nakagawa, K.³, Abe, K.³, and Suzuki, K.⁸ Calpain as a modulator protease. *The 3rd General Meeting of the IPS (International Proteolysis Society)*, Nagoya, Japan, 2003-11-13.
- 19) Sorimachi, H.^{2,3} Structure and function of calpain superfamily. *RIKEN Seminar*, Wako, Japan, 2003-1-15.

(国内会議)

- 1) 反町洋之^{2,3} 活性中心ミスセンスノックインを用いた組織特異的カルパインの生理機能解析. 特定領域研究平成 14 年度第 3 回公開シンポジウム「タンパク質分解:生命を理解する新機軸」、福岡、2002-12-20.
- 2) 反町洋之^{2,3} カルパインと病態—構造機能相関からの考察—. 第 76 回日本薬理学会年会シンポジウム「プロテアーゼ疾患の分子病態と治療戦略」、福岡、2003-3-24
- 3) 反町洋之^{2,3} モジュレータ・プロテアーゼ「カルパイン」による生体制御機構 臨床研セミナー、東京都臨床医学総合研究所、東京、2003-9-16.
- 4) 反町洋之^{2,3} モジュレータ・プロテアーゼ「カルパイン」による生体制御. 神経研究所セミナー、国立精神・神経センター、東京、2003-9-26.
- 5) 反町洋之^{2,3}、小野弥子^{2,3}、秦勝志³、木村映一^{2,3}、川畑順子^{2,3}、鳥居福代³、吉岡克英³、鈴木絃一⁸、阿部啓子³ Calpain systems of muscle cells in health and disease. 第 76 回日本生化学会大会シンポジウム「骨格筋研究をめぐる新たな地平(New horizon on muscle research)」、横浜、2003-10-16.
- 6) 反町洋之^{2,3} カルシウム結合ドメインの構造と機能. *Small group workshop: 三好型筋ジストロフィー/LGMD2B; ジスフェルリンの機能とジストロフィー*、東京、2003-10-24.
- 7) 武田伸一¹³、二川健¹⁴、反町洋之^{2,3}、深田宗一郎¹⁴ (¹³ 国立精神・神経セ、¹⁴ 徳島大・院ヘルスバイオ) 微小重力による筋萎縮の分子メカニズム: 微小重力によって誘導される MuRF1 遺伝子の発現機序の解析. 第 26 回日本分子生物学会サテライトシンポジウム、神戸、2003-12-10.
- 8) 反町洋之^{2,3}、小野弥子^{2,3}、秦勝志³、木村映一^{2,3}、川畑順子^{2,3}、鳥居福代³、小山傑³ カルパインによる生体機能のモジュレーション-遺伝子改変マウスによる解析. 文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究:タンパク質分解-平成 15 年度第 4 回公開シンポジウム:タンパク質分解のメカニズムとバイオロジー、岡崎、2003-12-19.
- 9) 前田達哉^{2,5} 酵母カルパインホモログ Cpl1 とアルカリ pH ストレス応答情報伝達経路. 東レ先

- 端研セミナー「タンパク質分解の生理機能と疾患－カルパインを中心として」、鎌倉、2004-03-05.
- 10) 反町洋之^{2,3} 細胞内モジュレータ・プロテアーゼ、カルパインの構造と機能. 東レ先端研セミナー「タンパク質分解の生理機能と疾患－カルパインを中心として」、鎌倉、2004-03-05.
 - 11) 鳥居福代³ 骨格筋特異的カルパイン p94 の変異体を用いた構造・機能相関解析. 東レ先端研セミナー「タンパク質分解の生理機能と疾患－カルパインを中心として」、鎌倉、2004-03-05.
 - 12) 川畑順子^{2,3} 骨格筋特異的カルパイン p94 の新規バリエーションの発見とその生理的意義. 東レ先端研セミナー「タンパク質分解の生理機能と疾患－カルパインを中心として」、鎌倉、2004-03-05.
 - 13) 秦勝志³ 胃特異的カルパイン nCL-2/-2'の遺伝子改変マウスを用いた生理機能解析. 東レ先端研セミナー「タンパク質分解の生理機能と疾患－カルパインを中心として」、鎌倉、2004-03-05.
 - 14) 小野弥子^{2,3} 骨格筋特異的カルパイン p94 の活性評価と生理機能. 東レ先端研セミナー「タンパク質分解の生理機能と疾患－カルパインを中心として」、鎌倉、2004-03-05
 - 15) 小山傑^{1,3} 東大・院農生科筋特異的コネクチン結合型 RING フィンガータンパク質 MuRFs の生理機能解析. 東レ先端研セミナー「タンパク質分解の生理機能と疾患－カルパインを中心として」、鎌倉、2004-03-05
 - 16) 反町洋之^{1,2} カルパインの生理機能と糖尿病. 朝日生命成人病研究所セミナー、東京、2004-07-20
 - 17) 反町洋之^{1,2} カルパインの生理機能－カルパイン活性のない世界. 文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究:タンパク質分解－新しいモディファイアータンパク質による制御－平成 16 年度第 5 回公開シンポジウム「タンパク質分解:新たな展開をめざして」、札幌、2004-09-03.
 - 18) 反町洋之^{1,2} カルパインの新しい Ca²⁺-結合モチーフと構造・機能相関. 生理研研究会『カルシウムシグナリング研究の新潮流』、岡崎、2004-11-18.
 - 19) 反町洋之^{1,2} カルパインの構造・機能相関とその生物学的意義. 第 30 回応用酵素協会研究発表会、大阪、2004-11-29.
 - 20) 反町洋之^{1,2}、小山傑^{1,3}、秦勝志¹、千葉智樹¹、小野弥子¹、尾嶋孝一^{1,2}、Witt, C.⁴、武田伸一^{1,3}、Labeit, S.⁴、阿部啓子³ (¹³ 国立精神・神経セ) 筋原線維のメカノシグナル伝達複合体としてのコネクチン/タイチンと MuRFs の機能解析 Connectin/titin and MuRFs as a mechanosignal transducing complex in the myofibril. 第 27 回日本分子生物学会ワークショップ「メカノバイオロジーにおける分子細胞生物学的展開の最先端」、神戸、2004-12-10.
 - 21) 反町洋之^{1,2} 細胞内モジュレータ・プロテアーゼの生理機能の解明－カルパインによる生体制御機構. 2004 年度”タンパク質関連領域”合同シンポジウム、東京、2004-12-22
 - 22) 饗場篤^{2,9} 代謝型グルタミン酸受容体と高次脳機能 第 28 回日本神経科学学会大会、2005-7-26、横浜
 - 23) 反町洋之^{1,2} 細胞内モジュレータ・プロテアーゼの生理機能の解析 2005 年度”タンパク質関連領域”合同シンポジウム、2005-11-16; 大阪

- 24) 反町洋之^{1,2}, 小野弥子¹, 秦勝志¹, 尾嶋孝一^{1,2}, 林道夫^{2,5}, 土井奈穂子^{1,2}, 小山傑^{1,3}, 林智佳子^{1,6}, 川原裕之¹⁰, 柳田光昭⁷, 饗場篤^{2,9}, 前田達哉⁵ カルパイン-複合体の構成因子としてのモジュレータ・プロテアーゼ 第28回日本分子生物学会 シンポジウム「多彩なタンパク質分解マシナリー」、2005-12-9; 福岡
- 25) 反町洋之^{1,2} 細胞内モジュレータ・プロテアーゼ「カルパイン」による生体制御 東京理科大学 公開セミナー、2005-12-16; 野田
- 26) 反町洋之^{1,2} カルパインを標的とした筋ジストロフィー・糖尿病などの攻略への戦略 財団法人 東京都医学研究機構 第5回研究交流フォーラム、2006-03-03; 東京
- 27) 反町洋之^{1,2} タンパク質の機能 首都大学東京オープンユニバーシティ「生命を支える分子の働き:パート(1)」、2006-03-09; 東京
- 28) 反町洋之^{1,2} 細胞内モジュレータ・プロテアーゼ「カルパイン」による生体制御 東京理科大学 公開セミナー、2006-10-6; 野田
- 29) 反町洋之^{1,2} 筋ジストロフィー等カルパイン不全で発症する疾患の解明 首都大バイオコンファレンス 2006. 2006-10-12, 八王子
- 30) 反町洋之^{1,2} 細胞内「モジュレータ・プロテアーゼ」カルパインの機能不全と病態 順天堂大学 細胞生物学セミナー 2006-11-18, 東京
- 31) 反町洋之^{1,2} 細胞内モジュレータ・プロテアーゼの生理機能の解析 2006年度”タンパク質関連領域”合同シンポジウム、2006-12-5; 東京
- 32) 反町洋之^{1,2} モジュレータ・プロテアーゼ「カルパイン」の動作機序とその破綻による病態 東大・大学院総合文化研究科・生命環境科学系セミナー、2006-12-22, 東京
- 33) 小野弥子¹, 尾嶋孝一^{1,2}, 林智佳子^{1,6}, 土井奈穂子^{1,2}, 北村ふじ子¹, 小山傑^{1,3}, 秦勝志¹, Labeit, S.⁴, 柳田光昭⁷, 前田達哉^{2,5}; 反町洋之^{1,2} 筋特異的カルパインの新しい展開 第12回 病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会、2007-08-03, 大阪
- 34) 反町洋之^{1,2}, 前田達哉⁵, 饗場篤^{2,9} 細胞内モジュレータプロテアーゼの生理機能の解析 CREST「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」平成14年度採択課題終了シンポジウム、2007-11-15, 東京
- 35) 反町洋之^{1,2} カルパインによる生体のモジュレーション 九州大学大学院歯学研究院大学院 特別セミナー、2008-1-25, 福岡

② 口頭発表 (国際会議 2件、国内会議 12件)
(海外)

- 1) Ono, Y.¹, Fukuyo Torii³, Ojima, K.^{1,2}, Doi, N.^{1,2}, Yoshioka, K.³, Labeit, D.⁴, Labeit, S.⁴, Koichi Suzuki⁸, Keiko Abe³, Maeda, T.^{1,5}, and Sorimachi, H.^{1,2} Effect of N2A connectin/titin on disassembly of p94/CAPN3 caused by autolysis in IS2. 31st FEBS Congress “Molecules in Health & Disease”. 2006-6-25, İstanbul, Turkey
- 2) Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,2}, Doi, N.^{1,2}, Hayashi, C.^{1,6}, Fukuyo Torii³, Yoshioka, K.³, Labeit, D.⁴, Labeit, S.⁴, Koichi Suzuki⁸, Keiko Abe³, Maeda, T.^{1,5}, and Sorimachi, H.^{1,2} Relationships

between p94/CAPN3 and N2A connectin/titin in skeletal muscle under the normal and dystrophic conditions. *XIth International Congress on Neuromuscular Diseases*. 2006-7-3, İstanbul, Turkey.

(国内)

- 1) 吉岡克英^{1,2}、勝井順子^{1,2}、鳥居福代^{1,2}、木村映一^{1,2}、秦勝志^{1,2}、反町洋之^{1,2}、阿部啓子¹
骨格筋特異的カルパインの相互作用タンパク質の解析. *日本農芸化学会 2003 年度大会*、2003-4-2、藤沢
- 2) 小野弥子^{1,2}、川畑順子^{1,2}、木村映一^{1,2}、吉岡克英^{1,2}、鳥居福代^{1,2}、秦勝志^{1,2}、阿部啓子¹、反町洋之^{1,2}
骨格筋機能を制御するカルパインシステムの解析. *農芸化学会 2004 年度大会*、2004-03-29、広島
- 3) 白須賀有香子¹、朝倉富子¹、中島健一郎¹、反町洋之^{2,3}、阿部啓子¹
Curculigo latifolia 果実の味覚修飾タンパク質の精製及び構造解析. *農芸化学会 2004 年度大会*、2004-03-30、広島
- 4) 小野弥子^{1,2}、尾嶋孝一^{1,2}、Witt, C.⁴、Labeit, S.⁴、Granzier, H.⁴、川畑順子^{1,2}、土井奈穂子^{1,2}、秦勝志^{1,2}、小山傑^{1,2,5}、中尾晴美^{2,6}、饗場篤^{2,6}、鈴木紘一⁷、阿部啓子⁵、反町洋之^{1,2}
mdm マウスは骨格筋特異的カルパインとコネクチンをつなぐか? *農芸化学会 2005 年度大会*、2005-03-29、札幌
- 5) 小山傑^{1,2,3}、秦勝志^{1,3}、小野弥子^{1,3}、尾嶋孝一^{1,3}、Witt, C.⁴、Labeit, S.⁴、松本一朗²、阿部啓子²、反町洋之^{1,3}
筋特異的ユビキチンリガーゼ MuRFs の機能解析 *農芸化学会 2005 年度大会*、2005-03-29、札幌
- 6) 中島健一郎¹、朝倉富子¹、松本一朗¹、秦勝志^{2,3}、反町洋之^{2,3}、阿部啓子¹
新規味覚修飾タンパク質”ネオクリン”の遺伝子構造の解析 *農芸化学会 2005 年度大会*、2005-03-30、札幌
- 7) 小野弥子¹、尾嶋孝一^{1,2}、林智佳子^{1,3}、柳田光昭⁴、小川秀興⁴、土井奈穂子^{1,2}、小山傑^{1,5}、秦勝志¹、饗場篤⁶、反町洋之^{1,2}
骨格筋特異的カルパイン p94/カルパイン 3 の生化学的解析 *農芸化学会 2006 年度大会*、2006-03-26、京都
- 8) 小山傑^{1,2}、秦勝志¹、小野弥子¹、尾嶋孝一^{1,3}、Witt, C.⁴、Labeit, S.⁴、松本一朗²、阿部啓子²、反町洋之^{1,3}
RING フィンガータンパク質 MuRFs とコネクチンを介した筋委縮シグナル伝達系の解析 *農芸化学会 2006 年度大会*、2006-03-27、京都
- 9) 林智佳子^{1,6}、小野弥子¹、尾嶋孝一^{1,2}、土井奈穂子^{1,2}、Siegfried, Labeit⁴、新井孝夫⁶、田口速男⁶、反町洋之^{1,2}
骨格筋における p94; コネクチンおよび Marps の相互作用解析 *農芸化学会 2007 年度大会*、2007-03-25; 東京
- 10) 小山傑^{1,2}、秦勝志¹、小野弥子¹、尾嶋孝一^{1,3}、Witt, C.⁴、Labeit, S.⁴、阿部啓子²、反町洋之^{1,3}
RING タンパク質 MuRF1 を介した筋細胞エネルギー恒常性維持機構の解析 *農芸化学会 2007 年度大会*、2007-03-25; 東京
- 11) 小山傑^{1,2}、秦勝志¹、Witt, C.C.⁴、Lerche, S.⁴、小野弥子¹、尾嶋孝一^{1,3}、土井奈穂子^{1,3}、北村ふじ子¹、Witt, S.H.⁴、Rybin, V.⁴、Gasch, A.⁴、Franz, T.⁴、Labeit, S.⁴、阿部啓子²、反町洋之^{1,3}
筋特異的 RING タンパク質 MURF1 による筋型クレアチンキナーゼの分解制御—MURF1

を介した筋細胞代謝の恒常性維持機構— 日本農芸化学会大会 2008、2008-3-26、名古屋

- 12) 小野弥子¹, 林智佳子^{1,6}, 土井奈穂子^{1,3}, 秦勝志¹, 反町洋之^{1,3} 「p94トラップ法」を用いた p94/カルパイン 3 の構造-機能相関解析 日本農芸化学会大会 2008、2008-3-26、名古屋

③ ポスター発表 (国際会議 26 件、国内会議 28 件)
(海外)

- 1) Ojima, K.^{1,2}, Ono, Y.¹, Doi, N.^{1,2}, Labeit, S.⁴, and Sorimachi, H.^{1,2} Impact of proteolytic activity of muscle-specific calpain, p94/calpain3, on its localization in sarcomeres. *The American Society for Cell Biology, the 47th Annual meeting*, 2007-12-1, Washington, DC, USA.
- 2) Ojima, K.^{1,2}, Ono, Y.¹, Doi, N.^{1,2}, Yoshioka, K.³, Kawabata, Y.^{2,3}, Labeit, S.⁴, and Sorimachi, H.^{1,2} Myogenic stage, sarcomere length and protease activity modulate localization of muscle-specific calpain p94/calpain 3. *FASEB Summer Research Conferences – The Biology of Calpains in Health & Disease*, 2007-07-15, Colorado, USA
- 3) Ono, Y.¹, Hayashi, C.^{1,2}, Doi, N.^{1,3}, Kitamura, F.¹, Shindo, M.⁴, Kenichi Kudo⁵, Tsubata, T.⁴, Yanagida, M.⁶, and Sorimachi, H.^{1,3} Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics. *FASEB Summer Research Conferences – The Biology of Calpains in Health & Disease*, 2007-07-15, Colorado, USA
- 4) Koyama, S.^{1,3}, Hata, S.¹, Witt, C.⁴, Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,3}, Chiba, T.⁴, Doi, N.^{1,3}, Kitamura, F.¹, Tanaka, K.⁴, Keiko Abe², Witt, S.⁴, Labeit, S.⁴, Sorimachi, H.^{1,3} Muscle RING-Finger Protein 1 (MuRF1) Ubiquitinates Muscle Type Creatine Kinase *via* for Degradation *in vivo* – Possible Regulation of Muscle Metabolic Homeostasis by MuRF1 *Xth International Symposium on PROTEINASE INHIBITORS AND BIOLOGICAL CONTROL: From single molecules to degradomics*, 2007-06-24, Portoroz, Slovenia
- 5) Ono, Y.¹, Hayashi, C.^{1,2}, Doi, N.^{1,3}, Kitamura, F.¹, Shindo, M.⁴, Kenichi Kudo⁵, Tsubata, T.⁴, Yanagida, M.⁶, and Sorimachi, H.^{1,3} (⁴Proteomics Small Mol. Div., Appl. Biosystems Japan Ltd.; ⁵KYA TECH Co.; ⁶Inst. Env. Gender Specific Med., Juntendo Univ. Grad. Sch. Med) Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics *Xth International Symposium on PROTEINASE INHIBITORS AND BIOLOGICAL CONTROL: From single molecules to degradomics*, 2007-06-24, Portoroz, Slovenia
- 6) K. Ojima,^{1,2} Y. Ono,¹ N. Doi,^{1,2} K. Yoshioka,³ Y. Kawabata,³ H. Sorimachi^{1,2} Interaction between p94/calpain 3 and sarcomeric- α -actinin in skeletal muscles *The American Society for Cell Biology, the 46th Annual meeting*, 2006-12-13, San Diego, CA, USA.
- 7) Ono, Y.¹, Fukuyo Torii², Ojima, K.^{1,3}, Doi, N.^{1,3}, Yoshioka, K.², Kawabata, Y.², Tagami, M.^{1,4}, Labeit, D.⁴, Labeit, S.⁴, Koichi Suzuki⁶, Keiko Abe², Maeda, T.^{1,5}, and Sorimachi, H.^{1,3} Evaluation of Autolytic Disassembly of p94/calpain 3 in a Genetic Reporter System. *5th International Conference on Cysteine Proteinases and Their Inhibitors: From Structure to Regulation and Biology*. 2006-9-3, Portoroz, Slovenia.

- 8) Koyama, S.^{1,3}, Hata, S.¹, Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,3}, Chiba, T.⁴, Doi, N.^{1,3}, Witt, C.⁴, Keiko Abe², Labeit, S.⁴, Sorimachi, H.^{1,3} Modulation of striated muscle energy homeostasis by M-line ubiquitin ligase MuRF1 - Possible involvement of the calpain system *5th International Conference on Cysteine Proteinases and Their Inhibitors: From Structure to Regulation and Biology*. 2006-9-3, Portoroz, Slovenia.
- 9) Hayashi, C.^{1,2}, Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,3}, Doi, N.^{1,3}, Hayao Taguchi² and Sorimachi, H.^{1,3} Involvement of the calpain system in the molecular interactions at connectin/titin N2A region in skeletal muscle. *5th International Conference on Cysteine Proteinases and Their Inhibitors: From Structure to Regulation and Biology*. 2006-9-3, Portoroz, Slovenia.
- 10) Ojima, K.^{1,2}, Ono, Y.¹, Doi, N.^{1,2}, Labeit, S.⁴, Sorimachi, H.^{1,2} Spatio-temporal expression of muscle-specific calpain, p94/calpain 3, during myogenesis. *XIth International Congress on Neuromuscular Diseases*. 2006-7-3, İstanbul, Turkey.
- 11) Ojima, K.^{1,2}, Ono, Y.¹, Doi, N.^{1,2}, Labeit, S.⁴, Sorimachi, H.^{1,2} Developing myotubes regulate the expression and localization of muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. 2006-6-23, Kyoto, Japan
- 12) Koyama, S.^{1,3}, Hata, S.¹, Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,3}, Chiba, T.⁴, Doi, N.^{1,3}, Witt, C.⁴, Keiji Tanaka⁴, Keiko Abe², Labeit, S.⁴, Sorimachi, H.^{1,3} Muscle ubiquitin ligase MuRF1 may modulate energy homeostasis in striated muscles. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. 2006-6-23, Kyoto, Japan
- 13) Hata, S.¹, Koyama, S.^{1,3}, Hiroyuki Kawahara³, Doi, N.^{1,4}, Maeda, T.^{1,5}, Noriko Toyama-Sorimachi⁶, Keiko Abe², Koichi Suzuki⁷, Sorimachi, H.^{1,4} Physiological functions of a stomach-specific calpain, nCL-2, in the mucus secreting cells. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. 2006-6-23, Kyoto, Japan
- 14) Hayashi, C.^{1,2}, Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,3}, Doi, N.^{1,3}, Labeit, S.⁴, Yanagida, M.⁵, Hideoki Ogawa⁵, Takao Arai², Sorimachi, H.^{1,3} Functions of calpain system in N2A connectin signaling complex in skeletal muscle. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. 2006-6-23, Kyoto, Japan
- 15) Ojima, K.^{1,2}, and Sorimachi, H.^{1,2} Expression of muscle-specific calpain, p94/calpain3, at the N2A and M-line regions of connectin/titin during myogenesis. *The American Society for Cell Biology, the 45th Annual meeting*, 2005-12-11, San Francisco, CA, USA.
- 16) Ono, Y.^{1,2}, Ojima, K.^{1,2}, Yanagida, M.³, Doi, N.^{1,2}, Hayashi, C.^{1,2,4}, Labeit, S.⁴, Aiba, A.^{2,6}, and Sorimachi, H.^{1,2} Molecular components involved in compromised skeletal muscle functions in p94/calpain3 and/or connectin/titin deficient mice; links between calpain proteolytic system and sarcomere structure. *International Symposium on Life of Proteins*, 2005-11-01, Awajishima, Japan

- 17) Koyama, S.^{1,3,3}, Hata, S.^{1,3}, Ono, Y.^{1,3}, Ojima, K.^{1,3}, Chiba, T.¹, Doi, N.^{1,3}, Witt, C.⁴, Abe, K.², Labeit, S.⁴, Sorimachi, H.^{1,3} Functional analysis of muscle specific RING finger protein, MuRF1. *The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology (第58回(平成17年度)日本細胞生物学会大会 in English)*, Omiya, Japan, 2005-6-17.
- 18) Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,2,3}, Kawahara, H.⁴, Doi, N.^{1,2}, Abe, K.³, Suzuki, K.⁵, Sorimachi, H.^{1,2} Physiological functions of stomach-specific calpain, nCL-2 in mucus cells. *The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology (第58回(平成17年度)日本細胞生物学会大会 in English)*, Omiya, Japan, 2005-6-17.
- 19) Ojima, K.^{1,2}, Ono, Y.^{1,2}, Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,3,3}, Doi, N.^{1,2}, Sorimachi, H.^{1,2} Spatio-temporal expression of muscle specific calpain, p94/calpain3, during myogenesis. *The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology (第58回(平成17年度)日本細胞生物学会大会 in English)*, Omiya, Japan, 2005-6-17.
- 20) Ono, Y.^{1,2}, Ojima, K.^{1,2}, Doi, N.^{1,2}, Witt, C.⁴, Witt, S.⁴, Granzier, H.⁴, Labeit, S.⁴, Suzuki, K.⁵, Sorimachi, H.^{1,2} Characterization of dystrophic phenotypes of *mdm* skeletal muscle and the relevance of calpain proteolytic system therein. *The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology (第58回(平成17年度)日本細胞生物学会大会 in English)*, Omiya, Japan, 2005-6-17.
- 21) Sorimachi, H.^{1,2}, Ojima, K.^{1,2}, Katsui, Y.^{1,2}, Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,2,3}, Doi, N.^{1,2}, Ono, Y.^{1,2} Analysis of calpainopathy by 2D-electrophoresis. *The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology (第58回(平成17年度)日本細胞生物学会大会 in English)*, Omiya, Japan, 2005-6-17.
- 22) Ojima, K.^{1,2}, Kawabata, Y.^{1,2}, Ono, Y.^{1,2}, Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,3,3}, Witt, C.⁴, Labeit, S.⁴, Abe, K.³, and Sorimachi, H.^{1,2} Ubiquitous expression of newly identified p94/calpain 3 variants. *The American Society for Cell Biology, the 44th Annual meeting*, Washington, DC, USA, 2004-12-6.
- 23) Koyama, S.^{1,3,3}, Hata, S.^{1,3}, Ono, Y.^{1,3}, Witt, C.⁴, Abe, K.², Labeit, S.⁴, and Sorimachi, H.^{1,3} Analysis of functions of muscle specific RING finger protein, MuRFs, and its relationships with calpain system. (Poster). FASEB Summer Research Conferences – Biology of the calpains in Health and Disease, 2004-6-15 (6/12-17), Tucson, AZ, U.S.A.
- 24) Ono, Y.^{2,3}, Kakinuma, K.^{2,3}, Torii, F.³, Irie, A.³, Nakagawa, K.³, Labeit, S.⁴, Abe, K.³, Suzuki, K.⁸, and Sorimachi, H.^{2,3} Enzymatic characterization and establishment of an assay system of skeletal-muscle-specific calpain, p94/calpain 3, towards diagnosis of muscular dystrophies. *The 3rd General Meeting of the IPS (International Proteolysis Society)*, Nagoya, Japan, 2003-11-13.
- 25) Kawabata, Y.^{2,3}, Hata, S.³, Ono, Y.^{2,3}, Suzuki, K.⁸, Abe, K.³, and Sorimachi, H.^{2,3} A third promoter of *CAPN3*, responsible gene for LGMD2A, drives ubiquitous expression of p94 variants. *The 3rd General Meeting of the IPS (International Proteolysis Society)*, Nagoya, Japan, 2003-11-13.
- 26) Torii, F.³, Nakagawa, K.³, Hata, S.³, Ono, Y.^{2,3}, Kawabata, Y.^{2,3}, Yoshioka, K.³, Abe, K.³, and

Sorimachi, H.^{2,3} Molecular mechanism of autolytic processes of p94/calpain 3 analyzed by N358D mutant. *The 3rd General Meeting of the IPS (International Proteolysis Society)*, Nagoya, Japan, 2003-11-13.

(国内)

- 1) 秦勝志³、小野弥子^{2,3}、木村映一^{2,3}、川畑順子^{2,3}、鳥居福代³、吉岡克英³、阿部啓子³、鈴木絃一⁸、反町洋之^{2,3} カルパインの生理機能解明に向けて--組織特異的カルパインの解析-- Analysis of physiological functions of tissue-specific calpains. 第3回日本タンパク質科学学会年会、2003-6-25、札幌
- 2) 小野弥子^{2,3}、柿沼良美^{2,3}、鳥居福代³、入江章太³、中川和博³、Labeit, S.⁴、阿部啓子³、鈴木絃一⁸、反町洋之^{2,3} Enzymatic characterization of skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain3, and application to LGMD2A. 第76回日本生化学会大会、2003-10-18、横浜
- 3) 木村映一^{2,3}、阿部啓子³、鈴木絃一⁸、反町洋之^{2,3} Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K interacts with and is proteolyzed by calpain *in vivo*. 第76回日本生化学会大会、2003-10-18、横浜
- 4) Kawabata, Y.^{1,2}, Nakao, H.^{2,3}, Ojima, K.^{1,2}, Ono, Y.^{1,2}, Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,3,4}, Witt, C.⁴, Labeit, S.⁴, Kawahara, H.⁶, Abe, K.⁴, Suzuki, K.⁷, Aiba, A.^{2,3}, and Sorimachi, H.^{1,2} Novel functions of skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3, shown by mutant mice. 第77回日本生化学会大会、2004-10-15、横浜
- 5) Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,3,3}, Kawahara, H.⁴, Abe, K.³, Suzuki, K.⁵, and Sorimachi, H.^{1,2} Physiological functions of stomach-specific calpains revealed by genetically modified mice. 第77回日本生化学会大会、2004-10-15、横浜
- 6) Koyama, S.^{1,3,3}, Hata, S.^{1,3}, Ono, Y.^{1,3}, Witt, C.⁴, Abe, K.², Labeit, S.⁴, and Sorimachi, H.^{1,3} Analysis of functions of muscle specific RING finger protein, MuRF-1, and its relationships with calpain system. 第77回日本生化学会大会、2004-10-15、横浜
- 7) Ono, Y.^{1,2}, Kakinuma, K.³, Torii, F.^{2,3}, Irie, A.³, Kawabata, Y.^{1,2}, Nakagawa, K.³, Witt, C.⁴, Labeit, S.⁴, Abe, K.³, Suzuki, K.⁵, and Sorimachi, H.^{1,2} Deciphering the functional properties of p94/calpain 3 in skeletal muscle. 第77回日本生化学会大会、2004-10-15、横浜
- 8) 小野弥子^{1,2}、土井奈穂子^{1,2}、尾嶋孝一^{1,2}、Witt, S.⁴、Witt, C.⁴、Labeit, S.⁴、反町洋之^{1,2} *mdm* マウス骨格筋における、p94 及びコネクチンの挙動について Functional properties of p94/calpain3 and connetin/titin in *mdm* mouse skeletal muscle. 第27回日本分子生物学会、2004-12-10、神戸
- 9) 小澤美来¹、斉藤太郎¹、藤田悠一¹、鈴木久美子¹、浅田明子¹、反町洋之^{2,3}、久永真市¹ カルパインによる限定分解の抑制に関わる Cdk5 活性化サブユニット p35 のリン酸化部位. Phosphorylation inhibitory for the cleavage of a p35 Cdk5 activator by calpain. 第27回日本分子生物学会、2004-12-10、神戸
- 10) Ojima, K.^{1,2}, Ono, Y.^{1,2}, Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,2,3} Doi, N.^{1,2}, and Sorimachi, H.^{1,2} Incorporation

- of muscle-specific calpain, p94/calpain 3, into the N2A and M-line regions of connectin/titin during myogenesis. 第78回日本生化学会大会、2004-10-21、神戸
- 11) Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,2,3}, Kawahara, H.⁴, Doi, N.^{1,2}, Maeda, T.^{1,5}, Sorimachi, N.⁶, Abe, K.³, Suzuki, K.⁷, and Sorimachi, H.^{1,2} Physiological functions of stomach-specific calpain, nCL-2, in mucus cells. 第78回日本生化学会大会、2004-10-21、神戸
 - 12) 亀井大嗣¹、斉藤太郎¹、小澤美来¹、浅田明子¹、反町洋之^{2,3}、久永真市¹ Cdk5 活性化サブユニット p35 のカルパインによる限定分解のリン酸化依存的調節 (Regulation of the calpain-dependent cleavage of a p35 Cdk5 activator by phosphorylation.) 第28回日本分子生物学会、2004-12-9、福岡
 - 13) 小野弥子^{1,2}、尾嶋孝一^{1,2}、川畑順子^{1,2}、林智佳子^{1,2,3}、土井奈穂子^{1,2}、Labeit, S.⁴、饗場篤^{2,5}、反町洋之^{1,2} p94/カルパイン 3 活性欠損マウス及びコネクチン変異マウスを用いた筋生理機能の比較解析 (Comparative analyses of skeletal muscle dysfunctions caused by defects in p94/calpain3 protease activity and connectin/titin based molecular interactions.) 第28回日本分子生物学会、2004-12-9、福岡
 - 14) 林智佳子^{1,2,3}、小野弥子^{1,3}、尾嶋孝一^{1,3}、土井奈穂子^{1,3}、柳田充昭⁴、小川秀興⁴、新井孝夫²、反町洋之^{1,3} 骨格筋におけるカルパインシステムと筋タンパク質との機能的相互作用に関する解析 (Functional interaction of calpain system and muscle proteins.) 第28回日本分子生物学会、2004-12-9、福岡
 - 15) 秦勝志^{1,2}、小山傑^{1,2,3}、川原裕之⁴、土井奈穂子^{1,2}、前田達哉^{1,5}、反町典子⁶、阿部啓子³、鈴木紘一⁷、反町洋之^{1,2} 粘液分泌細胞における胃特異的カルパイン nCL-2 の生理機能解析 (Physiological functions of stomach-specific calpain, nCL-2, in mucus cells) 第28回日本分子生物学会、2004-12-9、福岡
 - 16) Ojima, K.^{-1,2}, Ono, Y.^{1,2}, Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,2,3}, Doi, N.^{-1,2}, and Sorimachi, H.^{-1,2} Incorporation of muscle-specific calpain, p94/calpain 3, into the N2A and M-line regions of connectin/titin during myogenesis. 第78回日本生化学会大会、2005-10-21、神戸
 - 17) Hata, S.^{1,2}, Koyama, S.^{1,2,3}, Kawahara, H.⁴, Doi, N.^{1,2}, Maeda, T.^{1,5}, Sorimachi, N.⁶, Abe, K.³, Suzuki, K.⁷, and Sorimachi, H.^{1,2} Physiological functions of stomach-specific calpain, nCL-2, in mucus cells. 第78回日本生化学会大会、2005-10-21、神戸
 - 18) Ohtani, Y.¹, Hashimoto, K.², Tabata, H.², Kishimoto, Y.², Fukaya, M.³, Nakao, K.⁴, Kassai, H.¹, Watanabe, M.³, Kano, M.², and Aiba, A.^{1,5} C-terminal domain of mGluR1a is essential for synapse elimination and eye-blink conditioning. 第28回日本神経科学会大会、2005-7-26、横浜
 - 19) 亀井大嗣¹、斉藤太郎¹、小澤美来¹、浅田明子¹、反町洋之^{2,3}、久永真市¹ (1 首都大東京・理) Cdk5 活性化サブユニット p35 のカルパインによる限定分解のリン酸化依存的調節 第28回日本分子生物学会、2005-12-9、福岡
 - 20) 小野弥子^{1,2}、尾嶋孝一^{1,2}、川畑順子^{1,2}、林智佳子^{1,2,3}、土井奈穂子^{1,2}、Labeit, S.⁴、饗場篤^{2,5}、反町洋之^{1,2} p94/カルパイン 3 活性欠損マウス及びコネクチン変異マウスを用いた筋生

- 理機能の比較解析 第28回日本分子生物学会, 2005-12-9; 福岡
- 21) 林智佳子^{1,2,3}; 小野弥子^{1,3}; 尾嶋孝一^{1,3}; 土井奈穂子^{1,3}; 柳田充昭⁴; 小川秀興⁴; 新井孝夫²; 反町洋之^{1,3} 骨格筋におけるカルパインシステムと筋タンパク質との機能的相互作用に関する解析 第28回日本分子生物学会, 2005-12-9; 福岡
 - 22) 秦勝志^{1,2}; 小山傑^{1,2,3}; 川原裕之⁴; 土井奈穂子^{1,2}; 前田達哉^{1,5}; 反町典子⁶; 阿部啓子³; 鈴木紘一⁷; 反町洋之^{1,2} 粘液分泌細胞における胃特異的カルパイン nCL-2 の生理機能解析 第28回日本分子生物学会, 2005-12-9; 福岡
 - 23) Ojima, K.^{1,2}, Ono, Y.¹, Doi, N.^{1,2}, Yoshioka, K.³, Kawabata, K.^{2,3}, Sorimachi, H.^{1,2} Muscle specific calpain, p94, binds to sarcomeric- α -actinin 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会, 2007-05-28; 福岡
 - 24) 高谷恵美¹, 大迫洋平¹, 前田達哉², 人見清隆¹, 柴田英樹¹, 牧正敏¹ ヒト calpain7/PalBH の相互作用因子探索 第12回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2007-08-03, 大阪
 - 25) 小野弥子¹; 林智佳子^{1,3}; 土井菜穂子^{1,2}; 北村ふじこ¹; 柳田光昭⁴; 反町洋之^{1,2} プロテオーム解析による p94/calpain 3 の基質タンパク質検索 第12回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2007-08-03, 大阪
 - 26) 尾嶋孝一^{1,2}; 川畑順子^{2,3,4}; 中尾晴美⁴; 小野弥子^{1,2}; 土井奈穂子^{1,2}; 北村ふじ子¹; 秦勝志^{1,3}; 川原裕之⁵; Witt, C.⁴; Labeit, S.⁴; 鈴木紘一^{7,8}; 阿部啓子⁴; 前田達哉⁷; 饗場篤^{2,4}; 反町洋之^{1,2} 骨格筋特異的なカルパイン p94 の遺伝子改変マウスは筋ジストロフィー様の症状を呈する 第12回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2007-08-03, 大阪
 - 27) 小山傑^{1,2}; 秦勝志¹; Witt, C.⁴; 小野弥子¹; 尾嶋孝一^{1,3}; 土井菜穂子^{1,3}; 北村ふじ子¹; Witt, S.⁴; Labeit, S.⁴; 阿部啓子²; 反町洋之^{1,3} 筋特異的 RING タンパク質 MuRF1 による筋型クレアチンキナーゼの分解制御—MuRF1 を介した筋細胞代謝の恒常性維持機構について 第12回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2007-08-03, 大阪
 - 28) 林智佳子^{1,2}; 小野弥子¹; 尾嶋孝一^{1,3}; 土井奈穂子^{1,3}; Labeit, S.⁴; 新井孝夫²; 田口速男²; 反町洋之^{1,3} p94/カルパイン 3; コネクチンおよび MARPs の相互作用による骨格筋機能制御 第12回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会, 2007-08-03, 大阪
 - 29) 林智佳子¹ コネクチンを足場とした筋分子ネットワークでのカルパイン機能 首都大学東京バイオカンファレンス2007, 2007-10-25, 東京
 - 30) 反町洋之^{1,3} カルパインプロジェクトの紹介 首都大学東京バイオカンファレンス 2007, 2007-10-25, 東京
 - 31) 高原照直, 反町洋之^{1,3}, 前田達哉 Tosyl Phenylalanyl Chloromethyl Ketone (TPCK) による mTOR 経路阻害機構の解析 BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会), 2007-12-11, 横浜
 - 32) 尾嶋孝一^{1,3}, 小野弥子¹, 土井奈穂子^{1,3}, 吉岡克英, 川畑順子, Labeit, S., 反町洋之^{1,3} 骨格筋特異的なカルパイン p94/calpain 3 のサルコメア長に依存した局在変化 BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会), 2007-12-12, 横浜

- 33) 秦勝志¹, 北村ふじ子¹, 土井奈穂子^{1,3}, 反町洋之^{1,3} 胃特異的カルパイン nCL-2/calpain 8a の酵素学的性質の解析 *BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)*, 2007-12-12, 横浜
- 34) Hayashi, C.¹, Ono, Y.¹, Ojima, K.^{1,3}, Doi, N.^{1,3}, Labeit, S., Yanagida, M., Ogawa, H., Arai, T., Taguchi, H., and Sorimachi, H.^{1,3} Molecular interactions at N2A connectin in skeletal muscle. *BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)*, 2007-12-12, 横浜
- 35) 小山傑, 秦勝志¹, Witt, C.C., Lerche, S., 小野弥子¹, 尾嶋孝一^{1,3}, 土井奈穂子^{1,3}, 北村ふじ子¹, Witt, S.H., Rybin, V., Gasch, A., Franz, T., Labeit, S., 阿部啓子, 反町洋之^{1,3} 筋特異的 RING タンパク質 MURF1 による筋型クレアチンキナーゼの分解制御—MURF1 を介した筋細胞代謝の恒常性維持機構— *BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)*, 2007-12-14, 横浜

(4)特許出願

- ①国内出願 (0 件)
- ②海外出願 (0 件)

(5)受賞等

①受賞

- 1) Koyoma, S.(小山傑): *Murachi Award in FASEB Summer Research Conferences – Biology of the calpains in Health and Disease*, Tucson, AZ, USA, 2004-6-17.(当該学会(3年に1回)でポスター発表したポスドク・学生の中から顕著な功績を上げたと考えられる者2~4名に与えられる賞です。英語で受賞口頭講演も行いました。)
- 2) 尾嶋孝一: *病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会 第12回学術奨励賞* (当該学会(年1回)でポスター口頭発表したポスドク・学生の中から優秀な者12名に与えられる賞です。)大阪, 2007-8-3.
- 3) Ono, Y.(小野弥子) *et al.*: 下記の論文(5月1日公開)が *Biotech. J.* の”Most Accessed Articles”(月間最多被アクセス論文-毎月上位12報が統計的に自動的に選択されます)の一つに5月(6位)、6月(6位)、7月(9位)と3ヶ月連続で選ばれました(他のほとんどは総説であり、原著論文としては異例のことです)。
Ono, Y. *et al.* (2007) Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics - Possible regulation of protein synthesis by p94. *Biotech. J.*, **2**, 565-576.
- 4) 反町洋之: 財団法人東京都医学研究機構職員表彰、東京, 2007-10-16.

②新聞報道: ありません。

③その他: ありません。

(6)その他特記事項

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 1,700 spots、現在は 384 spots が限界)技術の開発を行い、実用化した。この技術が用いると、LC-MALDI の取り扱いが格段に簡単になる。

7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2005 年 10 月 20 日	The 78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (第 78 回日本生化学会大会) Mini-Symposium “Pathology of calpain” (in English)	神戸、国際会議場	約 150 名	カルパインは様々の生理過程や病理現象に関与し、その活性は特異的阻害タンパク質カルパスタチンで厳密に制御されている。最近、カルパイン、カルパスタチン遺伝子改変動物の作出により、これまでの常識がうち破られる一方、成熟脳での神経変性や臓器特異的疾患におけるカルパインの関与が明らかになってきた。さらに、カルパイン特異的阻害剤を用いた医学的応用の機運も高まっている。本シンポジウムでは、国内外で活発にカルパイン研究に取り組む新進の研究者を招待し、最前線の知見をもって、カルパインに関する議論を行った。
2005 年 11 月 15 日	チーム内ミーティング	大阪、千里阪急ホテル	6 名	これまでの研究経緯の確認と今後の研究方向の打ち合わせ
2007 年 3 月 9 日	チーム内ミーティング	東京都臨床医学総合研究所	4 名	これまでの研究経緯の確認と今後の研究方向の打ち合わせ
2007 年 9 月 7 日	チーム内ミーティング	東京都臨床医学総合研究所	3 名	これまでの研究経緯の確認と終了報告に関する打ち合わせ

8 結び

今でも、5年前に本CRESTの採択の通知を頂いたときの信じられないぐらいに嬉しかった想いと、良き友人でもある共同研究者の前田と祝杯をあげたことを、昨日のこのように思い出します。その時はずいぶん長いと感じた5年半でしたが、終わってみるとまるで邯鄲の夢のようです。しかし、この間の平成16年4月1日に、反町は東京大学から東京都臨床医学総合研究所に異動し、それに伴う研究室の新設と移動のため、平成15年の終わりから1年近くにわたってほとんどまともに研究ができない状態となっていました。しかしながら、大島泰郎先生をはじめ多くのスタッフの方々にサポートしていただいたために、これを乗り切ることができ、さらに、CREST 研究員・研究補助員として大変優秀な人材が何人も研究に合流してくれたため、平成17年以降、大きく研究を展開できました。今回、この報告書を作成することは、5年半の間の自分たちの仕事をあらためてきちんと整理する貴重な機会となりました。

中途のブランクはかなり大きかったですが、研究環境としては、大学よりも東京都臨床医学総合研究所の方が格段に勝るため、本CREST 研究期間全体で考えれば、差し引き生産性は倍増したと考えています。現在、投稿中、投稿準備中の論文が10近くあり、可及的速やかに投稿を終了し、CREST の成果として残したいと思います。達成度、意義に関して、少なくともこれ以上はできないところまで全身全霊を研究につき込んだ、ということだけは胸を張って言うことができます。いくつかの研究上の岐路についても、retrospective にもう一方の選択肢の方が良かったと思う部分もありますが、その時の選択としては正しかったと思っています。結果として、あまり派手な成果はありませんが、少なくとも純粋科学的に自分として満足のいく論文をいくつも書くことができたことは、まさにCREST のおかげであると思っています。特に、前田研究グループの長年の成果の結晶として、酵母カルパインホモログの関与するストレス応答システムの全体像を明らかにして、論文発表できたこと、また、饗場研究グループの高度な技術によりノックインマウスが作出できたことなどは、その成果自体も意義あるものと考えますが、極めて複雑な哺乳類カルパインシステムの一つのモデル系として酵母の系をお手本にして、ノックインマウスで検証することができる、という観点でも大きな意味を持っていると思います。

カルパインは、今話題となっているいくつかのプロテアーゼシステムや、リン酸化システムなどと比較すると、「わかりにくい」システムであり、なかなか「なるほど」と思うような形で成果を上げにくいものです。その最大の理由は、*in vivo* でカルパインは、存在量としてはかなりあるにもかかわらず、量的・時空間的に極めて限定されて活性化する、ということだと思われます。さらに、その相手(基質)となるものは多岐にわたっており、それらへの作用は極めて微小(ファインチューニングというイメージでしょうか)であって、しかも一部を除いて、そのアフィニティはあまり高くないという、あまり有り難くない性質を持っています。しかし、逆に言えば、これこそがカルパインの作動原理と言うこともできます。一方で、「カルパインが欠損すると致死や病態を引き起こす」という入口と出口は、遺伝学的にしっかりと抑えられているので、焦らずに、一つ一つの相互作用をきちんと解析していき、最終的に全体像を明らかにしたい、と考えています。

現在のカルパイン研究分野は、様々な疾患や細胞内情報伝達系への関与が報告され、大きくふくらんでおり、間もなく来るであろうブレイクスルーを誰もが待っている状態です。この状況は、ブ

ロテアソームの研究がユビキチンリガーゼの多様性の発見とともに大ブレイクした状況や、オートファジー系の研究が酵母における責任遺伝子の同定とともに大きく研究が展開している状況の、直前の状態に類似しているかもしれません。他の研究も同様ですが、カルパインのブレイクスルーも、遺伝学と生化学の有機的なコンビネーションによる研究にしかあり得ないと思っています。

同時に、CREST の研究において、技術の重要性が身に滲みました。遺伝子改変マウス、酵母遺伝学、プロテオーム解析、立体構造解析などなど、これらの技術の進歩と利用がなければ研究のブレイクスルーもあり得ないことがよく分かりました。しかし、逆に技術だけ有っても何も産み出さないのも事実で、その前には特定の分子あるいは現象に注目した地道な研究があって、初めて技術が生きて考えられます。よく言われることですが、純粋科学と技術は車の両輪であり、その意味で、科学技術振興機構が科学技術を振興するのではなく、科学と技術の両方を振興する機構で、いつまでもあって欲しいと思います。長い間の本当に多大なるサポートに、心から感謝いたします。



反町グループの現メンバーの一部(東京都臨床医学総合研究所)



平成 14 年秋、開始当時の反町グループのメンバー(東京大学)



前田グループのメンバー(東京大学)



饗場研マウス室の様子(神戸大学)



饗場グループのメンバー(神戸大学)