

カルpain 3 異常症 (カルpainノパチー)

尾嶋孝一、反町洋之

東京都臨床医学総合研究所 カルpainプロジェクト、JST, CREST

はじめに

肢帯型筋ジストロフィー (Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD)) はその責任遺伝子により現在までに 15 種類以上に分類されている。その中で骨格筋特異的カルpainである p94 (カルpain 3 とも呼ばれる) の遺伝子変異が原因で発症するものを肢帯型筋ジストロフィー2A型 (LGMD2A) あるいはカルpainノパチー (calpainopathy) と呼ぶ¹。遺伝形式は常染色体劣性である。世界的にはフランス La Réunion 島、スペインバスク国地方、米国オハイオ州・ペンシルバニア州などの Amish 居住地域などが LGMD2A の発症頻発地域である。日本を含め世界中で、LGMD2A は LGMD の中で最も頻度の高い筋疾患であり、25~50%を占めている。発症年齢は 10 代から中年期にかけて、幅広い年齢層にわたる。LGMD2A でのみ観察される特徴的な病理所見はないが、他の筋ジストロフィーと同様な症状 (筋線維径の大小不同、分葉状線維、血清中のクレアチンキナーゼ濃度の上昇、近位骨格筋での筋萎縮) は認められる。p94 は心筋に発現していないため心筋での症状は見られない。LGMD2A は細胞内プロテアーゼであるカルpainの機能不全により引き起こされる点が、他の筋ジストロフィーとは大きく異なる。本稿では LGMD2A の責任遺伝子産物である p94 の骨格筋における機能と LGMD2A 発症メカニズムに関して考察する。

骨格筋特異的カルpain p94 のプロテアーゼ活性不全が LGMD2A 発症の原因である

カルpainは細胞質内に存在するシステインプロテアーゼであり、ヒトでは 15 種の遺伝子にコードされる。μ-および m-カルpainなど組織普遍的に発現するタイプと、骨格筋特異的に発現する p94 のように組織特異的なタイプが存在する²。基質をオリゴペプチドあるいはアミノ酸にまで分解する消化酵素とは異なり、カルpainは基質を限定的に切断することで、その基質の新たな機能を引き出すモジュレータープロテアーゼである。

LGMD2A で見出された病原性変異を p94 タンパク質に導入した *in vitro* での生化学的解析において、プロテアーゼ活性 (基質切断・基質認識) の不全を示したこと³、プロテアーゼ活性を持たない変異 p94 (Cys129→Ser 変異体) を発現するトランスジェニックマウスの骨格筋がミオパチー症状を呈したこと⁴から、LGMD2A は p94 のプロテアーゼ活性不全が、発症の根本原因であることが強く示唆された。現在までに p94 遺伝子には 200 種類以上の病原性変異が報告されている。しかし、LGMD2A 発症となる変異部位のホットスポットは存在しない (図 1)。

LGMD2A の発症プロセス

プロテアーゼとしての p94 の、*in vitro* における基質は HSP60、フォドリン (α -スペクトリン)、カルパスタチンなどが知られている。プロテオーム解析による p94 の基質タンパク質候補の検索も行われ、翻訳系、解糖系、膜輸送などに関与するタンパク質も p94 の新たな標的候補として挙げられている⁵。しかし *in vivo* である骨格筋における p94 の基質は現在までに明らかになっていない。そのため p94 のプロテアーゼ活性不全により、何を基質としてモジュレートできないために、最終的に LGMD2A が発症するのか、そのプロセスは不明であった。

最近、我々は p94 のプロテアーゼ活性と骨格筋細胞でのサルコメアにおける p94 の局在に関連性があることを見出した⁶。p94 は筋原線維においてコネクチンの M 線および N2A 領域に直接結合し、局在する。興味深いことに、p94 の局在様式は成熟したサルコメアではその長さに応じて M 線から N2A 領域へと変化すること、しかもその局在変化は p94 のプロテアーゼ活性に依存していることが明らかとなった (図 2)。つまりプロテアーゼ活性がない場合はサルコメア長に依存した p94 の N2A 領域への集積が起こりにくくなる。このようなサルコメア長に依存した p94 の局在変化は骨格筋細胞への運動刺激に対して p94 がそのプロテアーゼ活性を伴って何らかの応答をしていることを示している。すなわち、骨格筋細胞には伸展刺激に応答する p94 を介したシグナル伝達ネットワークの存在を示唆する。LGMD2A においてはこのネットワークが部分的に破綻するため、結果的に骨格筋細胞が伸展刺激に応答することができなくなり、症状が現れると考えられる。しかし、上述のように p94 の *in vivo* でのターゲットなど未解明な点も多く、さらなる解析が必須である。

文献

1. Richard I, Broux O, Allamand V, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995;81:27-40.
2. Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, et al. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ -types. - Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1989;264:20106-20111.
3. Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, et al. Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J. Biol. Chem.* 1998;273:17073-17078.
4. Tagawa K, Taya C, Hayashi Y, et al. Myopathy phenotype of transgenic mice expressing active site-mutated inactive p94 skeletal muscle-specific calpain, the gene product responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A. *Hum. Mol. Genet.* 2000;9:1393-1402.
5. Ono Y, Hayashi C, Doi N, et al. Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics--possible regulation of protein synthesis by p94. *Biotechnol. J.* 2007;2:565-576.
6. Ojima K, Ono Y, Doi N, et al. Myogenic stage, sarcomere length, and protease activity modulate localization of muscle-specific calpain. *J. Biol. Chem.* 2007;282:14493-14504.

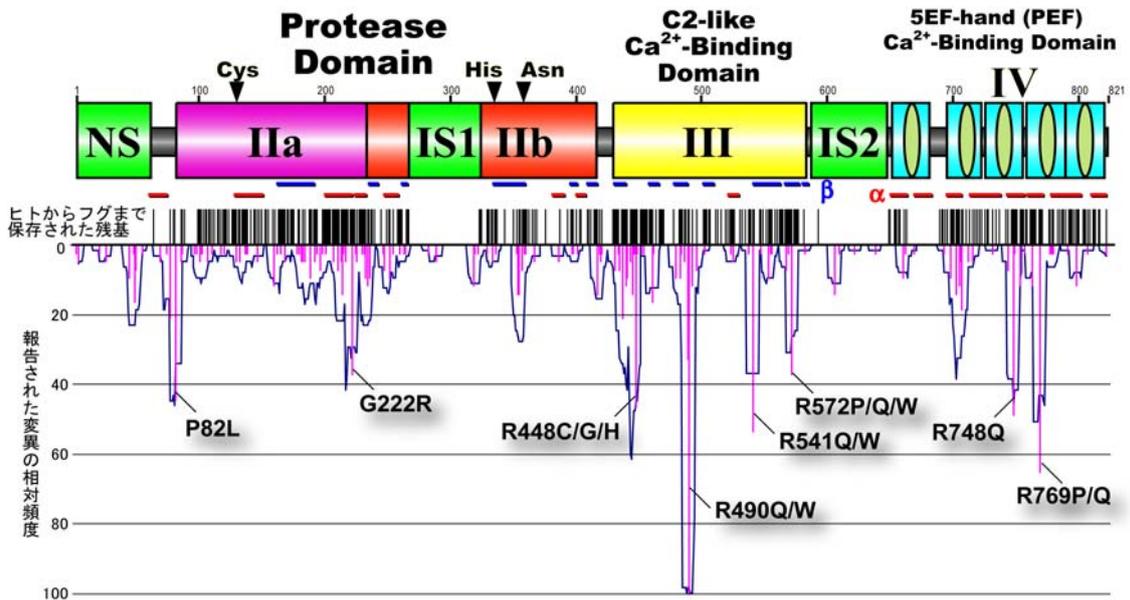


図1 骨格筋特異的カルパイン p94 の構造と LGMD2A で同定された病原性変異
 p94 はプロテアーゼドメイン (ドメイン II、IIa 及び I Ib の 2 つのサブドメインから成る活性ドメイン)、C2-ドメイン様 Ca²⁺-結合ドメイン (ドメイン III)、及び 5 つの EF-ハンドをタンデムに持つ Ca²⁺-結合ドメイン (ドメイン IV、PEF (penta EF-hand) ドメインとも呼ばれる) の 3 つの大きなドメインを持ち、N 末端、ドメイン I Ib、及びドメイン III~IV 間に p94 に特徴的な NS、IS1、IS2 領域を持つ。LGMD2A で同定された 191 種類の変異 (157 残基に当たる) の位置と相対頻度を桃色のバーで示した。多くはヒトからフグの p94 アミノ酸配列で保存された残基に含まれる。

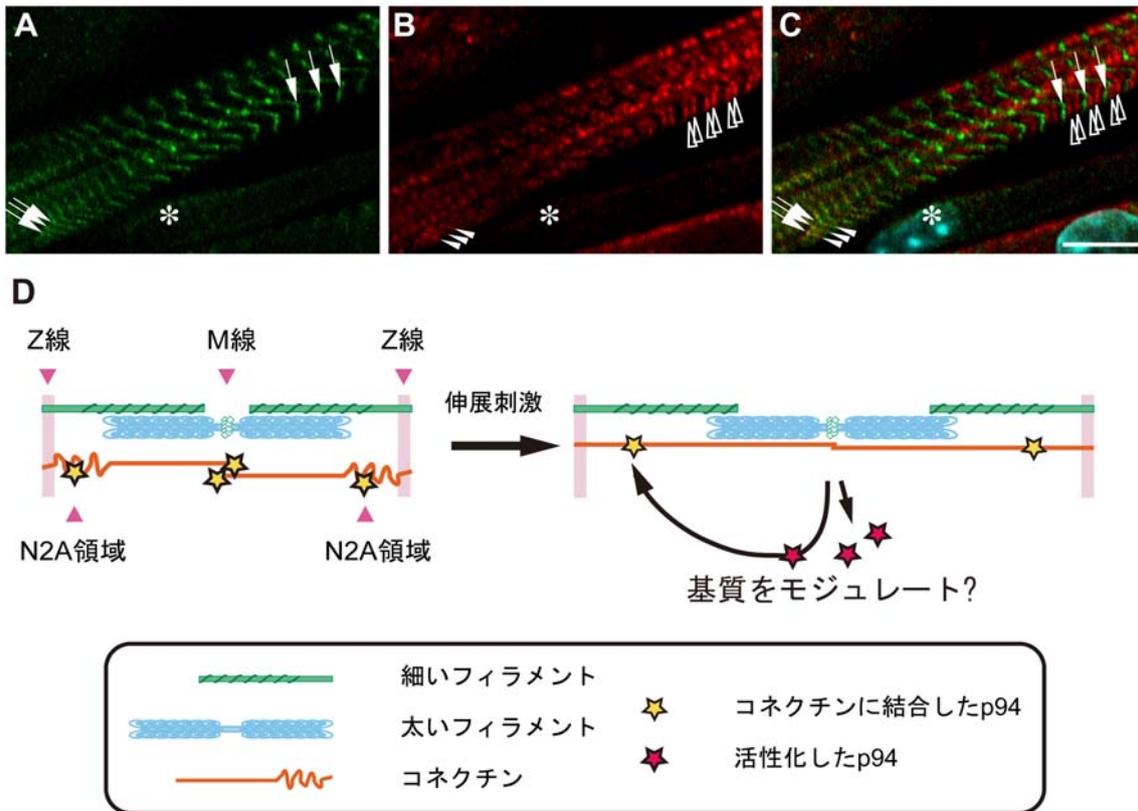


図2 骨格筋特異的カルパイン p94 のサルコメア長に依存した局在変化

(A-C)培養骨格筋細胞に Flag-p94 を遺伝子導入し、抗 M 線-コネクチン抗体(A)、抗 Flag 抗体 (B)、および DAPI (核染色) による三重染色後、共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得した。(C)は(A)と(B)を重ね合わせたもの。サルコメアが短いときは Flag-p94 は M 線に局在し (白矢頭)、長くなると N2A 領域に局在する (白縁矢頭)。白矢印は M 線、*はトランスフェクションされなかった細胞を示す。バー: 10 μ m (D)サルコメアの伸張刺激に応じた p94 の局在変化のモデル。サルコメア伸展により p94 は M 線から消失し N2A 領域に集積する。M 線の p94 が N2A 領域に移行する、細胞質の p94 が N2A 領域に集積する、あるいはその両方の可能性が考えられる。(文献 6 より改変)