

カルパイン

反町 洋之

Sorimachi Hiroyuki : 公益財団法人 東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野 (分野長)

Key words : 蛋白分解、限定分解、カルシウム、インヒビター、筋ジストロフィー

カルパイン (calpain, CAPN) は Ca^{2+} によって活性化されるシステインプロテアーゼの総称で、ほとんどの真核生物と一部の原核生物に存在し、スーパーファミリーを形成する。哺乳類では十数種の遺伝子にコードされ (図), 各遺伝子の欠損などにより, 胎生致死を初め様々な病態を引き起こすため, 生体制御に必須な機能を果たすことが明らかとなっている。更に, 病態解析が進んでいる筋ジストロフィーなどでは, 創薬の標的ともなっている。

カルパインはプロテアーゼでありながら, 基質蛋白質をバラバラに分解するのではなく, ごく一部のペプチド結合を切断する“限定分解”により, 基質機能・構造を変換するモジュレーター (調節・変換) プロテアーゼである。例えば, 阻害ドメインを同一分子内に持つために不活性状態で維持されている酵素 (プロテインキナーゼ C など) について, その部分を切断することで活性化する。また, 不安定化モチーフの切除により安定化し (またはその逆), 基質蛋白質の寿命を調節する。あるいは, 細胞骨格系蛋白質を限定切断することで, 細胞骨格構造を変化させ, 形態や移動能を調節する。その機能は補助的な場合も多いが, その分, 非常に広範な生命現象に関与するため, カルパイン不全による病態は, 前述以外にも, ストレス性胃出血, 2型糖尿病, 筋肥大, 好塩基球性食道炎, 硝子体網膜症など多岐にわたる。

カルパインは Ca^{2+} により活性化されるが, ほかに足場蛋白質や細胞内膜系, リン脂質, 局在変化などにより複雑かつ厳密に制御されている。ある生命現象に, カルパイン分子種のいずれかが関与すると考えられる場合は, 生化学的手法であたりをつけてから, 各カルパインのノックアウトマウスあるいはその初代培養細胞を用いて確認するのがよいと思われる。

■活性評価法

カルパインはプロテアーゼであるため, ペプチド結合の加水分解活性で評価する。コンベンショナルカルパイン (哺乳類カルパイン-1 (μ -カルパイン), -2 (m-カルパイン) および鳥類カルパイン-11 (μ /m-カルパイン) (図)。以下断りのない限り“カルパイン”と表記) の場合, カゼインあるいは蛍光基質を用いて分解産物量を定量する。注意点は, 細胞あるいは組織内のカルパインの活性を測定した場合, 活性型カルパインではなく総量 (活性型+不活性型) を測定しているということである。活性測定には CaCl_2 を添加して行うため, 存在する不活性型カルパインはすべて活性型になり, 活性として検出されるからである。更に, ほとんどの細胞・組織には内在性のカルパイン特異的阻害蛋白質カルパスタチン (CAST) が, カルパインよりも過剰に共存する。そのため, 細胞・組織の粗抽出可溶性画分には活性型カルパイン, 不活性型カルパイン, CAST の三者が共存することになる。この活性を測定すると, その量はカルパインと CAST の総量の差となる (すなわち, 多くの場合, 粗抽出可溶性画分から活性は検出できない)。カルパインと CAST の分離にはカラム操作が必要なため, 量を定量するだけならウェスタンブロット (WB) を用いたほうが簡便である。

一方, 細胞・組織内の活性型カルパインのみを検出したい場合は, 自己消化型 (多くの場合活性型と同義となる) カルパイン特異的抗体¹⁾または蛍光基質を用いる。蛍光基質は数種市販されているが, 特異性は高くない。そのため, 阻害剤 (次節参照) や siRNA, 不活性型カルパイン変異体などを用いた複数の陰性コントロールを使って評価する必要がある。

他のカルパインは, 量的に少ない, 安定性が低いなどの理由により, ごく一部しか活性を

測定したという報告がない。そのため、解析は多くの場合 WB 法か免疫染色法による。

■作用薬物

特異性の高い阻害剤としては、CAST のアミノ酸配列を持つペプチドが使われる。低分子量化合物の阻害剤も数種市販されているが、どれも特異性が不十分である。そのため、複数種の適用が必須である。一方、活性化剤については、 Ca^{2+} を透過させるイオノフォア A23187 が用いられる。細胞外液に混ぜるだけで、細胞内在性のカルパインが活性化される。この場合も Ca^{2+} 依存性酵素はすべて活性化されるため、カルパインの作用を示すためにはコントロールの必要がある。観察する系にカルパインの関与が期待される場合は、siRNA を用いるのが最適である(カルパイン-1, -2 共にノックダウンするときは CAPNS1 の siRNA を用いる)。

■抗体

カルパイン各分子種特異的な抗体は複数種市販されている。カルパイン-1, -2 は、各々活性サブユニット CAPN1, 2 と CAPNS1 とのヘテロ二量体を形成する(図)ため、特異的検出には CAPN1 または 2 の特異抗体を用いる。後者は優れたモノクローナル抗体も存在する²⁾。他のカルパインでは筋ジストロフィーとの関連で、CAPN3 の筋肉での検出(WB または免疫染色)には、CAPN3 の特異配列に対する抗体(anti-pIS2C)が用いられる。

■イメージング

カルパインの細胞内動態解析には蛍光蛋白質との融合体、蛍光基質、自己消化型カルパイン抗体、基質切断部位特異的抗体などが用いられる。例えば蛍光蛋白質融合型 CAPN3 は筋細胞内で、内在性 CAPN3 と同様に筋原線維上に局在する³⁾。蛍光基質は特異性が十分でなく、複数のコントロールが必要である。自己消化型と基質切断部位抗体は、カルパインの活性化と基質切断の瞬間を捉えうるため、WB だけでなくイメージングでも用いられる⁴⁾。

■分子操作

カルパインの機能解析には点変異やドメインを切り出したもの、ドメインスワッピングなどが用いられる。部位特異的変異導入により、活性中心残基を初め、 Ca^{2+} 感受性に関与する残基、構造安定化に寄与する残基などの同定が、立体構造情報を基に行われてきた。活性中心残基変異体は、実験の陰性コントロールとして優れている。筋ジストロフィーを発症する CAPN3 では病原性点変異が 120 種以上報告されており、構造機能相関解析に利用される。

■その他

これまでの研究は量的に多いコンベンショナルカルパインに集中していたが、近年 CAPN3 を初め、他のカルパインも様々な疾患の責任遺伝子産物であることが解明され、注目を集めている。これらのカルパインは性質が大きく異なるものが多く、それぞれ独自の研究手法が開発されている。カルパインの配列、構造、試薬などに関する情報源として二つのサイト(<http://calpain.net/>, <http://calpain.org/>)を参考にされたい。

■文献

- Saido TC, Shibata M, Takenawa T et al: *J Biol Chem.* 267: 24585-24590, 1992
Kasai Y, Inomata M, Hayashi M et al: *J Biochem.* 100: 183-190, 1986
Ojima K, Kawabata Y, Nakao H et al: *J Clin Invest.* 120: 2672-2683, 2010
Saido TC, Suzuki H, Yamazaki H et al: *J Biol Chem.* 268: 7422-7426, 1993
Ono Y, Sorimachi H: *Biochim Biophys Acta.* 1824: 224-236, 2012

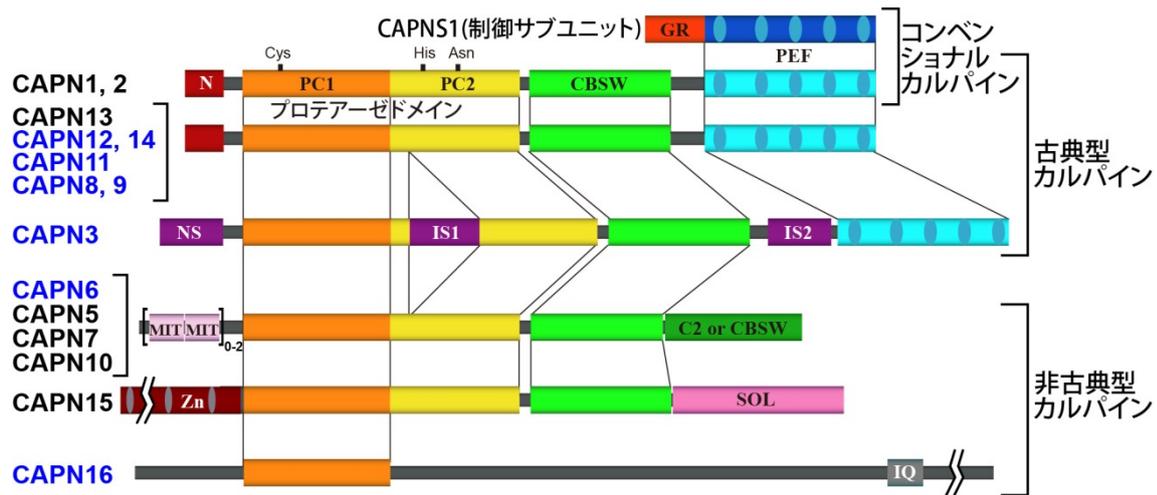


図 哺乳類カルパインの構造

ヒトの 15 のカルパインは構造的に古典, 非古典の 2 型に, 発現分布的に偏りがある (青色字) なし (黒色字) の 2 種に分類される。古典型の中で, よく研究されたカルパイン-1 (CAPN1+CAPNS1) と-2 (CAPN2+CAPNS1) をコンベンショナルカルパインと呼ぶ。動物種によっては一部が偽遺伝子化している。ドメイン名などについては総説を参照⁵⁾。