

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏名 秦 勝志

指導教官名 前田 達哉

論文題目

胃特異的に発現するカルパインの解析

I. はじめに

細胞内情報伝達系は細胞が接している外部環境からの刺激、情報を細胞内部に伝達する系であり、これが適正に働くためには、受容した情報を細胞内部に伝達する機能分子の各々が正確に発現、修飾、分解することが必要となる。この場合、細胞内プロテアーゼは蛋白質分解という代謝回転システムにおいて翻訳ミスやミスフォールディングによる異常蛋白質や不要蛋白質の分解を司る一方、基質蛋白質のモジュレーターとしてポジティブな役割をも演じることが明らかとなっている。さらに、これら一連の反応は、生化学的に不可逆的であることから、厳密に制御されており、その制御機構に狂いが生じた時、生体に多大な害を及ぼすこととなる。

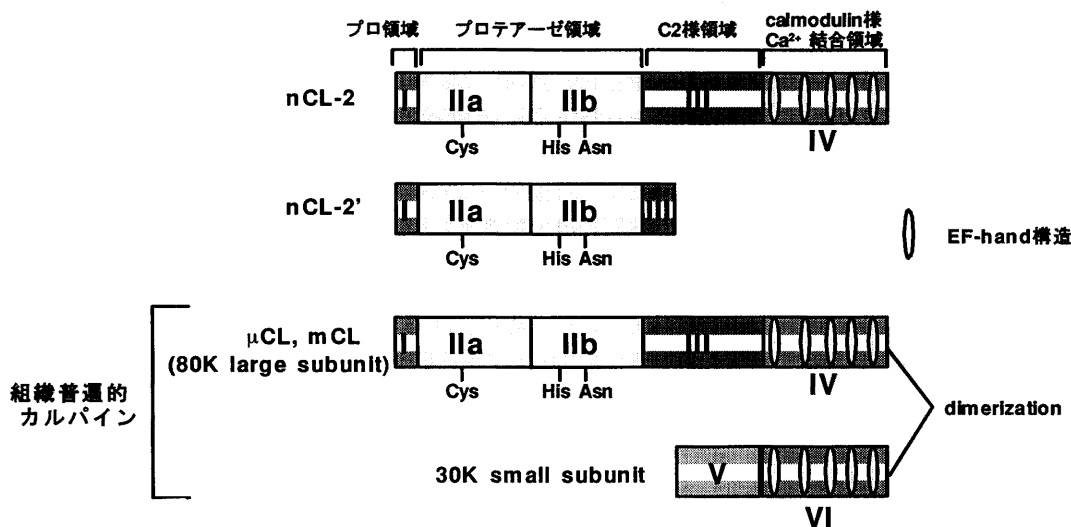
細胞内の蛋白質分解系にはおもにカテプシン、プロテアソーム、カルパインという細胞内プロテアーゼの関与が知られている。その中でカルパインは、活性化に Ca^{2+} を要求するシステインプロテアーゼで、菌類から哺乳類までのあらゆる生物の細胞内に存在し、特定の細胞内基質蛋白質の限定分解を通じ、その機能、性質を調節するバイオモジュレーターとして働く。哺乳類においては、現在までに少なくとも 13 種類のカルパイン相同分子が同定されており、それらの生体内での発現様式から、組織普遍的分子種と組織特異的分子種に分類される。組織普遍的カルパインである μ -カルパイン、 m -カルパインは共に約 80kDa の触媒大サブユニット(μ CL、 m CL)と、約 30kDa の活性制御小サブユニット(30K)からなるヘテロダイマーとして存在し、*in vitro* でそれぞれ μM 及び mM の Ca^{2+} 濃度を活性化に必要とする。これらは細胞にとって基本的かつ必須な機能を果たしていると考えられ、事実、30K ノックアウトマウスは 11.5 日胚で致死となる。また、異常な活性化が筋ジストロフィー、アルツハイマー病、虚血、白内障などの疾患を引き起こすことが示唆されているがその普遍的発現のために詳細な生理機能は特定されていない。

一方、組織特異的カルパインには骨格筋特異的な p94(カルパイン 3)、胃特異的な

nCL-2、消化管特異的な nCL-4 などが遺伝子レベルで知られているが蛋白質レベルでの知見はほとんど報告されていない。しかし p94 が肢帯型筋ジストロフィー2A型(LGMD2A)の責任遺伝子産物であることが明らかとなったことから、これらは発現する組織に直結した機能を果たしていると考えられ、哺乳類カルパインの生理機能を特定の組織に限定して解明する上で有利な材料と言える。

その中で nCL-2、nCL-2'は胃特異的に同程度の発現を示すカルパインとして同定された。nCL-2は μ CL、mCL と同様に4つのドメイン(プロ、プロテアーゼ、C2様、Ca²⁺結合ドメイン)から構成されるのに対し、nCL-2'は nCL-2 の C2様、Ca²⁺結合ドメインを欠失した構造を持つことから、両者が選択的スプライシング産物であること、また nCL-2 とは Ca²⁺による活性制御の受け方が異なることが予想されている。そして、nCL-2、nCL-2'は μ CL、mCL とほぼ同程度の発現を示すことから、胃においてこれらが生理機能を分担していると考えられているが、cDNA レベルから得られる一次構造以外の知見は皆無である。

そこで本研究では、カルパインの胃における生理機能の解明を目的に、nCL-2、nCL-2'に焦点を当て、1)組織特異的発現機構の解析、2)蛋白質レベルでの比較解析 3)組織内局在、4)生理機能解明へ向けたターゲティングマウスの作製を行った。



II. 結果・考察

1. マウス nCL-2、nCL-2'遺伝子(*Capn8*)のクローニング及び遺伝子構造の解析

nCL-2 の遺伝子クローンを単離するため、ラット nCL-2 cDNA 全長をプローブとして 129Sv マウス遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、約 50kb にわたり 22 個のエクソンが存在して nCL-2 cDNA 配列全長をコードする遺伝子領域を同定した。nCL-2 と nCL-2'が同一遺伝子の選択的スプライシング産物であることが、その一次構造から示唆されていたが、その点を検討するため、nCL-2 とは全く相同性を持たない nCL-2'の 3'非翻訳領域と高い相同性を持つ領域の探索を試みた。その結果、nCL-2 遺伝子のエクソン 9 と 10 の間にこの領域(エクソン 10'と命名)が見出されたことから、nCL-2 と nCL-2'の mRNA が同一遺伝子からの選択的スプライシングによって生じることが判明した。以上をまとめると、*Capn8*は全長約 50kb、少なくとも 23 個のエクソンから構成され、エクソン

10 以降もしくは 10' の選択的スプライシングにより nCL-2 及び nCL-2' を生じる遺伝子であった。Capn8 のエクソン-イントロン構造は他のカルパイン遺伝子と全体にわたり類似していたが、エクソン 10' は Capn8 に特有であった。これは長い進化の過程で、nCL-2' 様のカルパインが胃にとって必須であるために残存したと考えられた。

次に、スタンフォード G3 ラジエーションハイブリッドパネルを用いて染色体マッピングを行ったところヒト 1 番染色体の 1q32-41 付近に位置することが分かった。この位置と遺伝的疾患との関連は分かっていないが、mCL、nCL-4 両遺伝子と隣接してクラスターを形成していることが明らかとなった。

Capn8 の上流領域約 1.2 kb を含む遺伝子断片を詳細に解析したところ、TATA-box、GC-box として機能すると考えられる A/T または G/C に富んだ配列の他に、転写因子 GATA-4 及び GATA-6 のコンセンサス結合配列と非常に似た配列もいくつか発見した。GATA-4 及び GATA-6 は、zinc-finger ドメインを持つ DNA 結合蛋白質 GATA ファミリーに属し、胃分泌腺に特異的に発現し、H⁺/K⁺-ATPase などの遺伝子の転写調節を行っている。また、CREB(cAMP-responsive element binding protein) のコンセンサス結合配列も見出された。CREB は GC-box 結合因子である Sp1 と共に、ガストリン(胃酸分泌刺激ホルモン) 依存的な chromogranin A 遺伝子プロモーター活性の調節に関わっていることが報告されている。以上の結果は、Capn8 の胃特異的な発現のメカニズムを示唆するものであった。

2. nCL-2、nCL-2' の蛋白質レベルでの比較解析

まず、解析の第一歩として nCL-2、nCL-2' を COS-7 細胞に過剰発現させたところ、蛋白質として発現することが判明した。そして、nCL-2' が細胞破碎液の可溶性画分に回収されたのに対し nCL-2 は大部分が沈殿画分に存在したことから、nCL-2 の方は細胞内において不安定で凝集を起こしたか、細胞内局在が膜系であることが考えられた。免疫染色により nCL-2 の細胞内局在解析を行ったところ、核の周囲にドット状の強い染色が観察されたことから前者の可能性が強くと示唆された。一方、nCL-2' についてはドット状の強い染色は見られず、核を含め細胞全体が一様に染色された。

次に、大腸菌発現系を用いて発現、精製した nCL-2、nCL-2' の酵素学的及び生化学的解析を行った。両者に His-tag を付し、大腸菌 BL21(DE3) 株を用いて T7 プロモーター下で発現させたところ、COS-7 細胞発現系と同様に nCL-2' は可溶性画分に発現したが、nCL-2 はすべて沈殿画分に発現した。nCL-2 については発現条件をさらに検討した結果、lac プロモーター下、低温条件で、可溶性画分に発現させることに成功した。発現した nCL-2、nCL-2' は、Ni-アフィニティーカラム、MonoQ カラムを用いて精製を行った。結果として、1/l の大腸菌培養液から 0.5 mg の nCL-2、15 mg の nCL-2' を精製した。

精製した nCL-2、nCL-2' はいずれも Ca²⁺ 依存的カゼイン分解活性を持ち、システインプロテアーゼ阻害剤で阻害された。しかし、 μ -、m-カルパインに対する特異的かつ強力な内在性阻害蛋白質カルバスタチンによる阻害は見られず、さらにカルバスタチンは nCL-2' の基質となることが明らかとなった。最大活性の 50% の活性発現に必要な Ca²⁺ 濃度は nCL-2 が約 0.3 mM、nCL-2' が約 1.2 mM で大きな差が見られた。また、カゼインを基質とした時の比活性は μ -、m-カルパインに比べ非常に低く、自己消化も特殊なパターンを示した。これらの結果から nCL-2、nCL-2' の活性化機構は μ -、m-カルパインとは異なることが強く示唆された。

nCL-2、nCL-2'の生理機能を知る手がかりとして、まず *in vitro* の基質の探索を COS-7 細胞系より行った。その結果、nCL-2 はフォドリンを限定分解することが判明した。これは nCL-2 と nCL-2'の間で基質選択性が異なることを示唆するものであった。しかし、フォドリンは普遍的に存在する蛋白質であることから、次に胃特異的な基質蛋白質の同定を目指し、胃抽出液からの探索を現在行っている。

3. nCL-2、nCL-2'の組織内局在

nCL-2、nCL-2'及び、 μ -、 m -カルパインの胃組織内における局在を比較解析することで、これらの生理機能を間接的に予想することが可能となると考えられる。そこで、ラット胃の組織切片を用いて免疫染色による局在解析を行った。その結果、nCL-2、nCL-2'は分泌腺上部の被蓋上皮細胞(pit細胞)及び底部の主細胞、 μ -カルパインは噴門付近前胃部の粘膜層、 m -カルパインも分泌腺の底部が染色された。それぞれ異なる局在を示したことから、胃において各カルパイン分子が機能分担していることが示唆された。この結果から nCL-2、nCL-2'は胃細胞の組織内移動及び粘液分泌、 m -カルパインは消化酵素分泌への関与が考えられたが、 μ -カルパインの役割については前胃部の機能が不明なため予想できなかった。

4. *Capn8* 遺伝子変異マウスの作製

nCL-2 と nCL-2'の *in vivo* での機能を、プロテアーゼ活性に焦点を当てて明らかにすべく、nCL-2 及び nCL-2'活性中心変異体(以下、CS)を発現するマウスの作製を行った。nCL-2 及び nCL-2'の活性中心残基 Cys105 はエクソン 3 上にコードされることから、エクソン 3~5 を含む約 6.3kb の領域を組換え領域に設定した。部位特異的変異法により Cys105 部分が Ser をコードするように変異させ、エクソン 3 の上流部分に G418 耐性遺伝子(neo^r)を、設定領域の 3'末端にジフテリアトキシン A 遺伝子(DT-A)を挿入することでターゲティングベクターを構築した。これを TT2 ES 細胞株に導入し、158 個の G418 耐性 ES 細胞を取得した。そして、サザンブロット解析の結果得られた相同組換え ES クローン(*Capn8*^{+/CS})を ICR マウス 8 細胞期胚へマイクロインジェクションすることでキメラマウスを作製した。現在、このキメラマウスからヘテロマウス(*Capn8*^{+/CS})、ホモマウス(*Capn8*^{CS/CS})の作製を行っているところである。全身に ES クローンの寄与をうけたキメラマウスはすべて生後 2 週目で生育不全となり 3~4 週目に死亡した。ヘテロマウスの表現型については現在解析中である。

III. まとめ

本研究において nCL-2 及び nCL-2'の胃特異的発現機構を明らかにすると共に、蛋白質レベルでは初めて両者の発現・精製系を確立し、組織普遍的に発現する μ -、 m -カルパインとは異なる性質を明らかとした。これらの結果及び組織抗体染色の結果は、nCL-2 及び nCL-2'が μ -カルパイン、 m -カルパインとは異なる制御機構のもと、胃に特殊な機能を担っていることを示唆するものであった。今後、現在作製中のターゲティングマウスを用いた *in vivo* の解析を通じて、nCL-2 及び nCL-2'の生理的基質及び生理機能が明らかになると期待される。