

骨格筋特異的カルパイン-3 の活性制御因子は細胞内  $\text{Na}^+$  ～例外か多様性か

小野 弥子、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

カルパインは  $\text{Ca}^{2+}$  依存的細胞内システインプロテアーゼであり、ヒトでは 15 のカルパイン遺伝子がスーパーファミリーを構成している<sup>(1)</sup>。名前の由来 (Cal-) である“ $\text{Ca}^{2+}$  依存性”は、正確には  $\mu$ -及び m-カルパインの特徴であって、しかもその活性に必要な濃度は細胞質内の生理的濃度を遙かに超えている (それぞれ数  $10\ \mu\text{M}$  及び  $\text{mM}$  程度)。そして、現在知られているカルパイン分子種はこれらのプロテアーゼドメインに相同性の高いアミノ酸配列を持つものとして定義される。実際に、カルパインスーパーファミリーのメンバーの中には、 $\mu$ -、m-カルパインに適した実験条件下では  $\text{Ca}^{2+}$  依存的なプロテアーゼ活性が見出せないものもあり活性化機構の多様性が注目されている。

本稿で取り上げるカルパイン 3 (p94 とも呼ばれる) は特殊な例で、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下でも半減期 10 分間弱で消滅してしまうほど強い自己分解活性を示し、「カルパイン 3= $\text{Ca}^{2+}$  非依存的」とされてきた。この性質に加えて、カルパイン 3 は「骨格筋組織特異的な発現」、「巨大筋弾性タンパク質コネクチン (タイチンとも呼ばれる) との結合」さらに「肢帯型筋ジストロフィーLGMD2A (カルパインパチーとも呼ばれる) の責任遺伝子産物」、という特徴を有しており、カルパインとしても酵素としても非常にユニークな分子である<sup>(1)</sup>。一次構造上の特徴に着目して解析した結果、カルパイン 3 特異的な挿入配列 IS1 及び IS2 が「 $\text{Ca}^{2+}$

非存在下での自己分解活性発現」に必要であることが示されたが、未知の活性化因子の関与などについては不明であった。最近筆者らは、カルパイン 3 は  $\text{Na}^+$ でも活性化され、細胞質内程度の  $\text{Na}^+$ 存在下 (15 mM) では、細胞質内の生理的濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  (100 nM) によっても活性化される、つまり、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 依存的なプロテアーゼであることを見出した<sup>(2)</sup>。 $\text{Na}^+$ 依存性の細胞質内酵素としては初めての例である (図 1)。もちろん  $\mu$ -、 $m$ -カルパインをはじめ他のカルパインで  $\text{Na}^+$ 依存的に活性化するものは見つかっていない。

カルパイン 3 が  $\text{Na}^+$ 依存的に生理的  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度でも活性化できる、ということの意義は何であるのか。骨格筋にはカルパイン 3 だけでなく、 $\mu$ -、 $m$ -カルパインも発現しているが、後者二種の活性は、通常の細胞内ではほとんど発現されないと考えられる。一方、カルパイン 3 は  $\text{Na}^+$ と  $\text{Ca}^{2+}$ 両方を活性化因子として利用できるので、各イオンの生理的な濃度変化に応じて構造変化→活性化可能であり、それによって骨格筋細胞にとって必須な機能を果たすと考えられる。

このようなカルパイン 3 の性質が重要となるのは、骨格筋の中でどのような場面であろうか。筆者らを含めて複数の研究グループの注目している事象が、細胞内小器官である SR (sarcoplasmic reticulum) 付近へのカルパイン 3 の局在である。骨格筋は筋細胞膜が脱分極し細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇して収縮する。興味深いことに多くの骨格筋の収縮反応において重要なのは、細胞外からの流入でなく SR からの放出がもたらす  $\text{Ca}^{2+}$ である。筋細胞膜の脱分極はごく近傍での  $\text{Na}^+$ 上昇を伴い、同時に細胞膜が細胞質内に陥入した構造である T 管上の DHPR (dihydropyridine receptor) が SR の膜タンパク質である RYR (ryanodine receptor) と相互作用することにより、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流出を引き起こす。もし、カルパイン 3 が DHPR

と RYR の相互作用を調節していたら、というのが現在の作業仮説である (図 2)。SR から  $\text{Ca}^{2+}$  流出に先立つ微妙な細胞内の  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を、カルパイン 3 は自らの活性化や構造変化によって伝達するポテンシャルを有することになる。また、筆者らの実験結果では、 $\text{Ca}^{2+}$  または  $\text{Na}^+$  によるカルパイン 3 活性化では分解される基質が異なることが示されており<sup>(2)</sup>、カルパイン 3 は多面的に周囲のタンパク質群の機能を修飾しうると考えられる。

細胞外では  $\text{Na}^+$  依存性酵素として、血液凝固に関わるトロンビンやファクター Xa などが見出されている。ファクター Xa はセリンプロテアーゼであるが、カルパイン 3 同様に  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  依存性でありそれぞれのイオン結合サイトが活性中心を挟む形となっている<sup>(3)</sup>。一方、カルパインのプロテアーゼドメインは 2 つのサブドメイン (ドメイン IIa 及び IIb) に分割でき、それぞれに  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位がある<sup>(4)</sup>。筆者らは、カルパイン 3 ではドメイン IIa 内の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位に  $\text{Na}^+$  も結合することを示唆する実験結果を得ている<sup>(2)</sup>。実は  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Na}^+$  のイオン半径はほぼ同じで、チトクロム c ペルオキシダーゼという酵素では金属要求性を  $\text{K}^+ \rightarrow \text{Na}^+ \rightarrow \text{Ca}^{2+}$  と変えた変異体を人工的に設計できているのは驚きである<sup>(5)</sup>。カルパイン 3 においてはドメイン IIa が  $\text{Na}^+$  も結合できるように自然が進化させ、それが骨格筋での機能において進化的に有利であったのだろうと想像される。現時点で配列情報が可能なすべての脊椎動物においてカルパイン 3 の遺伝子は非常に良く保存されている。鳥類以下の脊椎動物において、 $\text{Na}^+$  感受性を始めカルパイン 3 の特質がどのように保存されているのかは不明であるが、カルパイン 3 と骨格筋構造の進化との関係は、他の組織特異的カルパインと発現組織での機能との関係を考察する上でも興味深い視点を提供する。

上記の性質は、カルパイン 3 がそもそもユニークなカルパインだとされていたから見逃

されなかったのかもしれない。しかしながら一般に「カルパインだったら〇〇 (=NaCl  
では活性化されない、とか?) だろう」というのは、実はカルパインファミリーのたかだ  
か 15 分の 2 で示されている前提なのであまり一般性はないかもしれず、実際には予想外の  
多様性が隠れているかもしれない。それらがカルパインファミリー全体を考慮したより正  
確な前提に行き着くのに大切なのではないかと想像する次第である。

#### 文献

- 1) H. Sorimachi, S. Hata & Y. Ono: *Exp. Anim.* **59**, 549 (2010).
- 2) Y. Ono, K. Ojima, F. Torii, E. Takaya, N. Doi, K. Nakagawa, S. Hata, K. Abe & H. Sorimachi: *J. Biol. Chem.*, **285**, 22986 (2010).
- 3) K. Kamata, H. Kawamoto, T. Honnma, T. Iwama & S. H. Kim: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 6630 (1998).
- 4) R.A. Hanna, R.L. Campbell & P.L. Davies: *Nature*, **456**, 409 (2008).
- 5) C.A. Bonagura, B. Bhaskar, M. Sundaramoorthy & T.L. Poulos: *J. Biol. Chem.*, **274**, 37827 (1999).

#### 図の説明

##### 図 1. カルパインの一次構造

カルパイン 3 (p94 と呼ばれる) は、 $\mu$ -カルパイン及び m-カルパインの活性サブユニットであるカルパイン 1 ( $\mu$ CL) 及びカルパイン 2 (mCL) と高い相同性を示す。NS、IS1、

IS2 は、カルパイン 3 に特異的な挿入配列である。μ-及び m-カルパインについて報告された Ca<sup>2+</sup>結合部位はカルパイン 3 においても同様に機能していると考えられる。カルパイン 3-domainIIa の Ca<sup>2+</sup>結合部位は、IS1 と IS2 の効果により Ca<sup>2+</sup>と Na<sup>+</sup>の二種を認識できるように進化したと推測される。

#### 図 2 Na<sup>+</sup>により活性化されたカルパイン 3 の作用についての予想図

骨格筋内でカルパイン 3 は複数の局在をとる。骨格筋の収縮に先立つ Na<sup>+</sup>濃度上昇は、SR に局在するカルパイン 3 の活性化・構造変化を引き起こす。この反応は DHPR と RYR の相互作用を直接・間接に修飾し、SR からの Ca<sup>2+</sup>放出を引き起こす。



