

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 12 年度 博士課程 進学

氏名 川畑 順子

指導教官名 阿部 啓子

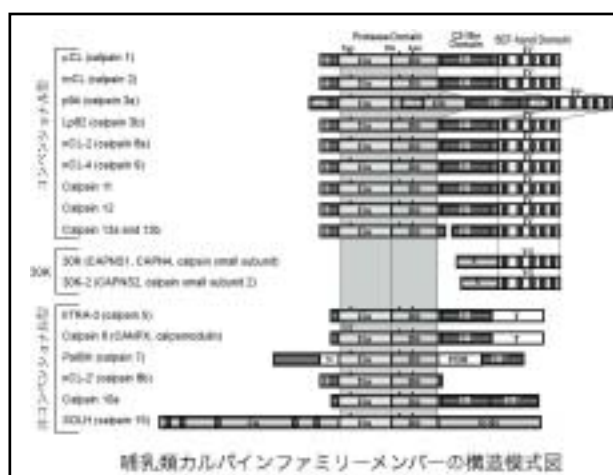
論文題目

骨格筋特異的カルパイン p94 及びスプライスバリエントの機能解析

カルパインは、ある種の細菌から哺乳類の広い生物種に存在する、Ca²⁺によって活性化されるシステインプロテアーゼである。外界からの刺激に対応して細胞内のタンパク質を限定分解し、その機能を調節する「モジュレータープロテアーゼ」であると考えられている。カルパイン分子の活性異常によって引き起こされる疾病として筋ジストロフィー、神経変成、腫瘍形成が報告されているが、生物学的な生理機能や具体的な基質分子に関しては未解明の点が多い。

代表的なカルパイン、m-、 μ -カルパインは、組織普遍的に存在し、固有の大サブユニットと共通の小サブユニット 30K のヘテロダイマーからなる。大サブユニットは四つのドメインから構成され、自己活性制御を担う第一ドメイン、触媒部位である第二ドメイン、Ca²⁺による活性の調節を担うドメインとして、C2 ドメイン様構造の第三ドメイン、及び EF ハンドモチーフを有する第四ドメインと、それぞれの機能が予測されている。

ヒトには 14 種のカルパイン様プロテアーゼをコードする遺伝子が存在する。それらの主要遺伝子産物は、全長に渡り m-、 μ -カルパインと相同性の高い分子種 (typical calpain) と、活性ドメインはよく保存されているものの、それ以外のドメインには様々なモチーフを有する分子種 (atypical calpain) に大別される (図)。 また、各分子が異なる発現様式を示すことから、それぞれの発現場所において特異的な機能と



役割を發揮することで生体機能を制御していることが予想される。個々の分子種の生理的役割を解明することは、生体を維持するのに必須である「カルパインシステム」の全貌を理解することに大きく寄与する。さらに、組織特異的に発現するカルパインの解析は、組織の特徴に特化した解析を可能にし、機能や性質をより明確に記述できる利点がある。以上を鑑み、本研究は哺乳類の骨格筋特異的に発現するカルパイン p94 について、その生理機能の解明に主眼を置いて行った。

p94(カルパイン 3)は、骨格筋に特異的に発現する分子量約 94kDa のカルパインである。組織普遍的カルパイン、 m -、 μ -カルパインの大サブユニットと相同性が高い 4 つのドメインからなるが、独自の 3 つの挿入配列、NS、IS1、IS2 を有しており、小サブユニット 30K を必要とせずに活性を示す。挿入配列部分の切断から始まる非常に強い自己消化活性を有し、その活性は一見 Ca^{2+} 非依存的で、*in vitro* では半減期 10 分以下で消失してしまうため生化学的解析は困難である。骨格筋内では、IS2 領域を介して巨大弾性タンパク質コネクチン(タイチン)と結合することで安定に存在し、機能すると考えられている。具体的な生理機能は他のカルパイン同様不明な点が多いが、p94 は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になっている。患者に見られる遺伝子変異は多岐に渡り、遺伝子全長において100種類以上の変異箇所が見つかっているが、いくつかの変異型 p94 で共通して失われている性質は基質切断活性であった。さらに、プロテアーゼ活性のみを失った p94 不活性型変異体を発現させたトランスジェニックマウスも、myopathy 症状を呈した(文献 1)ことから、p94 のプロテアーゼ活性が骨格筋の正常な機能維持に必須であることが示された。

p94 遺伝子は、いくつかのスプライスバリエントを生成することが知られている。骨格筋の発達段階で数種類のバリエントが発現する他、齧歯類などでは異なるプロモーターを使用するバリエント Lp82 が存在する。Lp82 はレンズ特異的に発現するカルパインで、p94 の挿入配列がほぼスプライスアウトされた構造、すなわち m -、 μ -カルパインの大サブユニットとより相同性の高い構造を有している。レンズの発生段階、白内障の進行に関わる機能を持つと考えられているが、ヒトでは発現していない。

本研究では、このように興味深い性質を示す p94 の生理機能を明確にするために、極めて有用なツールとなる遺伝子改変マウスの作成、及び p94 遺伝子の特徴ともいえる多岐のスプライスバリエントに関してさらなる解析を行った。その結果、目的の遺伝子改変マウスの作出に成功し、その過程で使用した遺伝子改変 ES 細胞を用いることで、筋初期発生における p94 の機能を解析した。また、ヒトとマウスで共通のプロモーター領域から発現する新たな p94 スプライスバリエントの構造を決定し、その性質について検討した(文献 2)。

1. 遺伝子改変マウスの作出

p94 の基質切断活性に特化した解析を行うことを目指し、活性中心 Cys を Ser に置換した、プロテアーゼ不活性型変異体のみを発現するノックインマウスの作出を行った。このマウスを用いることで、p94 活性の欠失による他タンパク質の挙動の変化(基質の蓄積や、影響を受ける分子の網羅的解析など)、p94 の存在様式、さ

らには LGMD2A の発症機序の分子レベルの解明といった解析が可能となる。

マウス ES 細胞に、Cys を Ser に置換させた活性中心部の配列を含むターゲティングベクターを導入し、相同組換え体を単離した。組換え ES 細胞をマウスの胚へ導入して得たキメラ体を経て、目的とした遺伝子改変マウスの系を作出した。現在、ヘテロ間交配、バッククロス、及び導入時の挿入配列(ネオマイシン耐性遺伝子)を除去するための Cre 発現マウスとの掛け合わせを同時に行い、実際の解析の試料となるマウスを揃えている。既にヘテロ間交配からはホモマウスも得られており、外見上は野生型と同等に生育している。

2. 組換え ES 細胞を用いた解析

マウスの作出と並行して、*in vitro* で ES 細胞を各種筋細胞に分化誘導する系を利用し、筋細胞発生の初期段階における p94 の機能の解析を行った。まず、マウス作成に用いた組換え ES 細胞を、ジェネティシンの濃度を徐々に上げる条件下で培養し、両アリルとも不活性型 p94 をコードするホモ接合体 ES 細胞を単離した。*in vitro* にて筋細胞へ分化させたところ、野生型、ホモ体どちらの細胞も心筋、平滑筋、骨格筋を形成し、分化の時期や筋細胞種の割合において差は見られなかった。この結果は、p94 の活性が骨格筋の初期発生には必ずしも必要ではなく、成熟骨格筋において機能していることを示すもので、LGMD2A が骨格筋の発達がある程度完了してから発症することと一致すると考えられる。次いで、分化過程での p94 転写産物量をリアルタイム PCR で測定したところ、ホモ変異体では細胞が融合を開始する所に野生型に比して p94 転写産物量が優位に増加しており、p94 が自身の活性を負に制御するフィードバック機構が存在することが示唆された。

3. 新規スプライスバリエントの同定

p94 のスプライスバリエントは、幼若骨格筋やレンズなどで存在が知られている。最近、C/EBP α 欠失マウスにおいて顆粒球分化が阻害され、その際 cyclinA の切断が抑制されているという興味深い現象が報告された。この切断に関与し得るプロテアーゼを探索した結果、血球幹細胞で発現する p94 スプライスバリエントの存在が強く示唆された。そこで、マウスの血球系培養細胞である MEL (murine erythroleukemia) 細胞の RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、p94 遺伝子由来の増幅産物が検出されたため、さらに 5'RACE を行い上流の配列を決定した。得られた配列は p94 と Lp82 と異なる新規の第一エクソンから開始されており、骨格筋・レンズでの発現と異なる転写調節を受けるプロモーターからの転写産物であることが明らかとなった。

さらに興味深いことに、新規の上流部分は、ゲノム上で p94 遺伝子上流に位置する neutral α -glucosidase C の最後の 4 エクソンとオーバーラップしており、エクソン-イントロン構造も同一であった。しかし、コドンの読み枠は異なり翻訳産物での相同部分は存在しない。EST データベース検索、及び cDNA のクローニングにより、ヒトにおいても同様の転写産物が存在することが判明し、この構造が生物種間で保存されていることが明らかになった。新たに同定した一次構造を有する遺伝子産物の発現様式を、マウス、ヒトの各組織から得た cDNA を鋳型とした RT-PCR を行い検討したところ、用いた全ての組織から増幅産物が検出され、新規のスプライスバリエントが普遍的に発現することが示された。新規の上流部位から翻訳されるドメイン I には、

他のカルパインとの相同性や、モチーフは見出されなかった。

ヒト、マウス双方のスプライスバリエントの全長の構造を調べた結果、ヒトではエクソン 15 (IS2 の一部) が、マウスはエクソン 6、15、16 (IS1 及び IS2) がそれぞれスプライスアウトされていた。予想される翻訳産物の大きさはそれぞれ 84kDa、76kDa であることから、hUp84、mUp76 と名付けた。両遺伝子を COS7 細胞に発現させたところ、野生型とプロテアーゼ不活性型変異体は同程度の発現量を示し、新規のドメイン I は p94 の NS とは異なり自己消化を抑制する機能を持つことが示唆された。

前述のように、齧歯類のレンズ特異的なバリエント Lp82 は、ヒトでは相同の配列部分に終始コドンが入っており発現しない。ヒトレンズ上皮細胞由来の培養細胞株 SRA01/04 から抽出した RNA を鋳型として RT-PCR を行ったところ、hUp84 由来の増幅産物が検出された。一方、マウス眼の RNA からは Lp82 の増幅は顕著に見られたが、mUp76 の増幅は起こらなかった。このことから、ヒトでは Lp82 に代わって hUp84 がレンズの発生や白内障の進行に関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、p94 遺伝子が骨格筋のみならず血球系などの他の器官で機能していることが明らかとなり、他の組織普遍的カルパインと協同して生理機能に関わっている可能性が示された。今回作出した遺伝子改変マウスの系は、p94 の生理機能の解析と筋ジストロフィーの治療法開発に有用であり、さらにカルパイン分子種の機能の統合的な理解にも大きく貢献できると考えられる。今後はノックインマウスを用いて、今回見出した新規スプライスバリエントの生理機能も含め、p94 の生体での役割を明確にし、カルパインシステム全貌の理解に近づきたい。

(文献 1) Tagawa K *et al.* *Hum Mol Genet.* 9(9): 1393-402. (2000)

(文献 2) Kawabata Y, *et al.* *FEBS Lett.* 555(3): 623-30. (2003)