

反町洋之博士 業績集・追悼集

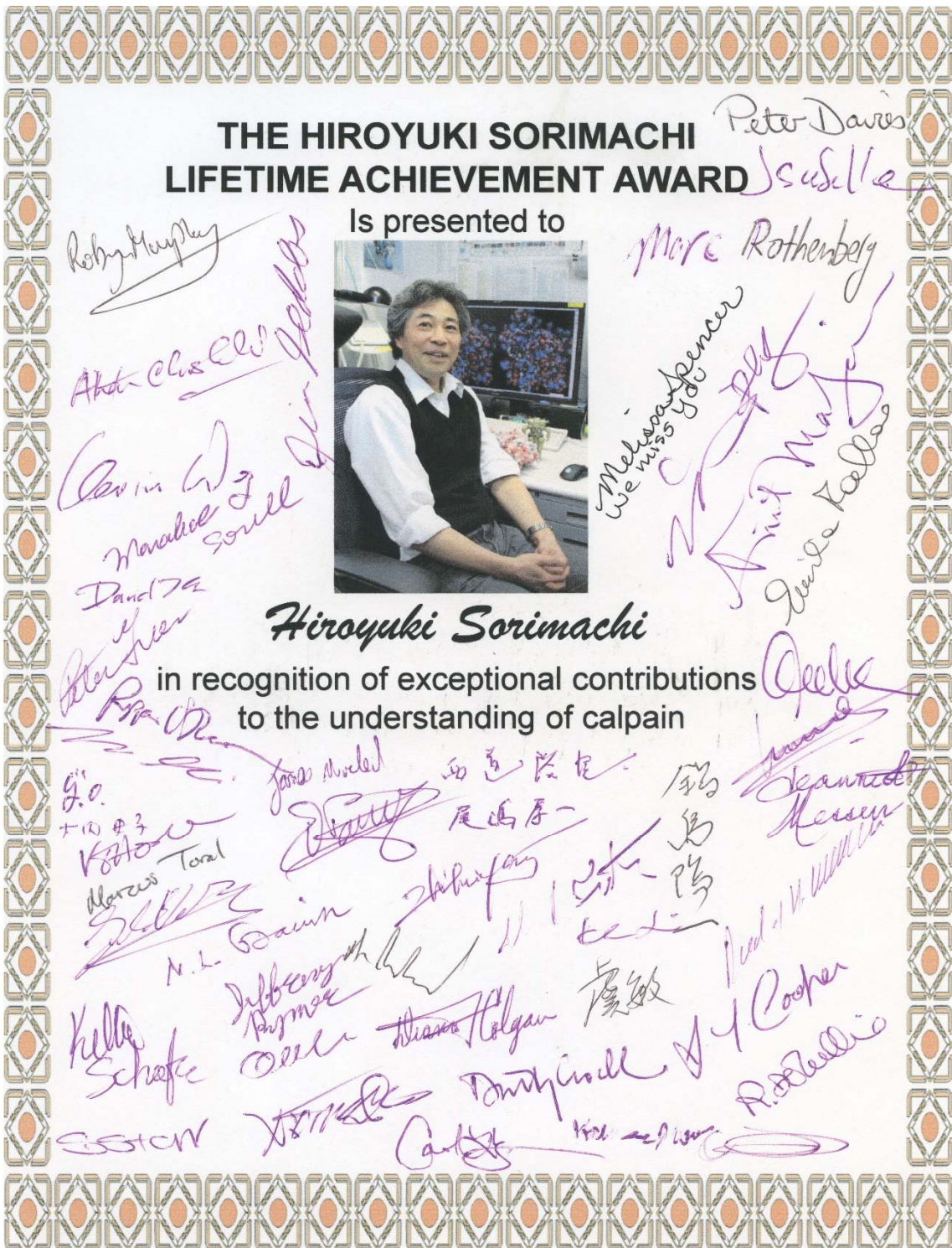


Three Decades of Calpain

表紙写真

2010年7月

臨床研セミナー（於・臨床医学総合研究所（旧称）2階講堂）



2016年7月

FASEB SRC - The Biology of Calpains in Health and Disease, The Hiroyuki Sorimachi

Lifetime Achievement Award が創設され、第一回目の受賞者となる。



2017年2月

カルパインプロジェクト・ラボセミナー（於・医学総合研究所2階会議室）

はしがき / Preface

私たちが敬愛する、同僚であり、友人である、反町洋之博士は、2018年（平成30年）1月6日にご病気のために他界されました。享年54歳という若さでの悲報は、全く信じられなく、とても受け入れることのできないものでした。半年以上経った今でも、医学研の廊下を歩いていると、笑顔の反町博士が、突然現れるような錯覚に陥ります。

反町博士は、栄光学園高等学校から、東大理Ⅱに進学、同大学理学部生物化学科をご卒業後、同大学院の理学系研究科修士課程に進学されました。この時から、故鈴木紘一先生に師事し、カルパインの研究を開始され、その後、一貫してカルパインの構造と機能の研究に一生をささげられました。まさに、Mr.カルパインであり、世界のカルパイン研究を先導されました。その業績を認められ、1999年には日本生化学会奨励賞、2016年7月にはFASEB会議から“The Lifetime Achievement Award”を授与されました。反町博士は、カルパインの遺伝子クローニングに始まり、その反応メカニズムの詳細な解析、そして数多いカルパイン分子の変異マウスを作製し、その機能解析から、カルパインの多彩な個体レベルでの機能を解明されました。また、カルパインの基質を詳細に解析し、膨大な data から、カルパインの切断部位の予測プログラムを樹立し、世界中の研究者が使用できるように web 上にオープンしました。このようにカルパイン研究史に燦然と輝く業績を打ち立てられ、現在も exciting な結果が、続々と誕生しているところでした。反町博士は、旧臨床研研究員、東大応微研の助手、助教授を経て、2004年から、臨床研、医学研で研究室を主宰されてきました。医学研では、生体分子先端研究分野長として研究所の運営に大きな貢献をされるとともに、多くの学生を指導し、優秀な人材を育成してきました。

本追悼集は、反町博士のご偉業とご遺徳を偲んで、カルパインプロジェクト研究室を中心に、知財センター、中央映像室、広報デザイン支援室の協力を得て作製いたしました。反町博士が、一生をかけて研究されたカルパイン研究の輝かしいご業績、そして、その敬愛すべきお人柄を、ぜひこの追悼集で後世に伝えたいと思います。奥様の反町典子博士、お嬢様の優理子さま、を始めご親族の方々には、悲しみは、簡単に癒えることはないと思いますが、この追悼集が、悲しみを癒すお力添えになればと考えております。本追悼集を編むにあたり、反町博士の安らかなご永眠を、謹んでお祈り申し上げます。

2018年7月20日

東京都医学総合研究所 所長
正井 久雄

目次 / Contents

略歴 / Biography	1
業績 / Works	
(A) 原著論文	4
(B) 英文著書等	26
(C) 和文著書等	40
(E) 特許	45
総説 / Reviews	46
追悼メッセージ / In memory of Dr. Sorimachi	
公益財団法人東京都医学総合研究所 理事長 田中啓二	48
公益財団法人東京都医学総合研究所 所長 正井久雄	51
公益財団法人東京都医学総合研究所 カルパインプロジェクト	53
知人・友人達より	54

略歴 / Biography

- 1963年4月24日 神奈川県川崎市 誕生
- 1982年3月 神奈川県 栄光学園高等学校卒業
- 1982年4月 東京大学理科Ⅱ類入学
- 1986年3月 東京大学理学部生物化学科卒業
- 1988年3月 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻 修士課程修了
- 1988年10月 財団法人東京都臨床医学総合研究所
分子生物学研究系遺伝情報研究部門（研究員）
- 1992年4月 東京大学応用微生物学研究所 第一研究部助手
- 1992年6月 博士（農学）取得（東京大学）
- 1994年4月 東京大学分子細胞生物学研究所 生体超高分子部門助手
- 1997年12月 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻
生物機能開発化学研究室助教授
- 2004年4月 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
分子生物学研究系酵素機能制御研究部門副参事研究員
- 2005年4月 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
蛋白質代謝研究分野副参事研究員
(カルパインプロジェクトリーダー)
- 2009年4月 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
蛋白質代謝研究分野参事研究員
(カルパインプロジェクトリーダー)
- 2011年4月 財団法人東京都医学総合研究所
生体分子先端研究分野長（参事研究員）
- 2012年4月 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長（参事研究員）
- 2018年1月6日 逝去

連携大学院協定に基づく教員歴

2005年 4月

東京理科大学 大学院理工学研究科 客員教授

2005年 4月 (～2010年 3月)

首都大学東京 大学院理工学研究科生命科学専攻 客員准教授

2008年 4月 (～2011年 3月)

東京大学 大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻
臨床医科学分野 客員准教授

2010年 4月

お茶の水女子大学 大学院人間文化創成科学研究科 客員教授

2011年 4月

筑波大学 大学院人間総合科学研究科 客員准教授

学会幹事

2008年 8月

日本病態プロテアーゼ学会 評議員

2011年 10月

日本学術会議 連携会員・農芸化学分科会 幹事

2011年 10月

International Research Staff Exchange Scheme “SARCOSI”, PI

2011 年 10 月

International Proteolysis Society (IPS), Council Member

2013 年 8 月

日本病態プロテアーゼ学会 理事

2013 年 9 月

第 86 回日本生化学会大会準備委員会 幹事補佐

2011 年～2016 年

FASEB Summer Research Conferences

– The Biology of calpains in Health and Disease, Advisory Committee

受賞

1999 年 10 月

日本生化学会奨励賞

「カルパイン及びそのホモログの構造・機能解析」

2007 年 10 月

財団法人東京都医学研究機構 職員表彰（理事長表彰）

「カルパイン(蛋白質調節切断酵素)の生理機能の新規研究手法の開発と解析」

2016 年 7 月

FASEB Summer Research Conferences – The Biology of Calpains in Health and Disease (Montana, USA)

“The Hiroyuki Sorimachi Lifetime Achievement Award” 受賞

業績 / Works

(A) 原著論文

1. Kitajima, K., Sorimachi, H., Inoue, S., and Inoue, Y. (1988) Comparative structures of the apopolysialoglycoproteins from unfertilized and fertilized eggs of salmonid fishes. *Biochemistry* **27**, 7141-7145.
2. Sorimachi, H., Emori, Y., Kawasaki, H., Kitajima, K., Inoue, S., Suzuki, K., and Inoue, Y. (1988) Molecular cloning and characterization of cDNAs coding for apo-polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. Multiple mRNA species transcribed from multiple genes contain diverged numbers of exact 39-base (13-amino acid) repeats. *J. Biol. Chem.* **263**, 17678-17684.
3. Emori, Y., Homma, Y., Sorimachi, H., Kawasaki, H., Nakanishi, O., Suzuki, K., and Takenawa, T. (1989) A second type of rat phosphoinositide-specific phospholipase C containing a src-related sequence not essential for phosphoinositide-hydrolyzing activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 21885-21890.
4. Homma, Y., Takenawa, T., Emori, Y., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1989) Tissue- and cell type-specific expression of mRNAs for four types of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 406-412.
5. Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y., and Suzuki, K. (1989) 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.* **264**, 20106-20111.

6. Sorimachi, H., Emori, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Inoue, Y. (1990) Molecular cloning and characterization of cDNAs coding for apopolysialoglycoproteins in cherry salmon (*Oncorhynchus masou*) eggs. *J. Biochem.* **107**, 61-67.
7. Sorimachi, H., Emori, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Inoue, Y. (1990) Organization and primary sequence of multiple genes coding for the apopolysialoglycoproteins of rainbow trout. *J. Mol. Biol.* **211**, 35-48.
8. Sorimachi, H., Tsukahara, T., Kawasaki, H., Ishiura, S., Emori, Y., Sugita, H., and Suzuki, K. (1990) Molecular cloning of cDNAs for two subunits of rat multicatalytic proteinase. Existence of N-terminal conserved and C-terminal diverged sequences among subunits. *Eur. J. Biochem.* **193**, 775-781.
9. Saido, T. C., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Sorimachi, H., Murofushi, H., Tsuchiya, T., Ito, H., and Suzuki, K. (1992) Autolytic transition of μ -calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis forms. *J. Biochem.* **111**, 81-86.
10. Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1993) A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca^{2+} -binding domain. *J. Biol. Chem.* **268**, 19476-19482.
11. Sorimachi, H., Toyama-Sorimachi, N., Saido, T. C., Kawasaki, H., Sugita, H., Miyasaka, M., Arahata, K., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1993) Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J. Biol. Chem.* **268**, 10593-10605.

12. Tagawa, K., Yazaki, M., Kinouchi, T., Maruyama, K., Sorimachi, H., Tsuchiya, T., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1993) Amyloid precursor protein is found in lysosomes. *Gerontology* **39 Suppl 1**, 24-29.
13. Kinbara, K., Kitagaki, H., Kinouchi, T., Okano, M., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1994) Processing and secretion of Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *Tohoku J. Exp. Med.* **174**, 209-216.
14. Saido, T. C., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Ito, H., Tsuchiya, T., Kawashima, S., and Suzuki, K. (1994) Distinct kinetics of subunit autolysis in mammalian m-calpain activation. *FEBS Lett.* **346**, 263-267.
15. Sakamoto, K., Sorimachi, H., Kinbara, K., Tezuka, M., Amano, S., Yoshizawa, T., Sugita, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1994) Quantification of calpain-related molecules by specific PCR amplification and its application to human muscular dystrophy. *Biomed. Res.* **15**, 337-346.
16. Sasagawa, N., Sorimachi, H., Maruyama, K., Arahata, K., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1994) Expression of a novel human myotonin protein kinase (MtPK) cDNA clone which encodes a protein with a thymopoietin-like domain in COS cells. *FEBS Lett.* **351**, 22-26.
17. Kinouchi, T., Ono, Y., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1995) Arachidonate metabolites affect the secretion of an N-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 841-849.

18. Kinouchi, T., Sorimachi, H., Maruyama, K., Mizuno, K., Ohno, S., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1995) Conventional protein kinase C (PKC)- α and novel PKC- ϵ , but not - δ , increase the secretion of an N-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein from PKC cDNA transfected 3Y1 fibroblasts. *FEBS Lett.* **364**, 203-206.
19. Sorimachi, H., Kinbara, K., Kimura, S., Takahashi, M., Ishiura, S., Sasagawa, N., Sorimachi, N., Shimada, H., Tagawa, K., Maruyama, K., and Suzuki, K. (1995) Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J. Biol. Chem.* **270**, 31158-31162.
20. Sorimachi, H., Tsukahara, T., Okada-Ban, M., Sugita, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1995) Identification of a third ubiquitous calpain species - chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochim. Biophys. Acta* **1261**, 381-393.
21. Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, H., Tobita, Y., Kitamura, F., Yagita, H., Suzuki, K., and Miyasaka, M. (1995) A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J. Biol. Chem.* **270**, 7437-7444.
22. Usuki, F., Ishiura, S., Sasagawa, N., Sorimachi, H., Suzuki, K., Shimizu, T., and Terao, T. (1995) Up-regulation of dystrophin mRNA by exposure to dibutyryl cAMP in the C2C12 muscle cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 654-659.

23. Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1995) A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity. *FEBS Lett.* **358**, 101-103.
24. Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1995) Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 376-383.
25. Saitoh, N., Sasagawa, N., Koike, H., Shimokawa, M., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1996) Immunocytochemical localization of a full-length myotonin protein kinase in rat L6 myoblasts. *Neurosci. Lett.* **218**, 214-216.
26. Sasagawa, N., Saitoh, N., Shimokawa, M., Sorimachi, H., Maruyama, K., Arahata, K., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1996) Effect of artificial (CTG) repeat expansion on the expression of myotonin protein kinase (MtPK) in COS-1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1315**, 112-116.
27. Sorimachi, H., Amano, S., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1996) Primary sequences of rat μ -calpain large and small subunits are, respectively, moderately and highly similar to those of human. *Biochim. Biophys. Acta* **1309**, 37-41.
28. Sorimachi, H., Forsberg, N. E., Lee, H. J., Joeng, S. Y., Richard, I., Beckmann, J. S., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1996) Highly conserved structure in the promoter region of the gene for muscle-specific calpain, p94. *Biol. Chem.* **377**, 859-864.
29. Yazaki, M., Tagawa, K., Maruyama, K., Sorimachi, H., Tsuchiya, T., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1996) Mutation of potential N-linked glycosylation sites in the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP). *Neurosci. Lett.* **221**, 57-60.

30. Jeong, S. Y., Sorimachi, H., Lee, H. J., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) Molecular cloning and characterization of cDNAs for the μ -type large subunit and the small subunit of chicken calpain. *Comp. Biochem. Physiol. Part B, Biochem. Mol. Biol.* **118**, 539-547.
31. Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 99-107.
32. Ono, Y., Kinouchi, T., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) Deletion of an endosomal/lysosomal targeting signal promotes the secretion of Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP). *J. Biochem.* **121**, 585-590.
33. Shimokawa, M., Ishiura, S., Kameda, N., Yamamoto, M., Sasagawa, N., Saitoh, N., Sorimachi, H., Ueda, H., Ohno, S., Suzuki, K., and Kobayashi, T. (1997) Novel isoform of myotonin protein kinase: gene product of myotonic dystrophy is localized in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* **150**, 1285-1295.
34. Sorimachi, H., Freiburg, A., Kolmerer, B., Ishiura, S., Stier, G., Gregorio, C. C., Labeit, D., Linke, W. A., Suzuki, K., and Labeit, S. (1997) Tissue-specific expression and α -actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J. Mol. Biol.* **270**, 688-695.
35. Usuki, F., Ishiura, S., Saitoh, N., Sasagawa, N., Sorimachi, H., Kuzume, H., Maruyama, K., Terao, T., and Suzuki, K. (1997) Expanded CTG repeats in

- myotonin protein kinase suppresses myogenic differentiation. *Neuroreport* **8**, 3749-3753.
36. Gregorio, C. C., Trombitas, K., Centner, T., Kolmerer, B., Stier, G., Kunke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Herrmann, B., Granzier, H., Sorimachi, H., and Labeit, S. (1998) The NH₂ terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J. Cell Biol.* **143**, 1013-1027.
 37. Kinbara, K., Ishiura, S., Tomioka, S., Sorimachi, H., Jeong, S. Y., Amano, S., Kawasaki, H., Kolmerer, B., Kimura, S., Labeit, S., and Suzuki, K. (1998) Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem. J.* **335**, 589-596.
 38. Koike, H., Saitoh, N., Sasagawa, N., Watanabe, T., Shimokawa, M., Sorimachi, H., Arahata, K., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) Identification and purification of myotonin protein kinase (MtPK) from rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biomed. Res.* **19**, 93-99.
 39. Kouchi, Z., Kinouchi, T., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) The deletion of the C-terminal tail and addition of an endoplasmic reticulum targeting signal to Alzheimer's amyloid precursor protein change its localization, secretion, and intracellular proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **258**, 291-300.
 40. Lee, H. J., Sorimachi, H., Jeong, S. Y., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol. Chem.* **379**, 175-183.

41. Masumoto, H., Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Nishino, T., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) Overexpression, purification, and characterization of human m-calpain and its active site mutant, m-C105S-calpain, using a baculovirus expression system. *J. Biochem.* **124**, 957-961.
42. Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saido, T. C., Beckmann, J. S., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J. Biol. Chem.* **273**, 17073-17078.
43. Saitoh, N., Usuki, F., Sasagawa, N., Koike, H., Sorimachi, H., Yabe, I., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) Myotonin protein kinase (MtPK) affects the chloride permeability of C2C12 myogenic cells. *Biomed. Res.* **19**, 191-198.
44. Futai, E., Maeda, T., Sorimachi, H., Kitamoto, K., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1999) The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 559-568.
45. Futai, E., Sorimachi, H., Jeong, S. Y., Kitamoto, K., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1999) *Aspergillus oryzae palB^{ory}* encodes a calpain-like protease: homology to *Emericella nidulans* PalB and conservation of functional regions. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 438-440.
46. Herasse, M., Ono, Y., Fougerousse, F., Kimura, E., Stockholm, D., Beley, C., Montarras, D., Pinset, C., Sorimachi, H., Suzuki, K., Beckmann, J. S., and Richard, I. (1999) Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated

- through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4047-4055.
47. Koike, H., Seki, H., Kouchi, Z., Ito, M., Kinouchi, T., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999) Thimet oligopeptidase cleaves the full-length Alzheimer amyloid precursor protein at a beta-secretase cleavage site in COS cells. *J. Biochem.* **126**, 235-242.
 48. Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* **343**, 371-375.
 49. Kouchi, Z., Sorimachi, H., Suzuki, K., and Ishiura, S. (1999) Proteasome inhibitors induce the association of Alzheimer's amyloid precursor protein with Hsc73. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 804-810.
 50. Lee, H. J., Tomioka, S., Kinbara, K., Masumoto, H., Jeong, S. Y., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1999) Characterization of a human digestive tract-specific calpain, nCL-4, expressed in the baculovirus system. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 22-31.
 51. Suo, S., Koike, H., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1999) Association and dissociation of the calcium-binding domains of calpain by Ca^{2+} . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 63-66.

52. Watanabe, T., Sasagawa, N., Usuki, F., Koike, H., Saitoh, N., Sorimachi, H., Maruyama, K., Nakase, H., Takagi, A., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1999) Overexpression of myotonic dystrophy protein kinase in C2C12 myogenic culture involved in the expression of ferritin heavy chain and interleukin-1 α mRNAs. *J. Neurol. Sci.* **167**, 26-33.
53. Hata, S., Sato, T., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (2000) A simple purification and fluorescent assay method of the poliovirus 3C protease searching for specific inhibitors. *J. Virol. Methods* **84**, 117-126.
54. Kitagaki, H., Tomioka, S., Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Saido, T. C., Ishiura, S., and Suzuki, K. (2000) Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain. *Biosci. Biotech. Biochem.* **64**, 689-695.
55. Koike, H., Kouchi, Z., Kinouchi, T., Maeda, T., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Suzuki, K., and Ishiura, S. (2000) Metabolism of amyloid precursor protein in COS cells transfected with a beta-secretase candidate. *Cytotechnology* **33**, 213-219.
56. Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, S., Sorimachi, H., Suzuki, K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H., Fernandez-Catalan, C., Bode, W., and Strobl, S. (2000) Crystallization and preliminary X-ray analysis of recombinant full-length human m-calpain. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**, 73-75.
57. Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguan, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., Lefranc, G., Fardeau, M., Sebille,

- A., and Beckmann, J. S. (2000) Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated I κ B α /NF κ B pathway perturbation in mice. *J. Cell Biol.* **151**, 1583-1590.
58. Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K., and Bode, W. (2000) The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 588-592.
59. Tagawa, K., Taya, C., Hayashi, Y., Nakagawa, M., Ono, Y., Fukuda, R., Karasuyama, H., Toyama-Sorimachi, N., Katsui, Y., Hata, S., Ishiura, S., Nonaka, I., Seyama, Y., Arahata, K., Yonekawa, H., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (2000) 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.* **9**, 1393-1402.
60. Bang, M. L., Mudry, R. E., McElhinny, A. S., Trombitas, K., Geach, A. J., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C. C., and Labeit, S. (2001) Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J. Cell Biol.* **153**, 413-427.
61. Centner, T., Yano, J., Kimura, E., McElhinny, A. S., Pelin, K., Witt, C. C., Bang, M. L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C. C., Sorimachi, H., and Labeit, S. (2001) Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J. Mol. Biol.* **306**, 717-726.

62. Futai, E., Kubo, T., Sorimachi, H., Suzuki, K., and Maeda, T. (2001) Molecular cloning of PalBH, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 316-319.
63. Hata, S., Nishi, K., Kawamoto, T., Lee, H. J., Kawahara, H., Maeda, T., Shintani, Y., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (2001) Both the conserved and the unique gene structure of stomach-specific calpains reveal processes of calpain gene evolution. *J. Mol. Evol.* **53**, 191-203.
64. Hata, S., Sorimachi, H., Nakagawa, K., Maeda, T., Abe, K., and Suzuki, K. (2001) Domain II of m-calpain is a Ca²⁺-dependent cysteine protease. *FEBS Lett.* **501**, 111-114.
65. Ilian, M. A., Morton, J. D., Bekhit, A. E., Roberts, N., Palmer, B., Sorimachi, H., and Bickerstaffe, R. (2001) Effect of preslaughter feed withdrawal period on longissimus tenderness and the expression of calpains in the ovine. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1990-1998.
66. Nakagawa, K., Masumoto, H., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (2001) Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. *J. Biochem.* **130**, 605-611.
67. Reverter, D., Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Sorimachi, H., Suzuki, K., and Bode, W. (2001) Structural basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains. *Biol. Chem.* **382**, 753-766.

68. Takahashi, N., Sasagawa, N., Usuki, F., Kino, Y., Kawahara, H., Sorimachi, H., Maeda, T., Suzuki, K., and Ishiura, S. (2001) Coexpression of the CUG-binding protein reduces DM protein kinase expression in COS cells. *J. Biochem.* **130**, 581-587.
69. Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K., and Friedrich, P. (2001) Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1333-1339.
70. Umeda, T., Kouchi, Z., Kawahara, H., Tomioka, S., Sasagawa, N., Maeda, T., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (2001) Limited proteolysis of filamin is catalyzed by caspase-3 in U937 and Jurkat cells. *J. Biochem.* **130**, 535-542.
71. McElhinny, A. S., Kakinuma, K., Sorimachi, H., Labeit, S., and Gregorio, C. C. (2002) Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J. Cell Biol.* **157**, 125-136.
72. Reverter, D., Braun, M., Fernandez-Catalan, C., Strobl, S., Sorimachi, H., and Bode, W. (2002) Flexibility analysis and structure comparison of two crystal forms of calcium-free human m-calpain. *Biol. Chem.* **383**, 1415-1422.
73. Spencer, M. J., Guyon, J. R., Sorimachi, H., Potts, A., Richard, I., Herasse, M., Chamberlain, J., Dalkilic, I., Kunkel, L. M., and Beckmann, J. S. (2002) Stable expression of calpain 3 from a muscle transgene in vivo: immature muscle in

- transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8874-8879.
74. Welm, A. L., Timchenko, N. A., Ono, Y., Sorimachi, H., Radomska, H. S., Tenen, D. G., Lekstrom-Himes, J., and Darlington, G. J. (2002) C/EBP α is required for proteolytic cleavage of cyclin A by calpain 3 in myeloid precursor cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 33848-33856.
75. Kawabata, Y., Hata, S., Ono, Y., Ito, Y., Suzuki, K., Abe, K., and Sorimachi, H. (2003) Newly identified exons encoding novel variants of p94/calpain 3 are expressed ubiquitously and overlap the α -glucosidase C gene. *FEBS Lett.* **555**, 623-630.
76. Kimura, E., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2003) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K interacts with and is proteolyzed by calpain in vivo. *Biosci. Biotech. Biochem.* **67**, 1786-1796.
77. Kawabata, Y., Hata, S., Ono, Y., Ito, Y., Suzuki, K., Abe, K., and Sorimachi, H. (2004) Corrigendum to: Newly identified exons encoding novel variants of p94/calpain 3 are expressed ubiquitously and overlap the α -glucosidase C gene (vol 555, pg 623, 2003). *FEBS Lett.* **557**, 293-293.
78. Ono, Y., Kakinuma, K., Torii, F., Irie, A., Nakagawa, K., Labeit, S., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2004) Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *J. Biol. Chem.* **279**, 2761-2771.

79. Sato, K., Hattori, S., Irie, S., Sorimachi, H., Inomata, M., and Kawashima, S. (2004) Degradation of fodrin by m-calpain in fibroblasts adhering to fibrillar collagen I gel. *J. Biochem.* **136**, 777-785.
80. Shirasuka, Y., Nakajima, K., Asakura, T., Yamashita, H., Yamamoto, A., Hata, S., Nagata, S., Abo, M., Sorimachi, H., and Abe, K. (2004) Neoculin as a new taste-modifying protein occurring in the fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **68**, 1403-1407.
81. Witt, C. C., Ono, Y., Puschmann, E., McNabb, M., Wu, Y., Gotthardt, M., Witt, S. H., Haak, M., Labeit, D., Gregorio, C. C., Sorimachi, H., Granzier, H., and Labeit, S. (2004) Induction and myofibrillar targeting of CARP, and suppression of the Nkx2.5 pathway in the MDM mouse with impaired titin-based signaling. *J. Mol. Biol.* **336**, 145-154.
82. Hayashi, M., Fukuzawa, T., Sorimachi, H., and Maeda, T. (2005) Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9478-9490.
83. Toyama-Sorimachi, N., Omatsu, Y., Onoda, A., Tsujimura, Y., Iyoda, T., Kikuchi-Maki, A., Sorimachi, H., Dohi, T., Taki, S., Inaba, K., and Karasuyama, H. (2005) Inhibitory NK receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation- and cytokine stimulation-dependent manner. *J. Immunol.* **174**, 4621-4629.
84. Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2006) Stomach-specific calpain, nCL-2,

- localizes in mucus cells and proteolyzes the β -subunit of coatomer complex, β -COP. *J. Biol. Chem.* **281**, 11214-11224.
85. Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, Y., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Kitamoto, K., and Abe, K. (2006) Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Env. Microbiol.* **72**, 3716-3723.
86. Nakajima, K., Asakura, T., Oike, H., Morita, Y., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. (2006) Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport* **17**, 1241-1244.
87. Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., and Sorimachi, H. (2006) Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 by N2A connectin/titin in a genetic reporter system. *J. Biol. Chem.* **281**, 18519-18531.
88. Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Terada, T., Asakura, T., Nakajima, K., Iwata, S., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. (2006) Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity. *J. Mol. Biol.* **359**, 148-158.
89. Takahara, T., Hara, K., Yonezawa, K., Sorimachi, H., and Maeda, T. (2006) Nutrient-dependent multimerization of the mammalian target of rapamycin through the N-terminal HEAT repeat region. *J. Biol. Chem.* **281**, 28605-28614.

90. Yajima, Y., Sato, M., Sorimachi, H., Inomata, M., Maki, M., and Kawashima, S. (2006) Calpain system regulates the differentiation of adult primitive mesenchymal ST-13 adipocytes. *Endocrinology* **147**, 4811-4819.
91. Hata, S., Doi, N., Kitamura, F., and Sorimachi, H. (2007) Stomach-specific calpain, nCL-2/calpain 8, is active without calpain regulatory subunit and oligomerizes through C2-like domains. *J. Biol. Chem.* **282**, 27847-27856.
92. Kamei, H., Saito, T., Ozawa, M., Fujita, Y., Asada, A., Bibb, J. A., Saido, T. C., Sorimachi, H., and Hisanaga, S. (2007) Suppression of calpain-dependent cleavage of the CDK5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **282**, 1687-1694.
93. Ojima, K., Ono, Y., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, S., and Sorimachi, H. (2007) Myogenic stage, sarcomere length, and protease activity modulate localization of muscle-specific calpain. *J. Biol. Chem.* **282**, 14493-14504.
94. Ono, Y., Hayashi, C., Doi, N., Kitamura, F., Shindo, M., Kudo, K., Tsubata, T., Yanagida, M., and Sorimachi, H. (2007) Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics-possible regulation of protein synthesis by p94. *Biotechnol. J.* **2**, 565-576.
95. Hayashi, C., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Tagami, M., Mineki, R., Arai, T., Taguchi, H., Yanagida, M., Hirner, S., Labeit, D., Labeit, S., and Sorimachi, H. (2008) Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **283**, 14801-14814.

96. Ono, Y., Hayashi, C., Doi, N., Tagami, M., and Sorimachi, H. (2008) The importance of conserved amino acid residues in p94 protease sub-domain IIb and the IS2 region for constitutive autolysis. *FEBS Lett.* **582**, 691-698.
97. Koyama, S., Hata, S. e. c. f. a., Witt, C. C., Ono, Y., Lerche, S., Ojima, K., Chiba, T., Doi, N., Kitamura, F., Tanaka, K., Abe, K., Witt, S. H., Rybin, V., Gasch, A., Franz, T., Labeit, S., and Sorimachi, H. (2008) Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *J. Mol. Biol.* **376**, 1224-1236.
98. Sasuga, Y., Iwasawa, T., Terada, K., Oe, Y., Sorimachi, H., Ohara, O., and Harada, Y. (2008) Single-cell chemical lysis method for analyses of intracellular molecules using an array of picoliter-scale microwells. *Anal. Chem.* **80**, 9141-9149.
99. Yamada, M., Yoshida, Y., Mori, D., Takitoh, T., Kengaku, M., Umeshima, H., Takao, K., Miyakawa, T., Sato, M., Sorimachi, H., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2009) Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues *in vivo* phenotypes in a mouse model of lissencephaly. *Nat. Med.* **15**, 1202-1207.
100. duVerle, D. A., Takigawa, I., Ono, Y., Sorimachi, H., and Mamitsuka, H. (2010) CaMPDB: a resource for calpain and modulatory proteolysis. *Genome Informatics* **22**, 202-213.
101. Hata, S., Abe, M., Suzuki, H., Kitamura, F., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Sakimura, K., and Sorimachi, H. (2010) Calpain 8/nCL-2 and calpain 9/nCL-4 constitute an active protease complex, G-calpain, involved in gastric mucosal defense. *PLoS Genet.* **6**, e1001040.

102. Ojima, K., Kawabata, Y., Nakao, H., Nakao, K., Doi, N., Kitamura, F., Ono, Y., Hata, S., Suzuki, H., Kawahara, H., Bogomolovas, J., Witt, C., Ottenheijm, C., Labeit, S., Granzier, H., Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, M., Suzuki, K., Maeda, T., Abe, K., Aiba, A., and Sorimachi, H. (2010) Dynamic distribution of muscle-specific calpain in mice has a key role in physical-stress adaptation and is impaired in muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **120**, 2672-2683.
103. Ono, Y., Ojima, K., Torii, F., Takaya, E., Doi, N., Nakagawa, K., Hata, S., Abe, K., and Sorimachi, H. (2010) Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na⁺-dependent protease. *J. Biol. Chem.* **285**, 22986-22998.
104. duVerle, D. A., Ono, Y., Sorimachi, H., and Mamitsuka, H. (2011) Calpain cleavage prediction using multiple kernel learning. *PLoS One* **6**, e19035.
105. Kondo, H., Ezura, Y., Nakamoto, T., Hayata, T., Notomi, T., Sorimachi, H., Takeda, S., and Noda, M. (2011) MURF1 deficiency suppresses unloading-induced effects on osteoblasts and osteoclasts to lead to bone loss. *J. Cell Biochem.* **112**, 3525-3530.
106. Ojima, K., Ono, Y., Ottenheijm, C., Hata, S., Suzuki, H., Granzier, H., and Sorimachi, H. (2011) Non-proteolytic functions of calpain-3 in sarcoplasmic reticulum in skeletal muscles. *J. Mol. Biol.* **407**, 439-449.
107. Saenz, A., Ono, Y., Sorimachi, H., Goicoechea, M., Leturcq, F., Blazquez, L., Garcia-Bragado, F., Marina, A., Poza, J. J., Azpitarte, M., Doi, N., Urtasun, M., Kaplan, J. C., and Lopez de Munain, A. (2011) Does the severity of the LGMD2A phenotype in compound heterozygotes depend on the combination of mutations? *Muscle Nerve* **44**, 710-714.

108. Tonami, K., Kurihara, Y., Arima, S., Nishiyama, K., Uchijima, Y., Asano, T., Sorimachi, H., and Kurihara, H. (2011) Calpain-6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1. *J. Cell Sci.* **124**, 1214-1223.
109. Harada, E., Nakagawa, J., Asano, T., Taoka, M., Sorimachi, H., Ito, Y., Aigaki, T., and Matsuo, T. (2012) Functional evolution of duplicated odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. *PLoS One* **7**, e29710.
110. Hata, S., Ueno, M., Kitamura, F., and Sorimachi, H. (2012) Efficient expression and purification of recombinant human m-calpain using an *Escherichia coli* expression system at low temperature. *J. Biochem.* **151**, 417-422.
111. Ozaki, T., Nakazawa, M., Yamashita, T., Sorimachi, H., Hata, S., Tomita, H., Isago, H., Baba, A., and Ishiguro, S. (2012) Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1783-1795.
112. Ono, Y., Iemura, S., Novak, S. M., Doi, N., Kitamura, F., Natsume, T., Gregorio, C. C., and Sorimachi, H. (2013) PLEIAD/SIMC1/C5orf25, a novel autolysis regulator for a skeletal-muscle-specific calpain, CAPN3, scaffolds a CAPN3 substrate, CTBP1. *J. Mol. Biol.* **425**, 2955-2972.
113. Hata, S., Kitamura, F., and Sorimachi, H. (2013) Efficient expression and purification of recombinant human μ -calpain using an *Escherichia coli* expression system at low temperature. *Genes Cells* **18**, 753-763.

114. Tonami, K., Hata, S., Ojima, K., Ono, Y., Kurihara, Y., Amano, T., Sato, T., Kawamura, Y., Kurihara, H., and Sorimachi, H. (2013) Calpain-6 deficiency promotes skeletal muscle development and regeneration. *PLoS Genet.* **9**, e1003668.
115. Buck, D., Smith, J. E., 3rd, Chung, C. S., Ono, Y., Sorimachi, H., Labeit, S., and Granzier, H. L. (2014) Removal of immunoglobulin-like domains from titin's spring segment alters titin splicing in mouse skeletal muscle and causes myopathy. *J. Gen. Physiol.* **143**, 215-230.
116. Maemoto, Y., Ono, Y., Kiso, S., Shibata, H., Takahara, T., Sorimachi, H., and Maki, M. (2014) Involvement of calpain-7 in epidermal growth factor receptor degradation via the endosomal sorting pathway. *FEBS J.* **281**, 3642-3655.
117. Ojima, K., Ono, Y., Hata, S., Noguchi, S., Nishino, I., and Sorimachi, H. (2014) Muscle-specific calpain-3 is phosphorylated in its unique insertion region for enrichment in a myofibril fraction. *Genes Cells* **19**, 830-841.
118. Ono, Y., Shindo, M., Doi, N., Kitamura, F., Gregorio, C. C., and Sorimachi, H. (2014) The N- and C-terminal autolytic fragments of CAPN3/p94/calpain-3 restore proteolytic activity by intermolecular complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E5527-5536.
119. Sasaki, K., Takada, K., Ohte, Y., Kondo, H., Sorimachi, H., Tanaka, K., Takahama, Y., and Murata, S. (2015) Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8⁺ T cells. *Nat. Commun.* **6**, 7484.

120. Sato, S., Kawamata, Y., Takahashi, A., Imai, Y., Hanyu, A., Okuma, A., Takasugi, M., Yamakoshi, K., Sorimachi, H., Kanda, H., Ishikawa, Y., Sone, S., Nishioka, Y., Ohtani, N., and Hara, E. (2015) Ablation of the p16^{INK4a} tumour suppressor reverses ageing phenotypes of *klotho* mice. *Nat. Commun.* **6**, 7035.
121. Shinkai-Ouchi, F., Koyama, S., Ono, Y., Hata, S., Ojima, K., Shindo, M., duVerle, D., Ueno, M., Kitamura, F., Doi, N., Takigawa, I., Mamitsuka, H., and Sorimachi, H. (2016) Predictions of cleavability of calpain proteolysis by quantitative structure-activity relationship analysis using newly determined cleavage sites and catalytic efficiencies of an oligopeptide array. *Mol. Cell Proteomics* **15**, 1262-1280.
122. Miyazaki, T., Tonami, K., Hata, S., Aiuchi, T., Ohnishi, K., Lei, X. F., Kim-Kaneyama, J. R., Takeya, M., Itabe, H., Sorimachi, H., Kurihara, H., and Miyazaki, A. (2016) Calpain-6 confers atherogenicity to macrophages by dysregulating pre-mRNA splicing. *J. Clin. Invest.* **126**, 3417-3432.
123. Hata, S., Kitamura, F., Yamaguchi, M., Shitara, H., Murakami, M., and Sorimachi, H. (2016) A gastrointestinal calpain complex, G-calpain, is a heterodimer of CAPN8 and CAPN9 calpain isoforms, which play catalytic and regulatory roles, respectively. *J. Biol. Chem.* **291**, 27313-27322.

(B) 英文著書等

1. Sorimachi, H., Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Saido, T. C., Ohno, S., Minami, Y., and Suzuki, K. (1990) A novel member of the calcium-dependent cysteine protease family. *Biol. Chem. Hoppe-Seyley* **371 Suppl.**, 171-176.
2. Suzuki, K., Sorimachi, H., Hata, A., Ohno, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Saido, T., Ohmi-Imajoh, S., and Akita, Y. (1990) Calcium dependent protease: A novel molecular species, regulation of gene expression, and activation at the cell membrane. in *Neurotoxicity of excitatory amino acids* (Guidotti, A. ed.), Raven Press, New York. pp 79-93.
3. Sorimachi, H., Kawasaki, H., Tsukahara, T., Ishiura, S., Emori, Y., Sugita, H., and Suzuki, K. (1991) Sequence comparison among subunits of multicatalytic proteinase. *Biomed. Biochim. Acta* **50**, 459-464.
4. Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1992) Regulation of activity of calpain and its physiological function. *Cell Str. Func.* **17**, 464.
5. Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1992) Sequence comparison among muscle-specific calpain, p94, and calpain subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **1160**, 55-62.
6. Harigaya, W., Saido, T. C., Nagao, S., Miyata, Y., Saito, Y., Sorimachi, H., Tuchiya, T., Suzuki, K., Yahara, I., and Kawashima, S. (1993) Analysis of calpain functions in epidermoid carcinoma KB cells by cDNA transfection. *Zool. Sci.* **10**, 14.

7. Sorimachi, H., Toyama-Sorimachi, N., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1993) Identification and localization of a novel muscle-specific calpain, p94. in *Proteolysis and Protein Turnover* (Bond, J. S., and Barrett, A. J. eds.), Portland Press Ltd., London. pp 45-49.
8. Saido, T. C., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1994) Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* **8**, 814-822.
9. Sorimachi, H., Saido, T. C., and Suzuki, K. (1994) New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains. *FEBS Lett.* **343**, 1-5.
10. Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1994) A novel calpain species, n-calpain, active at nM levels of calcium? in *Biological Functions of Proteases and Inhibitors* (Katunuma, N., Suzuki, K., Travis, J., and Fritz, H. eds.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp 35-46.
11. Sorimachi, H., Yoshizawa, T., and Suzuki, K. (1995) Molecular diversity and structure-function relationship of calpain. in *Adv. Biochem. Mol. Biol.*, Proceedings of the 11th FAOBMB Symposium on Biopolymers and Bioproducts.
12. Suzuki, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Ohno, S. (1995) Two family members of calpain: ubiquitous and tissue-specific calpains. in *Expression of Tissue Proteinases and Regulation of Protein Degradation as related to Meat Quality* (Ouali, A., Demeyer, D. I., and Smulders, J. J. M. eds.), Colophon, Utrecht. pp 1-15.

13. Suzuki, K., Sorimachi, H., Yoshizawa, T., Kinbara, K., and Ishiura, S. (1995) Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 523-529.
14. Sorimachi, H., Kimura, S., Kinbara, K., Kazama, J., Takahashi, M., Yajima, H., Ishiura, S., Sasagawa, N., Nonaka, I., Sugita, H., Maruyama, K., and Suzuki, K. (1996) Structure and physiological functions of ubiquitous and tissue-specific calpain species. Muscle-specific calpain, p94, interacts with connectin/titin. *Adv. Biophys.* **33**, 101-122.
15. Freiburg, A., Sorimachi, H., Suzuki, S., Stier, G., Kolmerer, B., Linke, W., and Labeit, S. (1997) The Z disc forming domain of titin, as revealed by its striated muscle-specific expression and alpha-actinin binding. *Eur. J. Cell Biol.* **72**, 60.
16. Ishiura, S., Mabuchi, Y., Urakami-Manaka, Y., Isobe, K., Tagawa, K., Maruyama, K., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1997) Proteases involved in the processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. in *Proteolysis In Cell Functions* (Hopsu-Havu, V. K., Järvinen, M., and Kirschke, H. eds.), IOS Press, Berlin. pp 507-512.
17. Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) A skeletal muscle-specific calpain, p94, exists in myofibrils bound to connectin/titin. in *Proteolysis In Cell Functions* (Hopsu-Havu, V. K., Järvinen, M., and Kirschke, H. eds.), IOS Press, Berlin. pp 68-75.

18. Kinouchi, T., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) Regulation of proteolysis of Alzheimer's disease amyloid precursor protein by intracellular signal transduction pathways. in *Proteolysis In Cell Functions* (Hopsu-Havu, V. K., Järvinen, M., and Kirschke, H. eds.), IOS Press, Berlin. pp 513-519.
19. Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* **328**, 721-732.
20. Sorimachi, H., Kinbara, K., Shimada, H., and Suzuki, K. (1997) Interaction of a skeletal muscle-specific calpain, p94, with connectin. in *Medical Aspects of Proteases and Protease Inhibitors* (Katunuma, N., Kido, H., Fritz, H., and Travis, J. eds.), IOS Press, Tokyo. pp 34-42.
21. Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) Skeletal muscle-specific calpain, p94: structure and physiological function. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 415-420.
22. Labeit, S., Linke, W. A., Freiburg, A., Sorimachi, H., Gregorio, C. C., Granzier, H., and Kolmerer, B. (1998) Clues to the function of the titin by the study of its differentially expressed isoforms. *FASEB J.* **12**, A313.
23. Ono, Y., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1998) Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 289-294.
24. Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1998) m-calpain. in *Handbook of Proteolytic enzymes* (Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. eds.), Academic Press. pp 649-654.

25. Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1998) μ -calpain. in *Handbook of Proteolytic enzymes* (Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. eds.), Academic Press. pp 643-649.
26. Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1998) Muscle calpain, p94. in *Handbook of Proteolytic enzymes* (Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. eds.), Academic Press. pp 654-656.
27. Suzuki, K., and Sorimachi, H. (1998) A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.* **433**, 1-4.
28. Gregorio, C. C., Granzier, H., Sorimachi, H., and Labeit, S. (1999) Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 18-25.
29. Kolmerer, B., Witt, C. C., Freiburg, A., Millevoi, S., Stier, G., Sorimachi, H., Pelin, K., Carrier, L., Schwartz, K., Labeit, D., Gregorio, C. C., Linke, W. A., and Labeit, S. (1999) The titin cDNA sequence and partial genomic sequences: insights into the molecular genetics, cell biology and physiology of the titin filament system. *Rev. Phys. Biochem. Pharmacol.* **138**, 19-55.
30. Ono, Y., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1999) New aspect of the research on limb-girdle muscular dystrophy 2A: a molecular biologic and biochemical approach to pathology. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 114-118.
31. Ono, Y., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1999) The calpain superfamily. in *Calpain* (Wang, K. K. W., and Yuen, P.-W. eds.), Taylor & Francis, Ann Arbor. pp 1-23.

32. Ono, Y., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1999) Calpains: structure and function of the calpain super family. in *Proteases: New Perspectives* (Turk, V. ed.), Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp 159-174.
33. Bang, M. L., Mudry, R. E., McElhinny, A. S., Sorimachi, H., Trombitas, K., Geach, A. J., Granzier, H., Labeit, S., and Gregorio, C. C. (2000) Z-linkin, a novel 145 kDa sarcomeric protein is required for Z-line structure. *Mol. Biol. Cell* **11**, 74A.
34. Ono, Y., Hata, S., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (2000) Calcium and muscle disease: Pathophysiology of calpains and limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A). in *Calcium: The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine* (Pochet, R., Donato, R., Haiech, J., Heizmann, C., and Gerke, V. eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp 443-464.
35. Sorimachi, H., Minami, N., Ono, Y., Suzuki, K., and Nonaka, I. (2000) Limb-girdle muscular dystrophy with calpain 3 (p94) gene mutations (calpainopathy). *Neurosci. News* **3**, 20-27.
36. Sorimachi, H., Ono, Y., and Suzuki, K. (2000) Molecular analysis of p94 and its application to diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A. *Methods Mol. Biol.* **144**, 75-84.
37. Sorimachi, H., Ono, Y., and Suzuki, K. (2000) Skeletal muscle-specific calpain, p94, and connectin/titin: their physiological functions and relationship to limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Adv. Exp. Med. Biol.* **481**, 383-395; discussion 395-397.

38. Bickerstaffe, R., Ilian, M., and Sorimachi, H. (2001) Abundance and cellular distribution of the calpain proteolytic system proteins in the longissimus of the ovine. *J. Dairy Sci.* **84**, 438.
39. McElhinny, A. S., Kakinuma, K., Geach, A. J., Sorimachi, H., Labeit, S., and Gregorio, C. C. (2001) Dual roles of MURF-1 in the regulation of sarcomeric M-line structure and in the potential modulation of gene expression via its interaction with titin and GMEB-1. *Mol. Biol. Cell* **12**, 38A-39A.
40. Reverter, D., Sorimachi, H., and Bode, W. (2001) The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 222-229.
41. Sorimachi, H., and Suzuki, K. (2001) The structure of calpain. *J. Biochem.* **129**, 653-664.
42. Spencer, M. J., Potts, A., Richard, I., Sorimachi, H., Chamberlain, J., and Beckmann, J. (2001) Transgenic mice overexpressing different isoforms of calpain 3 elucidate calpain 3's physiological function. *Neuromuscul. Disord.* **11**, 652.
43. Sorimachi, H., and Beckmann, J. S. (2002) Defects of non-lysosomal proteolysis: Calpain3 deficiency. in *Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases* (Karpati, G. ed.), ISN Neuropath. Press, Basel. pp 148-153.
44. Sorimachi, H., Hata, S., Nakagawa, K., Kimura, E., Katsui, Y., Torii, F., Ono, Y., Suzuki, K., and Abe, K. (2002) Calpain and apoptosis. *Neurosci. Res.*, S8.

45. Sorimachi, H., Hata, S., Katsui, Y., Ono, Y., Torii, F., Yoshioka, K., Kimura, E., Suzuki, K., and Abe, K. (2003) Structure-function relationships of calpain in pathophysiology. *J. Pharmacol. Sci.* **91**, 14.
46. Ojima, K., Kawabata, Y., Ono, Y., Hata, S., Koyama, S., Witt, C., Labeit, S., and Sorimachi, H. (2004) Ubiquitous expression of newly identified p94/calpain 3 variants. *Mol. Biol. Cell* **15**, 274A-275A.
47. Sorimachi, H. (2004) m-Calpain. in *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd Edition* (Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. eds.), Academic Press, Oxford, UK. pp 1211-1213.
48. Sorimachi, H. (2004) μ -Calpain. in *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd Edition* (Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. eds.), Academic Press, Oxford, UK. pp 1206-1211.
49. Sorimachi, H. (2004) Muscle calpain p94. in *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd Edition* (Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. eds.), Academic Press, Oxford, UK. pp 1213-1217.
50. Sorimachi, H. (2004) Other calpain. in *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd Edition* (Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. eds.), Academic Press, Oxford, UK. pp 1217-1225.
51. Sorimachi, H., and Ono, Y. (2004) Calpain. in *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Lennarz, W. J., and Lane, M. D. eds.), Elsevier, Oxford, UK. pp 300-306.

52. Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., and Sorimachi, H. (2004) Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* **53 Suppl. 1**, S12-18.
53. Kondo, H., Sorimachi, H., Takeda, S., and Noda, M. (2005) MuRF1, which induces denervation-dependent protein degradation in muscle, is involved in unloading-induced bone loss. *J. Bone Mineral Res.* **20**, S44.
54. Koyama, S., Hata, S., Ono, Y., Ojima, K., Chiba, T., Doi, N., Witt, C., Abe, K., Labeit, S., and Sorimachi, H. (2005) Functional analysis of muscle specific RING finger protein, MURF1. *Cell Str. Func.* **30**, 100.
55. Ojima, K., Ono, Y., Hata, S., Koyama, S., Doi, N., and Sorimachi, H. (2005) Spatio-temporal expression of muscle specific calpain, p94/calpain3, during myogenesis. *Cell Str. Func.* **30**, 58.
56. Ojima, K., Ono, Y., Hata, S., Koyama, S., Doi, N., and Sorimachi, H. (2005) Possible functions of p94 in connectin-mediated signaling pathways in skeletal muscle cells. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26**, 409-417.
57. Ono, Y., Ojima, K., Doi, N., Witt, C., Witt, S., Granzier, H., Labeit, S., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2005) Characterization of dystrophic phenotypes of mdm skeletal muscle and the relevance of calpain proteolytic system therein. *Cell Str. Func.* **30**, 102.
58. Ono, Y., Ojima, K., Kawabata, Y., Doi, N., Witt, C. C., Witt, S., Labeit, D., Granzier, H., Gregorio, C. C., Labeit, S., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2005)

- Functional properties of p94/calpain3 and connectin/titin in mdm mouse skeletal muscle. *FEBS J.* **272 Suppl.**, 182.
59. Sorimachi, H., Oima, K., Katsui, Y., Hata, S., Koyama, S., Doi, N., and Ono, Y. (2005) Analysis of calpainopathy by 2D-electrophoresis. *Cell Str. Func.* **30**, 102.
60. Sorimachi, H., Ono, Y., Ojima, K., Kawabata, Y., Witt, C. C., Nakao, H., Kawahara, H., Hata, S., Koyama, S., Granzier, H., Gregorio, C. C., Labeit, S., Aiba, A., Abe, K., and Suzuki, K. (2005) Calpain and connectin/titin in health and disease of skeletal muscle. *FEBS J.* **272 Suppl.**, 177-178.
61. Ojima, K., Ono, Y., Doi, N., Labeit, S., and Sorimachi, H. (2006) Spatio-temporal expression of muscle-specific calpain, p94/calpain 3, during myogenesis. *Neuromuscul. Disord.* **16**, S72.
62. Ono, Y., Ojima, K., Doi, N., Hayashi, C., Torii, F., Yoshioka, K., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., and Sorimachi, H. (2006) Relationships between p94/CAPN3 and N2A connectin/titin in skeletal muscle under the normal and dystrophic conditions. *Neuromuscul. Disord.* **16**, S56.
63. Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., and Sorimachi, H. (2006) Effect of N2A connectin/titin on disassembly of p94/CAPN3 caused by autolysis in IS2. *FEBS J.* **273 Suppl.**, 50-51.

64. Sorimachi, H., Ojima, K., Yanagida, M., Ogawa, H., Hayashi, C., Doi, N., and Ono, Y. (2006) How do defects in proteolytic functions of skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3, cause calpainopathy/LGMD2A? *Neuromuscul. Disord.* **16**, S148.
65. Koyama, S., Hata, S., Ojima, K., Hayashi, C., Kitamura, F., Doi, N., Takigawa, I., Matsushima, Y., Abe, K., Mamitsuka, H., Ono, Y., and Sorimachi, H. (2008) Analysis of sequence specificity for calpain by monitoring cleavages of multiple peptides using iTRAQTM and 2D-LC-MS/MS. *J. Proteomics Bioinformatics* **S2**, 187-188.
66. Fardeau, M., Beckmann, J. S., Sorimachi, H., and Urtizbera, J. A. (2010) Une contribution à l'histoire de la découverte des calpainopathies. (in French). *Les Cahiers de Myologie* **2**, 5-10.
67. Ojima, K., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Kawabata, Y., Suzuki, K., Maeda, T., Abe, K., Nakao, H., Aiba, A., Suzuki, H., Kawahara, H., Witt, C., Ottenheijm, C., Labeit, S., Ottenheijm, C., Granzier, H., Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, M., and Sorimachi, H. (2010) Skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain-3, dynamically distributes in skeletal muscle cells to adapt to physical stress, defects of which cause muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 598-599.
68. Ono, Y., Ojima, K., Torii, F., Takaya, E., Doi, N., Nakagawa, K., Hata, S., Abe, K., and Sorimachi, H. (2010) Redundant and non-redundant effects of Ca²⁺ and Na⁺ on the activation of p94/calpain-3. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 608.

69. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2010) Expanding members and roles of the calpain superfamily and their genetically modified animals. *Exp. Anim.* **59**, 549-566.
70. Ojima, K., Ono, Y., Ottenheijm, C., Hata, S., Suzuki, H., Oe, M., Nakajima, I., Muroya, S., Granzier, H., and Sorimachi, H. (2011) Structural functions of skeletal muscle-specific calpain in Ca²⁺ efflux from the sarcoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2011 ASCB Annual Meeting abstracts (doi: 2010.1091/mbc.E2011-2010-0886).
71. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2011) Calpain chronicle-an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc. Jpn. Acad. Ser B Phys. Biol. Sci.* **87**, 287-327.
72. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2011) Impact of genetic insights into calpain biology. *J. Biochem.* **150**, 23-37.
73. Ono, Y., and Sorimachi, H. (2012) Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 224-236.
74. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2012) Chapter 454. μ -calpain. in *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd Edition* (Rawlings, N. D., and Salvesen, G. eds.), Elsevier Academic Press, Oxford, UK. pp 1995-2007.

75. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2012) Chapter 455. m-calpain. in *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd Edition* (Rawlings, N. D., and Salvesen, G. eds.), Elsevier Academic Press, Oxford, UK. pp 2007-2011.
76. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2012) Chapter 456. Muscle calpain. in *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd Edition* (Rawlings, N. D., and Salvesen, G. eds.), Elsevier Academic Press, Oxford, UK. pp 2011-2017.
77. Sorimachi, H., Ono, Y., and Hata, S. (2012) Chapter 457. Gastrointestinal calpain. in *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd Edition* (Rawlings, N. D., and Salvesen, G. eds.), Elsevier Academic Press, Oxford, UK. pp 2018-2022.
78. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2012) Chapter 459. Other calpains. in *Handbook of Proteolytic enzymes, 3rd Edition* (Rawlings, N. D., and Salvesen, G. eds.), Elsevier Academic Press, Oxford, UK. pp 2027-2038.
79. Sorimachi, H., Mamitsuka, H., and Ono, Y. (2012) Understanding the substrate specificity of conventional calpains. *Biol. Chem.* **393**, 853-871.
80. Sorimachi, H., and Ono, Y. (2012) Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc. Res.* **96**, 11-22.
81. Anagli, J., Wang, K. K. W., Ono, Y., and Sorimachi, H. (2013) Chapter 12: Calpains in Health and Disease. in *Proteases: Structure and Function* (Brix, K., and Stöcker, W. eds.), Springer-Verlag, Wien. pp 395-431.

82. Sorimachi, H., Hata, S., and Ono, Y. (2013) Calpain. in *Encyclopedia of Biological Chemistry, 2nd Edition* (Lane, M. D., and Lennarz, W. J. eds.), Academic Press, Waltham, MA. pp 353-361.
83. Ono, Y., and Sorimachi, H. (2015) Amino acid sequence alignment of vertebrate CAPN3/calpain-3/p94. *Data in Brief* **5**, 366-367.
84. Ono, Y., Ojima, K., Shinkai-Ouchi, F., Hata, S., and Sorimachi, H. (2016) An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3. *Biochimie* **122**, 169-187.
85. Ono, Y., Saido, T. C., and Sorimachi, H. (2016) Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 854-876.
86. Sorimachi, H., Ono, Y., Hata, S., and Shinkai-Ouchi, F. (2018) Elucidation of the molecular mechanism of disease development due to calpain dysfunction – CALPAIN. *Impact / Science Impact LTD* **2018**, 74-76.

(C) 和文著書等

1. 反町洋之 (1993) カルパイン研究の新しい局面. 生化学 **65**, 1170-1174.
2. 反町洋之, 笹川昇, 丸山敬, 荒畑喜一, 石浦章一, 鈴木絃一 (1994) Myotonic dystrophy と CTG-リピート. 臨床神経学 **34**, 1230-1232.
3. 鈴木絃一, 反町洋之, 伴真伊, 石浦章一 (1994) 普遍のおよび組織特異的カルパイン. 運動生化学 **6**, 50-56.
4. 石浦章一, 笹川昇, 斎藤直人, 小池恒, 反町洋之, 鈴木絃一, 下川雅丈, 臼杵扶佐子, 中瀬浩史, 鎌倉恵子, 古賀律子, 荒畑喜一 (1995) Myotonin protein kinase. 臨床神経学 **35**, 1482-1483.
5. 石浦章一, 笹川昇, 反町洋之, 鈴木絃一 (1995) CTG リピートを非翻訳領域にもつ筋緊張性ジストロフィー. 実験医学 **13**, 77-79.
6. 反町洋之, 鈴木絃一 (1995) カルパインスーパーファミリーの分子多様性と生理機能. 実験医学 **13**, 1045-1052.
7. 嶋田弘子, 反町洋之, 鈴木絃一 (1996) Long PCR を用いた site-directed mutagenesis. 実験医学 **14**, 2673-2676.
8. 石浦章一, 笹川昇, 斎藤直人, 小池恒, 渡辺知司, 下川雅丈, 臼杵扶佐子, 丸山敬, 反町洋之, 鈴木絃一 (1996) 筋緊張性ジストロフィーとミオトニンキナーゼ. 神経化学 **35**, 204-205.

9. 反町洋之 (1996) 筋ジストロフィーに帰ってきたカルパイン. バイオサイエンスとバイオインダストリー **53**, 1057-1058.
10. 田川一彦, 反町洋之, 脊山洋右, 石浦章一, 鈴木絃一 (1997) カルパインスーパーファミリーとカルパインに相互作用する蛋白質. 蛋白質核酸酵素 **42**, 2165-2174.
11. 反町洋之, 鈴木絃一 (1996) カルパイン制御サブユニットのシャペロニン機能. 医学のあゆみ **178**, 211-215.
12. 反町洋之, 鈴木絃一 (1997) 酵母 Two-Hybrid 系を用いたタンパク質間相互作用の解析. 蛋白質核酸酵素 **42**, 2433-2440.
13. ウィリアム・R・クラーク(著), 反町洋之(訳), 反町典子(訳) (1997) 免疫の反逆, 三田出版, 東京.
14. 反町洋之, 鈴木絃一 (1998) Ca^{2+} 結合タンパク質としてのカルパイン. 蛋白質核酸酵素 **43**, 1666-1674.
15. 小野弥子, 反町洋之, 鈴木絃一 (2000) カルパイン-カルパスタチン系. 「タンパク質分解 -分子機構と細胞機能-」 (鈴木絃一, 木南英紀, 田中啓二編), シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, pp 59-70.
16. 反町洋之, 小野弥子, 鈴木絃一 (2000) 筋ジストロフィー症. 「タンパク質分解 -分子機構と細胞機能-」 (鈴木絃一, 木南英紀, 田中啓二編), シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, pp 157-164.

17. 反町洋之 (2000) カルパインおよびそのホモログの構造と機能. 生化学 **72**, 1297-1315.
18. 反町洋之, 小野弥子, 鈴木絃一 (2000) 肢帯型筋ジストロフィー. 神経研究の進歩 **44**, 189-203.
19. 反町洋之, 中川和博 (2000) カルシウムと分解シグナル. 「神経難病の分子機構」(石浦章一 編), シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京, pp 94-103.
20. 秦勝志, 反町洋之, 鈴木絃一 (2001) カルパインスーパーファミリーの構造と機能. 生化学 **73**, 1129-1140.
21. 反町洋之 (2001) 筋ジストロフィー症とカルパイン. 蛋白質核酸酵素 **46**, 1772-1780.
22. 反町洋之 (2001) 骨格筋特異的カルパインの分子機能. 生体の科学 **52**, 280-286.
23. 反町洋之 (2001) ゲノムプロジェクトによるカルパインスーパーファミリーの同定—分子構造と昨日の多様性, その疾病への応用をめざして—. 農業および園芸 **76**, 883-890.
24. 反町洋之 (2002) 蛋白質「分解」酵素の「異常」による筋ジストロフィー—カルパインパチー—. 臨床検査 **46**, 555-560.
25. 鈴木絃一, 秦勝志, 反町洋之 (2002) カルパインファミリーメンバーの機能と疾患. *Molecular Medicine* **39**, 10-17.

26. 反町洋之, 川畑順子 (2003) カルパインと病態—構造活性相関からの考察—
一. 薬理学会誌 **122**, 21-29.
27. 小野弥子, 川畑順子, 反町洋之 (2004) 骨格筋特異的カルパイン p94/カル
パイン 3 と肢帯型筋ジストロフィー. ゲノム医学 **4**, 27-34.
28. 小野弥子, 反町洋之 (2004) カルパインの機能制御と筋ジストロフィー.
実験医学 **22**, 198-204.
29. 小野弥子, 反町洋之 (2005) 神経細胞死の分子機構と Ca²⁺依存性プロテア
ーゼカルパイン. 医学のあゆみ **215**, 811-817.
30. 尾嶋孝一, 反町洋之, 木村澄子 (2005) 「筋弾性タンパク質の国際シンポ
ジウム」報告記. 生体の科学 **56**, 157-159.
31. 秦勝志, 反町洋之 (2007) 「モジュレータープロテアーゼ」カルパインと
細胞内膜系との新たな展開. 生化学 **79**, 46-50.
32. 小野弥子, 反町洋之 (2008) カルパインの生理機能とその不全による病態
「カルパインノパチー」. 実験医学 **26**, 306-315.
33. 反町洋之 (2008) 「今話題の重要なプロテオリシス」概論. 実験医学 **26**,
294-299.
34. 尾嶋孝一, 反町洋之 (2008) カルパイン 3 異常症 (カルパインノパチー) .
Clinical Neuroscience **26**, 154-155.

35. 反町洋之 (2010) カルパインの機能不全と疾患. *Medical Science Digest* **36**, 706-710.
36. 反町洋之 (2010) 「プロテアーゼ」、「コラーゲン」など 36 項目担当. 生物学辞典 (石川統, 黒岩常祥, 塩見正衛, 松本忠夫, 守隆夫, 八杉貞雄, 山本正幸 編), 東京化学同人, pp 134 他.
37. 小野弥子, 反町洋之 (2011) 骨格筋特異的カルパイン-3 の活性制御因子は細胞内 Na^+ ~例外か多様性か. *化学と生物* **49**, 229-231.
38. 秦勝志, 反町洋之 (2011) 胃粘膜防御に果たすカルパインの役割. *日本臨床* **69**, 1116-1122.
39. 村田茂雄, 反町洋之 (2011) 細胞内分解系によるリノベーシヨンの分子機構に迫る. *実験医学* **29**, 1850-1854.
40. 反町洋之, 小野弥子 (2011) 肢帯型筋ジストロフィーの発症機構. *生体の科学* **62**, 95-99.
41. 反町洋之, 秦勝志, 小野弥子 (2011) 第 1 節・第 4 項「カルパイン」. モデル動物利用マニュアル< 生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール > (小幡裕一, 城石俊彦, 芹川忠夫, 田中啓二, 米川博通 編), 株式会社 LIC, pp 232-248.
42. 反町洋之, 秦勝志, 小野弥子 (2011) カルパインの組織機能論. *実験医学* **29**, 1882-1890.

43. 反町洋之 (2012) 『細胞が自分を食べるオートファジーの謎』水島昇著 (書評). 実験医学 **30**, 523.
44. 反町洋之 (2012) 『脳一分子・遺伝子・生理一』石浦章一 他著 (書評). 生化学 **84**, 149.
45. 川井尚臣, 足立克仁, 反町洋之 (2015) 骨格筋症候群 (上) - I 筋ジストロフィーおよび膜イオンチャネル異常症-肢帯型筋ジストロフィー-常染色体劣性型 LGMD-LGMD2A (calpain 3 異常症). 別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ, pp 105-110.
46. 反町洋之 (2015) カルパイン. 生体の科学 **66**, 500-501.
47. 反町洋之 (2015) 「カルパイン」. 生化学事典 (朝倉書店; 田中啓二、石浦章一、水島昇、谷口直之、遠藤玉夫、竹縄忠臣、伊藤俊樹、花岡文雄、塩見春彦 編), *in press*.
48. 反町洋之, 小野弥子 (2016) カルパインは阻害すればよいのか?. 生化学 **88**, 704-722.

(D) 特許

1. 反町洋之, 秦勝志 (発明者) (2017) 組換えヒト m-カルパインの調製方法. 特許第 6101442 号 (権利者 公益財団法人東京都医学総合研究所)
2. 反町洋之, 秦勝志 (発明者) (2017) 組換えヒト μ -カルパインの調製方法. 特許第 6235815 号 (権利者 公益財団法人東京都医学総合研究所)

総説 / **Reviews**

Calpain research for drug discovery: challenges and potential

Yasuko Ono¹, Takaomi C. Saïdo² and Hiroyuki Sorimachi¹

Abstract | Calpains are a family of proteases that were scientifically recognized earlier than proteasomes and caspases, but remain enigmatic. However, they are known to participate in a multitude of physiological and pathological processes, performing ‘limited proteolysis’ whereby they do not destroy but rather modulate the functions of their substrates. Calpains are therefore referred to as ‘modulator proteases’. Multidisciplinary research on calpains has begun to elucidate their involvement in pathophysiological mechanisms. Therapeutic strategies targeting malfunctions of calpains have been developed, driven primarily by improvements in the specificity and bioavailability of calpain inhibitors. Here, we review the calpain superfamily and calpain-related disorders, and discuss emerging calpain-targeted therapeutic strategies.

Clan

Peptidases and their proteinaceous inhibitors are systematically classified by the online MEROPS database. A clan is composed of multiple families, each of which corresponds to a group of orthologous peptidases. Members of a clan share similar primary and tertiary structures. This classification system complements and extends the previously established enzyme classification system, which includes all enzymes.

¹Calpain Project, Department of Advanced Science for Biomolecules, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science (IGAKUKEN), 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan.
²Laboratory for Proteolytic Neuroscience, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan.

Correspondence to H.S. and T.C.S.
sorimachi-hr@igakuken.or.jp;
saido@brain.riken.jp

doi:10.1038/nrd.2016.212
Published online 11 Nov 2016

We dedicate this Review to our late mentor Koichi Suzuki, who made tremendous scientific contributions as the world leader in calpain research for four decades, led us into the world of calpains and died too soon on 20 April 2010 aged 71 years.

Calpains, discovered in 1964 (REF. 1), are clan CA family C02 cysteine proteases (EC 3.4.22.17) defined by a well-conserved cysteine protease domain called the CysPc motif²⁻⁴ (FIG. 1). The word calpain combines ‘cal’ and ‘ain’, which are respectively derived from calcium and cysteine proteases such as papain and legmain⁵. Calpains were previously called Ca²⁺-activated neutral proteases^{6,7}.

Although there are vast numbers of proteases and proteolytic complexes in biological systems, the calpains are some of the very few that are directly activated by Ca²⁺, a primary second messenger in signal transduction. In addition, calpains are modulator proteases that perform limited proteolysis to modulate rather than abolish the function of their substrate. As Ca²⁺ signalling and proteolysis are two widely studied biological processes, basic and clinical researchers often find themselves trying to fit calpains into their subject of interest. The identification of calpains as aggravating factors in human diseases can be attributed to such scientific curiosity. However, although the vital roles of calpains in various biological systems are clear, their mechanistic features remain poorly understood. Owing to their modulatory nature and lack of clear cleavage sequence specificity, calpains appear to have less precise activity and to be less amenable to systematic examination than

proteases such as caspases and those involved in the ubiquitin–proteasome system. Consequently, the biological functions and therapeutic potential of calpains remain relatively unexplored.

Calpain-related disorders have a substantial impact on society. Although some diseases are caused by genetic defects, many are lifestyle-related⁸ or caused by infection with a pathogenic microorganism⁹⁻¹³. These diseases are of growing concern worldwide from both human health and economic perspectives. Disorders for which calpains may serve as therapeutic targets include neurodegenerative disorders¹⁴⁻²², cardiovascular diseases²³, ischaemic disorders²⁴, arterial sclerosis^{25,26} and cancers²⁷⁻³⁰. Additional disorders include cataracts³¹, muscular dystrophies³², gastric ulcer³³, vitreoretinopathy³⁴, oesophagitis^{35,36}, pulmonary fibrosis³⁷, diabetes^{38,39}, malaria^{40,41}, trypanosomiasis⁴², schistosomiasis¹⁰, candidiasis⁴³ and periodontitis¹². In most cases of calpain-related disease, calpain activity is elevated and aggravates symptoms. For example, transient cerebral ischaemia caused by various insults results in calpain activation that leads to neuronal cell death⁴⁴.

Some calpain inhibitors have already been developed for therapeutic applications. For example, the *Aspergillus*-derived calpain inhibitor E-64d (also called loxistatin, aloxistatin, rexostatine, EST and Estate) was used in clinical trials for Duchenne muscular dystrophy (DMD)⁴⁵, and the α -ketoamide inhibitor A-705253 (also known as BSF 419961 and CAL 9961) has been tested as a treatment for Alzheimer disease (AD)⁴⁶. More recently, it was recognized that restoration or compensation of calpain activity could ameliorate diseases such as limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A)⁴⁷ and spastic

a Human

Conventional calpain subunits:

- CAPN1 or CAPN2 (also known as μ CL or mCL, respectively)
- CAPNS1 (also known as 30K)

Unconventional classical calpain subunits:

- CAPN3 (also known as p94)
- CAPN8 (also known as nCL-2)
- CAPN9 (also known as nCL-4)
- CAPN11–14

Unconventional non-classical calpain subunits:

- CAPN5 (also known as hTRA3)
- CAPN6 (also known as CANPX)
- CAPN7 (also known as PalBH)
- CAPN10
- CAPN15 (also known as SOLH)
- CAPN16 (also known as demi-calpain)

b *Schistosoma mansoni*

- Smp-157500

c *Plasmodium falciparum*

- P_f-calpain

d *Trypanosoma brucei*

- ClpGM6

- CAP5.5 (also known as TbCALP1)

e *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*

- PalB/Rim13

f *Porphyromonas gingivalis*

- Tpr

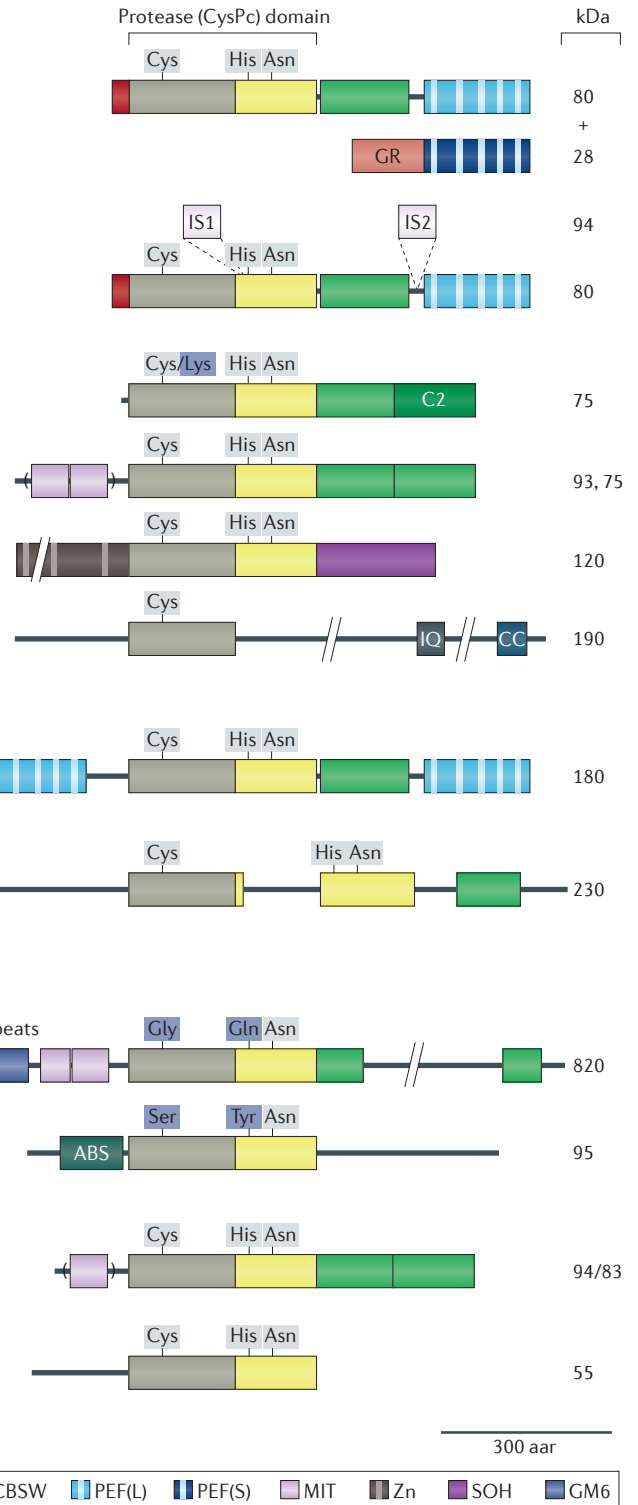


Figure 1 | Schematic structure of calpains. a | In vertebrates, calpain-1 and calpain-2 are heterodimers of a large catalytic subunit (CAPN1 and CAPN2, respectively) and a small regulatory subunit (CAPNS1). Calpain-1 and calpain-2 are called conventional calpains, with the remaining calpains known as unconventional calpains (avian calpain-11 (CAPN11–CAPNS1) may also be called a conventional calpain). Calpains are classified into two types on the basis of their structure: classical, with domain structures that are identical to those of CAPN1 and CAPN2, and non-classical. **b–f** | Among the non-human calpains shown, only Smp-157500 (the carboxyl-terminal half is known as Smp-80) of *Schistosoma mansoni* is a classical calpain.

Plasmodium falciparum and *Porphyromonas gingivalis* each have only one calpain, whereas *S. mansoni*, *Trypanosoma brucei* and *Aspergillus nidulans* have 7, 18 and 2 calpains in total, respectively. For ClpGM6 the number of repetitions of the GM6 antigen repeat unit could not be determined owing to an incomplete genomic sequence. ABS, all β -strand structure (found among several glycosyl hydrolases); CBSW, calpain-type β -sandwich domain; CysPc, cysteine protease domain, calpain-type; GR, glycine-rich domain; IQ, calmodulin-interacting domain; IS, insertion sequence; MIT, microtubule-interacting and transport domain; PC, protease core; PEF, penta-EF-hand domain; SOH, SOL-homology domain; Zn, zinc-finger motif.

CysPc motif

A protease catalytic domain of calpains. CysPc-containing proteases belong to the same clan as papain, but unlike the catalytic domain of papain the CysPc divides into two separate structures, protease core 1 (PC1) and PC2, in the absence of Ca²⁺. Amino acid sequence comparisons suggest that all of the calpain species for which 3D structures are not yet solved share similarity in their CysPc domain.

 α -Ketoamide inhibitor

A class of reversible inhibitors for cysteine, serine or threonine proteases that add an electrophile to these active site amino acid residues. Many inhibitors of this class have been developed by systematically replacing aldehyde moieties of known calpain inhibitors with α -ketoamide, and subsequently modifying other positions to improve effectiveness.

Calpainopathies

Diseases caused by a genetic defect in a calpain gene. The pathogenic mechanism can be either loss of function (for example, limb-girdle muscular dystrophy type 2A is caused by inactivating mutations in the *CAPN3* gene) or gain of function (for example, autosomal dominant neovascular inflammatory vitreoretinopathy is caused by an excessive activation of CAPN5 due to mutations).

Calpain-type β -sandwich (CBSW). A domain whose 3D structure, but not primary sequence, shows overall similarity to the C2 domain, a calcium-binding motif found in protein kinase C, synaptotagmins and other calcium-related proteins. The CBSW domain has a role in substrate recognition.

Penta-EF-hand

(PEF). Among the proteins with Ca²⁺-binding EF-hand motifs, those with five EF-hand motifs in tandem comprise the PEF family. The fifth EF region is often involved in homo- or heterodimerization. Classical calpains have a PEF domain, and hence also belong to the PEF family.

paraplegia⁴⁸. Therefore, calpain-targeting strategies now encompass two key approaches: calpain inhibition and calpain activation (either directly or by replacement).

This Review seeks to address how the wealth of discoveries gained from calpain research can be translated into strategies for combating various disorders. In this regard, we first describe the current state of calpain research and discuss the pathological roles of calpain activity. We then assess various therapeutic strategies that target calpains as defined by three major approaches: first, the inhibition of human calpains that aggravate symptoms; second, inhibition of the calpains of parasites or pathogenic microorganisms to disrupt the invasion, growth and/or egress of the organism; and, last, complementation of calpain functions by gene therapy or gene editing to correct or compensate for a defective calpain. Importantly, the challenges faced in therapeutic modulation of calpain activity are discussed.

The calpain superfamily**Human calpains**

Calpains exist in almost all eukaryotes and some bacteria, whereas calpains are present in very few fungi and no calpain gene has been found so far in the genome of any archaea^{49–52}. Various motifs or domains (>40) occur together with the CysPc motif^{51,52}. Humans express 15 calpain genes, *CAPN1* to *CAPN16* except for *CAPN4*, each of which generates one or more transcripts and constitute a superfamily of more than 50 molecular species (for example, *CAPN3* has more than 10 variants)^{4,53}. Mutations in individual calpain genes are associated with lethality or disorders known as calpainopathies, indicating the importance of calpains in mammalian life and health^{4,53} (see below and TABLE 1). In non-mammals, calpains have also been genetically shown to be involved in various biological phenomena, such as optic neuron development in fruitflies, sex determination in nematodes, alkaline environment adaptation in fungi and yeasts, and germ cell generation in plants^{2,4,49,54,55}.

Calpain-1 and calpain-2, known as the conventional calpains, are the most ubiquitous and well-studied calpain family members, and are activated *in vitro* by micromolar and millimolar concentrations of Ca²⁺, respectively². They modulate the structures and functions of their substrates by limited proteolysis^{2,50}. There is a long-standing paradox regarding the mechanisms of calpain-1 (also known as μ -calpain) and calpain-2 (also known as m -calpain) activation: given that physiological intracellular Ca²⁺ concentrations reach micromolar levels at most, calpain-1 was thought to be used most widely *in vivo*. However, reverse genetics has shown that CAPN1-deficient mice are apparently normal⁵⁶, whereas CAPN2 deficiency induces embryonic lethality^{57,58}, suggesting that calpain-2 has more important functions than calpain-1 *in vivo*. The reason for the discrepancy between the biochemistry and the biology of calpain-1 and calpain-2 remains largely elusive.

Among the unconventional calpain subunits, CAPN5, 7, 10, 13 and 15 also exist in most cells (called ubiquitous calpains for descriptive purposes), whereas CAPN3, 6, 8, 9, 11, 12, 14 and 16 are expressed predominantly in

particular tissues and organs (tissue-specific calpains)^{4,50}. The tissue-specific calpains, when defective, cause disorders specific to the tissues in which they are expressed. For example, pathogenic mutations in *CAPN3*, which is predominately expressed in skeletal muscle, result in LGMD2A³² (TABLE 1). By contrast, the ectopic expression of CAPN3 in the heart, another tissue composed of striated muscle, is lethal, highlighting the need for tightly regulating calpain expression in specific tissue and cellular environments^{47,59}. Intriguingly, despite their presence in most tissues, pathogenic alterations in *CAPN1* and *CAPN5* lead to deficiencies in specific tissues (neuronal cells and eyes, respectively)^{34,48}.

Between 1964 and 1988, calpain research focused solely on conventional calpains. The first unconventional calpain was identified in 1989 (REF. 60), followed by the discoveries of others. Since the twenty-first century, unconventional calpains have become a critical topic in the calpain field^{4,50}. An endogenous proteinaceous calpain inhibitor, calpastatin (CAST), has been found in mammals and birds, and adds another layer of complexity to the calpain system⁶¹. The inhibitory activity of CAST is specific for calpains, and it does not inhibit any other proteases⁶¹ (see below).

Structures of calpains

The conventional calpains consist of a large catalytic subunit and a small regulatory subunit (FIG. 1). The large subunit (CAPN1 and CAPN2 for calpain-1 and calpain-2, respectively) has an amino-terminal anchor helix (N region), a CysPc domain composed of protease core 1 (PC1) and PC2 domains, a calpain-type β -sandwich (CBSW; previously known as C2-domain-like (C2L)) domain, and a penta-EF-hand (PEF)⁶² domain (PEF(L)). The common small subunit CAPN5 is composed of glycine-rich (GR) and PEF(S) domains (FIG. 1) and is essential for the stability of CAPN1 and CAPN2. Genetic disruption of *Capns1* in mice inactivates both calpain-1 and calpain-2 (REFS 58,63). CAPN3, 8, 9 and 11–14 have domain structures identical to those of CAPN1 and 2, and are called classical calpain subunits, whereas the remaining non-classical calpain subunits have another motif (or motifs) in place of the PEF domain. CAST, the calpain-specific inhibitor protein, has several splicing variants, the longest of which consists of N-terminal non-inhibitory regions and four repeated calpain-inhibitory domains, which are each composed of three subdomains: A, B and C⁶¹. Subdomain B interacts with the CysPc domain, whereas subdomains A and C, which form α -helices, bind to PEF(L) and PEF(S) of the conventional calpains, respectively, and stabilize the CAST-calpain complex^{64,65}.

The 3D structure of calpain-2 was the first to be reported^{64–67}. So far, the only calpain for which the complete 3D structure has been solved is calpain-2; however, 3D modelling of other calpains has been accepted as a rational approach^{68–71}. Four domains of CAPN2 align on the same surface, which spreads over an imaginary oval plane. In the absence of Ca²⁺, PC1 and PC2 have open structures that do not form a catalytic triad^{66,67}. Activation by Ca²⁺, surprisingly, does not dramatically change the

Table 1 | Calpainopathies

Gene (alternative names)*	Expression preference	Phenotype related to gene mutation
CAPN1, <i>Capn1</i>	All cells	Spastic paraplegia ⁴⁸ , platelet dysfunction ⁵⁶ and spinocerebellar ataxia (hereditary also in dogs) ^{170,171}
<i>Capn2</i>	Most cells	Embryonic lethal ^{57,58}
<i>Capns1</i>	All cells	Embryonic lethal ^{63,263}
CAPN3, <i>Capn3</i>	Skeletal muscle	Various muscular dystrophies ^{32,161,264,265}
CAPN5, <i>Capn5</i>	Most cells	Vitreoretinopathy ^{34,165}
<i>Capn6</i>	Embryonic muscle	Hypergenesis ²⁴⁰
CAPN7	Most cells	NP
<i>Capn8</i>	Gastrointestinal tract	Gastric ulcer ³³
<i>Capn9</i>	Gastrointestinal tract	Gastric ulcer ³³
CAPN10	Most cells	Type 2 diabetes ²⁵¹
CAPN11	Testes	NP
CAPN12	Hair follicles, skin	Congenital ichthyosis ²⁶⁶
CAPN13	Most cells	NP
CAPN14	Oesophagus	Eosinophilic oesophagitis ³⁵
CAPN15 (SOLH)	Most cells	NP
CAPN16 (ADGB, C6ORF103)	Testes	NP

NP, not yet published for human or mouse gene. *CAPN and *Capn* indicate human and mouse genes, respectively.

overall calpain structure; instead, one Ca²⁺ binds to each of the PC domains, which causes PC1 and PC2 to connect, forming the ‘closed’ active structure^{64,65} (FIG. 2). Crystal structures of the active calpain-2–CAST complex show that the CAST amino acid residues that interact near the active site of calpain do so mostly through their peptide bond backbone atoms, whereas the side chains of CAST are mostly oriented outwards from the structure and do not engage in atomic interactions with calpain^{64,65}. This preference for binding to the peptide bond backbone atoms may explain the apparently low amino acid sequence selectivity for calpain substrates.

The cleavage site of a protease substrate can be described as the bond between amino acid site P1 on the N-terminal side and P1’ on the carboxy-terminal side. The residues oriented away from the cleavage site are labelled P2, P3, and so on, and P2’, P3’ and so on. The site in the binding pocket of the protease that binds with P1 is called S1, and so on. In calpain substrates, P2, P1 and the primed sites interact with CysPc, whereas most of the unprimed sites in the N-terminal to P2 are recognized by CBSW^{64,65} (FIG. 2). Together with the 3D structures of CysPc–inhibitor complexes^{72–75}, these findings indicate that the P2–S2 interaction between a conventional calpain and its substrate is prominent, similar to other clan CA proteases such as cysteine cathepsins, and that the primed sites are also important for the efficient and specific blockade of calpains by inhibitors.

A recent structural insight worth noting is that of the complex of calpain with its allosteric inhibitors. To date, an α -mercaptoacrylic acid derivative (PD150606) and an oligopeptide (LSEAL) have been proposed to exert an allosteric inhibitory effect on calpains^{76–78}. Both molecules bind to hydrophobic clefts in the calpain PEF domains in a manner similar to the CAST subdomains

A and C. However, a recent study showed that PD150606 inhibits calpains by directly interacting with the CysPc domain, and that LSEAL does not inhibit calpains *in vitro*⁷⁹. As discussed below, the mode of inhibition by PD150606 remains elusive.

The 3D structure of calpain has revealed new strategies for inhibitor design. For example, the specific inhibition of calpain by CAST is enabled by the core inhibitory sequence within subdomain B of CAST, which is positioned beyond the active site^{64,65}. This finding has led to a new concept for inhibitor design, in which molecules such as macrocyclic peptides are of interest. In addition, although the available structural data are currently limited, examining differences among the CysPc structures from different calpains is possible: for example, the domain rotations of PC1 and PC2 relative to each other^{72,80,81} (FIG. 2). Such information can direct the design of specific inhibitors and/or substrates for each calpain species (BOX 1).

Substrate specificities of calpains

The identification of calpain substrates has revealed several signal transduction-related molecules for which proteolysis by calpain results in functional alterations. One interesting substrate is p35, which can be converted by calpain to p25, an activator of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) that may be involved in memory formation⁸². Another interesting substrate is interleukin-1 α (IL-1 α)⁸³, an inflammation-related cytokine in humans. IL-1 β is secreted after its cleavage by caspase 1, whereas IL-1 α is cleaved by calpain⁸⁴ and then transported out of the cytoplasm by an as yet unknown mechanism. In addition, cleavage of the MYC oncoprotein by calpain is a critical step in transforming the functions and localization of this key molecule in cancer cell survival^{85–87}.

CAPNS1

(Calpain small subunit 1). A PEF family member. A paralogue called CAPNS2 has an unknown function. *In vivo*, CAPNS1 is an essential component of the two conventional calpains, calpain-1 and calpain-2. However, *in vitro*, the cysteine protease domains isolated from CAPN1 and CAPN2 (mini-calpains) are functional as active proteases.

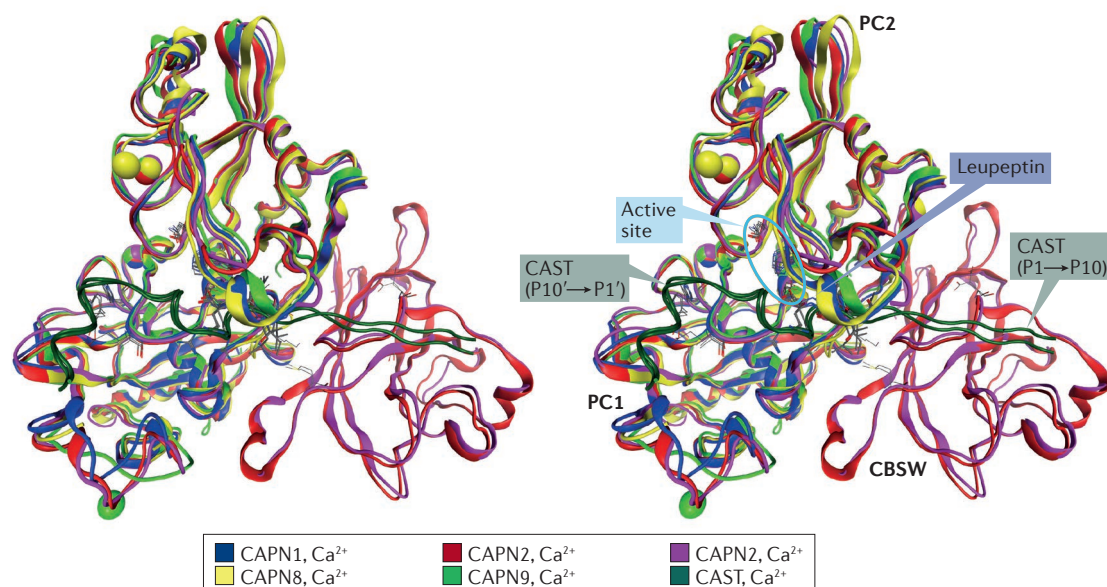


Figure 2 | Cross-eye stereo view of CAPN1, 2, 8 and 9. The cysteine protease (CysPc) domain of CAPN1, the large catalytic subunit of calpain-1 (RCSB Protein Data Bank (PDB) ID: 1TL9), CAPN8 (PDB ID: 2NQA) and CAPN9 (PDB ID: 2P0R) are shown in complex with leupeptin (shown by stick models) and Ca²⁺ (shown by balls). The CysPc and calpain-type β -sandwich (CBSW) domains of CAPN2 (PDB ID: 3BOW (red) and 3DF0 (purple)) in a complex with calpastatin (CAST; indicated by dark green tubes; right to left corresponds to amino terminus to carboxyl terminus) and Ca²⁺ were superimposed at the protease core 1 (PC1) and PC2 regions. The amino acid alignment (data not shown) according to these superimpositions indicates that the amino acid residues proximal to CAST are well conserved among CAPN1, 2, 3, 8 and 9, except that several amino acid residues in CBSW (corresponding to S3–S10) are divergent in CAPN3. Structures generated by MOE Ver.2015.10 (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada).

The calpain-mediated cleavage of dysferlin, a gene product responsible for LGMD2B, also exemplifies the transformative nature of calpain. The C-terminal C2 domains of dysferlin are released by calpain in response to membrane injury, and these domains function as effectors in a membrane repair cascade^{88,89}. Finally, one of the best-known calpain substrates is spectrin, an important membrane cytoskeletal maintenance protein (spectrin- α chain non-erythrocytic 1 is also known as α -fodrin). The calpain-dependent proteolysis of spectrin is closely associated with neuronal cell death⁹⁰. Spectrin is proteolysed at a specific site by calpain-1 and calpain-2 (REFS 91,92), as well as by other calpains⁹³.

Elucidating substrate specificity at the molecular level has been a challenge in calpain research, although it is emerging as an attractive subject for bioinformatics studies. Initial studies at the protein and amino acid sequence levels revealed the limited nature of the proteolytic activity of conventional calpains⁹⁴. A few years later, a position-specific scoring matrix analysis revealed the amino acid residue preference at each position around the cleavage site, which provided the first theoretical information regarding the substrate specificities of calpains⁹⁵. Further studies were carried out using peptide libraries^{74,96–98} and/or machine learning^{98–102}, which yielded calpain cleavage site predictors that were sufficiently accurate for practical use^{98–102}. A comprehensive kinetics analysis of peptide-array substrates showed that in addition to P2, the P3' and P4' sites are important for the cleavage efficiency of calpains⁹⁸. These features may provide directions for peptide-based inhibitor design.

Human disorders involving calpains

Calpain-associated diseases can be categorized into three types according to the way calpain is involved in their pathogenesis: those caused or exacerbated by human calpain activities (type 1; for example, neurodegenerative and cardiovascular disorders, ischaemia, cancers and cataracts); those caused by parasites or pathogenic microorganisms that use the host's and/or their own calpains for infection and survival (type 2; for example, malaria, trypanosomiasis, schistosomiasis, candidiasis and periodontitis); and calpainopathies caused by deficiencies in calpain genes (type 3; for example, muscular dystrophies, vitreoretinopathy, gastric ulcer and oesophagitis) (TABLES 1,2). Representative examples are described below.

Many studies of calpain-related disorders have used transgenic mice. For example, mice deficient in calpain-1 and/or calpain-2 and mutant mice that lack or overexpress CAST (*Cast*^{-/-} and transgenic CAST mice, respectively)^{23,59,103–105}. Together with antibodies that recognize activated CAPN1 (REF. 106) or calpain-cleaved spectrin¹⁰⁷, these mouse models have been valuable tools for revealing clear cause-and-effect relationships in neurodegenerative and other disorders. However, there is growing awareness that transgenic mice are an idealized and simplified experimental system and that the results obtained using these systems must be carefully interpreted.

Neurodegenerative disorders

Several reports have indicated that calpain may have a major aggravating role in the pathogenesis of AD^{20,108–110}. For example, calpain-1 is hyperactivated in the AD brain¹⁰⁸,

Box 1 | Improving the specificity of human calpain inhibitors

Most calpain inhibitors (Supplementary information S1,S2 (figure, table)) are not specific and block other proteases such as cysteine cathepsins. Calpastatin (CAST) is the only absolutely specific inhibitor for classical calpains: calpain-1 (CAPN1–CAPNS1) and calpain-2 (CAPN2–CAPNS1), calpain-8 (CAPN8_n), calpain-9 (CAPN9–CAPNS1), and calpain-8/9 (CAPN8–CAPN9; also known as G-calpain)^{2,33,61,253}; however, it does not inhibit calpain-3 (CAPN3)^{68,254}. The mini-calpain mutants cysteine protease (CysPc)-only CAPN1 and CAPN2 are also not effectively inhibited by CAST^{255,256}. The calpain amino acid residues proximal to the bound CAST are well conserved among CAPN1, 2, 3, 8 and 9, except that several amino acid residues of the calpain-type β -sandwich (CBSW) domain that contact CAST at the P3–P10 sites are divergent in CAPN3. The alignment of the CBSW domain relative to the CysPc domain may also be different between CAPN3 and other calpain subunits. Thus, the CAST–CBSW interaction appears to be key for CAST specificity.

The existence of CAST indicates that there is a solution to developing absolutely specific calpain inhibitors. A relatively long peptide bridging CysPc and CBSW may be required. Once an inhibitor is discovered, issues such as its stability and bioavailability *in vivo*, membrane penetrability and production cost need to be examined. With regard to these issues, secondary-structure-fixed inhibitors (CAST peptidomimetics and macrocyclic peptides) discussed in the main text^{188,190,192} and calpain-derived inhibitory peptide¹⁹³ appear to be promising. Currently, although the specificity of these peptide inhibitors is satisfactory, their stability *in vivo*, bioavailability, cost to synthesize and/or cell penetrability need to be improved for their application as therapeutic agents. Among these inhibitors, β -strand-fixed macrocyclic inhibitors can be relatively easily applied for proteases other than calpains (such as cathepsins L and S, and proteasomes) by substituting amino acid residues¹⁹¹. This approach may be applied for isoform-specific calpain inhibitors (see below).

Almost all calpain inhibitors are active site-directed, which is one of the reasons for their poor specificity for calpains. Because protease core 1 (PC1) and PC2 need to connect to be active, inhibiting this connection, for example, by an intercalation between PC1 and PC2, may result in supremely specific inhibitors for calpains. Similarly, other allosteric inhibitors discussed in the main text are also worth pursuing^{79,195,196}. Alternatively, when the involvement of cysteine proteases other than calpains cannot be ruled out owing to a lack of inhibitor specificity, inhibitors specific for cysteine cathepsins can be tested for their ability to suppress disorders that are ameliorated by nonspecific calpain inhibitors. Specific inhibitors for cathepsins B, K, S and L are available (CA-074, odanacatib, CLIK-060 and CLIK-148, respectively)^{247,248}. Comparing the effects of these cathepsin inhibitors with those of calpain inhibitors such as ALLNal and MDL28170 may help to identify the responsible protease (or proteases) for various phenomena. Specifically targeting inhibitors by conjugating them with molecules with an affinity for particular sites or tissues — for example, carnitine (muscle)¹²⁷, taurine (neuron)²¹⁴ or pregabalin (brain)²¹⁵ — is another promising method.

At the molecular level, some differences in the substrate specificities of calpain-1 and calpain-2 have been recently revealed⁹⁸, and distinct biological functions of these calpains have also been reported^{150,257–260}. Thus, differential inhibitions of calpain-1 and calpain-2 may improve the efficacy of some calpain-targeted drugs. One of the peptidyl α -ketoamide derivatives shows more than 100-fold selectivity for calpain-2 over calpain-1 (mCalp-I; Supplementary information S2 (table))^{261,262}. Although a calpain-1-specific inhibitor has not yet been found (PD151746 shows only modest selectivity for calpain-1 over calpain-2, of approximately 20-fold; see Supplementary information S2 (table)), the existence of mCalp-I indicates that such inhibitors are worth seeking.

and calpain inhibitors can improve memory and synaptic function in mice overexpressing the amyloid precursor protein (APP), a model of AD¹⁰⁹. This view was supported by findings that CAST deficiency induces the hyperphosphorylation of tau, somatodendritic atrophy, early lethality, augmented amyloid- β (A β) amyloidosis and elevated neuroinflammation in APP-overexpressing mice¹⁰⁹. However, most of these phenotypes could not be reproduced using a second-generation mouse model of AD, which accumulates A β ₄₂ without overexpressing APP; thus, the role for calpain in AD pathogenesis was challenged^{20,110}. A recent study has shown that overexpression of APP and presenilin in mice causes calpain activation, indicating that preclinical studies should not unduly rely on overexpression paradigms¹¹¹. Nevertheless, CAST deficiency accelerates A β amyloidosis and neuroinflammation in the second-generation mouse model, indicating that the calpain–CAST system may regulate the fundamental pathological processes of AD^{20,110}.

Calpain activity also appears to be an important player in other neurodegenerative diseases. For example, CAST overexpression reduces protein aggregation and synaptic impairment in mouse models of Parkinson disease (PD)¹⁹. In addition, the calpain-dependent cleavage

of TDP43, a 43 kDa heterogeneous nuclear ribonucleoprotein that binds to the TAR DNA sequence and regulates transcription and RNA splicing, is an essential contributor to amyotrophic lateral sclerosis (ALS) aetiology¹⁵. Furthermore, CAST deficiency aggravates the pathology and symptoms of animal models of spinocerebellar ataxia type 3 (REF. 16).

Calpain inhibition may also be therapeutically beneficial in lissencephaly, a developmental brain disorder caused by defective neuronal migration¹⁴. Turnover of one of the responsible gene products, LIS1, is regulated by calpain proteolysis, and a heterozygous loss of LIS1 results in insufficient amounts of LIS1 protein, causing defective intracellular microtubule network (homozygous loss results in lethality)¹⁴. Administration of calpain inhibitors to *Lis1*^{+/-} mice (a model of lissencephaly) after disease onset significantly rescued defects in brain functions related to motor behaviour and glucose metabolism^{14,17}. Calpain inhibitors tested in *Lis1*^{+/-} mice include small interfering RNA (siRNA) targeted against *Capns1*, ALLNal (also known as calpain inhibitor I; an inhibitor of calpain-1 and calpain-2 and cysteine cathepsins) and SNJ1945 (a cell-permeable second-generation inhibitor of calpain-1 and calpain-2)^{14,17}.

Table 2 | Diseases involving calpains and their therapeutic strategies

Disease	Related calpain protein or gene (source)	Effect of activity	Calpain-related therapeutic candidates	Refs
Disease with a primary cause other than calpains				
Atherosclerosis	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	25
Brain ischaemia	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	24,44
Cardiovascular disorders	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	23,39,114,116,117,119
Cataracts	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	92,134,136–139
Neurodegenerative disorders (e.g. Parkinson disease, amyotrophic lateral sclerosis, spinocerebellar ataxia type 3 and lissencephaly)	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	14–17,19
Retinitis pigmentosa	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	141,142
Cancers	Calpain-1, -2, CAPN3 and CAPN9 (human, mouse)	Preventive, aggravating or causative	Calpain inhibitors and/or gene therapy	29,85,86,145,147–159
Alzheimer disease	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	May be aggravating or causative	Potentially calpain inhibitors	20,110
Muscular dystrophies	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	May be aggravating or causative	Potentially calpain inhibitors	130
Disease model				
Cardiac scar	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	Preventive	Potentially gene therapy	120
Dilated cardiomyopathy	Calpain-1 and -2 (human, mouse)	Preventive	Potentially gene therapy	121
Infectious disease				
Fungal infection (opportunistic infection)	PalB/Rim13 (fungus)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	181,182
Malaria	Calpain-1 and -2, Pf-calpain (human*, mouse*, parasite)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	41,178
Periodontitis	Tpr (bacteria)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	12
Trypanosomiasis and leishmaniasis (e.g. African sleeping sickness)	Calpain-1 and -2, ClpGM6 (human*, mouse*, parasite)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	180
Schistosomiasis	Smp-157500 (parasite)	Aggravating or causative	Vaccine (rSm-p80)	10,225
Calpainopathies				
Autosomal dominant neovascular inflammatory vitreoretinopathy	CAPN5 (human, mouse)	Aggravating or causative	Calpain inhibitors	34,167
Eosinophilic oesophagitis	CAPN14 (human, mouse)	Preventive	Potentially gene therapy	35,36
Gastric ulcer	CAPN8, CAPN9 (human, mouse)	Preventive	Potentially gene therapy	33
Limb-girdle muscular dystrophy type 2A	CAPN3 (human, mouse)	Preventive	Potentially gene therapy	32
Spastic paraplegia 76	CAPN1 (human, mouse)	Preventive	Potentially gene therapy	48
Type 2 diabetes	CAPN10 (human, mouse)	Not definable	Unclear	251,252

Pf, *Plasmodium falciparum*; rSm-p80, recombinant Smp-157500 (carboxy-terminal 80 kDa fragment). *Calpains in host cells — that is, human or mouse — are used by the parasite.

Brain ischaemia

Brain ischaemia is caused by various insults, including cerebral infarction, haemorrhage, vasospasm and, sometimes, cardiac infarction. Brain ischaemia results in neuronal glucose starvation, ATP depletion and a rise in Ca^{2+} levels⁴⁴. Transient cerebral ischaemia in gerbils is accompanied by calpain activation, which occurs in two phases: an immediate activation of calpain in hippocampal CA3 neurons followed by substantial calpain activation in CA1 neurons approximately 7 days later¹¹². This process results in an overall delay in cell death of

CA1 neurons, which can be blocked by administering the experimental calpain inhibitor ALLNa²⁴.

However, calpain is not easy to activate under physiological conditions. For example, almost lethal doses of kainic acid are required to achieve the forced activation of brain calpain, even in *Cast^{-/-}* mice¹⁰⁵. The observation that calpain is not widely activated in the brain supports the idea that if spatiotemporally restricted in the brain for a short period, a calpain-specific inhibitor would generate only minor side effects on physiological processes, at least in the experimental context.

Cardiovascular disorders

One of the pathological mechanisms underlying many acute cardiovascular disorders^{8,113}, including ischaemia–reperfusion and pressure-overload models, is thought to involve the calpain-mediated proteolysis of myocardial proteins^{114,115}. Accordingly, calpain inhibitors are able to ameliorate symptoms of these disorders in animal models (TABLE 3). A protective effect of ALLNal, but not of a broad caspase inhibitor, on the myocardial injury and mitochondrial dysfunction caused by ischaemia–reperfusion revealed that calpain activation can result in cell death independent of caspases¹¹⁶. More specifically, mitochondrial calpain-1 was suggested to be involved in cardiac injury¹¹⁷; this injury could be prevented by the calpain inhibitor MDL28170, a cell-penetrating dipeptidyl aldehyde inhibitor that also acts on cysteine cathepsins¹¹⁸. MDL28170 is also called calpain inhibitor III (see [Supplementary information S1,S2](#) (figure, table)).

Another calpain inhibitor, A-705253, a benzoylalanine-derived α -ketoamide inhibitor with improved water solubility, metabolic stability and cell permeability, exhibited protective effects on heart functions and global haemodynamics in a porcine myocardial ischaemia–reperfusion model¹¹⁹. Results from mice in which calpain activity was genetically inhibited by transgenic CAST expression or *Capns1* disruption also suggested that calpain is an aggravating factor in the chronic cardiac complications associated with type 1 diabetes or angiotensin II infusion^{23,39}. Furthermore, the calpain inhibitors ALLMal, calpeptin and BDA-410 suppress atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-}, *ApoE*^{-/-} and angiotensin II-treated *Ldlr*^{-/-} mice by blocking the proteolysis of vascular endothelial cadherin and/or spectrin^{25,26} (TABLE 3).

Although calpain inhibition appears to be a promising approach for the treatment of several cardiovascular disorders, some adverse effects of calpain inhibition have been reported. For example, dilated cardiomyopathy and impaired scar healing are observed in transgenic CAST mice, in which endogenous calpain activity is reduced^{59,120}. In addition, cardiac-specific *Capns1*^{-/-} mice, although healthy under normal conditions, show cardiac dysfunction under pressure overload¹²¹. These studies suggest that calpain activation is required under some pathological conditions to overcome cardiotoxicity.

One possible mechanism by which calpain protects heart function is related to its role in membrane repair^{89,122}. Meanwhile, studies using human blood cells and mouse models have indicated that calpain has opposing effects on inflammation and immune processes depending on the context, such as its localization¹²³. In addition, an upregulation of CAPN2 was associated with the effect of a potential cardioprotective reagent, which is being considered for use in combination chemotherapeutic drug therapy¹²⁴. Further clarification of the precise targets and timing of calpain activity will help us to evaluate the balance between the possible benefits and limitations of calpain inhibition.

Myopathies

In DMD, the activities of conventional calpains are upregulated due to a loss of Ca²⁺ homeostasis^{2,113}. Several muscle proteins are substrates of calpains; thus, increased

calpain activity is thought to exacerbate symptoms. In fact, studies using the dystrophin-deficient DMD mouse model, *mdx* mice, demonstrated that the increased calpain activation in necrotic muscle fibres was corrected in CAST overexpression in *mdx* mice, accompanied by the amelioration of the dystrophic phenotype^{103,125}. Thus, proposed pharmacological approaches for ameliorating DMD have long included calpain inhibition. For example, the ability of inhibitors such as E-64d and leupeptin to delay muscle degeneration has been extensively studied^{45,126} (see below). Promising results in model animals have led to further studies seeking to improve the bioavailability of these inhibitors in skeletal muscle tissues¹²⁷.

More recent studies using *mdx* mice¹²⁸ and a golden retriever DMD model¹²⁹, however, did not support the long-standing view that the pharmacological inhibition of calpains ameliorates DMD pathology. These studies showed that a decrease in calpain activity does not necessarily improve muscle functions, and also warned that chronic calpain inhibition by either inhibitor administration or CAST overexpression induces a compensatory upregulation of calpains. Thus, the outcomes of such treatments or conditions need to be carefully and consistently analysed¹³⁰.

Meanwhile, α -klotho, defects in which causes senescence, is specifically suppressed in the muscles of *mdx* mice after the clinical onset of muscular dystrophy, and transgenic α -klotho expression rescues the muscle atrophy phenotype in these mice¹³¹. The α -klotho protein modulates Ca²⁺ homeostasis, and *Kl*^{-/-} mice exhibit overactivated calpain-1 and phenotypes reminiscent of ageing-related disorders. Such phenotypes include infertility, body weight loss, multiple organ atrophies, ectopic calcification and bone mineral density reduction¹³². These symptoms are ameliorated by the administration of the calpain inhibitor BDA-410 (REF. 133), implicating a role for α -klotho in regulating calpain activity (TABLE 3). Downregulation of α -klotho is also found in muscle biopsies from patients with DMD¹³¹, suggesting that calpain inhibition might be more therapeutically effective if combined with another treatment that compensates for a deficiency in α -klotho function.

Ophthalmic diseases

Cataracts, a prominent age-related disease, result from the aggregation of crystallines, which is caused by oxidative damage and/or by over-proteolysis by calpains and other proteases³¹. Calpain-2 has a major role in human cataractogenesis by proteolysing the major lens proteins α - and β -crystallins¹³⁴, whereas variants of CAPN3, such as Lp82, and CAPN10 are also involved, especially in rodent models¹³⁵. In transgenic mice expressing K6W mutant ubiquitin in the lens, the altered ubiquitin–proteasome system causes calpain hyperactivation, resulting in disease progression¹³⁶. Thus, the development and application of calpain inhibitors for the treatment of cataracts has been an active topic in calpain research. *In vitro*, a preventive effect of calpain inhibitors against cataractogenesis in cultured rat lenses was first demonstrated for E-64 (REF. 137), and later for SJA6017

Table 3 | Selected *in vitro* and *in vivo* studies (since 2010) of calpain inhibition in disease

Inhibitor or vaccine	Disease/phenomenon	Model	Target*	Effects	Refs
ALLNal	Coxsackievirus B3 infection and replication	H9c2 cells	Calpains	• ↓ Virus titre • ↓ Autophagy	11
	Uterine implantation	Mice	Calpains (CAPN2)	• ↓ Implantation	246
	Lissencephaly	Lis1 ^{+/-} mice	Calpains	• No change in LIS1 cleavage • ↓ Spectrin- α cleavage • ↓ Hyperexcitability (spontaneous and miniature excitatory postsynaptic current)	267
ALLNal, PD150606	Retinitis pigmentosa	Royal College of Surgeon's rats	Calpains	• ↓ Retinal cell apoptosis	268
ALLNal, calpeptin	Oestrogen-mediated cancer metastasis	Oestrogen and pure anti-oestrogen fulvestrant (ICI 182 780)-treated MCF-7 cells	CAPN1	• ↓ Cell–Matrigel adhesion	269
Calpeptin	Parkinson disease	MPTP-induced acute Parkinsonian mice	Calpains	• ↓ Glial activation • ↓ T cell infiltration • ↓ Neuronal death • ↓ Gait deficit	270
	Multiple sclerosis	EAE in Lewis rats	Calpains	• ↓ Gliosis • ↓ Loss of myelin • ↓ Axonal damage • ↓ Inflammation and microgliosis in optic nerve	271, 272
	Idiopathic inflammatory myopathies	IFN γ - or TNF-treated rat L6 myoblasts	Calpains	• ↓ MHC class I- and inflammation-related transcription factors • ↓ Apoptosis	273
	Idiopathic pulmonary fibrosis	Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice	Calpains	• ↓ Lung fibrosis • ↓ Bleomycin-induced transcriptional upregulation of CAPN1, CAPN2, IL-6, TGF β 1, angiotensin 1 and collagen type I α 1	274
MDL28170, calpeptin	Melanoma cell survival	Cisplatin-treated Me21 melanoma cells	Calpains	• ↓ Activation of caspases 3 and 7 • ↓ Cisplatin-induced apoptosis • ↑ Autophagy	160
MDL28170	Cardiac ischaemia–reperfusion	Mice	CAPN1	• ↓ Spectrin or junctophilin 2 cleavage • ↓ Damage on mitochondrial function	117, 275
	Chronic heart failure	Cardiomyocytes of dogs of chronic heart failure	Calpains	• ↓ Augmentation and altered kinetics of late Na ⁺ current	276
	Leishmaniasis	<i>In vitro</i> growth of promastigotes of <i>L. amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i> calpain [†]	• ↑ Apoptosis (cell cycle arrest and DNA fragmentation)	173
	Chagas disease	<i>T. cruzi</i> epimastigotes infection <i>in vitro</i>	<i>T. cruzi</i> calpain [†]	• ↓ Attachment to insect midgut • ↓ Differentiation • ↓ Viability	277
	Pre-eclampsia	BeWo cells	Calpains	• ↓ Apoptosis-inducing factor cleavage	278
	Spinal cord injury	Rats with spinal cord transection	Calpains	• ↓ Cleavage of α -subunit of voltage-gated Na ⁺ 1.6 channel • ↓ Persistent inward Na ⁺ current • ↓ Spasms	249
MDL28170, mCalp-I	LTP	Rats	CAPN1 and CAPN2	• ↓ LTP • ↓ SCOP degradation (MDL28170, but not mCalp-I) • ↓ PTEN degradation (mCalp-I)	261
AK295, calpastatin peptide (CAST)	Retinitis pigmentosa	C3H <i>rd1/rd1</i> mice	Calpains	• ↓ Photoreceptor cell death (AK295, short term; CAST, short and long term) • ↑ Photoreceptor cell death (AK295, long term)	279

Table 3 (cont.) | Selected *in vitro* and *in vivo* studies (since 2010) of calpain inhibition in disease

Inhibitor or vaccine	Disease/phenomenon	Model	Target*	Effect	Refs
SNJ1945	Multiple sclerosis	EAE in mice	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Paralysis, • ↓ T_H1 and T_H17 cell inflammatory responses • ↓ Induction of calpain 	22
	Retinal ischaemia	Rats	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Electrophysiological function of inner retinal layers • ↓ Loss of cone-ON bipolar and amacrine cells 	280
	Lissencephaly	Lis1 ^{+/-} mice	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ LIS1 cleavage • ↑ Corticogenesis, • ↑ Behavioural performance • ↑ Brain metabolism 	17
	Cardiac ischaemia–reperfusion	Rats	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Spectrin-α and SERCA2A cleavage • ↑ Left ventricular function 	281
	Cortical impact traumatic brain injury	Mice	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Spectrin-α cleavage 	282
BDA-410	Machado–Joseph disease	Lentiviral expression of 72xGln-ataxin 3 in mice	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Ataxin 3 cleavage • ↓ Cerebellar degeneration • ↓ Motor behavioural deficits 	283
	Ageing-related syndromes	Kl ^{-/-} mice	CAPN1	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Reproductive ability • ↑ Body weight • ↓ Organ atrophy • ↓ Ectopic calcifications • ↓ Bone mineral density reduction • ↓ Pulmonary emphysema • ↓ Senile atrophy of skin 	133
	Sickle cell disease	Hbb ^{single/single} SAD1 mice	CAPN1	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ RBC morphology • ↓ RBC density • ↓ Hypoxia-induced RBC dehydration 	220
	Abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis	Hypercholesterolaemic Ldl ^{-/-} mice	CAPN1	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Spectrin-α cleavage • ↓ Abdominal aortic width • ↓ Atherosclerotic lesions 	26
CYLA	Retinal ischaemia	Rats	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Electrophysiological function of retina 	218
A-705253 (BSF 419961)	Alzheimer disease	NMDAR-mediated neurodegeneration and Aβ-induced synaptic deficits in mice	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Neuronal cell death • ↓ Caspase 3 activation • ↓ Deficits in synaptic transmission 	284
	Alzheimer disease	Mice harbouring APP:K670M or APP:M671L, presenilin 1:M146V and tau:P301L mutations	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Tau hyperphosphorylation • ↓ Proteolytic cleavage of CDK5 subunit p35 to p25 	46
	Alcoholism	Cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behaviour in post-dependent Wistar rats	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behaviour • ↓ Alcohol (but not saccharine)-deprivation effects • No significant induction of NMDAR-mediated side effects (psychostimulant, cognition-impairing psychotomimetic effects) 	285
Macrocyclic aldehyde (CAT811)	Cataracts	Lambs with inherited cortical cataracts	Calpains	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Lens cytoskeletal protein cleavage • ↓ Cataract development 	139
NH ₂ -GRKKRRQRRR-PPQPDALKSRTLR-COOH (Tat-μCL), PD150606	Retinitis pigmentosa	Rats expressing rhodopsin:S334ter	CAPN1	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Retinal apoptosis 	286
Dipeptidyl α,β-unsaturated ester	Malaria	<i>P. falciparum</i> parasitaemia in human erythrocytes or HeLa cells	Possibly Pf-calpain	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Parasite survival 	287

Table 3 (cont.) | Selected *in vitro* and *in vivo* studies (since 2010) of calpain inhibition in disease

Inhibitor or vaccine	Disease/phenomenon	Model	Target*	Effect	Refs
Hypervalent organotellurium compound (RF19)	Malaria	<i>P. falciparum</i> parasitaemia in human erythrocytes	Possibly Pf-calpain	• ↓ Parasite survival	219
rSm-p80 (recombinant protein)	Schistosomiasis	Baboon or hamster	Smp-157500 (<i>S. mansoni</i> calpain)	• ↓ Adult worms and eggs in tissues (hamster) • ↓ Egg excretion in faeces and urine (baboon) • ↑ Protective immune response	10, 225

A β , amyloid- β ; APP, amyloid precursor protein; CDK5, cyclin-dependent kinase 5; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; IFN, interferon; IL, interleukin; *L. amazonensis*, *Leishmania amazonensis*; LTP, long-term potentiation; MHC, major histocompatibility complex; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; *P. falciparum*, *Plasmodium falciparum*; PTEN, phosphatase and tensin homologue; RBC, red blood cell; *S. mansoni*, *Schistosoma mansoni*; SCOP, suprachiasmatic nucleus circadian oscillatory protein; SERCA2A, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase; *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi*; TGF, transforming growth factor; T_H, T helper; TNF, tumour necrosis factor. *No specific calpain was targeted in the study unless specified. †Involvement of other cysteine peptidases has not been excluded.

(REF. 92), a more potent calpain inhibitor with good cell penetrability. Recently, a more specific macrocyclic inhibitor, CAT811 (ointment form), was tested on a sheep model of heritable cataract development; the inhibitor successfully slowed the development of the disease^{138,139} (BOX 1; TABLE 3; [Supplementary information S1](#) (figure)).

Calpain is also a therapeutic target for retinitis pigmentosa, which is caused by defects primarily in rhodopsins but also in various other genes, including those encoding carbonic anhydrase, pre-mRNA processing factors and phosphodiesterases¹⁴⁰ (TABLE 3). Retinitis pigmentosa is characterized by photoreceptor cell death, which results from calpain-mediated apoptosis induction¹⁴¹, increased lysosomal membrane permeability¹⁴² and/or downregulated heat shock protein 70 (HSP70)¹⁴³. Thus, combining calpain inhibitors with inhibitors of cathepsin and caspase, as well as HSP70 inducers, could be an effective strategy for relieving the symptoms of retinitis pigmentosa.

Cancer

The calpain–CAST system has demonstrated opposing roles in cancer³⁰. In many cases, the upregulation of CAPN1, CAPN2 and/or CAPNS1 is observed, whereas CAST is increased in others^{27,144–146}. Activation of calpain-1 and calpain-2, and the proteolytic products of their substrates, have critical roles in cancer cell survival. For example, MYC-nick, a calpain-mediated cleavage product of the MYC proto-oncoprotein, promotes cytoskeletal remodelling, is upregulated in cancer cells and facilitates cell growth under hypoxia and nutrient deprivation, leading to malignancy^{85,86}. Calpain–CAST is also involved in pathological angiogenesis, which is often observed in tumours. This angiogenesis is promoted by a loss of CAST, which amplifies the activity of calpain-2 (REF. 147). In addition, an accelerated calpain-mediated cleavage of receptors, such as the androgen receptor¹⁴⁸ and human epidermal growth factor receptor HER2 (also known as ERBB2)¹⁴⁹, contributes to cellular resistance to anticancer therapies. Calpain-1 and calpain-2 also regulate cellular machineries for drug efflux and hence reduce the efficacy of antitumour therapeutics such as tanespimycin, an HSP90 inhibitor derived from the antibiotic geldanamycin²⁹.

Recently, calpain-1 activity was shown to be important in the treatment for myelodysplastic syndrome (MDS)¹⁵⁰. MDS is a haematopoietic stem cell disorder characterized

by ineffective haematopoiesis and a tendency for acute myeloid leukaemia progression. Lenalidomide, a synthetic glutamic-acid-derived immunomodulatory drug, is used to treat MDS as well as multiple myeloma¹⁵¹. The sensitivity of myeloid cells to lenalidomide is dependent on calpain-1 but not calpain-2 activity, and suppression of CAST increases the susceptibility of MDS to lenalidomide¹⁵⁰. These results indicate that in the treatment of MDS and possibly multiple myeloma, sufficient calpain-1 activity in the target myeloid cells is required for malignant cells to respond to treatment.

Unexpectedly, the unconventional CAPN3 (also known as p94) and CAPN9 (also known as nCL-4) have also been pathologically implicated in cancers. For example, CAPN3 is highly expressed in melanoma cell lines¹⁵² and is downregulated in response to interferon- γ treatment¹⁵³. CAPN3 is also found in bovine bladders with urothelial tumours¹⁵⁴. Conversely, the CAPN3 isoforms hMp84 and hMp78 are upregulated in human melanoma cell lines treated with cisplatin to induce apoptosis, and downregulated in biopsies from human malignant melanocytic lesions¹⁴⁴. Consistent with these observations, overexpressing hMp84, but not inactive hMp84:C42S, in melanoma results in cell death¹⁵⁵.

CAPN8 (also known as nCL-2) and CAPN9 are predominantly expressed in the gastrointestinal tract, and CAPN9 but not CAPN8 is suggested to be involved in the suppression of tumorigenesis^{156–158}. Recently, downregulation of human CAPN9, but not CAPN8, was shown to correlate with unfavourable prognosis in patients with gastric cancer¹⁵⁹. An expression study using stable human gastric cancer cell lines (MGC80-3 and MKN-45) showed that CAPN9 but not CAPN8 induced G1 cell cycle arrest and caspase-mediated apoptosis¹⁵⁹.

Other studies have suggested that calpain is required for apoptosis induced by the anticancer drug cisplatin in various cancer cell models^{144,160}, and that calpain inhibition is both beneficial and detrimental depending on the stage of tumour progression¹⁴⁵. Thus, further studies are required to clarify whether calpains can both promote and suppress tumour growth and metastasis in different settings. More systematic studies examining, for example, whether the involvement of calpains depends on the cell type and/or calpain species, should clarify whether calpain-targeted strategies would be beneficial in cancer therapies.

Macrocyclic inhibitor

Macrocyclic structures introduced into linear peptides or compounds often improve potency by providing well-defined conformations, such as α -helices and β -strands in the case of peptides, thereby facilitating interactions with their targets, which include proteases. This strategy has been used to develop improved calpain inhibitors.

Calpainopathies

LGMD2A, the first calpainopathy. An important function of calpains was confirmed when CAPN3 was identified as the responsible agent for LGMD2A^{32,93,161}. Prompted by this groundbreaking discovery, the term calpainopathy was explicitly defined as a disease condition that results from mutations in calpain genes. CAPN3 is predominantly expressed in skeletal muscle and was the first non-ubiquitous member of the calpain superfamily to be reported⁶⁰. LGMDs are characterized by their selective effect on the proximal muscles of limb girdles¹⁶² (see also the [Calpain 3](#) page of the Leiden Muscular Dystrophy website; see Further information). Worldwide, LGMD2A, an autosomal recessive LGMD, is the most frequent form of LGMD, and the rate of LGMD2A occurrence in some regions is much higher than average¹⁶².

In LGMD2A, CAPN3 is devoid of protease function⁹³. This finding is in stark contrast to the general concept that the pathology of muscular dystrophies is aggravated by a secondary overactivation of conventional calpains¹³⁰. Moreover, studies using various mouse models of LGMD2A have revealed that CAPN3 also has a role as a regulatory component for Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum in muscle cells in a manner independent of its protease activity^{163,164}. Therefore, inhibiting CAPN3 would not be effective for LGMD2A and in fact could be detrimental (for an exception, see below).

Accordingly, the objectives of CAPN3-targeted therapy for LGMD2A are to restore or compensate for the loss of CAPN3 function⁵³. To achieve these goals, essential questions that remain to be answered include how CAPN3 functions both as a protease and as a non-proteolytic modulator in muscle cells, what the *in vivo* targets of CAPN3 activity are, and in which biological pathways CAPN3 plays a part.

Other calpainopathies. CAPN5 is responsible for autosomal dominant neovascular inflammatory vitreoretinopathy (ADNIV)^{34,71}. CAPN5 is expressed in most tissues, especially in the central nervous system^{165,166}. So far, R243L, L244P and K250N have been identified as ADNIV-causative CAPN5 mutations. Among these, R243L appears to be hyperactive, and transgenic mice overexpressing CAPN5:R243L show an ADNIV-like phenotype¹⁶⁷, whereas *Capn5*^{-/-} mice exhibit no apparent phenotype¹⁶⁵. Therefore, inhibiting CAPN5 (also known as hTRA3) in the retina is a possible therapeutic strategy for ADNIV; however, whether the Ca²⁺-dependent proteolytic activity of CAPN5 is similar to those of conventional calpains needs to be explored. Alternatively, a mutant CAPN5-specific siRNA may be considered as a therapeutic approach.

CAPN14 has been identified as a genomic locus that is specifically associated with another calpainopathy, the allergic disorder eosinophilic oesophagitis^{35,36}. CAPN14 is predominately expressed in the oesophagus and is upregulated in eosinophilic oesophagitis or by IL-13 stimulation³⁵. Intriguingly, an eosinophilic oesophagitis-associated risk single-nucleotide polymorphism (SNP) in CAPN14 is intronic and decreases the expression level of CAPN14. The characterization of the protease

activity of CAPN14 and its possible substrates suggests that downregulation of CAPN14 compromises the cellular responses to IL-13 signals, whereas excess CAPN14 activity impairs epithelial barrier function¹⁶⁸. The restoration of CAPN14 may therefore represent a logical therapeutic strategy, but its potential cytotoxicity must be monitored. Intriguingly, although the human CAPN14 gene is localized to a genomic region that is syntenically conserved in mice and rats, mouse or rat *Capn14* cannot be found. This finding suggests that another calpain species in some rodents assumes the functions of CAPN14 and/or that the calpain-related aspect of the eosinophilic oesophagitis pathology does not present in these rodents.

More recently, another calpainopathy was reported: spastic paraplegia 76, a neurological disorder linked to CAPN1 (REF. 48). Pathogenic mutations in CAPN1 and other experimental evidence indicate that spastic paraplegia 76 is caused by a loss of calpain-1 function. Although no gross neurological abnormality is apparent in the constitutive *Capn1*^{-/-} mouse, calpain-1 is known to have a neuroprotective role and to contribute to synaptic plasticity^{18,169}. In addition, missense mutations in CAPN1 are associated with spinocerebellar ataxia in dogs¹⁷⁰ and humans¹⁷¹. Taking this evidence together, it is strongly anticipated that calpain-1 will be a target not only for inhibition but also for genetic restoration therapeutic strategies.

Finally, with regard to additional potential calpainopathies, functional effects of SNPs in CAPN8 and CAPN9 merit attention. CAPN8 and CAPN9 are expressed in the gastrointestinal tract, especially in the mucus-secreting cells of the stomach, where they function as a heterodimer in complex with each other (called calpain-8/9 or G-calpain (G for gastric))³³. *Capn8*^{-/-}, *Capn9*^{-/-} and *Capn8*^{C105S/C105S} mice are significantly more susceptible to gastric ulcers induced by ethanol stress than wild-type mice³³. Importantly, several SNPs that inactivate CAPN8 or CAPN9 exist, suggesting that a susceptibility to gastric ulcers can be predicted by these SNPs. Therefore, strategies that compensate for and/or activate calpain-8/9, depending on the effect of the SNP, would be logical directions for treatment.

Infectious diseases

Parasitic diseases. Calpains expressed in parasites play crucial parts in their pathogenicity; thus, calpains represent promising anti-disease targets. Notably, calpains are involved in the pathogenicity of trypanosomiasis¹⁷², leishmaniasis^{172,173} and schistosomiasis¹⁷⁴, which are among the neglected tropical diseases recognized by the World Health Organization¹⁷⁵.

Malaria caused by *Plasmodium falciparum* is one of the most serious parasitic diseases¹⁷⁶. *P. falciparum* uses aspartyl and cysteine proteases to degrade host haemoglobins and to survive as a parasite¹⁷⁷, and *Pf*-calpain is essential for the life cycle of the parasite in cells¹⁷⁸, suggesting that these proteases are promising drug targets. Although host calpain-1 is reported to be required for the efficient egress of *P. falciparum*⁴¹, the invasion and growth of parasites in erythrocytes from wild-type and *Capn1*^{-/-} mice show no significant difference¹⁷⁹.

Neglected tropical diseases
Among various parasitic and
infectious diseases, 17
diseases have been recognized
by the World Health
Organization as targets for
which control would promote
an exodus from poverty
somewhere in the world.

Table 4 | Selected calpain-related therapeutic agents

Compound (alternative names)	Company or institute	Disease	Phase	Details	Refs
ABT-957	AbbVie	Alzheimer disease	Phase I, terminated	Randomized, multiple-dose-escalation safety, tolerability and pharmacokinetics study	288
ABT-957	AbbVie	Alzheimer disease	Phase I, terminated	Randomized, multiple-dose-escalation safety and efficacy study	289
Olesoxime	Trophos	Relapsing-remitting multiple sclerosis	Phase I, completed	Randomized, single-dose safety study	290
Olesoxime	F. Hoffmann-La Roche	Spinal muscular atrophy	Phase II/III, in progress	Single-dose safety, tolerability and efficacy study	291
Olesoxime	Trophos	Amyotrophic lateral sclerosis	Phase II/III, completed	Multicentre, open-label safety extension study	292,293
Cyclosporine A	Edward Hall, University of Kentucky	Traumatic brain injury	Phase I/II, in progress	Randomized, pharmacokinetics and pharmacodynamics study; evaluated by calpain-mediated cytoskeletal breakdown products	294
E-64d (EST, Estate, loxistatin and rexostatine)	Taisho Pharmaceutical	Muscular dystrophy	Phase III, discontinued	Effective for protease inhibition to delay muscle protein degradation and disease progression	45
AK-295 (CX295)	Alkermes	• Stroke • Cataracts	Preclinical, discontinued	Systemic inhibition of calpain to suppress side effects of cancer therapy on sensory neurons	295
C-101 (myodur and CLA)	CepTor	Muscular dystrophy	Preclinical, discontinued	Increased myofibre diameter in <i>mdx</i> mice and low toxicity for rats	127
CYLA	The State University of New York	• Multiple sclerosis • Retinal ischaemia	Preclinical	Capable of crossing the blood–brain barrier through taurine transporter and effective for retinal ischaemia-associated lesions	217,218
C-201 (neurodur and CLA)	CepTor	• EAE • Acoustic trauma	Preclinical	Aldehyde form of CYLA; effective for slowing EAE progression in mice and treating acoustic trauma in chinchillas	214
CEP-3453	University of Pennsylvania, Teva	Ischaemic stroke	Preclinical	Neuroprotective 22 h post-ischaemia treatment in a rat model	296
CEP-4143	Cephalon	Spinal cord injuries	Preclinical, discontinued	Pre-injury treatment exhibited neuroprotection in rat model	297
Calpeptin (IPSI-001)	Medical University of South Carolina	Multiple sclerosis	Preclinical	Reduction of demyelination and axonal damage to treat multiple sclerosis-associated optic neuritis	272
Calpeptin (IPSI-001)	Washington University School of Medicine	Wolfram syndrome	Preclinical	One of disease-responsible gene products, WFS2, downregulates CAPNS1 via the ubiquitin–proteasome system	298
A-705239 (BSF 409425)	Abbott	• Acute myocardial infarction • Cerebrovascular diseases	Preclinical	Preserved respiratory functions of mitochondria from the heart challenged by ischaemia–reperfusion	199,200
A-705253 (CAL 9961 and BSF 419961)	Christian-Albrechts University of Kiel	Acute myocardial infarction	Preclinical	Pre-infarction administration inhibited calpain and cardiac hypertrophy	299
Ala-1.0 (leupeptin linked to pregabalin)	City University of New York, Institute of Basic Research in Developmental Disabilities, The State University of New York	• Stroke • Alzheimer disease • Muscular dystrophy	Preclinical	Intraperitoneal administration immediately after controlled cortical impact decreased neurodegeneration in a rat model	216
rAAV2/1-CAPN3	French National Center for Scientific Research (CNRS)	Muscular dystrophy	Preclinical	Intramuscular delivery of CAPN3 gene corrected dystrophic features of LGMD2A model mice	300
• Sm-p80-pcDNA3 • Sm-p80-VR1020	Texas Tech University Health Sciences Center	Schistosomiasis	Preclinical	Longevity of production of Sm-p80-specific antibodies (1–8 years) was demonstrated	226,301
rSm-p80	Texas Tech University Health Sciences Center	Schistosomiasis	Preclinical	Effect of vaccination to acute and chronic infection was shown	225

EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; LGMD2A, limb-girdle muscular dystrophy type 2A.

Another parasite spread by insects is *Trypanosoma*, which causes African sleeping sickness (*Trypanosoma brucei* transmitted by *Glossina* spp. (tsetse fly)), Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* transmitted by *Reduviidae* spp. (assassin fly)), kala-azar and Oriental sore (*Leishmania donovani* and *Leishmania major* transmitted by *Phlebotominae* spp. (sand fly)), as well as other diseases¹⁷². Surprisingly, these parasites have 18–27 calpain genes⁴², one of which, ClpGM6, is involved in the morphology determination of *T. brucei*¹⁸⁰. ClpGM6 is an 820 kDa protein containing three copies of the CysPc and CBSW domains, and >70 repeats of the GM6 motif (a 68 amino acid residue unit) (FIG. 1). It is still unknown whether trypanosomal calpains function as proteases because most of them lack the conserved active site cysteine residue⁴².

The blood flukes *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma haematobium* are transmitted by *Planorbidae* spp. (planorbid or ramshorn snails) and cause schistosomiasis, which can include hepatosplenic inflammation, liver fibrosis and bladder cancer¹⁷⁴. *S. mansoni* harbours seven genes that encode calpains, four of which are classical calpains and one is a CAPN7 homologue. At least one of the classical calpains, Smp-157500 (FIG. 1), may be essential for the pathogenicity of this parasite given that it is an effective target for vaccines¹⁰ (TABLES 3,4 and see below). The physiological functions of these calpains, however, are still elusive⁵⁰.

Fungal and bacterial infections. Of the 449 whole-genome-sequenced fungus genera, 431 have one or more calpain-encoding genes; important exceptions include *Schizosaccharomyces*, *Encephalitozoon* and *Pneumocystis* (see [Mycocosm](#) of the US Department of Energy's Joint Genome Institute Genome Portal; Further information). Candidiasis, cryptococcosis, aspergillosis, coccidioidomycosis and trichophytia are caused by infection with the fungi or yeasts *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Coccidioides* spp. and *Trichophyton* spp., respectively, of various human tissues, such as the lung, mouth and skin⁴³. These infections cause serious problems, especially in immunocompromised individuals, such as HIV-infected or organ transplant patients.

To infect human tissues, the pathogens described above adapt to the environmental pH by a mechanism that uses their own calpains, PalB/Rim13 (REFS 181,182). RIM13 is the only *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a calpain¹⁸³, and *palB* is one of the calpain genes of *Aspergillus nidulans*¹⁸⁴; they are both orthologues of human CAPN7. The involvement of Rim13 and PalB in alkaline adaptation signalling was discovered in *A. nidulans* and *S. cerevisiae*, followed by elucidation of the detailed process⁵⁴. A pH sensor (consisting of Rim21/Dfg16/PalH (7 spanners), Rim8/PalF (arrestin-like) and Rim9/PalI (chaperone)) transduces an alkaline signal to a proteolytic complex with the aid of ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-I, II and III. In this process, Rim20/PalA and Ygr122w/PalC are induced to act as a scaffold for the proteolytic activation of Rim101/PacC (transcription factor) by Rim13/PalB⁵⁴. Thus, this signalling is called the Rim101 pathway.

Among the few bacterial calpains⁵², Tpr of *Porphyromonas gingivalis*, which causes periodontitis, is required for the survival and infection ability of the bacteria, and was shown to be a Ca²⁺-dependent cysteine protease with both autolytic and substrate (for example, fibrinogen) proteolytic activities¹².

Strategies for therapeutics

As discussed above, there are three types of calpain-related human disorders: those exacerbated by human calpain activities (type 1); those caused by pathogenic microorganisms that use the host's and/or their own calpains for infection and survival (type 2); and those caused by calpain gene deficiencies (type 3). For most of the type 1 and some of the type 2 disorders, inhibitors for the conventional calpains are the first therapeutic choice. Some microorganisms in type 2 disorders can infect or survive using their own calpains, which may therefore represent ideal specific targets. For type 3 disorders with defective calpains, gene therapy to restore calpain activity should be considered as a potential therapeutic approach. In addition, some type 3 disorders result in hyperactivation of calpains due to a gain-of-function mutation¹⁶⁷, for which the inhibition or reduction of calpain activity would be a logical therapeutic strategy.

Inhibiting conventional calpain activities

First-generation calpain inhibitors include leupeptin and E-64, originating from actinomycete and fungus, respectively, and their derivatives. These inhibitors exhibit little specificity for calpains and show broad inhibitory activity against not only clan CA proteases¹¹⁸ but also matrix metalloproteinase 2 (REF. 185) (BOX 1; TABLE 3; [Supplementary information S1,S2](#) (figure, table)). Nevertheless, leupeptin and its modified versions have been studied extensively and evaluated in pilot clinical trials¹⁸⁶. One of these products, C-101 (also known as myodur; see below), although discontinued as a clinical candidate, represents an important approach to effectively deliver a drug to muscle cells by taking advantage of a receptor–ligand interaction¹²⁷ (see below) ([Supplementary information S1](#) (figure)). Meanwhile, E-64d was shown to prolong the lifespan of a dystrophic hamster, UM-X7, and was used in clinical trials up to phase III in the 1980s⁴⁵. Unfortunately, the results were inconclusive, and the trials were discontinued in 1992 (REF. 187). Several attempts to improve the specificity of these molecules resulted in second-generation inhibitors such as SJA6017 (REF. 92) and PD150606 (REF. 76). However, these agents were still not sufficiently specific to distinguish calpains from other proteases. Although endogenous CAST is currently the only absolutely specific inhibitor for classical calpains, strategies to improve inhibition are emerging (BOX 1).

Indeed, advances in structural biology have enabled logical structure design, which has led to a group of promising third-generation inhibitors with fixed secondary structures. Although proteases are known to generally recognize β -strands¹⁸⁸, most of the small-molecule protease inhibitors are conformationally flexible. This flexibility induces cooperative effects between the protease and the inhibitor (so-called induced fit¹⁸⁹),

resulting in unexpected enzyme–inhibitor interactions at adjacent or even remote locations from the active site and, therefore, a loss of inhibitory specificity. This effect can be avoided by restricting the secondary structure of the inhibitor molecule. Among several attempts to achieve this goal, stable β -strands were achieved by the macrocyclization of inhibitor peptides^{138,190,191}.

Notably, although CAST is an intrinsically unstructured protein, the 3D structure of a calpain-2–CAST complex shows that α -helix and β -turn structures in CAST sub-domain B induced by its binding to the active site of calpain-2 have essential roles in its specific inhibition. Thus, peptides made to mimic these structures by crosslinkers¹⁹² or by cyclization¹⁸⁸ are inherently specific to calpains (with inhibition constant (K_i) values of 10–20 μ M) (Supplementary information S1 (figure)).

In addition, an alternative approach is provided by a calpain-derived inhibitory peptide for mitochondrial calpain-1 that specifically blocks calpains¹⁹³. Mitochondrial calpain-1 is associated with the molecular chaperone ERp57 via the CBSW domain of CAPN1 (REF. 194). Because inhibiting ERp57 destabilizes mitochondrial calpain-1 (REF. 194), synthetic peptides were screened for their ability to competitively inhibit the ERp57–CBSW interaction. This screen identified PDALKSRTLRL, an oligopeptide corresponding to a linker region between the PC2 and CBSW domains of CAPN1 that inhibited mitochondrial but not cytosolic calpain-1 (median inhibitory concentration (IC_{50}) of 112 nM)¹⁹⁴. A form of this peptide N-terminally conjugated with the cell-penetrating HIV-1 Tat sequence (GRKKRRQRRRPPQ) prevented photoreceptor cell death in retinal dystrophic rats (TABLE 3), with no inhibition of cathepsin L, papain or proteasomes¹⁹⁴. This strategy is ideal in its specificity, and may be applicable to other calpains: for example, for the development of a peptide that interferes with the PEF(L) and PEF(S) interaction of conventional calpains.

As described above, the development of allosteric inhibitors of calpains is another important area for improving specificity. For this endeavour, elucidation of the precise inhibitory mechanisms of α -mercaptoacrylic acid derivatives, such as PD150606, is urgently required. Intriguingly, the dimerization of PD150606 and its derivatives via disulfide formation significantly increases their calpain inhibitory activity (for example, the IC_{50} values of PD150606 and its dimer are 5.0 μ M and 7.5 nM, respectively)¹⁹⁵. The dimerized molecules bind to the PEF domain similarly to PD150606 but more stably¹⁹⁵, although their inhibitory mechanisms are unclear. These studies have opened up a new direction for calpain-specific inhibitor development, in which the inhibitors are directed to regions other than the active site.

As a promising example, a novel allosteric site and its small-molecule inhibitor, NSC13345, for cathepsin K, a cysteine cathepsin with 3D structural similarity to the calpain CysPc domain, were discovered by computational methods¹⁹⁶. NSC13345 inhibits cathepsin K by binding to a relatively flat side surface of the β -strand-rich region that harbours the active site histidine and asparagine residues, corresponding to the PC2 domain of calpains¹⁹⁶. Therefore, similar methods should be

applicable to finding calpain-specific allosteric sites and their docking molecules. Further information about the recent progress on calpain inhibitors can be found in other detailed and comprehensive reviews^{3,197,198}.

Preclinical and clinical agents in development. Calpain inhibitors are continuing to be developed therapeutically, and some of them are currently being tested in clinical trials (TABLE 4). Two structurally related α -ketoamide calpain inhibitors, A-705239 (also known as BSF 409425) and A-705253, show promise because of their improved water solubility, cell permeability and metabolic stability over other inhibitors, although they have some limitations with regard to specificity (Supplementary information S1, S2 (figure, table))¹⁹⁹. Administering A-705239 after an induced traumatic brain injury in rats rescued brain cells, proving the biological efficacy of the drug¹⁹⁹. In another disease model, acute myocardial infarction induced by ischaemia–reperfusion in a rabbit heart, the infarct size was reduced and the respiratory function of mitochondria was preserved when A-705239 was included throughout the procedure²⁰⁰. An improved derivative of A-705239 developed by AbbVie, ABT-957, had been in the first sets of clinical trials as a treatment for cognitive disorders until recently^{198,201–203} (TABLE 4). The exact structure of ABT-957 has not yet been disclosed.

A neuroprotective cholesterol derivative, olesoxime (Supplementary information S1 (figure)), which has been subjected to clinical trials as a therapeutic reagent for motor neuron diseases such as ALS²⁰⁴, spinal muscular atrophy (SMA)^{205,206} and relapsing–remitting multiple sclerosis²⁰⁷, was recently shown to suppress calpain activity in a rat model of Huntington disease^{208,209}. The precise mode of action of olesoxime is currently elusive, but as it binds to outer mitochondrial membrane proteins and inhibits the efflux of apoptotic factors under neurotoxic or cytotoxic conditions *in vitro*²¹⁰, calpains are probably not its direct target. The safety and suitability of olesoxime for oral delivery have been demonstrated in clinical trials^{206,211} (TABLE 4). A beneficial clinical outcome, such as a retardation of disease progression, was observed in a SMA trial focusing on the early phase of disease onset²⁰⁵, but not in an ALS trial assessing survival at the end stage of the disease²¹¹. These results suggest that the neuroprotective effect of olesoxime depends on the timing of its administration during disease progression. Although the calpain activity in olesoxime-treated neurodegenerative diseases other than Huntington disease awaits investigation, it is possible that one of the main neuroprotective actions of olesoxime depends on calpain suppression. Notably, survival of motor neuron (SMN) protein, a gene product responsible for SMA, is a calpain substrate²¹², and calpain upregulation has been reported in an ALS mouse model²¹³, suggesting that other calpain inhibitors may also be effective for treating these diseases as well as Huntington disease.

In parallel with the efforts to refine the core structure of calpain inhibitors, the covalent attachment of a tag motif to an inhibitor molecule that causes it to accumulate in a region of interest, such as muscle cells, has been examined^{127,214–216}. Among these compounds, C-101 is a modified leupeptin linked to carnitine, which

Intrinsically unstructured protein

A protein that does not possess a fixed or stable 3D structure (also called an ‘intrinsically disordered protein’). Some of these proteins remain unstructured even in their functional state, whereas others adopt a fixed structure after binding to another protein. For example, calpastatin has tandemly repeated calpain inhibitory sequences, neither of which assumes a defined structure unless calpastatin is bound to calpain.

is efficiently targeted to skeletal muscle tissue, where the carnitine receptor OCTN2 (also known as SLC22A5) is expressed¹²⁷. At the preclinical level, C-101 increased the fibre diameter in the skeletal muscle of *mdx* mice, indicating its promise as a therapeutic reagent for muscular dystrophies¹²⁷. However, the preclinical trial for this product was discontinued, and other variants that have been examined at the preclinical level await further evaluation. These inhibitors include C-201 (also known as neurodur)²¹⁴, GABA_Dur²¹⁵ and Ala-1.0 (REF. 216), which are attached to taurine or the anti-epileptic drug pregabalin and are designed to elicit neuroprotection by limiting calpain activation (Supplementary information S1 (figure)). CYLA is a diethyl acetal of C-201 that is converted to an active form after undergoing hydrolysis *in vivo*. Delivery of CYLA to the brain and prevention of axon injury was demonstrated in a mouse model of multiple sclerosis²¹⁷. CYLA is also reported to prevent retinal cell degeneration in a rat model of retinal ischaemia²¹⁸.

Targeting calpain pathways in infectious diseases

Malaria and sickle cell disease. As the malaria-causing *Plasmodium* parasite requires proteases, including *Pf*-calpain, for its survival, these proteases represent promising drug targets. Conventional calpain inhibitors also inhibit *Pf*-calpain: ALLNal and ALLMal suppress the erythrocyte invasion of *P. falciparum*⁴⁰, and BDA-410 blocks parasite growth *in vitro* and *in vivo*⁹. In addition, hypervalent organotellurium compounds inhibit the *Pf*-calpain-like activity²¹⁹ (TABLE 3). These potential drug candidates should be tested for their specificity using recombinant *Pf*-calpain⁷⁰.

Sickle cell disease (SCD) is caused by pathogenic mutations of the β -globin gene (*HBB*) and is accompanied by malaria resistance. Dense sickle cells are a hallmark of human SCD and show reduced levels of CAST²²⁰. Notably, the oral administration of BDA-410 in a mouse model of SCD (SAD mice) ameliorates sickle cell density and hypoxia-induced erythrocyte dehydration²²⁰. The proposed molecular mechanisms of sickle cell deficiency include the perturbation of PRX2 (also known as calpromotin), which protects against oxidative stress, and the upregulation of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel (Gardos channel) by overactivated calpain-1 (REF. 220). Consistent with this scenario, Gardos channel activity is suppressed in *Capn1*^{-/-} mouse erythrocytes²²¹. However, the *Capn1*^{-/-} mouse erythrocytes become deformed upon Ca^{2+} -ionophore-induced echinocyte formation²²¹. Thus, further investigations of the effects of calpain-1 inhibition on erythrocytes need to be conducted before applying calpain inhibitors to treat SCD.

Trypanosomiasis and leishmaniasis. MDL28170 shows trypanocidal effects without significant toxicity to the host cells¹⁷³ (TABLE 3). Treating *Leishmania amazonensis* promastigotes with 30 μM (double the IC_{50} dose) of MDL28170 efficiently suppresses their growth and viability, and induces an apoptosis-like cell morphology accompanied by cell cycle arrest and DNA fragmentation¹⁷³. ALLNal, however, suppresses the apoptosis-like cell death of *L. donovani* induced by miltefosine (another

trypanocidal agent), and E-64 has no effect²²². These studies collectively suggest that the target of MDL28170 is unlikely to be calpain activity, but that *Trypanosomal* calpain-like molecules, such as CAP5.5 (*Tb*CALP1; FIG. 1), that lack protease activity may act as cytoskeletal modulators^{180,223}. Although there is evidence to suggest that trypanosomal calpains would be good drug targets, inhibitors such as MDL28170 also act on host calpains, and detailed studies are needed to determine how the pseudo-proteolytic trypanosomal calpains function and how calpain inhibitors act against them.

Schistosomiasis. There is currently no vaccine for schistosomiasis for human use. However, one of the leading candidate target molecules for a schistosomiasis vaccine is Sm-p80, a C-terminal portion of the *S. mansoni* calpain Smp-157500 (FIG. 1). Smp-157500 is exposed on the membrane surface and has an important role in the surface membrane renewal and recycling of the parasite to evade the host immune response^{10,224}. Although the precise function of Smp-157500 is currently elusive, baboon vaccination data for Sm-p80 are promising^{10,225} (TABLES 3,4). Baboons chronically infected with *S. mansoni* were treated with a recombinant Sm-p80 protein (rSm-p80) or an Sm-p80-expression DNA vector plasmid along with adjuvants (Toll-like receptor 4 agonist-based glucopyranosyl lipid (GLA-SE) or aluminium hydroxide (alum))¹⁰. Among several combinations, rSm-p80 plus GLA-SE was the most effective, resulting in the production of immunoglobulin A (IgA) in addition to IgG and IgM, a 36% reduction in the number of worms, and 54% and 33% reductions in the amounts of tissue and faecal eggs, respectively¹⁰. The same strategy was also effective in baboons and hamsters infected with *S. haematobium*, the Sm-p80 amino acid sequence of which is 95% identical to that of *S. mansoni*²²⁵. Surprisingly, the elicited Sm-p80-specific IgG in vaccinated baboons was still detected 5–8 years after immunization²²⁶. These studies support the testing of an Sm-p80 vaccine in human clinical trials.

Diseases caused by fungi, yeasts and bacteria. Inhibitors specific for calpains in fungi, yeast and bacteria are promising therapeutics for diseases caused by these pathogens. For example, *C. albicans* infects and lives on mucosal surfaces of the human gastrointestinal and genitourinary tracts by expressing several genes for alkaline adaptation, such as superoxide dismutase 4 (*SOD4*) and *SOD5* and aspartyl proteases (*SAP5* and *SAP6*), causing candidiasis¹³. Deletion of *RIM101* effectively disrupted this infection by downregulating Rim101-induced genes¹³. Similarly, *Cryptococcus neoformans* uses the Rim101 pathway for infection, and causes life-threatening meningitis in immunocompromised humans¹⁸². Rim13 proteins of these yeasts are homologues of PalB and CAPN7 (also known as PalBH), which constitute the most divergent calpain subfamily, and have further diverged CysPc domains even compared with that of human CAPN7 (~20% identity)⁵⁰. Thus, it is possible to design inhibitors specific to these yeast Rim13 proteins without inhibitory activity to human CAPN7, which is thought to be essential for human cellular functions²²⁷. However, so far, no inhibitor

Box 2 | Activators of calpains

Many enzymes have efficient activators, such as phorbol esters and diacylglycerol for protein kinase C, AMP for AMPK, and the small GTPase RAC for NADPH oxygenase. Calpain activators could be used, for example, to increase calpain activity in attenuated activity-type calpainopathies and in some cardiovascular disorders requiring a transient activation of calpains. The conventional calpains are activated by Ca^{2+} , Mg^{2+} and phospholipids, which are common activators for various enzymes, and hence could not be used as a specific activator. Although activator macromolecules for calpains (UK114, acyl CoA-binding protein, DNA and calpastatin fragments, among others) have been reported, none of them has survived further analysis. Why is a calpain activator so elusive?

One possible reason is that calpain activity has to be strictly suppressed in the cell. In fact, conventional calpains proteolyse more than 40% of the peptide bonds of most polypeptides when exhaustively reacted *in vitro* (F. Shinkai-Ouchi, Y.O., T.C.S. and H.S., unpublished observations). Thus, there are multiple safety features that regulate the activity of conventional calpains, such as the very high $[\text{Ca}^{2+}]$ requirement for full activity and the lack of an active site conformation in the absence of Ca^{2+} . In addition, the deep active site cleft is inaccessible for many structured polypeptides, and the specific inhibitor calpastatin is expressed in excess amounts in most cells. However, the recently reported intermolecular complementation phenomenon of CAPN3 (REF. 232) provides a potential new direction for the development of a calpain activator, in that some parts of calpain itself might function as an activator.

has been designed, and no 3D structures have been determined for Rim13. These topics are challenging but urgent for future study. Conventional calpain inhibitors may also be effective in controlling these diseases. For example, *Shigella flexneri*, a dysentery-causing bacteria, does not have its own calpain but escapes from the host immunity by activating conventional calpains²²⁸.

Restoring intrinsic functions of calpains

LGMD2A is the most thoroughly studied human calpainopathy confirmed to be caused by the genetic loss-of-function of a calpain gene (*CAPN3*), and is therefore the leading example for which the complementation of calpain activity would be an appropriate therapy. Among other calpainopathies reported so far, those caused by defects in *CAPN1* (REF. 48), *CAPN8* (REF. 33), *CAPN9* (REF. 33) and *CAPN14* (REFS 35,36) would also require restoration by complementation.

There are several challenges facing the diagnosis and treatment of LGMD2A. A definitive diagnosis of LGMD2A requires the identification of pathogenic mutations in *CAPN3*, which encompasses more than 60 kb, and this test is time consuming and costly. A frequently used alternative is to check the CAPN3 protein by western blot analysis. However, a normal level of CAPN3 is found in ~30% of patients with LGMD2A¹⁶², and clinicians need to be aware of this fact when using this method. Analysing the Na^+ -dependent autolytic activity, a unique feature of CAPN3 (REF. 229), to assess the activity of CAPN3 would be a better diagnostic method. Furthermore, the nature of the protease activity of CAPN3 remains unclear: that is, where it is activated, in what forms and under what circumstances.

Gene therapy. Gene therapy is currently the most practical approach for calpain replacement because the sizes of calpains (~100 kDa) are appropriate for viral vectors, and no activators for these calpains are currently available (BOX 2).

In the course of developing strategies for correcting genetically defective *CAPN3* by gene transfer, it was revealed that skeletal but not heart muscle has the capacity to regulate CAPN3, and that freely active CAPN3 can be detrimental to tissues in which it is accidentally expressed^{47,59}. To address this issue, skeletal-muscle-specific promoters and/or cardiac-specific gene suppression by microRNAs are effective strategies that do not decrease the expression level of the transferred *CAPN3* gene in skeletal muscle⁴⁷ (TABLE 4).

Therapeutic strategies to correct causative gene mutations by gene editing techniques combined with the use of patient-derived induced pluripotent stem cells are also on the horizon^{230,231}. Therapies for calpainopathies, depending on the nature of the affected tissues and the mutation, could greatly benefit from such advancements. More than one-third of the cases of LGMD2A are caused by mis-sense mutations¹⁶² (see also Further information), which are appropriate for gene editing therapy.

Intermolecular complementation of CAPN3. An alternative approach to correct CAPN3 activity is suggested by an unusual activation ability of CAPN3. CAPN3 undergoes rapid autolysis; however, it was recently discovered that the protease activity, including its autolytic activity, can be restored through the intermolecular complementation (iMOC) of autolysed fragments²³². Such iMOC had only previously been described for some proteases of viruses, the self-remodelling of which is involved in efficient infectivity²³³. The iMOC of CAPN3 is thought to be a mechanism for regulating its activity and localization²³². Therefore, in some specific cases, it might be possible to correct dysfunctional CAPN3 mutants by delivering a defined region of CAPN3, which is not in itself active because it is not the whole molecule^{232,234}.

Inhibition of LGMD2A mutant CAPN3. An *in vitro* study indicated that some LGMD2A mutant CAPN3 proteins, such as those mutated in the PEF domain, have accelerated autolytic activity, so they cannot function owing to their rapid autodegradation^{93,235}. It may therefore be possible to use partial inhibitors that slow down this autolysis but do not competitively inhibit the protease activity. For example, PD150606 binds to PEF domains⁷⁶, although its primary site of action is the CysPc not the PEF domain (see above)⁷⁹. One of the amino acid residues, F226 of PEF(S), that contacts PD150606 or its derivatives, is conserved in the PEF(L) of CAPN3, a region of LGMD2A pathogenic mutation (F779I)²³⁶ (see also Further information). Therefore, PD150606 and/or its derivatives may alter the activity of PEF-domain-mutated CAPN3 proteins with moderate efficiency. In addition to LGMD2A caused by hyper-autodegrading *CAPN3* mutations, some other conditions may be ameliorated by inhibiting CAPN3. For example, tibial muscular dystrophy is primarily caused by mutations in the titin (*TTN*) gene, which in turn dysregulate CAPN3 (REF. 237). Cardiomyopathy phenotypes collaterally caused by misexpression of *CAPN3* in heart muscle, which is a problem in applying gene therapy for LGMD2A⁴⁷, could also be prevented by

Intermolecular complementation

(iMOC). A phenomenon in which single-polypeptide-derived fragments, none of which are capable of expressing the activity of the original protein, reconstitute the original activity through spontaneous and noncovalent interaction under physiological conditions. In this process, the amino acids essential for the activity are provided by different fragments.

inhibiting CAPN3 in the heart (TABLE 4). In these cases, the development of CAPN3-specific inhibitors would be helpful.

Increasing muscle mass. A different approach to treat LGMD2A, as well as other muscular dystrophies, is to promote muscle development and regeneration, as is the aim of anti-myostatin treatment^{238,239}. In this respect, CAPN6 (also known as CANPX), the only naturally proteolytically inactive human calpain (FIG. 1), represents a unique factor regulating skeletal muscle mass²⁴⁰. *Capn6* gene-disrupted mice exhibit skeletal muscle hypergenesis, and mice with myostatin (*Mstn*) gene disruption exhibit increased muscle mass^{240,241}. Therefore, counteracting CAPN6 and/or its downstream molecules, which largely remain elusive, by specific antibodies or siRNA may ameliorate the phenotypes of muscular dystrophies. The effect of CAPN6 inhibition on muscular dystrophies, which may vary depending on the genes responsible for disease, the model animal and/or the methodology of inhibition, as has been reported for myostatin^{242,243}, warrants further investigation.

Challenges in targeting calpains

The conventional calpains are expressed in almost all cells. However, because their physiological roles are generally auxiliary, their inhibition does not cause serious problems under normal conditions. This finding explains the rationale for using conventional calpain inhibitors to treat various diseases that are aggravated by calpain activity. However, calpain activity is required for some processes that involve the orchestration of multiple molecular functions. Therefore, the safety of chronically inhibiting calpain activity must be considered. Indeed, detrimental effects of calpain inhibition on cardiomyocytes^{59,121}, the immune system^{120,123,244,245}, uterine implantation²⁴⁶ and cancer suppression^{150,155–159} have already been reported (TABLE 3). The use of calpain inhibitors and potential side effects must also be studied under various conditions: for example, under a perturbed immune system due to disease, the environment and/or ageing.

Another issue is that in some studies of acute disorders, such as cardiovascular disorders, the calpain inhibitors are administered *ex ante*, which does not happen in actual therapy. The effects of calpain inhibition initiated after disease onset would be of more practical value. Except for preventing the effects of infectious diseases or the manifestation of disease symptoms, most therapies target calpains at the postsymptomatic stage. To identify useful clinical treatments, the efficacy and safety of these therapies should be evaluated using model systems that reflect the symptomatic context of the disease.

As discussed above, achieving specificity when targeting calpains is challenging. Indeed, many of the first-generation calpain inhibitors were nonspecific and targeted other proteases¹¹⁸. A calpain inhibitor can be useful for disease treatment, for purely scientific experiments or both. The difference is exemplified by *in vitro* specificity versus practical *in vivo* effects¹⁹⁸. *In vitro* specificity is gradually being addressed by inhibitor

chemistry inspired by structures and other new approaches (see above and BOX 1). Promising strategies include restricting secondary structures of inhibitors^{138,139,188,192}, learning from the 3D structure of calpain–CAST complexes^{188,192}, allosteric inhibition, including the idea of intercalation between PC1–PC2 or PEF(L)–PEF(S), and use of cathepsin-specific inhibitors^{247,248}.

Understanding calpain substrate specificities is another key concern, particularly when considering potential off-target effects when attempting to target calpains. However, this knowledge is lacking, and solving calpain substrate specificity remains a key priority in the field. As discussed above, CysPc domains are structurally nonspecific with respect to recognizing substrate amino acid residue side chains^{64,65}. Although bioinformatics studies have achieved practically usable predictors for calpain substrate cleavage sites^{98–102}, a constitutive principle of how calpains recognize substrates is far from clear.

Another consideration is that *in vivo*, calpain inhibition alone may not be completely effective in treating a disease. Rather, a strategy combining calpain inhibition and other therapeutic protocols may be more beneficial. For this approach, the molecular context of functions of the targeted calpain, including the presence of other drugs and the disease condition, needs to be thoroughly examined. The same principle holds true in designing gene therapies, and information about how the responsible calpains function needs to be constantly updated. Recent reports showing additive effects of calpain inhibition and other drugs are promising examples of this strategy: for example, MDL28170 in combination with the existing ALS therapeutic drug riluzole²⁴⁹, or genetic disruption plus an HSP90 inhibitor²⁹.

Conclusions and perspectives

Proteases have proved to be effective targets in various diseases²⁵⁰. However, the paucity of information about the substrate specificity of calpains as a protease family has severely limited our understanding of calpain functions. This issue has been appreciably overcome in the past decade or so^{64,65,75,95,96,98}.

When targeting calpains, inhibition, activation and restoration represent therapeutic options depending on the disease. Promising strategies and inhibitors found to date could be improved through continued basic research. Importantly, the specific and selective manipulation of calpain activities is an increasing research trend. As calpain research proceeds, we need to continuously examine whether newly developed calpain inhibitors are applicable for therapy, and whether gene therapies for calpainopathies are a feasible therapeutic option.

The pathological mechanisms of known calpainopathies have also been extensively studied using state-of-the-art techniques combined with mouse genetics and genome-wide analyses. An exception is the poorly understood role of CAPN10 in the pathology of type 2 diabetes mellitus, an important research topic with substantial implications for modern society^{251,252}.

The targeting of calpains in causative organisms for infectious diseases is highly challenging because the structures of these calpain species are markedly divergent

from those of conventional calpains. There is therefore an urgent need to systematically advance this field to aid the development of potential novel therapies.

Translational research involving calpains is still at the development stage. To advance, we need to learn more about the calpains themselves, as well as their impact on various physiological systems and molecular pathways and events. The ambiguous impression we have of calpains may simply reflect the fact that they have not yet

been thoroughly studied. Calpain molecules actually possess many features that make them attractive subjects for intensive analysis in the field of protein science. A multidisciplinary approach to unveiling the physiological functions of calpains will continue to provide valuable information for medical and basic biological studies. Such knowledge will improve the likelihood that we will successfully correct the aberrant functions of calpains in various disease conditions.

- Guroff, G. A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* **239**, 149–155 (1964).
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. The calpain system. *Physiol. Rev.* **83**, 731–801 (2003).
- Campbell, R. L. & Davies, P. L. Structure–function relationships in calpains. *Biochem. J.* **447**, 335–351 (2012).
- Sorimachi, H., Hata, S. & Ono, Y. Impact of genetic insights into calpain biology. *J. Biochem.* **150**, 23–37 (2011).
- Murachi, T. Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem. Int.* **18**, 263–294 (1989).
- Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K. & Imahori, K. Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization. *J. Biochem.* **84**, 225–230 (1978).
- Ohno, S. *et al.* Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* **312**, 566–570 (1984).
- Letavernier, E. *et al.* The role of calpains in myocardial remodelling and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **96**, 38–45 (2012).
- Li, X., Chen, H., Jeong, J. J. & Chishti, A. H. BDA-410: a novel synthetic calpain inhibitor active against blood stage malaria. *Mol. Biochem. Parasitol.* **155**, 26–32 (2007).
- Karmakar, S. *et al.* Use of an Sm-p80-based therapeutic vaccine to kill established adult schistosome parasites in chronically infected baboons. *J. Infect. Dis.* **209**, 1929–1940 (2014).
Shows the effectiveness of rSm-p80, the C-terminal portion of the *S. mansoni* calpain Smp-157500, as an anti-schistosomiasis vaccine in baboons.
- Li, M. *et al.* Coxsackievirus B3-induced calpain activation facilitates the progeny virus replication via a likely mechanism related with both autophagy enhancement and apoptosis inhibition in the early phase of infection: an *in vitro* study in H9c2 cells. *Virus Res.* **179**, 177–186 (2014).
- Stanic, D. *et al.* Calcium regulates the activity and structural stability of Tpr, a bacterial calpain-like peptidase. *J. Biol. Chem.* **290**, 27248–27260 (2015).
The first report to show the existence of calpains — that is, a Ca²⁺-dependent CysPc motif-containing cysteine protease — in bacteria. This calpain, Tpr, is a possible therapeutic target for periodontitis.
- Xu, W. *et al.* Activation and alliance of regulatory pathways in *C. albicans* during mammalian infection. *PLoS Biol.* **13**, e1002076 (2015).
- Yamada, M. *et al.* Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues *in vivo* phenotypes in a mouse model of lissencephaly. *Nat. Med.* **15**, 1202–1207 (2009).
- Yamashita, T. *et al.* A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat. Commun.* **3**, 1307 (2012).
- Hübener, J. *et al.* Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum. Mol. Genet.* **22**, 508–518 (2013).
- Toba, S. *et al.* Post-natal treatment by a blood–brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci. Rep.* **3**, 1224 (2013).
Shows that the oral and postnatal administration of the calpain inhibitor SNJ1945 substantially ameliorates the lissencephaly phenotype of *Lis1*^{+/−} mice.
- Amini, M. *et al.* Conditional disruption of calpain in the CNS alters dendrite morphology, impairs LTP, and promotes neuronal survival following injury. *J. Neurosci.* **33**, 5773–5784 (2013).
- Diepenbroek, M. *et al.* Overexpression of the calpain-specific inhibitor calpastatin reduces human α -synuclein processing, aggregation and synaptic impairment in [A30P] α Syn transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3975–3989 (2014).
- Saito, T. *et al.* Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **17**, 661–663 (2014).
- Knaryan, V. H. *et al.* SNJ-1945, a calpain inhibitor, protects SH-SY5Y cells against MPP⁺ and rotenone. *J. Neurochem.* **130**, 280–290 (2014).
- Trager, N. *et al.* Effects of a novel orally administered calpain inhibitor SNJ-1945 on immunomodulation and neurodegeneration in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurochem.* **130**, 268–279 (2014).
- Letavernier, E. *et al.* Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Circ. Res.* **102**, 720–728 (2008).
- Yokota, M. *et al.* Calpain inhibitor entrapped in liposome rescues ischemic neuronal damage. *Brain Res.* **819**, 8–14 (1999).
Shows that calpain inhibition protects the brain from ischaemic damage.
- Miyazaki, T. *et al.* m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation* **124**, 2522–2532 (2011).
- Subramanian, V. *et al.* Calpain inhibition attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **59**, 66–76 (2012).
- Storr, S. J., Carragher, N. O., Frame, M. C., Parr, T. & Martin, S. G. The calpain system and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 364–374 (2011).
- Hoskin, V. *et al.* Ezrin regulates focal adhesion and invadopodia dynamics by altering calpain activity to promote breast cancer cell invasion. *Mol. Biol. Cell* **26**, 3464–3479 (2015).
- Grieve, S., Gao, Y., Hall, C., Hu, J. & Greer, P. A. calpain genetic disruption and HSP90 inhibition combine to attenuate mammary tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 2078–2088 (2016).
- Leloup, L. & Wells, A. Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 309–323 (2011).
- Moreau, K. L. & King, J. A. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol. Med.* **18**, 273–282 (2012).
- Richard, I. *et al.* Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* **81**, 27–40 (1995).
The first report of human calpainopathy using forward genetics, representing one of the greatest milestones in calpain research and causing a paradigm shift in the field.
- Hata, S. *et al.* Calpain 8/nCL-2 and calpain 9/nCL-4 constitute an active protease complex, G-calpain, involved in gastric mucosal defense. *PLoS Genet.* **6**, e1001040 (2010).
- Mahajan, V. B. *et al.* Calpain-5 mutations cause autoimmune uveitis, retinal neovascularization, and photoreceptor degeneration. *PLoS Genet.* **8**, e1003001 (2012).
Reports another human calpainopathy, which is thought to result from gain-of-function mutations, showing the importance of unconventional calpains in human health.
- Kottyan, L. C. *et al.* Genome-wide association analysis of eosinophilic esophagitis provides insight into the tissue specificity of this allergic disease. *Nat. Genet.* **46**, 895–900 (2014).
- Sleiman, P. M. *et al.* GWAS identifies four novel eosinophilic esophagitis loci. *Nat. Commun.* **5**, 5593 (2014).
References 35 and 36 identify a third human calpainopathy, known as eosinophilic oesophagitis, by genome-wide association analyses. The classical CAPN14, which is expressed predominantly in the oesophagus, causes eosinophilic esophagitis by a combination of loss- and gain-of-function mechanisms.
- Li, F. Z. *et al.* Crosstalk between calpain activation and TGF- β 1 augments collagen-I synthesis in pulmonary fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 1796–1804 (2015).
- Li, Y. *et al.* Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes. *Diabetes* **60**, 2985–2994 (2011).
- Ni, R. *et al.* Mitochondrial calpain-1 disrupts ATP synthase and induces superoxide generation in type 1 diabetic hearts: a novel mechanism contributing to diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **65**, 255–268 (2016).
- Olaya, P. & Wasserman, M. Effect of calpain inhibitors on the invasion of human erythrocytes by the parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1096**, 217–221 (1991).
- Chandramohanadas, R. *et al.* Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells. *Science* **324**, 794–797 (2009).
- Ersfeld, K., Barraclough, H. & Gull, K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J. Mol. Evol.* **61**, 742–757 (2005).
- Vallabhaneni, S., Mody, R. K., Walker, T. & Chiller, T. The global burden of fungal diseases. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **30**, 1–11 (2016).
- Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* **79**, 1431–1568 (1999).
- Satoyoshi, E. Therapeutic trials on progressive muscular dystrophy. *Intern. Med.* **31**, 841–846 (1992).
- Nikkel, A. L. *et al.* The novel calpain inhibitor A-705253 prevents stress-induced tau hyperphosphorylation *in vitro* and *in vivo*. *Neuropharmacology* **63**, 606–612 (2012).
- Roudaut, C. *et al.* Restriction of calpain3 expression to the skeletal muscle prevents cardiac toxicity and corrects pathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Circulation* **128**, 1094–1104 (2013).
Shows that induction of strong proteolytic CAPN3 activity via gene therapy causes severe toxicity owing to its leaked ectopic expression in the heart. Improving the specificity of the promoters driving viral vectors ameliorated toxicity.
- Gan-Or, Z. *et al.* Mutations in CAPN1 cause autosomal-recessive hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* **98**, 1058–1046 (2016).
- Croall, D. E. & Ersfeld, K. The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol.* **8**, 218 (2007).
- Sorimachi, H., Hata, S. & Ono, Y. Calpain chronicle — an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc. Jpn Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **87**, 287–327 (2011).
- Zhao, S. *et al.* Massive expansion of the calpain gene family in unicellular eukaryotes. *BMC Evol. Biol.* **12**, 193 (2012).
- Rawlings, N. D. Bacterial calpains and the evolution of the calpain (C2) family of peptidases. *Biol. Direct* **10**, 66 (2015).
References 51 and 52 extensively classify the calpain homologues in all living organisms, revealing that many functional domains are fused with the CysPc domain. Reference 52 includes analyses of bacterial calpains.

53. Ono, Y., Ojima, K., Shinkai-Ouchi, F., Hata, S. & Sorimachi, H. An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3. *Biochimie* **122**, 169–187 (2016).
54. Maeda, T. The signaling mechanism of ambient pH sensing and adaptation in yeast and fungi. *FEBS J.* **279**, 1407–1413 (2012).
55. Joyce, P. I., Satija, R., Chen, M. & Kuwabara, P. E. The atypical calpains: evolutionary analyses and roles in *Caenorhabditis elegans* cellular degeneration. *PLoS Genet.* **8**, e1002602 (2012).
56. Azam, M. *et al.* Disruption of the mouse μ -calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol. Cell Biol.* **21**, 2213–2220 (2001).
57. Dutt, P. *et al.* m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev. Biol.* **6**, 3 (2006).
58. Takano, J. *et al.* Vital role of the calpain–calpastatin system for placental-integrity-dependent embryonic survival. *Mol. Cell Biol.* **31**, 4097–4106 (2011). **Reveals the essential role of calpain activity in the placenta. Surprisingly, the embryonic lethality of *Capn2*^{-/-} was rescued by an additional *Cast* knockout.**
59. Galvez, A. S. *et al.* Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circ. Res.* **100**, 1071–1078 (2007).
60. Sorimachi, H. *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.* **264**, 20106–20111 (1989).
61. Wendt, A., Thompson, V. F. & Goll, D. E. Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol. Chem.* **385**, 465–472 (2004).
62. Maki, M., Maemoto, Y., Osako, Y. & Shibata, H. Evolutionary and physical linkage between calpains and penta-EF-hand Ca²⁺-binding proteins. *FEBS J.* **279**, 1414–1421 (2012).
63. Arthur, J. S., Elce, J. S., Hegadorn, C., Williams, K. & Greer, P. A. Disruption of the murine calpain small subunit gene. *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol. Cell Biol.* **20**, 4474–4481 (2000).
64. Hanna, R. A., Campbell, R. L. & Davies, P. L. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* **456**, 409–412 (2008).
65. Moldoveanu, T., Gehring, K. & Green, D. R. Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature* **456**, 404–408 (2008). **References 64 and 65 show the 3D structures of an active full-length calpain in complex with Ca²⁺ and CAST, which are now standard for analysing calpain substrate recognition and inhibitory mechanisms.**
66. Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L. & Jia, Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* **18**, 6880–6889 (1999).
67. Strobl, S. *et al.* The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 588–592 (2000).
68. Fukiage, C., Nakajima, E., Ma, H., Azuma, M. & Shearer, T. R. Characterization and regulation of lens-specific calpain Lp82. *J. Biol. Chem.* **277**, 20678–20685 (2002).
69. Garnham, C. P. *et al.* Limb-girdle muscular dystrophy type 2A can result from accelerated autoproteolytic inactivation of calpain 3. *Biochemistry*. **48**, 3457–3467 (2009).
70. Soh, B. Y. *et al.* Identification of active *Plasmodium falciparum* calpain to establish screening system for Pf-calpain-based drug development. *Malar. J.* **12**, 47 (2013).
71. Bassuk, A. G. *et al.* Structural modeling of a novel CAPN5 mutation that causes uveitis and neovascular retinal detachment. *PLoS ONE* **10**, e0122552 (2015).
72. Moldoveanu, T., Campbell, R. L., Cuerrier, D. & Davies, P. L. Crystal structures of calpain-E64 and -leupeptin inhibitor complexes reveal mobile loops gating the active site. *J. Mol. Biol.* **343**, 1313–1326 (2004).
73. Cuerrier, D., Moldoveanu, T., Inoue, J., Davies, P. L. & Campbell, R. L. Calpain inhibition by α -ketoamide and cyclic hemiacetal inhibitors revealed by X-ray crystallography. *Biochemistry* **45**, 7446–7452 (2006).
74. Cuerrier, D. *et al.* Development of calpain-specific inactivators by screening of positional scanning epoxide libraries. *J. Biol. Chem.* **282**, 9600–9611 (2007).
75. Qian, J. *et al.* Cocrystal structures of primed side-extending α -ketoamide inhibitors reveal novel calpain-inhibitor aromatic interactions. *J. Med. Chem.* **51**, 5264–5270 (2008).
76. Wang, K. K. *et al.* An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 6687–6692 (1996).
77. Lin, G. D. *et al.* Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 539–547 (1997).
78. Deshmukh, L., Wu, L., Guttman, R. P. & Vinogradova, O. NMR structural characterization of the penta-peptide calpain inhibitor. *FEBS Lett.* **583**, 135–140 (2009).
79. Low, K. E., Karunan Partha, S., Davies, P. L. & Campbell, R. L. Allosteric inhibitors of calpains: reevaluating inhibition by PD150606 and LSEAL. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 3367–3373 (2014).
80. Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Lim, D., Jia, Z. & Davies, P. L. Calpain silencing by a reversible intrinsic mechanism. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 371–378 (2003).
81. Davis, T. L. *et al.* The crystal structures of human calpains 1 and 9 imply diverse mechanisms of action and auto-inhibition. *J. Mol. Biol.* **366**, 216–229 (2007).
82. Seo, J. *et al.* Activity-dependent p25 generation regulates synaptic plasticity and β -induced cognitive impairment. *Cell* **157**, 486–498 (2014).
83. Kobayashi, Y. *et al.* Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 α . *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 5548–5552 (1990).
84. Gross, O. *et al.* Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* **36**, 388–400 (2012).
85. Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C. & Eisenman, R. N. Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes α -tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell* **142**, 480–493 (2010).
86. Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., Anderson, S., Brabletz, T. & Eisenman, R. N. Stress-induced cleavage of Myc promotes cancer cell survival. *Genes Dev.* **28**, 689–707 (2014).
87. Anderson, S. *et al.* MYC-nick promotes cell migration by inducing fascin expression and Cdc42 activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, E5481–E5490 (2016).
88. Lek, A. *et al.* Calpains, cleaved mini-dysferlin₇₂₂, and L-type channels underpin calcium-dependent muscle membrane repair. *J. Neurosci.* **33**, 5085–5094 (2013).
89. Redpath, G. M. *et al.* Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3037–3048 (2014).
90. Yan, X. X., Jeromin, A. & Jeromin, A. Spectrin breakdown products (SBDPs) as potential biomarkers for neurodegenerative diseases. *Curr. Transl. Geriatr. Exp. Gerontol. Rep.* **1**, 85–93 (2012).
91. Harris, A. S., Croall, D. E. & Morrow, J. S. The calmodulin-binding site in α -fodrin is near the calcium-dependent protease-I cleavage site. *J. Biol. Chem.* **263**, 15754–15761 (1988).
92. Fukiage, C. *et al.* SJA6017, a newly synthesized peptide aldehyde inhibitor of calpain: amelioration of cataract in cultured rat lenses. *Biochim. Biophys. Acta* **1361**, 304–312 (1997).
93. Ono, Y. *et al.* Functional defects of a muscle-specific calpain, 94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J. Biol. Chem.* **273**, 17073–17078 (1998).
94. Sorimachi, H., Mamitsuka, H. & Ono, Y. Understanding the substrate specificity of conventional calpains. *Biol. Chem.* **393**, 853–871 (2012).
95. Tompa, P. *et al.* On the sequential determinants of calpain cleavage. *J. Biol. Chem.* **279**, 20775–20785 (2004).
96. Cuerrier, D., Moldoveanu, T. & Davies, P. L. Determination of peptide substrate specificity for μ -calpain by a peptide library-based approach: the importance of primed side interactions. *J. Biol. Chem.* **280**, 40632–40641 (2005). **Using a peptide sequencer, determined the substrate amino acid preference of calpain and invented a highly sensitive fluorescent calpain substrate.**
97. Thomas, D. A. *et al.* A broad-spectrum fluorescence-based peptide library for the rapid identification of protease substrates. *Proteomics* **6**, 2112–2120 (2006).
98. Shinkai-Ouchi, F. *et al.* Predictions of cleavability of calpain proteolysis by quantitative structure-activity relationship analysis using newly determined cleavage sites and catalytic efficiencies of an oligopeptide array. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 1262–1280 (2016).
99. Verspurten, J., Gevaert, K., Declercq, W. & Vandenaebroeck, P. SitePredicting the cleavage of proteinase substrates. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 319–323 (2009).
100. Liu, Z. *et al.* GPS-CCD: a novel computational program for the prediction of calpain cleavage sites. *PLoS ONE* **6**, e19001 (2011).
101. Fan, Y. X., Zhang, Y. & Shen, H. B. LabCaS: Labeling calpain substrate cleavage sites from amino acid sequence using conditional random fields. *Proteins* **81**, 622–634 (2013).
102. duVerle, D. A., Ono, Y., Sorimachi, H. & Mamitsuka, H. Calpain cleavage prediction using multiple kernel learning. *PLoS ONE* **6**, e19035 (2011).
103. Spencer, M. J. & Mellgren, R. L. Overexpression of a calpastatin transgene in *mdx* muscle reduces dystrophic pathology. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2645–2655 (2002).
104. Higuchi, M. *et al.* Distinct mechanistic roles of calpain and caspase activation in neurodegeneration as revealed in mice overexpressing their specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* **280**, 15229–15237 (2005).
105. Takano, J. *et al.* Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. *J. Biol. Chem.* **280**, 16175–16184 (2005).
106. Saïdo, T. C., Suzuki, H., Yamazaki, H., Tanoue, K. & Suzuki, K. *In situ* capture of μ -calpain activation in platelets. *J. Biol. Chem.* **268**, 7422–7426 (1993).
107. Saïdo, T. C. *et al.* Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. *J. Biol. Chem.* **268**, 25239–25243 (1993).
108. Taniguchi, S. *et al.* Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett.* **489**, 46–50 (2001).
109. Higuchi, M. *et al.* Mechanistic involvement of the calpain–calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J.* **26**, 1204–1217 (2012).
110. Nilsson, P., Saito, T. & Saïdo, T. C. New mouse model of Alzheimer's. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 499–502 (2014).
111. Saito, T., Matsuba, Y., Yamazaki, N., Hashimoto, S. & Saïdo, T. C. Calpain activation in Alzheimer's model mice is an artifact of APP and presenilin overexpression. *J. Neurosci.* **36**, 9933–9936 (2016).
112. Yokota, M., Saïdo, T. C., Tani, E., Kawashima, S. & Suzuki, K. Three distinct phases of fodrin proteolysis induced in postischemic hippocampus. Involvement of calpain and unidentified protease. *Stroke* **26**, 1901–1907 (1995).
113. Sorimachi, H. & Ono, Y. Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc. Res.* **96**, 11–22 (2012).
114. Kang, M. Y. *et al.* Receptor-independent cardiac protein kinase Ca activation by calpain-mediated truncation of regulatory domains. *Circ. Res.* **107**, 903–912 (2010).
115. Nishida, K., Yamaguchi, O. & Otsu, K. Degradation systems in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **84**, 212–222 (2015).
116. Chen, M., Won, D. J., Krajewski, S. & Gottlieb, R. A. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* **277**, 29181–29186 (2002).
117. Thompson, J., Hu, Y., Lesnfsky, E. J. & Chen, Q. Activation of mitochondrial calpain and increased cardiac injury: beyond AIF release. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **310**, H376–H384 (2016).
118. Mehdi, S. Cell-penetrating inhibitors of calpain. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 150–153 (1991).
119. Khalil, P. N. *et al.* Calpain inhibition reduces infarct size and improves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine myocardial ischemia/reperfusion model. *Eur. J. Pharmacol.* **528**, 124–131 (2005).
120. Wan, F. *et al.* Calpastatin overexpression impairs postinfarct scar healing in mice by compromising reparative immune cell recruitment and activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**, H1883–H1893 (2015).
121. Taneike, M. *et al.* Calpain protects the heart from hemodynamic stress. *J. Biol. Chem.* **286**, 32170–32177 (2011). **Shows that cardiac-specific *Capn1*^{-/-} aggravates fibrosis after transverse aortic constriction.**
122. Mellgren, R. L. *et al.* Calcium-dependent plasma membrane repair requires m- or μ -calpain, but not calpain-3, the proteasome, or caspases. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1886–1893 (2009).

123. Perez, J. *et al.* Calpains released by T lymphocytes cleave TLR2 to control IL-17 expression. *J. Immunol.* **196**, 168–181 (2016).
124. Zhang, S., Meng, T., Liu, J., Zhang, X. & Zhang, J. Cardioprotective effects of dexrazoxane on animal cardiotoxicity model induced by anthracycline combined with trastuzumab is associated with upregulation of calpain-2. *Medicine* **94**, e445 (2015).
125. Spencer, M. J., Croall, D. E. & Tidball, J. G. Calpains are activated in necrotic fibers from *mdx* dystrophic mice. *J. Biol. Chem.* **270**, 10909–10914 (1995).
126. Badalamente, M. A. & Stracher, A. Delay of muscle degeneration and necrosis in *mdx* mice by calpain inhibition. *Muscle Nerve* **23**, 106–111 (2000).
127. Stracher, A., Kesner, L., Barton, N. W. & Carver, T. E. Compounds and kits for treating muscle disorders and methods of use thereof. WIPO patent WO2005124563 (2005).
128. Selsby, J. *et al.* Leupeptin-based inhibitors do not improve the *mdx* phenotype. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R1192–R1201 (2010).
129. Childers, M. K. *et al.* Chronic administration of a leupeptin-derived calpain inhibitor fails to ameliorate severe muscle pathology in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Front. Pharmacol.* **2**, 89 (2011).
130. Hollinger, K. & Selsby, J. T. The physiological response of protease inhibition in dystrophic muscle. *Acta Physiol.* **208**, 234–244 (2013).
131. Wehling-Henricks, M. *et al.* Klotho gene silencing promotes pathology in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddw111> (2016).
132. Manya, H. *et al.* Klotho protein deficiency leads to overactivation of μ -calpain. *J. Biol. Chem.* **277**, 35503–35508 (2002).
133. Nabeshima, Y. *et al.* Calpain 1 inhibitor BDA-410 ameliorates α -klotho-deficiency phenotypes resembling human aging-related syndromes. *Sci. Rep.* **4**, 5847 (2014).
Shows that calpain inhibition by orally administering BDA-410 substantially suppresses ageing-related symptoms caused by *Kl* knockout.
134. David, L. L. & Shearer, T. R. Purification of calpain II from rat lens and determination of endogenous substrates. *Exp. Eye Res.* **42**, 227–238 (1986).
135. Biswas, S., Harris, F., Dennison, S., Singh, J. & Phoenix, D. A. Calpains: targets of cataract prevention? *Trends Mol. Med.* **10**, 78–84 (2004).
136. Liu, K. *et al.* Altered ubiquitin causes perturbed calcium homeostasis, hyperactivation of calpain, dysregulated differentiation, and cataract. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 10711–10716 (2015).
Reveals the connection between calpains and the ubiquitin–proteasome system in cataractogenesis and shows the importance of the K6-conjugated ubiquitin chain.
137. Shearer, T. R., Azuma, M., David, L. L. & Murachi, T. Amelioration of cataracts and proteolysis in cultured lenses by cysteine protease inhibitor E64. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**, 533–540 (1991).
138. Abell, A. D. *et al.* Molecular modeling, synthesis, and biological evaluation of macrocyclic calpain inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 1455–1458 (2009).
139. Morton, J. D. *et al.* A macrocyclic calpain inhibitor slows the development of inherited cortical cataracts in a sheep model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 389–395 (2013).
Reports the synthesis of a small-molecule inhibitor using macrocyclic structures that are markedly specific for calpains. These inhibitors show significant therapeutic effects in a sheep cataract model.
140. Daiger, S. P., Sullivan, L. S. & Bowne, S. J. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin. Genet.* **84**, 132–141 (2013).
141. Shinde, V., Kotla, P., Strang, C. & Gorbatyuk, M. Unfolded protein response-induced dysregulation of calcium homeostasis promotes retinal degeneration in rat models of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Cell Death Dis.* **7**, e2085 (2016).
142. Rodriguez-Muela, N. *et al.* Lysosomal membrane permeabilization and autophagy blockade contribute to photoreceptor cell death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Cell Death Differ.* **22**, 476–487 (2015).
143. Koriyama, Y., Ogai, K., Sugitani, K., Hisano, S. & Kato, S. Geranylgeranylacetone suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell loss in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* **854**, 237–243 (2016).
144. Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G. & Maellaro, E. Calpains and cancer: friends or enemies? *Arch. Biochem. Biophys.* **564**, 26–36 (2014).
145. Raimbourg, O. *et al.* The calpain/calpastatin system has opposing roles in growth and metastatic dissemination of melanoma. *PLoS ONE* **8**, e60469 (2013).
146. Wu, Q., Dhir, R. & Wells, A. Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion. *Mol. Cancer* **11**, 3 (2012).
147. Miyazaki, T. *et al.* Calpastatin counteracts pathological angiogenesis by inhibiting suppressor of cytokine signaling 3 degradation in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* **116**, 1170–1181 (2015).
Shows the involvement of calpains in pathological angiogenesis in tumours and in ischaemic retinopathy, which are suppressed by the transgenic expression of CAST.
148. Libertini, S. J. *et al.* Evidence for calpain-mediated androgen receptor cleavage as a mechanism for androgen independence. *Cancer Res.* **67**, 9001–9005 (2007).
149. Kulkarni, S. *et al.* Calpain regulates sensitivity to trastuzumab and survival in HER2-positive breast cancer. *Oncogene* **29**, 1539–1550 (2010).
150. Fang, J. *et al.* A calcium- and calpain-dependent pathway determines the response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *Nat. Med.* **22**, 727–734 (2016).
151. Pan, B. & Lentzsch, S. The application and biology of immunomodulatory drugs (IMiDs) in cancer. *Pharmacol. Ther.* **136**, 56–68 (2012).
152. Weeraratna, A. T. *et al.* Generation and analysis of melanoma SAGE libraries: SAGE advice on the melanoma transcriptome. *Oncogene* **23**, 2264–2274 (2004).
153. Gollub, J. A., Sciambi, C. J., Huang, Z. & Dressman, H. K. Gene expression changes and signaling events associated with the direct anti-melanoma effect of IFN- γ . *Cancer Res.* **65**, 8869–8877 (2005).
154. Roperto, S. *et al.* Calpain3 is expressed in a proteolytically active form in papillomavirus-associated urothelial tumors of the urinary bladder in cattle. *PLoS ONE* **5**, e10299 (2010).
155. Moretti, D. *et al.* Calpain-3 impairs cell proliferation and stimulates oxidative stress-mediated cell death in melanoma cells. *PLoS ONE* **10**, e0117258 (2015).
156. Liu, K., Li, L. & Cohen, S. N. Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 31093–31098 (2000).
157. Yoshikawa, Y., Mukai, H., Hino, F., Asada, K. & Kato, I. Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer. *Jpn J. Cancer Res.* **91**, 459–463 (2000).
158. Vaish, V. & Sanyal, S. N. Role of sulindac and celecoxib in chemoprevention of colorectal cancer via intrinsic pathway of apoptosis: exploring NHE-1, intracellular calcium homeostasis and calpain 9. *Biomed. Pharmacother.* **66**, 116–130 (2012).
159. Peng, P. *et al.* Decreased expression of calpain-9 predicts unfavorable prognosis in patients with gastric cancer. *Sci. Rep.* **6**, 29604 (2016).
160. Del Bello, B., Toscano, M., Moretti, D. & Maellaro, E. Cisplatin-induced apoptosis inhibits autophagy, which acts as a pro-survival mechanism in human melanoma cells. *PLoS ONE* **8**, e57236 (2013).
161. Richard, I. *et al.* Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated IkB α /NF κ B pathway perturbation in mice. *J. Cell Biol.* **151**, 1583–1590 (2000).
162. Fanin, M. & Angelini, C. Protein and genetic diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A: the yield and the pitfalls. *Muscle Nerve* **52**, 163–173 (2015).
163. Kramerova, I. *et al.* Novel role of calpain-3 in the triad-associated protein complex regulating calcium release in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3271–3280 (2008).
164. Ojima, K. *et al.* Non-proteolytic functions of calpain-3 in sarcoplasmic reticulum in skeletal muscles. *J. Mol. Biol.* **407**, 439–449 (2011).
165. Franz, T., Winckler, L., Boehm, T. & Dear, T. N. *Capn3* is expressed in a subset of T cells and is dispensable for development. *Mol. Cell Biol.* **24**, 1649–1654 (2004).
166. Singh, R. *et al.* Calpain 5 is highly expressed in the central nervous system (CNS), carries dual nuclear localization signals, and is associated with nuclear promyelocytic leukemia protein bodies. *J. Biol. Chem.* **289**, 19383–19394 (2014).
167. Wert, K. J. *et al.* *CAPN5* mutation in hereditary uveitis: the R243L mutation increases calpain catalytic activity and triggers intraocular inflammation in a mouse model. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 4584–4598 (2015).
168. Davis, B. P. *et al.* Eosinophilic esophagitis-linked calpain 14 is an IL-13-induced protease that mediates esophageal epithelial barrier impairment. *JCI Insight* **1**, e86355 (2016).
169. Wang, Y., Briz, V., Chishti, A., Bi, X. & Baudry, M. Distinct roles for μ -calpain and m-calpain in synaptic NMDAR-mediated neuroprotection and extrasynaptic NMDAR-mediated neurodegeneration. *J. Neurosci.* **33**, 18880–18892 (2013).
170. Forman, O. P., De Riso, L. & Mellersh, C. S. Missense mutation in *CAPN1* is associated with spinocerebellar ataxia in the Parson Russell Terrier dog breed. *PLoS ONE* **8**, e64627 (2013).
171. Wang, Y. *et al.* Defects in the *CAPN1* gene result in alterations in cerebellar development and cerebellar ataxia in mice and humans. *Cell Rep.* **16**, 79–91 (2016).
172. Berthier, D. *et al.* Tolerance to trypanosomatids: a threat, or a key for disease elimination? *Trends Parasitol.* **32**, 157–168 (2016).
173. Marinho, F. A. *et al.* The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *PLoS ONE* **9**, e87659 (2014).
174. Cai, P., Gobert, G. N., You, H. & McManus, D. P. The Tao survivorship of schistosomes: implications for schistosomiasis control. *Int. J. Parasitol.* **46**, 453–463 (2016).
175. Hotez, P. J. *et al.* Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0003895 (2016).
176. Tuteja, R. Malaria – an overview. *FEBS J.* **274**, 4670–4679 (2007).
177. Rosenthal, P. J. Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites. *Adv. Exp. Med. Biol.* **712**, 30–48 (2011).
178. Russo, I., Oksman, A., Vaupel, B. & Goldberg, D. E. A calpain unique to alveolates is essential in *Plasmodium falciparum* and its knockdown reveals an involvement in pre-S-phase development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 1554–1559 (2009).
179. Hanspal, M., Goel, V. K., Oh, S. S. & Chishti, A. H. Erythrocyte calpain is dispensable for malaria parasite invasion and growth. *Mol. Biochem. Parasitol.* **122**, 227–229 (2002).
180. Hayes, P. *et al.* Modulation of a cytoskeletal calpain-like protein induces major transitions in trypanosome morphology. *J. Cell Biol.* **206**, 377–384 (2014).
Elucidates the physiological functions of ClpGM6, one of 18 calpains in *T. brucei*, and shows that ClpGM6 is a promising therapeutic target for trypanosomiasis.
181. Li, M., Martin, S. J., Bruno, V. M., Mitchell, A. P. & Davis, D. A. *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot. Cell* **3**, 741–751 (2004).
182. Ost, K. S., O'Meara, T. R., Huda, N., Esher, S. K. & Alspaugh, J. A. The *Cryptococcus neoformans* alkaline response pathway: identification of a novel Rim pathway activator. *PLoS Genet.* **11**, e1005159 (2015).
183. Futai, E. *et al.* The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 559–568 (1999).
184. Denison, S. H., Orejas, M. & Arst, H. N. Jr. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* **270**, 28519–28522 (1995).
185. Ali, M. A., Stepanko, A., Fan, X., Holt, A. & Schulz, R. Calpain inhibitors exhibit matrix metalloproteinase-2 inhibitory activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 1–5 (2012).
186. Vondracek, P. *et al.* in *Focus on Birth Defects Research* (ed. Engels, J. V.) 161–183 (Nova Science Publishers, 2006).
187. Krantz, A. Proteases in inflammation. *Ann. Rep. Med. Chem.* **28**, 187–196 (1993).
188. Low, K. E. *et al.* Rational design of calpain inhibitors based on calpastatin peptidomimetics. *J. Med. Chem.* **59**, 5403–5415 (2016).
189. Koshland, D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **44**, 98–104 (1958).
190. Chen, H. *et al.* New tripeptide-based macrocyclic calpain inhibitors formed by N-alkylation of histidine. *Chem. Biodivers.* **9**, 2473–2484 (2012).
191. Jones, S. A. *et al.* A template-based approach to inhibitors of calpain 2, 20S proteasome, and HIV-1 protease. *ChemMedChem* **8**, 1918–1921 (2013).

192. Jo, H. *et al.* Development of α -helical calpain probes by mimicking a natural protein–protein interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17704–17713 (2012). **Uses the 3D structure of the CAPN2–CAST complex to develop calpain inhibitors with a CAST-derived α -helix fixed by a linker group, achieving high specificity for calpain.**
193. Ozaki, T., Nakazawa, M., Yamashita, T. & Ishiguro, S. Delivery of topically applied calpain inhibitory peptide to the posterior segment of the rat eye. *PLoS ONE* **10**, e0130986 (2015).
194. Ozaki, T. *et al.* Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1783–1795 (2012).
195. Adams, S. E. *et al.* Conformationally restricted calpain inhibitors. *Chem. Sci.* **6**, 6865–6871 (2015).
196. Novinec, M. *et al.* A novel allosteric mechanism in the cysteine peptidase cathepsin K discovered by computational methods. *Nat. Commun.* **5**, 3287 (2014).
197. Donkor, I. O. An updated patent review of calpain inhibitors (2012–2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* **25**, 17–31 (2015). **A comprehensive and clear review of recent progress in the structures and properties of calpain inhibitors.**
198. Siklos, M., BenAissa, M. & Thatcher, G. R. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm. Sin.* **35**, 506–519 (2015).
199. Lubisch, W. *et al.* Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability. *J. Med. Chem.* **46**, 2404–2412 (2003).
200. Trumbeckaite, S., Neuhof, C., Zierz, S. & Gellerich, F. N. Calpain inhibitor [BSF 409425] diminishes ischemial reperfusion-induced damage of rabbit heart mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 911–916 (2003).
201. Froestl, W., Muhs, A. & Pfeifer, A. Cognitive enhancers (nootropics). Part 2: drugs interacting with enzymes. Update 2014. *J. Alzheimers Dis.* **42**, 1–68 (2014).
202. Mack, H. *et al.* Carboxamide compounds and their use as calpain inhibitors. US patent US8283363 (2012).
203. Kling, A. *et al.* Carboxamide compounds and their use as calpain inhibitors. US patent US8906941 (2014).
204. Bordet, T. *et al.* Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **322**, 709–720 (2007).
205. Iascone, D. M., Henderson, C. E. & Lee, J. C. Spinal muscular atrophy: from tissue specificity to therapeutic strategies. *F1000Prime Rep.* **7**, 04 (2015).
206. Zanetta, C. *et al.* Molecular therapeutic strategies for spinal muscular atrophies: current and future clinical trials. *Clin. Ther.* **36**, 128–140 (2014).
207. Magalon, K. *et al.* Olesoxime accelerates myelination and promotes repair in models of demyelination. *Ann. Neurol.* **71**, 213–226 (2012).
208. Weber, J. J., Ortiz Rios, M. M., Riess, O., Clemens, L. E. & Nguyen, H. P. The calpain-suppressing effects of olesoxime in Huntington's disease. *Rare Dis.* **4**, e1153778 (2016).
209. Clemens, L. E. *et al.* Olesoxime suppresses calpain activation and mutant huntingtin fragmentation in the BACHD rat. *Brain* **138**, 3632–3653 (2015).
210. Gouarne, C. *et al.* Olesoxime protects embryonic cortical neurons from camptothecin intoxication by a mechanism distinct from BDNF. *Br. J. Pharmacol.* **168**, 1975–1988 (2013).
211. Lenglet, T. *et al.* A phase II/III trial of olesoxime in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **21**, 529–536 (2014).
212. Walker, M. P. *et al.* SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3399–3410 (2008).
213. Stefanese, R. *et al.* Role of calpain-1 in the early phase of experimental ALS. *Arch. Biochem. Biophys.* **562**, 1–8 (2014).
214. Stracher, A., Kesner, L., Carver, T. E. & Barton, N. W. Compounds for treating neurologic diseases, otologic diseases, or ophthalmologic diseases and methods of use thereof. US patent US20080200399 (2005).
215. Stracher, A., Kesner, L. & Shulman, A. Targeted delivery of pharmaceutical compounds. US patent US8729024 (2007).
216. Dugue, R. *et al.* The effect of the novel blood–brain barrier permeable calpain inhibitor Ala-1.0 in a rat model of traumatic brain injury (Poster). *Neurology* **86**, P3.286 (2016).
217. Hassen, G. W., Feliberti, J., Kesner, L., Stracher, A. & Mokhtarian, F. Prevention of axonal injury using calpain inhibitor in chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* **1236**, 206–215 (2008).
218. David, J. *et al.* A novel calpain inhibitor for treatment of transient retinal ischemia in the rat. *Neuroreport* **22**, 633–636 (2011).
219. El Chamy Maluf, S. *et al.* Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of *P. falciparum* calcium-dependent cysteine proteases. *Parasitol. Int.* **65**, 20–22 (2016).
220. De Franceschi, L. *et al.* Pharmacological inhibition of calpain-1 prevents red cell dehydration and reduces gardos channel activity in a mouse model of sickle cell disease. *FASEB J.* **27**, 750–759 (2013).
221. Wieschhaus, A. *et al.* Calpain-1 knockout reveals broad effects on erythrocyte deformability and physiology. *Biochem. J.* **448**, 141–152 (2012).
222. Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C. & Breard, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 852–859 (2004).
223. Galetovic, A. *et al.* The repetitive cytoskeletal protein H49 of *Trypanosoma cruzi* is a calpain-like protein located at the flagellum attachment zone. *PLoS ONE* **6**, e27634 (2011).
224. Andresen, K., Tom, T. D. & Strand, M. Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **266**, 15085–15090 (1991).
225. Karmakar, S. *et al.* Cross-species protection: *Schistosoma mansoni* Sm-p80 vaccine confers protection against *Schistosoma haematobium* in hamsters and baboons. *Vaccine* **32**, 1296–1303 (2014).
226. Zhang, W. *et al.* Longevity of Sm-p80-specific antibody responses following vaccination with Sm-p80 vaccine in mice and baboons and transplacental transfer of Sm-p80-specific antibodies in a baboon. *Parasitol. Res.* **113**, 2239–2250 (2014).
227. Maemoto, Y. *et al.* Involvement of calpain-7 in epidermal growth factor receptor degradation via the endosomal sorting pathway. *FEBS J.* **281**, 3642–3655 (2014).
228. Andree, M. *et al.* BID-dependent release of mitochondrial SMAC dampens XIAP-mediated immunity against *Shigella*. *EMBO J.* **33**, 2171–2187 (2014).
229. Ono, Y. *et al.* Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na⁺-dependent protease. *J. Biol. Chem.* **285**, 22986–22998 (2010).
230. Hotta, A. & Yamanaka, S. From genomics to gene therapy: induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Annu. Rev. Genet.* **49**, 47–70 (2015).
231. Li, H. L. *et al.* Precise correction of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Rep.* **4**, 143–154 (2015).
232. Ono, Y. *et al.* The N- and C-terminal autolytic fragments of CAPN3/p94/calpain-3 restore proteolytic activity by intermolecular complementation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E5527–E5536 (2014). **Describes the unique characteristic of CAPN3, the iMOC of its proteolytic activity, previously lost by autolysis. This is the first example of this mechanism in a bacterial and eukaryotic protease and is interesting in view of a gene therapy approach for LGMD2A.**
233. Loveland, A. N., Chan, C. K., Brignole, E. J. & Gibson, W. Cleavage of human cytomegalovirus protease pUL80a at internal and cryptic sites is not essential but enhances infectivity. *J. Virol.* **79**, 12961–12968 (2005).
234. Saenz, A. *et al.* Does the severity of the LGMD2A phenotype in compound heterozygotes depend on the combination of mutations? *Muscle Nerve* **44**, 710–714 (2011).
235. Ermolova, N. *et al.* Pathogeny of some limb girdle muscular dystrophy mutations can result from reduced anchorage to myofibrils and altered stability of calpain 3. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3331–3345 (2011).
236. Piluso, G. *et al.* Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes. *J. Med. Genet.* **42**, 686–693 (2005).
237. De Cid, R. *et al.* A new titinopathy: childhood-juvenile onset Emery–Dreifuss-like phenotype without cardiomyopathy. *Neurology* **85**, 2126–2135 (2015).
238. Mendell, J. R. *et al.* A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for Becker muscular dystrophy. *Mol. Ther.* **23**, 192–201 (2015).
239. Bartoli, M. *et al.* AAV-mediated delivery of a mutated myostatin propeptide ameliorates calpain 3 but not α -sarcoglycan deficiency. *Gene Ther.* **14**, 733–740 (2007).
240. Tonami, K. *et al.* Calpain-6 deficiency promotes skeletal muscle development and regeneration. *PLoS Genet.* **9**, e1003668 (2013).
241. McPherron, A. C., Lawler, A. M. & Lee, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* **387**, 83–90 (1997).
242. Lamar, K. M. *et al.* Overexpression of latent TGF β binding protein 4 in muscle ameliorates muscular dystrophy through myostatin and TGF β . *PLoS Genet.* **12**, e1006019 (2016).
243. Cotten, S. W. *et al.* Genetic myostatin decrease in the golden retriever muscular dystrophy model does not significantly affect the ubiquitin proteasome system despite enhancing the severity of disease. *Am. J. Transl. Res.* **6**, 43–53 (2013).
244. Kumar, V., Everingham, S., Hall, C., Greer, P. A. & Craig, A. W. Calpains promote neutrophil recruitment and bacterial clearance in an acute bacterial peritonitis model. *Eur. J. Immunol.* **44**, 831–841 (2014).
245. Elagib, K. E. *et al.* Calpain 2 activation of P-TEFb drives megakaryocyte morphogenesis and is disrupted by leukemogenic GATA1 mutation. *Dev. Cell* **27**, 607–620 (2013).
246. Kaneko, Y., Murphy, C. R. & Day, M. L. Calpain 2 activity increases at the time of implantation in rat uterine luminal epithelial cells and administration of calpain inhibitor significantly reduces implantation sites. *Histochem. Cell Biol.* **141**, 423–430 (2014). **An impressive study showing that calpain inhibition by ALLNal significantly reduces the number of uterine implantation sites. Calpains have essential roles in the placenta and the use of calpain inhibitors during pregnancy may carry serious risks.**
247. Duong, L. T., Leung, A. T. & Langdahl, B. Cathepsin K inhibition: a new mechanism for the treatment of osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* **98**, 381–397 (2016).
248. Katunuma, N. Structure-based development of specific inhibitors for individual cathepsins and their medical applications. *Proc. Jpn Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **87**, 29–39 (2011).
249. Brocard, C. *et al.* Cleavage of Na⁺ channels by calpain increases persistent Na⁺ current and promotes spasticity after spinal cord injury. *Nat. Med.* **22**, 404–411 (2016). **The ameliorating effect of the calpain inhibitor MDL28170 for spasms resulting from spinal cord injury, was shown to be comparable to that of riluzole. The use of MDL28170 with riluzole had an additive effect.**
250. Drag, M. & Salvesen, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 690–701 (2010).
251. Horikawa, Y. *et al.* Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* **26**, 163–175 (2000).
252. Panico, P., Salazar, A. M., Burns, A. L. & Ostrosky-Wegman, P. Role of calpain-10 in the development of diabetes mellitus and its complications. *Arch. Med. Res.* **45**, 103–115 (2014).
253. Hata, S., Doi, N., Kitamura, F. & Sorimachi, H. Stomach-specific calpain, nCL2/calpain 8, is active without calpain regulatory subunit and oligomerizes through C2-like domains. *J. Biol. Chem.* **282**, 27847–27856 (2007).
254. Ono, Y. *et al.* Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, 94/calpain 3. *J. Biol. Chem.* **279**, 2761–2771 (2004).
255. Hata, S. *et al.* Domain II of m-calpain is a Ca²⁺-dependent cysteine protease. *FEBS Lett.* **501**, 111–114 (2001).
256. Moldoveanu, T. *et al.* A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain. *Cell* **108**, 649–660 (2002).
257. Hata, A., Ohno, S. & Suzuki, K. Transcriptional activation of the gene for the large subunit of human m-calpain by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *FEBS Lett.* **304**, 241–244 (1992).
258. Santos, D. M., Xavier, J. M., Morgado, A. L., Sol \ddot{a} , S. & Rodrigues, C. M. Distinct regulatory functions of calpain 1 and 2 during neural stem cell self-renewal and differentiation. *PLoS ONE* **7**, e33468 (2012).
259. Prangsaengtong, O. *et al.* Calpain 1 and -2 play opposite roles in cord formation of lymphatic endothelial cells via eNOS regulation. *Hum. Cell* **25**, 36–44 (2012).
260. Wang, Y. *et al.* Calpain-1 and calpain-2 play opposite roles in retinal ganglion cell degeneration induced by retinal ischemia/reperfusion injury. *Neurobiol. Dis.* **93**, 121–128 (2016).

261. Wang, Y. *et al.* A molecular brake controls the magnitude of long-term potentiation. *Nat. Commun.* **5**, 3051 (2014).
262. Li, Z. *et al.* Novel peptidyl α -keto amide inhibitors of calpains and other cysteine proteases. *J. Med. Chem.* **39**, 4089–4098 (1996).
263. Zimmerman, U. J., Boring, L., Pak, J. H., Mukerjee, N. & Wang, K. K. The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality. *IUBMB Life* **50**, 63–68 (2000).
264. Kramerova, I., Kudryashova, E., Tidball, J. G. & Spencer, M. J. Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation *in vivo* and *in vitro*. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1373–1388 (2004).
265. Ojima, K. *et al.* Dynamic distribution of muscle-specific calpain in mice has a key role in physical-stress adaptation and is impaired in muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **120**, 2672–2683 (2010).
266. Bochner, R. *et al.* Calpain 12 function revealed through the study of an atypical case of autosomal recessive congenital ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.043> (2016).
267. Sebe, J. Y., Bershteyn, M., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris, A. & Baraban, S. C. ALLN rescues an *in vitro* excitatory synaptic transmission deficit in *Lis1* mutant mice. *J. Neurophysiol.* **109**, 429–436 (2013).
268. Mizukoshi, S. *et al.* Activation of mitochondrial calpain and release of apoptosis-inducing factor from mitochondria in RCS rat retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* **91**, 353–361 (2010).
269. Chen, Y. *et al.* Estrogen and pure antiestrogen fulvestrant (ICI 182 780) augment cell-matrigel adhesion of MCF-7 breast cancer cells through a novel G protein coupled estrogen receptor (GPR30)-to-calpain signaling axis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **275**, 176–181 (2014).
270. Samantaray, S. *et al.* Inhibition of calpain activation protects MPTP-induced nigral and spinal cord neurodegeneration, reduces inflammation, and improves gait dynamics in mice. *Mol. Neurobiol.* **52**, 1054–1066 (2015).
271. Guyton, M. K. *et al.* Calpeptin attenuated inflammation, cell death, and axonal damage in animal model of multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* **88**, 2398–2408 (2010).
272. Das, A. *et al.* Calpain inhibitor attenuated optic nerve damage in acute optic neuritis in rats. *J. Neurochem.* **124**, 133–146 (2013).
273. Nozaki, K., Das, A., Ray, S. K. & Banik, N. L. Calpeptin attenuated apoptosis and intracellular inflammatory changes in muscle cells. *J. Neurosci. Res.* **89**, 536–543 (2011).
274. Tabata, C., Tabata, R. & Nakano, T. The calpain inhibitor calpeptin prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **162**, 560–567 (2010).
275. Guo, A. *et al.* Molecular determinants of calpain-dependent cleavage of junctophilin-2 protein in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **290**, 17946–17955 (2015).
276. Undrovinas, A., Maltsev, V. A. & Sabbah, H. N. Calpain inhibition reduces amplitude and accelerates decay of the late sodium current in ventricular myocytes from dogs with chronic heart failure. *PLoS ONE* **8**, e54436 (2013).
277. Ennes-Vidal, V., Menna-Barreto, R. F., Santos, A. L., Branquinha, M. H. & d'Ávila-Levy, C. M. MDL28170, a calpain inhibitor, affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS ONE* **6**, e18371 (2011).
278. Huang, Q. *et al.* Reduced synctin-1 expression in choriocarcinoma BeWo cells activates the calpain1-AIF-mediated apoptosis, implication for preeclampsia. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3151–3164 (2014).
279. Paquet-Durand, F. *et al.* Photoreceptor rescue and toxicity induced by different calpain inhibitors. *J. Neurochem.* **115**, 930–940 (2010).
280. Suzuki, R., Oka, T., Tamada, Y., Shearer, T. R. & Azuma, M. Degeneration and dysfunction of retinal neurons in acute ocular hypertensive rats: involvement of calpains. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **30**, 419–428 (2014).
281. Takeshita, D. *et al.* A new calpain inhibitor protects left ventricular dysfunction induced by mild ischemia–reperfusion in *in situ* rat hearts. *J. Physiol. Sci.* **63**, 113–123 (2013).
282. Bains, M. *et al.* Pharmacological analysis of the cortical neuronal cytoskeletal protective efficacy of the calpain inhibitor SNJ-1945 in a mouse traumatic brain injury model. *J. Neurochem.* **125**, 125–132 (2012).
283. Simoes, A. T., Goncalves, N., Nobre, R. J., Duarte, C. B. & Pereira de Almeida, L. Calpain inhibition reduces ataxin-3 cleavage alleviating neuropathology and motor impairments in mouse models of Machado–Joseph disease. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4932–4944 (2014).
284. Nimrich, V. *et al.* Inhibition of calpain prevents NMDA-induced cell death and beta-amyloid-induced synaptic dysfunction in hippocampal slice cultures. *Br. J. Pharmacol.* **159**, 1525–1531 (2010).
285. Vengeliene, V. *et al.* The calpain inhibitor A-705253 attenuates alcohol-seeking and relapse with low side-effect profile. *Neuropsychopharmacology* **41**, 979–988 (2016).
286. Ozaki, T. *et al.* Inhibitory peptide of mitochondrial μ -calpain protects against photoreceptor degeneration in rhodopsin transgenic S334ter and P23H rats. *PLoS ONE* **8**, e71650 (2013).
287. Mallik, S. K. *et al.* Synthesis and evaluation of peptidyl α , β -unsaturated carbonyl derivatives as anti-malarial calpain inhibitors. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 469–479 (2012).
288. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02220738> (2016).
289. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02573740> (2016).
290. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01808885> (2014).
291. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02628743> (2016).
292. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01285583> (2013).
293. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00868166> (2012).
294. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov* <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02496975> (2015).
295. Wang, M. S. *et al.* Calpain inhibition protects against Taxol-induced sensory neuropathy. *Brain* **127**, 671–679 (2004).
296. Frederick, J. R. *et al.* Neuroprotection with delayed calpain inhibition after transient forebrain ischemia. *Crit. Care Med.* **36**, S481–S485 (2008).
297. Schumacher, P. A., Siman, R. G. & Fehlings, M. G. Pretreatment with calpain inhibitor CEP-4143 inhibits calpain I activation and cytoskeletal degradation, improves neurological function, and enhances axonal survival after traumatic spinal cord injury. *J. Neurochem.* **74**, 1646–1655 (2000).
298. Lu, S. *et al.* A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E5292–E5301 (2014).
299. Sandmann, S., Prenzel, F., Shaw, L., Schauer, R. & Unger, T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium — influence of the calpain inhibitor CAL 9961. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 1951–1958 (2002).
300. Bartoli, M. *et al.* Safety and efficacy of AAV-mediated calpain 3 gene transfer in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Mol. Ther.* **13**, 250–259 (2006).
301. Siddiqui, A. A. *et al.* Characterization of the immune response to DNA vaccination strategies for schistosomiasis candidate antigen, Sm-p80 in the baboon. *Vaccine* **23**, 1451–1456 (2005).

Acknowledgements

The authors thank all of the laboratory members for their invaluable support. Y. Ogata for thoroughly surveying the clinical trial studies of calpain-related agents, S. Ishiura for valuable advice on early clinical studies of calpain inhibitors, and L. Miglietta and G. Gray for their excellent English editing. This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) (JP25440059 to Y.O. and JP15H02389 to H.S.), Open Partnership Joint Projects of the JSPS Bilateral Joint Research Projects (to H.S.), a Takeda Science Foundation research grant (to Y.O. and H.S.), the Council for Science, Technology and Innovation's Strategic Innovation Promotion Programme "Technologies for creating next-generation agriculture, forestry, and fisheries" (funded by BTRAI-NARO to H.S.), and a research grant of The Naito Foundation (to H.S.).

Competing interests statement

The authors declare no competing interests.

DATABASES

MEROPS: <http://merops.sanger.ac.uk>
RCSB Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb>

FURTHER INFORMATION

Joint Genome Institute: MycoCosm: <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>
Leiden Muscular Dystrophy: Calpain-3 (CAPN3): www.dmd.nl/capn3_home.html

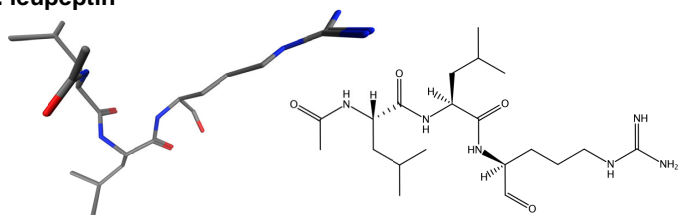
SUPPLEMENTARY INFORMATION

See online article: S1 (figure) | S2 (table)

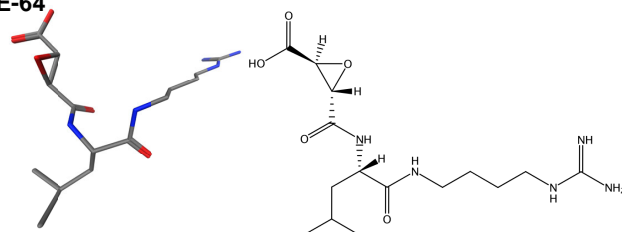
ALL LINKS ARE ACTIVE IN THE ONLINE PDF

Supplementary Figure 1. Calpain inhibitors and related molecules

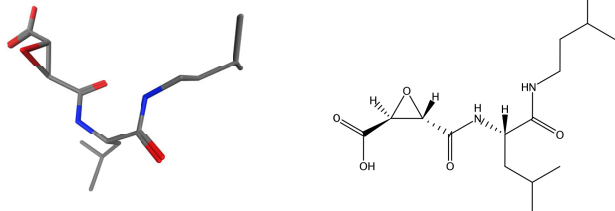
1. leupeptin



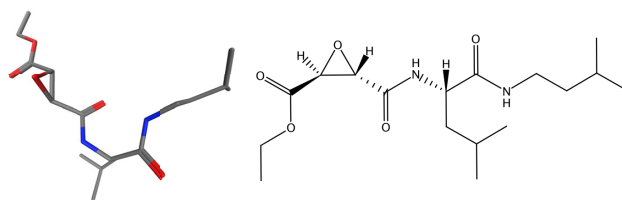
2. E-64



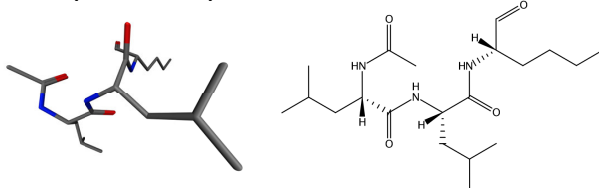
3. E-64c



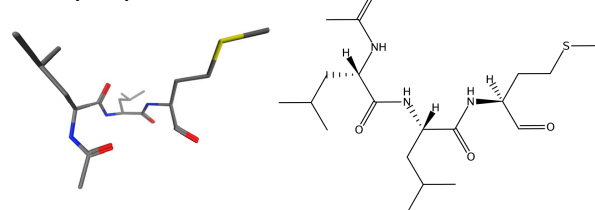
4. E-64d (loxistatin)



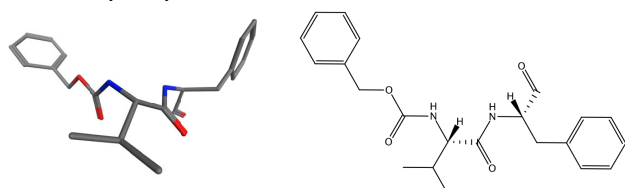
5. ALLNal (CI-I, MG101)



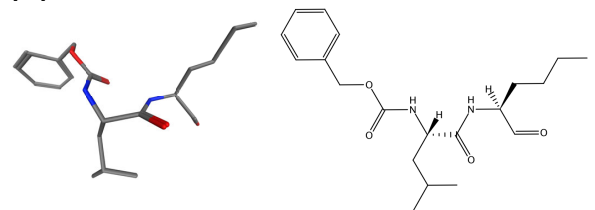
6. ALLMal (CI-II)



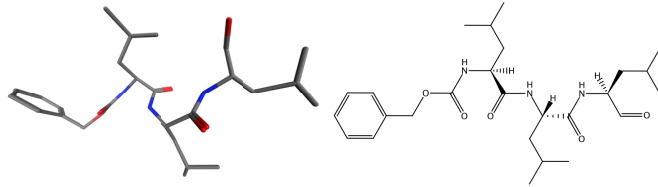
7. MDL28170 (CI-III)



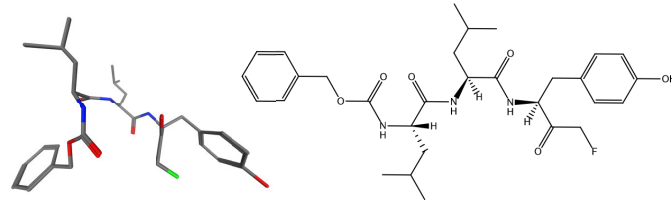
8. calpeptin



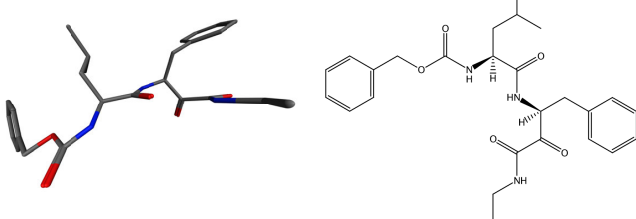
9. MG132



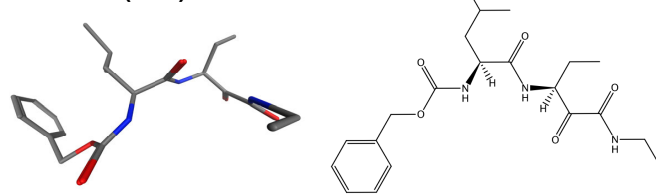
10. CI-IV



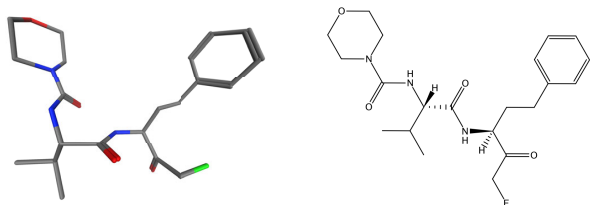
11. AK269



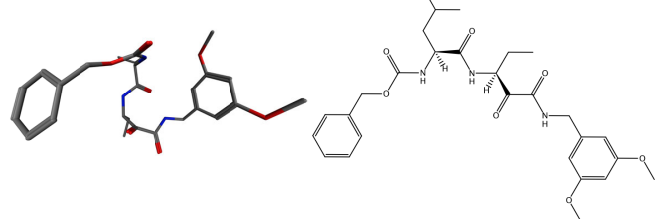
12. AK275 (CI-X)



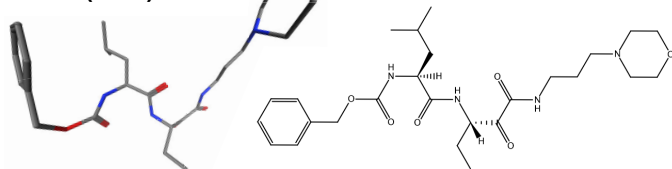
13. CI-V



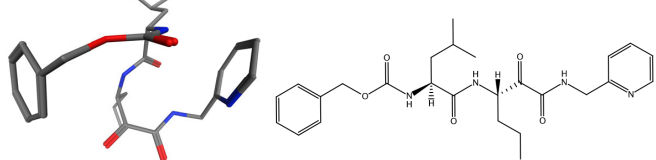
14. mCalp-I (No.18)



15. AK295 (CI-XI)



16. CI-XII

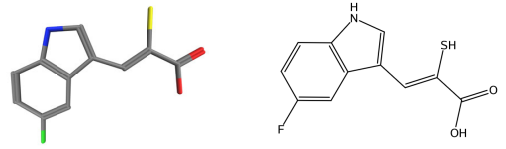


Supplementary Figure 1 (continued)

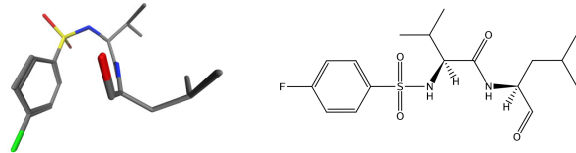
17. PD150606



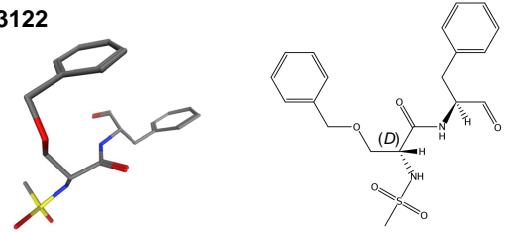
18. PD151746



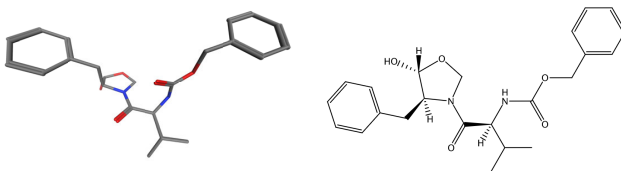
19. SJA6017 (CI-VI)



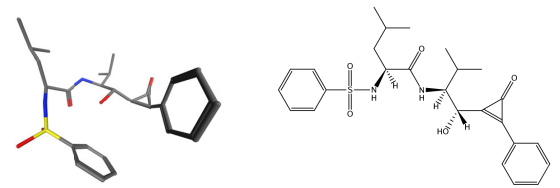
20. CEP-3122



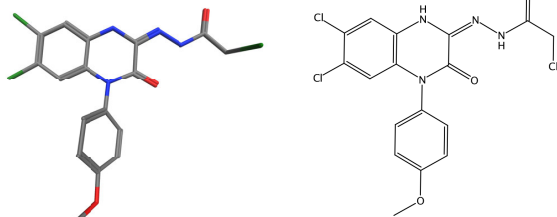
21. MDL104903



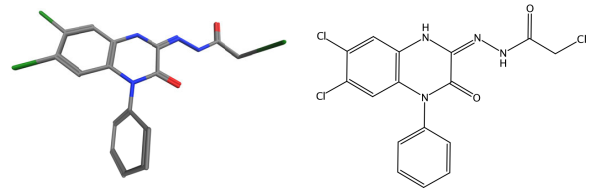
22. BDA-410



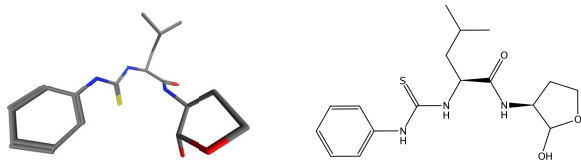
23. SJA7019



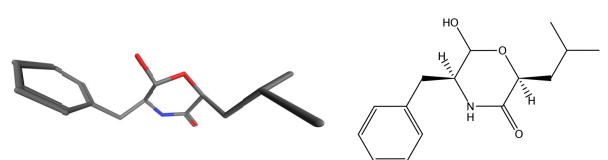
24. SJA7029



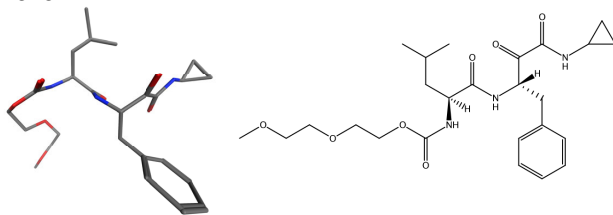
25. SNJ1715



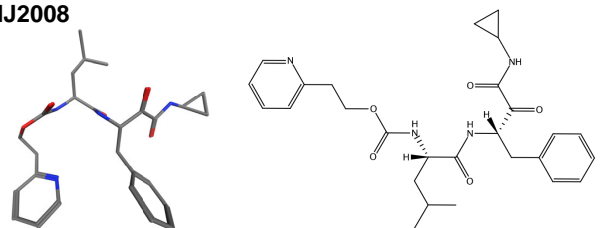
26. SNJ1757



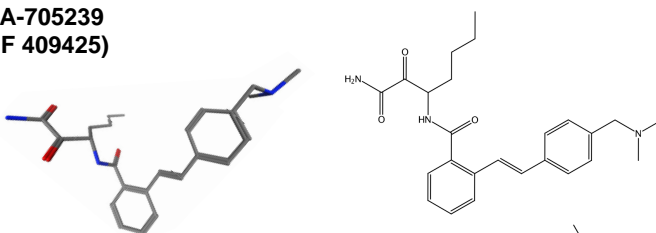
27. SNJ1945



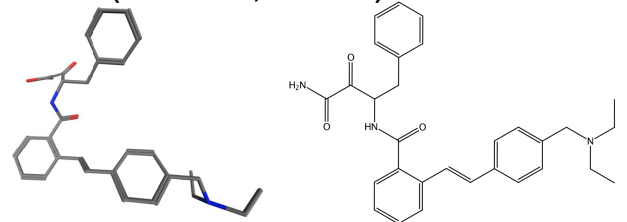
28. SNJ2008



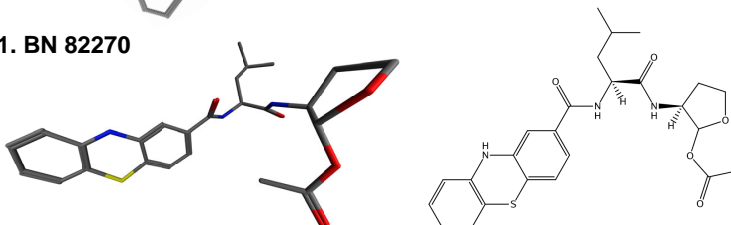
29. A-705239
(BSF 409425)



30. A-705253 (BSF 419961, CAL 9961)

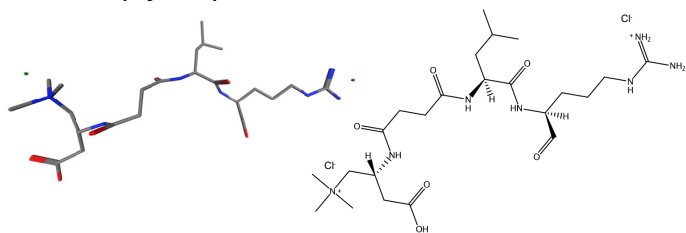


31. BN 82270

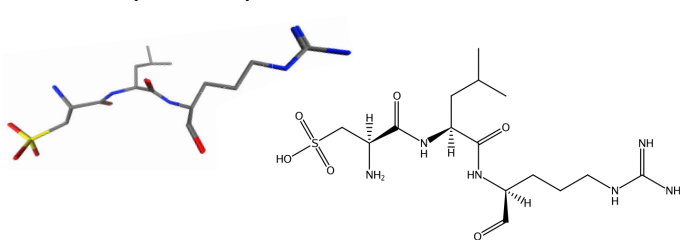


Supplementary Figure 1 (continued)

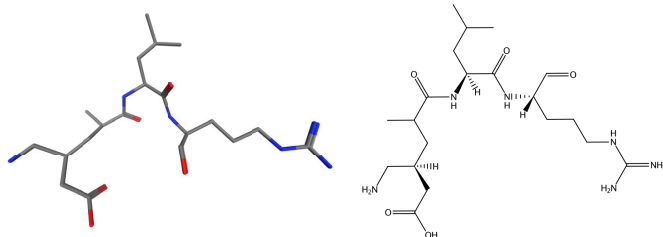
32. C-101 (Myodur)



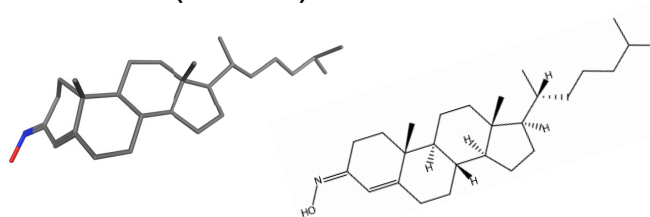
33. C-201 (Neurodur)



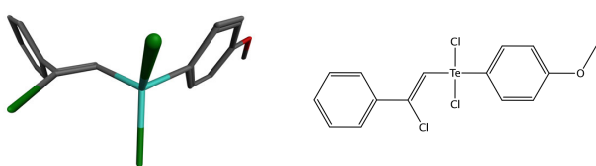
34. GABA_Adur



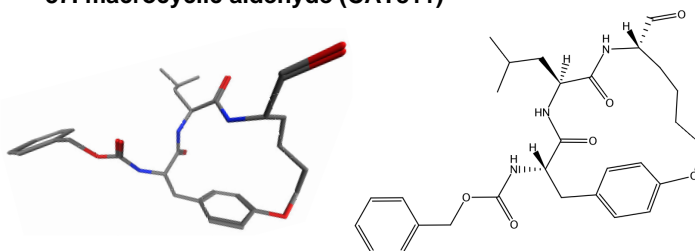
35. olesoxime (TRO19622)



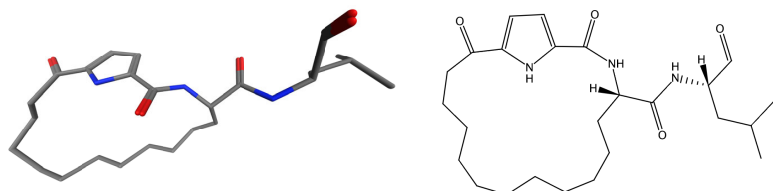
36. hypervalent organotellurium compound (No.11, RF19)



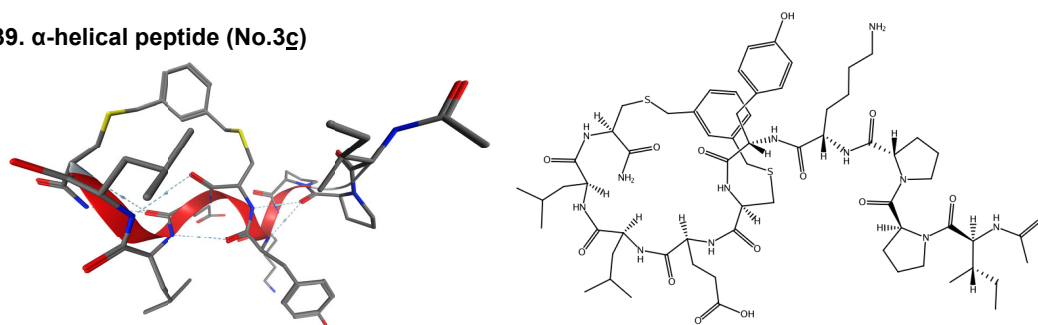
37. macrocyclic aldehyde (CAT811)



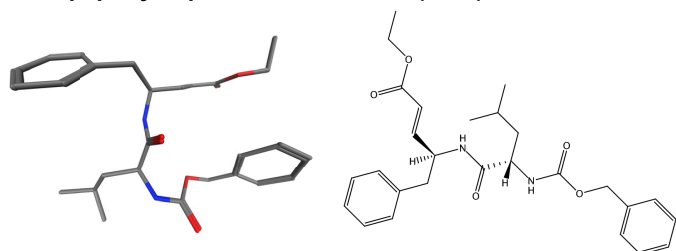
38. indole-containing 18-membered aldehyde (No. 1c)



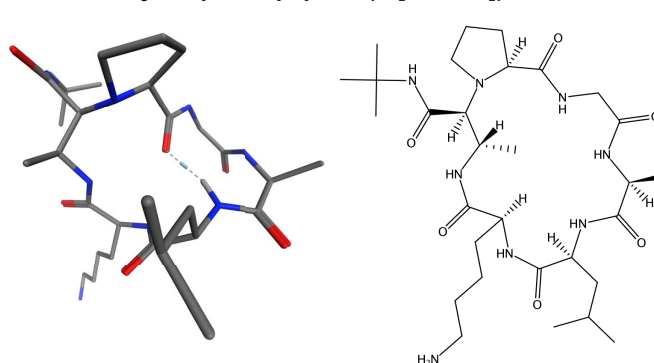
39. α -helical peptide (No.3c)



40. dipeptidyl α,β -unsaturated ester (No.8)



41. macrocyclic β -turn peptide (c*[PGALK])



Supplementary figure legend

Supplementary Figure 1: Calpain inhibitors and related molecules

Examples of calpain inhibitors and related molecules are numbered here approximately in the order of their discovery/synthesis (the earliest discovered are at the top, as in Supplementary Table 1).

Note that they are not actually specific for calpains. Descriptive names of the smaller molecules are as follows (for their properties, see Supplementary Table 1):

1. **leupeptin**, Ac-*L*-Leu-*L*-Leu-*L*-argininal¹
2. **E-64**, [(2*S*,3*S*)-3-carboxyoxirane-2-carbonyl]-*L*-Leu-(4-guanidinobutyl)amide)^{2,3}
3. **E-64c**, [(2*S*,3*S*)-3-carboxyoxirane-2-carbonyl]-*L*-Leu-(3-methylbutyl)amide⁴
4. **E-64d** (loxistatin), [(2*S*,3*S*)-3-ethoxycarbonyloxirane-2-carbonyl]-*L*-Leu-(3-methylbutyl)amide)⁴
5. **ALLNal** (calpain inhibitor (CI-) I, MG101), Ac-*L*-Leu-*L*-Leu-*L*-norleucinal⁵
6. **ALLMal** (CI-II), Ac-*L*-Leu-*L*-Leu-*L*-methional⁵
7. **MDL28170** (CI-III), *Z*-*L*-Val-*L*-phenylalaninal⁶
8. **calpeptin**, *Z*-*L*-Leu-*L*-norleucinal⁷
9. **MG132**, *Z*-*L*-Leu-*L*-Leu-*L*-leucinal⁸
10. **CI-IV**, *Z*-*L*-Leu-*L*-Leu-*L*-Tyr-CH₂F^{9,10}
11. **AK269**, *Z*-*L*-Leu-*L*-Phe-CONH-C₂H₅¹¹⁻¹³
12. **AK275** (CI-X), *Z*-*L*-Leu-*L*-Abu-CONH-C₂H₅¹¹⁻¹⁵
13. **CI-V**, morpholinoureidyl-*L*-Val-*L*-homophenylalanyl-CH₂F¹⁶
14. **mCalp-I** (No. 18), *Z*-*L*-Leu-*L*-Abu-CONH-CH₂-C₆H₃-3,5-(OCH₃)₂¹³
15. **AK295** (CI-XI), *Z*-*L*-Leu-*L*-Abu-CONH-(CH₂)₃-morpholine^{12,13,17}
16. **CI-XII**, *Z*-*L*-Leu-*L*-norvaline-CONH-CH₂-2-pyridyl¹⁸
17. **PD150606**, 3-(4-iodophenyl)-2-mercapto-(*Z*)-2-propenoic acid¹⁹
18. **PD151746**, 3-(5-fluoro-3-indolyl)-2-mercapto-(*Z*)-2-propenoic acid¹⁹
19. **SJA6017** (CI-VI), 4-fluorophenylsulfonyl-*L*-Val-*L*-leucinal²⁰
20. **CEP-3122**, CH₃-SO₂-*D*-phenylmethylserine-*L*-phenylalaninal²¹
(**CEP-3453** is the HSO₃ addition of CEP-3122²²)
21. **MDL104903**, [1-[(5-hydroxy-4-phenyl-methyl-3-oxazolidinyl)carbonyl]-2-ethylpropyl]carbamic acid phenylmethyl ester²³
22. **BDA-410**, (2*S*)-N-[(1*S*)-1-[(*S*)-hydroxy(3-oxo-2-phenyl-1-cyclopropen-1-yl)methyl]-2-methylpropyl]-2-benzenesulfonylamino-4-methylpentanamide²⁴⁻²⁶
23. **SJA7019**, chloroacetic acid *N'*-[6,7-dichloro-4-(4-methoxyphenyl)-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalin-2-yl]hydrazide²⁷
24. **SJA7029**, chloroacetic acid *N'*-(6,7-dichloro-4-phenyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalin-2-yl)hydrazide²⁷
25. **SNJ1715**, (2*S*)-4-methyl-2-(3-phenylthioureido)-N-[(3*S*)-tetrahydro-2-hydroxy-3-furanyl]pentanamide²⁸
26. **SNJ1757**, (2*S*,5*S*)-5-benzyl-6-hydroxy-2-(2-methylpropyl)-3-morpholinone²⁹

- 27. SNJ1945**, [(1*S*)-1-([(1*S*)-1-benzyl-3-(cyclopropylamino)-2,3-dioxopropyl]amino)carbonyl]-3-methylbutyl]carbamic acid 5-methoxy-3-oxapentyl ester³⁰
- 28. SNJ2008**, [(1*S*)-1-([(1*S*)-1-benzyl-3-(cyclopropylamino)-2,3-dioxopropyl]amino)carbonyl]-3-methylbutyl]carbamic acid 2-(pyridin-2-yl)ethyl ester³¹
- 29. A-705239** (BSF 409425), *N*-(1-carbamoyl-1-oxohex-1-yl)-2-[*E*-2-(4-dimethylaminomethyl phenyl)ethen-1-yl]benzamide³²
- 30. A-705253** (BSF 419961, CAL 9961), *N*-(1-benzyl-2-carbamoyl-2-oxoethyl)-2-[*E*-2-(4-diethyl aminomethylphenyl)ethen-1-yl]benzamide³²
- 31. BN 82270** (No. 7), phenothiazine-*L*-Leu-2-hydroxytetrahydrofuran³³
- 32. C-101** (Myodur), *L*-aminocarnitylsuccinyl-*L*-Leu-*L*-argininal dichloride³⁴ (Counter ions (Cl⁻) are depicted as associated, but not covalently connected, objects in the structures).
- 33. C-201** (Neurodur), *L*-cysteyl-*L*-Leu-*L*-argininal³⁵ (CYLA is diethyl acetal of C-201³⁶)
- 34. GABA_{Adur}**, pregabalin-*L*-Leu-*L*-argininal³⁷
- 35. olesoxime** (TRO19622), (3*Z*)-*N*-hydroxycholest-4-en-3-imine³⁸
- 37. macrocyclic aldehyde** (No. 2d, CAT811), ((7*S*,10*S*,13*S*)-7-formyl-10-isobutyl-9,12-dioxo-2-oxa-8,11-diaza-bicyclo[13.2.2]nonadeca-1(18),15(19),16-trien-13-yl)-carbamic acid benzyl ester³⁹
- 38. indole-containing 18-membered aldehyde** (No. 1c), (*S*)-*N*-[(*S*)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]-2,16-dioxo-3,20-diazabicyclo[15.2.1]icosa-1(19),17-diene-4-carboxamide⁴⁰
- 39. dipeptidyl α,β -unsaturated ester** (No. 8), (*E*)-ethyl-4-(2-(benzyl-oxycarbonyl-amino)-4-methyl pentanamido)-5-phenylpent-2-enoate⁴¹.

For the following larger molecules, molecular ID used in the first paper reporting their synthesis is as follows:

36. hypervalent organotellurium compound, No. 11⁴² or RF19⁴³

39. α -helical peptide (Ac-IPPKYCELLC-NH₂), No. 3c⁴⁴

41. macrocyclic β -turn peptide (PGALK), c*[PGALK]⁴⁵.

Stick representations (C: grey, N: blue, O: rouge, F: lime, S: yellow, Cl: green, I: dark red, Te: turquoise, H: not shown) and 2D chemical structures were energy minimized and drawn by MOE Ver. 2015.10. In the structure of 39 and 41, a ribbon scheme and/or hydrogen bonds are shown.

Abbreviations: Abu, α -aminobutylic acid residue; Ac, acetyl; Z, benzyloxycarbonyl.

Supplementary table

Supplementary Table 1: Properties of calpain inhibitors

Ki and IC50 values vary substantially depending on the reference. The values shown here are from the references indicated. Numbers (No.) correspond to those in Supplementary Figure 1.

No.	Inhibitor	Composition Formula	Mr	Year*1	Mode*2	Inhibitory activity (upper: Ki, lower: IC50 if otherwise indicated) (nM)							Ref.
						C1*3	C2*3	papain	CathB*4	CathL	Trypsin	Others	
1	Leupeptin	C ₂₀ H ₃₈ N ₆ O ₄	426.56	1969	R	320 351	430 176	- 1.5x10 ³	6 27		35 -	plasmin: Ki=3.4x10 ³ kalikrein: Ki>1.9x10 ⁵	1,5,20, 29,46,47
2	E-64	C ₁₅ H ₂₇ N ₅ O ₅	357.41	1978	I	800*5 1.0x10 ³	- 2.6x10 ³	- 290	- 800				2,48
3	E-64c	C ₁₅ H ₂₆ N ₂ O ₅	314.38	1980	I	960*5 1.5x10 ⁴ *5		- 4.4x10 ³	- 240	- 90			3,4,48
4	E-64d (loxistatin)	C ₁₇ H ₃₀ N ₂ O ₅	342.44	1986	I							(active only after hydrolysis (=E-64c))	4
5	ALLNal (CI-I, MG101)	C ₂₀ H ₃₇ N ₃ O ₄	383.53	1986	R	86 310	192 160	2.2x10 ³ 4.5x10 ³	22 -		>5x10 ⁵ -	thermolysin: Ki >5x10 ⁵ MMP2: IC50=2.19x10 ⁴ calcineurin/CaM: Ki >2x10 ⁵	5,19,49
6	ALLMal (CI-II)	C ₁₉ H ₃₅ N ₃ O ₄ S	401.57	1986	R	- 250	- 140	- 3.6x10 ³					5
7	MDL28170 (CI-III)	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.46	1988	R	7 -	- 100		25 -		>2x10 ⁶ -	plasmin: Ki=2.7x10 ⁵ kalikrein: Ki>5x10 ⁶	6,46,50
8	Calpeptin	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₄	362.47	1988	R	- 52	- 34	- 138				Proteasome: Ki=1.1x10 ⁵ Immunoproteasome: Ki=1.0x10 ³	7,51
9	MG132	C ₂₆ H ₄₁ N ₃ O ₅	475.63	1991	R		10 1.2x10 ³					20S proteasome: IC50=100, Ki=6.9x10 ³	8,51,52
10	CI-IV	C ₃₀ H ₄₀ N ₃ O ₆ F	557.66	1991	I		k*6= 2.9x10 ⁴ *5			k= 6.8x10 ⁵			9,10
11	AK269	C ₂₆ H ₃₃ N ₃ O ₅	467.57	1993	R	200 -	39 -	4.5x10 ⁴ -	6.0x10 ³ -				11,18
12	AK275 (CI-X)	C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O ₅	405.50	1993	R	250 -	210 -	9.3x10 ⁴ -	2.4x10 ³ -				11,18
13	CI-V	C ₂₁ H ₃₀ N ₃ O ₄ F	407.49	1994	I				- ~10	- ~100		ca.70% inhibition of total cysteine protease activity from rat kidney by oral administration (10.0mg/kg).	16,53
14	mCalp-I (No. 18)	C ₂₈ H ₃₇ N ₃ O ₇	527.62	1996	R	940 2.3x10 ³	25 22	- 1.8x10 ³					18,54
15	AK295 (CI-XI)	C ₂₆ H ₄₀ N ₄ O ₆	504.63	1996	R	140 -	41 -	6.9x10 ³ -					18
16	CI-XII	C ₂₆ H ₃₄ N ₄ O ₅	482.58	1996	R	19 -	120 -	750 -					18
17	PD150606	C ₉ H ₇ O ₂ SI	306.12	1996	R	210 -	370 -	>5x10 ⁵ -	1.3x10 ⁵ -		>5x10 ⁵ -	thermolysin: Ki=2.0x10 ⁵ MMP2: IC50=9.3x10 ³ calcineurin/CaM: Ki=1.3x10 ⁴	19,49
18	PD151746	C ₁₁ H ₈ NO ₂ SF	237.25	1996	R	260 -	5.3x10 ³ -	>5x10 ⁵ -	>2x10 ⁵ -		>5x10 ⁵ -	thermolysin:Ki >5x10 ⁵ calcineurin/CaM: Ki >8.5x10 ⁴	19
19	SJA6017 (CI-VI)	C ₁₇ H ₂₅ N ₂ O ₄ SF	372.46	1997	R	- 22	- 49	- -	- 6.9			20S proteasome: IC50>10 ⁵	20,28,29
20	CEP-3122	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₅ S	404.49	1998	R	8 -	5 -	32 -				IC50 of CEP3453 for C1: Ki=15, for CathB: Ki=15	21,22
21	MDL104903	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₅	412.49	1999	R	33 -							23
22	BDA-410	C ₂₆ H ₃₂ N ₂ O ₅ S	484.62	1999	R	130 21	630 21	- 400	- 1.6x10 ⁵			thrombin, CathG, proteasome: Ki=1.0x10 ⁵ CathD: Ki=9.1x10 ⁵	24,25,55
23	SJA7019	C ₁₇ H ₁₃ N ₄ O ₃ Cl ₃	427.67	1999	I	- 77	- 64			- 1.5x10 ³			27
24	SJA7029	C ₁₆ H ₁₁ N ₄ O ₂ Cl ₃	397.65	1999	I	- 120	- 170			- 4.2x10 ³			27
25	SNJ1715	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O ₅ S	351.47	2003	R	- 86	- 190					20S proteasome: IC50>10 ⁵	28
26	SNJ1757	C ₁₅ H ₂₁ NO ₃	263.34	2003	R	- 700	- 930		- >1x10 ⁵				29

27	SNJ1945	C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₇	491.58	2005	R	-	-												30
28	SNJ2008	C ₂₇ H ₃₄ N ₄ O ₅	494.59	2006	R	-	-												31,56
29	A-705239 (BSF 409425)	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₃	421.54	2003	R	13	-			27	22							proteasome: Ki=4.0x10 ⁵	32,57
30	A-705253 (BSF 419961, CAL 9961)	C ₃₀ H ₃₃ N ₅ O ₃	483.61	2003	R	27	-			62	149							proteasome: Ki=2.6x10 ⁴	32,57
31	BN 82270	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₅ S	483.59	2004	R	-	>1x10 ³											Dual inhibitor for calpains (active after hydrolysis of the acetyl group) and lipid peroxidation. Cellular calpain inhibition: IC50=1.33x10 ⁴ ; Fe ²⁺ induced lipid peroxidation in rat brain microsomes inhibition: IC50=1.55x10 ⁴ ; permanent hearing and hair cell loss of guinea pigs induced by sound trauma: IC50=4x10 ³	33,58
32	C-101 (Myodur)	C ₂₃ H ₄₇ N ₇ O ₆ Cl ₂	588.58	2005	R													spectrin breakdown (145 kDa): IC50=3.7x10 ⁴	34
33	C-201 (Neurodur)	C ₁₅ H ₃₀ N ₆ O ₆ S	422.51	2005	R													(no Ki or IC50 data)	35
-	CYLA	C ₁₉ H ₄₀ N ₆ O ₇ S	496.63	2006	R													Total calpain amounts in spinal cord homogenates were reduced <i>ca.</i> a half after 2 mg/mouse/day administration. (active only after hydrolysis (=C-201))	36
34	GABA _{Adur}	C ₂₀ H ₃₈ N ₆ O ₅	442.56	2007	R													(no Ki or IC50 data)	37
35	Olesoxime (TRO19622)	C ₂₇ H ₄₅ NO	399.66	2007	R	*7	*7											mitochondrial translocator protein 18 kDa and its ligand, PK11195, binding: IC50=3~5x10 ⁴	38,59,60
36	Hypervalent organotellurium compound (No. 11, RF19)	C ₁₅ H ₁₃ OCl ₃ Te	443.23	2009	I	-	200 ^{*8}			k=7.9 x10 ³	k=9.4x10 ³							CathS: k=2.0 x10 ⁵ CathK: k=3.8 x10 ⁵	42,43
37	Macrocyclic aldehyde (CAT811)	C ₂₉ H ₃₇ N ₃ O ₆	523.63	2009	R	-	220	-	30	>5x10 ⁵	70							pepsin and α-chymotrypsin: IC50>5x10 ⁵	39
38	Indole-containing 18-membered aldehyde (No.1c)	C ₂₅ H ₃₉ N ₅ O ₄	445.60	2012	R	-	42	-	66									α-chymotrypsin: IC50>2.5x10 ⁵	40
39	α-helical peptide (No. 3c, Ac-IPPKYCELLC-NH ₂)	C ₆₄ H ₉₆ N ₁₂ O ₁₄ S ₂	1321.67	2012	R	1x10 ⁴	-	>1x10 ⁵	-	>1x10 ⁵	3.9x10 ⁴								44
40	Dipeptidyl α,β-unsaturated ester (No.8)	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₅	466.58	2012	R													IC50 for <i>P. falciparum</i> growth rate in human erythrocytes=5x10 ³ IC50 for HeLa cell growth=3.5x10 ⁵	41
41	Macrocyclic β-turn peptide (c*[PGALK])	C ₃₀ H ₅₄ N ₈ O ₆	622.81	2016	R	(~50% ^{*9})	1.7x10 ⁴	(~10%)	-			(~100%)							45

*1: a year of the first report for synthesis or discovery; *2: a mode of inhibition, reversible (R) or irreversible (I); *3: C1, calpain-1; C2, calpain-2; *4: Cath, cathepsin; *5: for chicken calpain-11; *6: a rate constant (M⁻¹s⁻¹) of a reaction, E+I→EI (E: enzyme, I: inhibitor); *7: showing *in vivo* inhibitory activity; *8: for *P. falciparum* proteases; *9: relative to inhibitory effect observed for C2 under the same condition.

References for supplementary figure and table

- 1 Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, A., Kawamura, K. & Kondo, S. Leupeptins, new protease inhibitors from Actinomycetes. *J. Antibiot.* **22**, 283-286, (1969).
- 2 Hanada, K. *et al.* Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 523-528, (1978).
- 3 Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E. & Katunuma, N. Inhibitions by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L *in vitro* and *in vivo*. *J. Biochem.* **88**, 1805-1811, (1980).
- 4 Tamai, M. *et al.* In vitro and in vivo inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64. *J. Pharmacobiodyn.* **9**, 672-677, (1986).
- 5 Saito, M. *et al.* Purification and structure of novel cysteine proteinase inhibitors, staccopins P1 and P2, from *Staphylococcus tanabeensis*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 861-868, (1987).
- 6 Mehdi, S., Angelastro, M. R., Wiseman, J. S. & Bey, P. Inhibition of the proteolysis of rat erythrocyte membrane proteins by a synthetic inhibitor of calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 1117-1123, (1988).
- 7 Tsujinaka, T. *et al.* Synthesis of a new cell penetrating calpain inhibitor (calpeptin). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1201-1208, (1988).
- 8 Hayashi, M., Inomata, M., Saito, Y., Ito, H. & Kawashima, S. Activation of intracellular calcium-activated neutral proteinase in erythrocytes and its inhibition by exogenously added inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1094**, 249-256, (1991).
- 9 Angliker, H., Anagli, J. & Shaw, E. Inactivation of calpain by peptidyl fluoromethyl ketones. *J. Med. Chem.* **35**, 216-220, (1992).
- 10 Anagli, J., Hagmann, J. & Shaw, E. Investigation of the role of calpain as a stimulus-response mediator in human platelets using new synthetic inhibitors. *Biochem. J.* **274**, 497-502, (1991).
- 11 Li, Z. *et al.* Peptide alpha-keto ester, alpha-keto amide, and alpha-keto acid inhibitors of calpains and other cysteine proteases. *J. Med. Chem.* **36**, 3472-3480, (1993).
- 12 Wu, C., Akiyama, A. & Straub, J. A. High-performance liquid Chromatographic reversed-phase and normal-phase separation of diastereomeric α -ketoamide calpain inhibitors. *J. Chromatogr.* **684**, 243-249, (1994).
- 13 Li, Z. *et al.* Novel peptidyl alpha-keto amide inhibitors of calpains and other cysteine proteases. *J. Med. Chem.* **39**, 4089-4098, (1996).
- 14 Harbeson, S. L. *et al.* Stereospecific synthesis of peptidyl alpha-keto amides as inhibitors of calpain. *J. Med. Chem.* **37**, 2918-2929, (1994).
- 15 Bartus, R. T. *et al.* Postischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**, 537-544, (1994).
- 16 Esser, R. E. *et al.* Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* **37**, 236-247, (1994).
- 17 Bartus, R. T. *et al.* Calpain inhibitor AK295 protects neurons from focal brain ischemia. Effects of postocclusion intra-arterial administration. *Stroke* **25**, 2265-2270, (1994).
- 18 Haug, L. S. *et al.* Decreased inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor levels in Alzheimer's disease cerebral cortex: selectivity of changes and possible correlation to pathological severity. *Neurodegeneration* **5**, 169-176, (1996).
- 19 Wang, K. K. *et al.* An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6687-6692, (1996).
- 20 Fukiage, C. *et al.* SJA6017, a newly synthesized peptide aldehyde inhibitor of calpain: amelioration of cataract in cultured rat lenses. *Biochim. Biophys. Acta* **1361**, 304-312, (1997).
- 21 Chatterjee, S. *et al.* D-amino acid containing, high-affinity inhibitors of recombinant human calpain I. *J. Med. Chem.* **41**, 2663-2666, (1998).
- 22 Frederick, J. R. *et al.* Neuroprotection with delayed calpain inhibition after transient forebrain ischemia. *Crit. Care Med.* **36**, S481-485, (2008).
- 23 Peet, N. P. *et al.* Hydroxyoxazolidines as alpha-aminoacetaldehyde equivalents: novel inhibitors of calpain. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **9**, 2365-2370, (1999).
- 24 Yoshii, N. *et al.* Neuroprotective effects of a novel orally active reversible calpain inhibitor BDA-410. *Society For Neuroscience Abstracts* **25**, 344, (1999).
- 25 Battaglia, F. *et al.* Calpain inhibitors, a treatment for Alzheimer's disease: position paper. *J. Mol. Neurosci.* **20**, 357-362, (2003).
- 26 Trinchese, F. *et al.* Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **118**, 2796-2807, (2008).

- 27 Liu, X., Harriman, J. F. & Schnellmann, R. G. Cytoprotective properties of novel nonpeptide calpain inhibitors in renal cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 88-94, (2002).
- 28 Nakamura, M., Yamaguchi, M., Sakai, O. & Inoue, J. Exploration of cornea permeable calpain inhibitors as anticataract agents. *Bioorg Med. Chem.* **11**, 1371-1379, (2003).
- 29 Nakamura, M. *et al.* Novel 6-hydroxy-3-morpholinones as cornea permeable calpain inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 5449-5460, (2003).
- 30 Shirasaki, Y., Miyashita, H., Yamaguchi, M., Inoue, J. & Nakamura, M. Exploration of orally available calpain inhibitors: peptidyl alpha-ketoamides containing an amphiphile at P3 site. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 4473-4484, (2005).
- 31 Shirasaki, Y., Miyashita, H. & Yamaguchi, M. Exploration of orally available calpain inhibitors. Part 3: Dipeptidyl alpha-ketoamide derivatives containing pyridine moiety. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 5691-5698, (2006).
- 32 Lubisch, W. *et al.* Benzoylalanine-derived ketoamides carrying vinylbenzyl amino residues: discovery of potent water-soluble calpain inhibitors with oral bioavailability. *J. Med. Chem.* **46**, 2404-2412, (2003).
- 33 Auvin, S. *et al.* Novel dual inhibitors of calpain and lipid peroxidation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 3825-3828, (2004).
- 34 Stracher, A., Kesner, L., Barton, N. W. & Carver, T. E. Compounds and kits for treating muscle disorders and methods of use thereof. WIPO patent WO2005124563 (2005).
- 35 Stracher, A., Kesner, L., Carver, T. E. & Barton, N. W. Compounds for treating neurologic diseases, otologic diseases, or ophthalmologic diseases and methods of use thereof. US patent US20080200399 (2005).
- 36 Hassen, G. W., Feliberti, J., Kesner, L., Stracher, A. & Mokhtarian, F. A novel calpain inhibitor for the treatment of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **180**, 135-146, (2006).
- 37 Stracher, A., Kesner, L. & Shulman, A. Targeted delivery of pharmaceutical compounds. US patent US8729024 (2007).
- 38 Bordet, T. *et al.* Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **322**, 709-720, (2007).
- 39 Abell, A. D. *et al.* Molecular modeling, synthesis, and biological evaluation of macrocyclic calpain inhibitors. *Angew. Chem.* **48**, 1455-1458, (2009).
- 40 Abell, A. D., Chua, K. & Pietsch, M. Macrocyclic compounds and uses thereof. US patent US20150299250 (2015).
- 41 Mallik, S. K. *et al.* Synthesis and evaluation of peptidyl α,β -unsaturated carbonyl derivatives as anti-malarial calpain inhibitors. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 469-479, (2012).
- 42 Cunha, R. L. *et al.* Irreversible inhibition of human cathepsins B, L, S and K by hypervalent tellurium compounds. *Biol. Chem.* **390**, 1205-1212, (2009).
- 43 El Chamy Maluf, S. *et al.* Hypervalent organotellurium compounds as inhibitors of *P. falciparum* calcium-dependent cysteine proteases. *Parasitol. Int.* **65**, 20-22, (2016).
- 44 Jo, H. *et al.* Development of α -helical calpain probes by mimicking a natural protein-protein interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17704-17713, (2012).
- 45 Low, K. E. *et al.* Rational Design of Calpain Inhibitors Based on Calpastatin Peptidomimetics. *J. Med. Chem.* **59**, 5403-5415, (2016).
- 46 Mehdi, S. Cell-penetrating inhibitors of calpain. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 150-153, (1991).
- 47 Sasaki, T., Kikuchi, T., Yumoto, N., Yoshimura, N. & Murachi, T. Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *J. Biol. Chem.* **259**, 12489-12494, (1984).
- 48 Suzuki, K. Reaction of calcium-activated neutral protease (CANP) with an epoxysuccinyl derivative (E64c) and iodoacetic acid. *J. Biochem.* **93**, 1305-1312, (1983).
- 49 Ali, M. A., Stepanko, A., Fan, X., Holt, A. & Schulz, R. Calpain inhibitors exhibit matrix metalloproteinase-2 inhibitory activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 1-5, (2012).
- 50 Lampi, K. J., Kadoya, K., Azuma, M., David, L. L. & Shearer, T. R. Comparison of cell-permeable calpain inhibitors and E64 in reduction of cataract in cultured rat lenses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **117**, 53-57, (1992).
- 51 Kuhn, D. J. *et al.* Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood* **113**, 4667-4676, (2009).
- 52 Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H. & Kawashima, S. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J. Biochem.* **119**, 572-576,

- (1996).
- 53 de Oliveira, S. S., Garcia-Gomes Ados, S., d'Avila-Levy, C. M., dos Santos, A. L. & Branquinha, M. H. Expression of calpain-like proteins and effects of calpain inhibitors on the growth rate of *Angomonas deanei* wild type and aposymbiotic strains. *BMC Microbiol.* **15**, 188, (2015).
 - 54 Wang, Y. *et al.* A molecular brake controls the magnitude of long-term potentiation. *Nat. Commun.* **5**, 3051, (2014).
 - 55 Li, X., Chen, H., Jeong, J. J. & Chishti, A. H. BDA-410: a novel synthetic calpain inhibitor active against blood stage malaria. *Mol. Biochem. Parasitol.* **155**, 26-32, (2007).
 - 56 Shirasaki, Y., Yamaguchi, M. & Miyashita, H. Retinal penetration of calpain inhibitors in rats after oral administration. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **22**, 417-424, (2006).
 - 57 Maybauer, M. O. *Einfluss einer Calpaininhibition auf die Störung der pulmonalvaskulären Permeabilität nach intravasaler Aktivierung von Granulozyten Experimentelle Untersuchungen: am Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge*, Justus-Liebig-University of Giessen, (2003).
 - 58 Wang, J. *et al.* A novel dual inhibitor of calpains and lipid peroxidation (BN82270) rescues the cochlea from sound trauma. *Neuropharmacology* **52**, 1426-1437, (2007).
 - 59 Weber, J. J., Ortiz Rios, M. M., Riess, O., Clemens, L. E. & Nguyen, H. P. The calpain-suppressing effects of olesoxime in Huntington's disease. *Rare Dis.* **4**, e1153778, (2016).
 - 60 Clemens, L. E. *et al.* Olesoxime suppresses calpain activation and mutant huntingtin fragmentation in the BACHD rat. *Brain* **138**, 3632-3653, (2015).
 - 61 Kuramochi, H., Nakata, H. & Ishii, S. Mechanism of association of a specific aldehyde inhibitor, leupeptin, with bovine trypsin. *J. Biochem.* **86**, 1403-1410, (1979).

Notes for references

¹In the original report, leupeptin was shown to have *DL*-argininal; however, a later study⁶¹ showed that *L*-argininal, but not *D*-argininal, has a strong affinity to trypsin. Thus, the structure is shown as *Ac-L-Leu-L-Leu-L*-argininal.

⁵The original report was by Saito, M., Higuchi, N., Kawaguchi, N., Tanaka, T. and Murachi, T. at the 4th FAOB Congress in Singapore, November 30, 1986 (Abstracts of Papers, p58).

^{11,18}The AK275 was first synthesized as a diastereometric mixture (called CX275); however, since a later study¹⁴ showed that the *L, L* isomer has inhibitory activity, this active structure is shown here, and so are for other AK series inhibitors.

¹⁶This reference described synthesis and the effect of morpholinoureidyl-*L*-**Leu-L**-homophenylalanyl-CH₂F (mu-**L**-hF-fmk, P34089), but not those of **Val** (mu-**V**-hF-fmk, *i.e.*, CI-V). Since the described method can be applied to mu-**V**-hF-fmk (CI-V) and no other reference describing the synthesis of CI-V was found, this reference is cited here.

²⁷The original report was by Inoue, J., Cui, Y.-S., Sakai, O., Nakamura, M., Yuen, P.-W., and Wang, K.K.W. (1999) α -Substituted hydrazides having calpain inhibitory activity, in *Proceedings of the FASEB Summer Conference on Calpains*, 1999 June 20–23, Breckenridge, CO.

³⁴This reference did not mention about the stereochemical analysis, and, thus, the structure is an estimate from those of *L*-carnitine and leupeptin.

³⁵This reference did not mention about the stereochemical analysis, and, thus, the structure is an estimate from those of *L*-cysteic acid and leupeptin.

³⁷This reference did not mention about the stereochemical analysis, and, thus, the structure is an estimate from those of pregabalin and leupeptin.

カルパインは阻害すればよいのか？

反町 洋之, 小野 弥子

カルパインは細胞内Ca²⁺要求性プロテアーゼである。プロテアソームやオートファジーとは異なり、基質タンパク質の限定切断によりその機能や構造を調節・変換する。さまざまな生命現象に関与するが、我々は依然その生理機能を明示的に記述できずにいる。一方で、神経疾患、虚血性疾患、筋・心疾患、がん、早老症、マラリア、カンジダ症、歯周病等々、広範な病態にカルパインが登場する。ほぼすべての場合カルパイン阻害が症状緩和をもたらす。まるでカルパインはない方が病気は早く治るとでもいうかのように、もちろんそれは過大な一般化で、そこには落とし穴がある。主にノックアウトマウスの解析から、カルパインの欠損・慢性的抑制は予想外の悪影響を及ぼすことがわかってきた。本稿ではカルパイン関連疾患、カルパインの機能と阻害剤治療の関係、阻害特異性向上に基質認識機構が与えるヒントを紹介し、阻害剤開発の今後の可能性を考察する。

1. はじめに

古今東西を問わず天才外科医の話が大人気ではあるが、どんな病気でも薬を飲むだけで痛くも苦しくもなく完治すればそれにこしたことはない。いくつかの疾患についてカルパインの阻害剤はそのような夢の治療薬になりうるかもしれない。

カルパインは主に細胞質内で機能するCa²⁺要求性のシステインプロテアーゼである。以前は、プロテアソームやカスパーゼ、さらにはオートファジーよりも知名度は高かったのだが、現状は逆転している。その理由は、カルパインの生理機能を明示的に（たとえば100字で）記述することができないという、よくいえば懐の広さ、悪くいえば茫漠としたファジー性にあるのだろうか。何事にも短期間での明確な成果が要求される昨今、かなり腰を据えて研究しても「〇〇のときに、△△を切断することにより、□□を引き起こす、それが生理機能だ」と、なかなかいい切れないのがカルパインである。

しかし、見方を変えればまさにダイヤモンドの原石（たとえ

ば、夢の治療薬への手がかり）がごろごろ転がっているわけで、一部には、密かに、原石を全部拾うまで、カルパインのメジャーデビューは控えさせたいという声もある。そのためこのような総説はもしかしたら営業妨害になるかもしれないが、せつかなので原石の“鑑定過程”を紹介させていただきたい。なお紙面の都合上、阻害剤などの分子構造や治験などの情報については割愛したので、これらについては最近の英文総説¹⁾を参照していただけると幸いである。

2. 名前には歴史がある

カルパインは1964年（論文投稿は1963年7月）に初めて報告された²⁾。ちなみに、C. de Duve博士が初めてオートファジーという言葉を使ったのは1963年だが、大きく注目され始めたのは2016年ノーベル生理学・医学賞に輝かれた大隅良典博士が酵母で分子機構を発見した1990年代以降である。また、プロテアソームとカスパーゼがどちらも1980年代に発見されたことを考えると、カルパインは比較的長い研究歴を持つ細胞内プロテアーゼといえることができる。ただし、鈴木紘一博士によって「カルパイン」という名称に統一されたのは1991年で、それまではカルシウム依存性中性プロテアーゼ（Ca²⁺-activated neutral protease : CANP）の他、カルシウム依存性プロテアーゼ（Ca²⁺-dependent protease : CDP）、キナーゼ活性化因子（kinase-activating factor : KAF）、カルシウム依存性筋細胞質因子（Ca²⁺-activated sarcoplasmic factor : CASF）などと各々のカルパイン研究者が呼称していた（よくある話では

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
カルパインプロジェクト（〒156-8506 東京都世田谷区上北沢2-1-6）

Does calpain inhibition always rescue us?

Hiroyuki Sorimachi and Yasuko Ono (Calpain Project, Department of Advanced Science for Biomolecules Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880704

© 2016 公益社団法人日本生化学会

あるが)。

「カルパイン」という名称は村地孝博士によって1981年に考案されたもの³⁾である。ポスター発表前夜の丑三つ時にトロントのホテルで“calpastatin” (カルパインの内在性特異的阻害タンパク質：後述)をまず思いつき、そこから派生して“calpase” (当初はcalpainではなかった)を創語し、ポスターにわざわざ大きく貼り出したという興味深いいきさつが村地博士自身により記されている⁴⁾。しかし、なぜ10年近くも本邦で、そして全世界的に二つの名称、カルパインとCANPとが共存していたかについては、鈴木博士による含蓄に富む総説⁵⁾をぜひご参照いただきたい。ポイントは、まず、今堀和友博士らが提唱したCANPという名称で、1977年に鈴木博士が「CANPは阻害剤に対する挙動からシステインプロテアーゼと考えられる」と発表したところ、村地博士から「活性中心にSH基の存在を確かめるまでは阻害剤の結果だけからシステインプロテアーゼと呼ぶべきではない」とすぐにその場で反論され、しかしもっともと納得した。当時、活性中心の同定には約100mg (鶏胸肉50~60枚からの精製量に匹敵する)の酵素が必要であり、実際に同定されたのは1983年のことであった⁶⁾。ところが、村地博士の提唱した「カルパイン」はCa²⁺の「カル」とパインなどのシステインプロテアーゼを表す“ain”との造語であり⁴⁾、システインプロテアーゼと呼ぶべきでないといっていた本人が、1981年の時点で「カルパイン」の名を作り出したことに、今堀博士のグループから派生した研究者たちは筋が通らないと考えたわけであった。その後、1990年6月のゴードン会議で名称の統一を議論し、同年10月の第8回細胞内タンパク質分解に関する国際会議 (The 8th International Conference on Proteolysis and Protein Turnover : ICOP) で、*in vivo*での活性化にそれぞれμM, mMレベルのCa²⁺を必要とする2種の酵素として、μ-カルパイン、m-カルパインという名称が関係者に正式に周知された。大変残念なことにゴードン会議の直前に村地博士は急逝され、鈴木博士と今堀博士は2010年4月と2016年5月にそれぞれ逝去された。今では天国でカルパインについて再び激論を交わされているであろう。

その後もカルパインの分子種名やドメインの名称でしばらく混乱があったが、今はおさまりつつある (と筆者は信じている)。誰でも、自分たちが最初に見つけて命名した名称を、後から相談もなく勝手に変えられては、気分がよくない (だろう)。特に若いときは (きっと)。カナダのPeter L. Davies博士のグループ⁷⁾と、鈴木博士らとドイツのWolfram Bode博士との共同グループ⁸⁾とが決定したカルパインの立体構造に基づき、2013年のアメリカ実験生物学会研究カンファレンス (Federation of American Societies for Experimental Biology Science Research Conference : FASEB SRC) において出席者全員のコンセンサスを得た命名法を図1に示す。何とかこれを浸透させるべく、本稿もこの命名に従う。本音をいうと、現在のカルパイン関

係の呼称 (カルパイン-1~16やドメイン名) は、欧米勢に押し切られたような感じで、ちょっと残念ではある。しかし、共通の言葉を使用するという科学の発展の基本精神に則って、一日も早くカルパインを研究する者全員が共通の用語を用いるようになってほしいと切望している。

もう一点大事なこととして、カルパイン (CAPN) という分子を定義しておきたい。これも研究者によって微妙に異なるが、ここでは単純に、ヒトのカルパイン-1 (μ-カルパイン, μCANP, μ80K, カルパインI, CDP Iなどと呼ばれていた)の触媒ドメインに有意に相同性のある配列領域を有する遺伝子産物、とする。このドメインは、アメリカNCBI (National Center for Biotechnology Information) のCDD (Conserved Domain Database) に“CysPc” (何の略かはどこにも記載がないが、Cysteine Protease domain, calpain-typeといった感じか)として登録されているモチーフである。

また、酵素としての活性を問題にしていないことに注意してほしい。実は、カルパインの中には活性を持たないと考えられる分子種や、酵素としてはサブユニット構造をとるものも存在する。「カルパイン」という名称は、集会的には上記で定義される遺伝子産物を示し、しかしながら、個別にカルパイン-1,-2のように使う場合は、生体内での本来の構造を持つもの (=活性のあるものならintactな酵素)を意味する。一方、サブユニットや本来の構造が不明なものについては遺伝子名を用いた遺伝子産物としてCAPN1, CAPN2のように呼ぶ。ややこしくて申しわけないが、カルパイン-1=CAPN1+CAPNS1 (CAPN1/S1とも表記)、カルパイン-2=CAPN2+CAPNS1 (CAPN2/S1)となる (どちらもヘテロ二量体で、CAPNS1は、両者に共通の制御サブユニット、図1)。

哺乳類のカルパイン-1,-2および鳥類のカルパイン-11 (当初はカルパイン-1と-2の中間型と考えられていた)は、カルパイン研究の黎明期に最もよく解析されたため、conventional (標準型)カルパインと呼ばれる。それ以外はすべてunconventional (非標準型)カルパインとなる (図1)。以下で論ずる構造は標準型を基準として、同様のドメイン構造を有するカルパインをclassical (古典型)カルパインと呼ぶ。これらは歴史的経緯による命名なので、実際には、古典型カルパインは動物にしか見いだされず、最も普遍的に存在しているカルパインはnon-classical (非古典型)カルパインのCAPN7である (後述)。以前は、プロテインキナーゼCに倣って、古典型を“typical”, 非古典型を“atypical”と呼んでいたが、atypicalの方が普遍的に存在するのはおかしいということで、classical/non-classicalに変更した。

3. スーパーファミリーとしてのカルパインの構造

古典型カルパインは、N末端αヘリックス、CysPcドメイン [PC1およびPC2 (protease core domain 1および2)

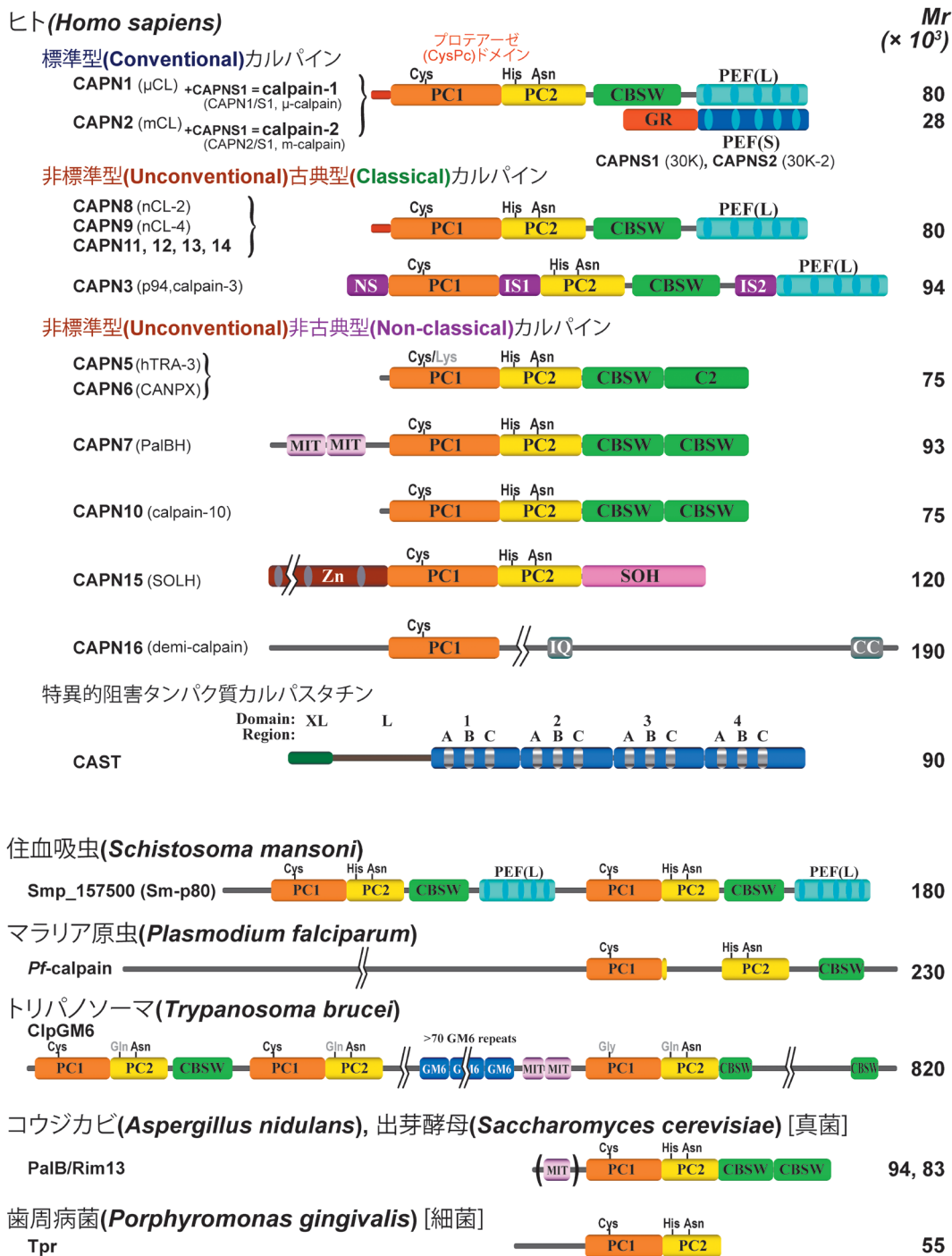


図1 カルパインのドメイン構造

カルパイン-1と-2は各々 CAPN1+CAPNS1 (CAPN1/S1) および CAPN2+CAPNS1 (CAPN2/S1) のヘテロ二量体であり、「標準型」カルパインと呼ばれる。これ以外は「非標準型」である。また、標準型カルパインと同様のドメイン構造を持つものを「古典型」、そうでないものを「非古典型」と呼ぶ。ここに示したヒト以外のカルパインでは、Smp_157500のみが古典型である。*P. falciparum*と*P. gingivalis*とはカルパイン遺伝子をそれぞれ一つしか持たないが、*S. mansoni*、*T. brucei*、*A. nidulans*はそれぞれ、ここに示したものを含め全部で7, 18, 2遺伝子を有する。C2: C2 domain, CBSW: calpain-type β -sandwich domain, CysPc: cysteine protease domain, calpain-type, GM6: GM6 antigen repeat unit, GR: Gly-rich domain, IQ: calmodulin interacting domain, IS1/2: insertion sequence 1/2, MIT: microtubule interacting and transport domain, PC1/2: protease core domain 1/2, PEF: penta-EF-hand domain, SOH: SOL-homology domain, Zn: zinc-finger motif.

の二つからなる], CBSW (calpain-type β -sandwich) ドメイン, PEF (penta-EF-hand) ドメインという構造を持つ (図1)。カルパイン-1および-2はヘテロ二量体であり、

CAPNS1という非カルパイン遺伝子産物をサブユニットに持つ。CAPNS1は、N末端にグリシンのクラスター領域 (Gly-rich: GRドメイン) を、後半にはPEFドメインを持ち、活

性サブユニットの安定化に寄与する。また、胃に遍在するカルパイン-8/9 (CAPN8/9, G-カルパインとも呼ぶ) はCAPN8とCAPN9のヘテロ二量体である。これ以外のカルパインは四次構造が不明なので、どれも遺伝子産物として表記することが望ましい。たとえば、カルパイン-3やカルパイン-10は、CAPN3やCAPN10を活性サブユニットに持つ仮想的酵素であり、その実体はまだ不明確である。そのため、本来はCAPN3, CAPN10と表記すべきである。カルパイン-3に関しては、*in vitro*ではCAPN3のホモ二量体の可能性が示唆されているが、*in vivo*では未確認である。さらに、*in vivo*ではコネクチン (タイチンとも呼ばれる) との結合状態で存在し、少なくとも*in vitro*ではPLEIAD (platform element for inhibition of autolytic degradation)⁹⁾ と結合して安定化するなど、酵素としてのカルパイン-3の実体解明にはさらなる解析が必要である。

ヒトには15のカルパイン遺伝子が存在し、複数の選択的スプライス転写産物を持つ遺伝子もあるため、50以上のカルパイン分子種が存在する。ヒトの非古典型カルパインにはCysPcのうち活性中心のCys残基やPC2を失っているものも存在する (図1)。全生物的には、カルパインはほぼすべての真核生物と一部の原核生物に存在する。そして、CysPcドメインに組み合わされるモチーフの種類は40を超え、その中にはMIT (microtubule interacting and transport) モチーフ、Znフィンガーモチーフ、ユビキチン結合 (ubiquitin-associated: UBA) ドメインなども存在する¹⁰⁾。

一方、カルパインの進化を考えるにあたって、不可解な事例がいくつかある。その最たるものとして、同じ真菌の中でも、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) やコウジカビ (*Aspergillus nidulans*) にはCAPN7ホモログであるRim13/PalBが存在するのに、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces* 属; *S. cryophilus*, *S. octosporus*, *S. pombe* および *S. pombe*) には、カルパイン遺伝子が存在しないことがあげられる。Rim13/PalBは*S. cerevisiae*や*A. nidulans*が生育環境

のアルカリ側への変動に適合して生存するために必要なシグナル伝達系の構成成分として、転写調節因子Rim101/PacCをプロセッシング・活性化することが知られている (表1)¹¹⁾。

これらのシグナル伝達系を構成する分子の、少なくとも一部については、分裂酵母、さらにはヒトにもオルソログが存在している (表1)。 *S. cerevisiae*や*A. nidulans*と同様のpHを感知するシグナル伝達系をヒトが有するとは考えにくい、分裂酵母が備えている可能性はあるだろう。また、pH変化以外の要因に対応するための伝達系をこれらオルソログが構成している可能性もある。いずれにしても、①Rim13/PalBの活性化には、Rim20/PalA (分子N末端にBRO-1ドメインという構造を持つ) との複合体形成、およびそれを介したESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 膜輸送系との相互作用が必要であること、②ESCRT系は分裂酵母からヒトに至るまで保存されていること、③ヒトCAPN7についてもBRO-1ドメインタンパク質であるALIXとの相互作用が報告されている¹²⁾ことから、ヒトでも部分的に変更されながらも保存されたシグナル伝達系として重要な機能を担っている可能性が高い。一方で、出芽酵母と同様の生活環境変化への対応が必要と考えられる分裂酵母が、なぜ、カルパインなしで生きていけるのか、ぜひその仕組みを知りたいものである。

4. 立体構造が語ること

カルパイン-2については非活性型と活性型の両方の全体立体構造が解かれている。各ドメインは時計回りに活性サブユニットのN→C末端方向へ、さらに制御サブユニットのC→N末端方向へと卵形に美しく並んでいる (図2)。カルモジュリンのCa²⁺結合モチーフとして有名なEFハンドモチーフを五つ含有するPEFドメインにカルパインのCa²⁺依存性は担われていると考えられてきたが、実際に

表1 酵母Rim101経路関連分子と、他生物でのオルソログ

機能	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>H. sapiens</i>	特徴
細胞外シグナルを検出	(α -arrestins)* ¹	Rim8	PalF	(α -arrestins)* ¹	α -arrestin様タンパク質
	SPCC1919.12c* ²	Rim21/Dfg16	PalH	(7TM)* ¹	7回膜貫通タンパク質
	SPCC1739.10	Rim9	PalI	—* ³	SUR7/PalIモチーフを持つ3回膜貫通タンパク質
膜輸送系	Vps32	Snf7	AN4240.2	CHMP4A	ESCRT-III構成成分
転写調節因子のプロセッシング・活性化	SPAC2G11.05c	Rim20	PalA	ALIX	BRO-1ドメインを持つ足場タンパク質
	—* ³	Rim13	PalB	CAPN7	プロテアーゼ
	—* ³	Ygr122w	PalC	—* ³	BRO-1ドメインタンパク質
アルカリ環境適応遺伝子群の転写	(Zn-finger TFs)* ¹	Rim101	PacC	(Zn-finger TFs)* ¹	C2H2 Znフィンガー転写調節因子、プロセッシングを受けて活性化する

ESCRT: endosomal sorting complex required for transport, TF: 転写調節因子, TM: 膜貫通。

*¹類似構造の分子が複数あり、対応する分子が特定されていない。

*²メタロペプチダーゼドメインを含む。

*³対応する分子が存在しない。

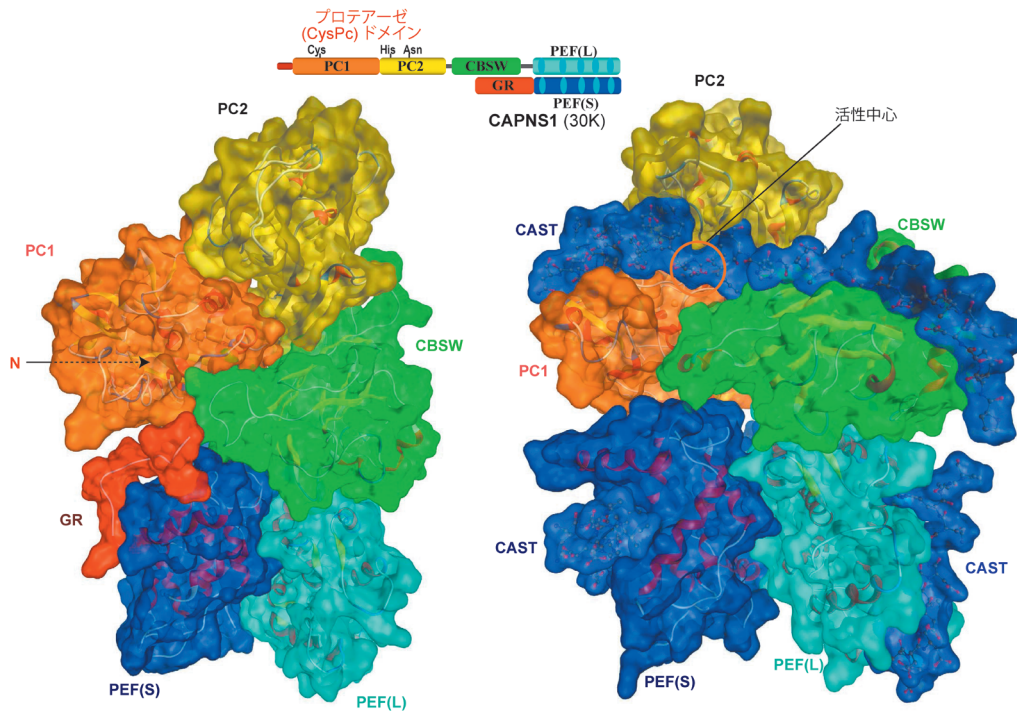


図2 カルパインの立体構造

カルパイン-2の不活性化状態（左，1KFU）および活性化状態（右，3BOW, CAST, Ca^{2+} との共結晶構造）の立体構造をリボン（CAST部分はボールスティック）模式図+表面描画により示した [MOE Ver.2015.10 (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec) による描画]. ドメインの色は図1および中央上部の模式図と一致している (N末端領域はちょうどPC1の裏側となりみえていない). CAST: calpastatin, CBSW: calpain-type β -sandwich domain, GR: Gly-rich domain, PC1/2: protease core domain 1/2, PEF: penta-EF-hand domain.

は両サブユニットのPEFドメインは触媒 (CysPc) ドメインからは最も離れて位置しており, Ca^{2+} の結合の有無によってもほとんど立体構造を変化させないことが明らかとなった¹³⁻¹⁵⁾. さらに, CysPcドメインのPC1とPC2とに1分子ずつの Ca^{2+} が直接結合すること, その結合によってPC1とPC2の配置が変化し, 活性中心が初めて形成されることが判明した¹⁶⁻¹⁸⁾.

逆にいうと, Ca^{2+} がCysPcに結合していない状態ではPC1/2の配置が開いた状態となり, 活性中心が形成されないため不活性化状態が維持されている. カルパインは, 細胞質内に存在しており他のタンパク質といつでも相互作用することが可能なため, その活性発現は厳密に制御される必要があるということを反映しているのだろうか. この構造的な危険防止機能に加えて, 他にも, 100%の活性を出すためには非生理的に高い Ca^{2+} 濃度が必要である, 活性中心が奥まったところに位置しており, 構造を持つタンパク質がアクセスしにくい, 特異的阻害タンパク質カルパスタチンが過剰量存在している, など二重, 三重の安全装置が備わっている.

カルパスタチン (CAST) との複合体の活性化型カルパイン-2の立体構造 (図2右), すなわち阻害された構造, をみると, カルパインがどのように基質を認識しているかがよくわかる. CASTは鳥類, 哺乳類で見いだされる内在性のカルパインに対する特異的阻害タンパク質であり, 他のプロテアーゼを一切阻害しない. いくつかのサプライズバ

リアントが存在するが, 基本構造は四つの繰り返し領域であり, 各々が1分子のカルパイン-1と-2を (多少の違いはあるが) 数nMの K_i で阻害する (図1). その他に古典型カルパインのCAPN8/9¹⁹⁾, CAPN9/S1²⁰⁾, CAPN(8)_n²¹⁾も阻害するが, CAPN3に対しては非常によい基質となってしまうまったく阻害できない²²⁾. また, CysPcドメインだけにしたCAPN1 (ミニCAPN1と呼ぶ) は Ca^{2+} 依存性のCysプロテアーゼ活性を保持するが, CASTによる阻害への感受性をほぼ失っている^{16, 23)}.

CASTは溶液中では特定の構造をとらない天然変性タンパク質 (intrinsically unstructured/disordered protein: IUPまたはIDP) で, Ca^{2+} 結合により活性化状態になったカルパインと, 繰り返し領域内に定義される三つの配列A, B, C (図1) でそれぞれ活性サブユニットPEF (PEF(L)) ドメイン, CysPcドメイン, 制御サブユニットPEF (PEF(S)) ドメインと相互作用している. この際にCysPcの活性中心付近にくる部分は誘導適合 (induced-fit) が起こり, 一部分が α -ヘリックスを構成して親和性が高まるのと同時に, そのままでは活性中心と接触してしまうペプチド結合をちょうど避難させるように, カルパイン分子の外側に向かって β ターンによる小ループの形成が起こる. その結果, カルパインは猿ぐつわをされたようになり, 活性を阻害される. 3配列のうちA, Cを欠失させても阻害活性を保持するため, PEFへの結合は, 阻害活性の安定性を高めるものの必須ではない.

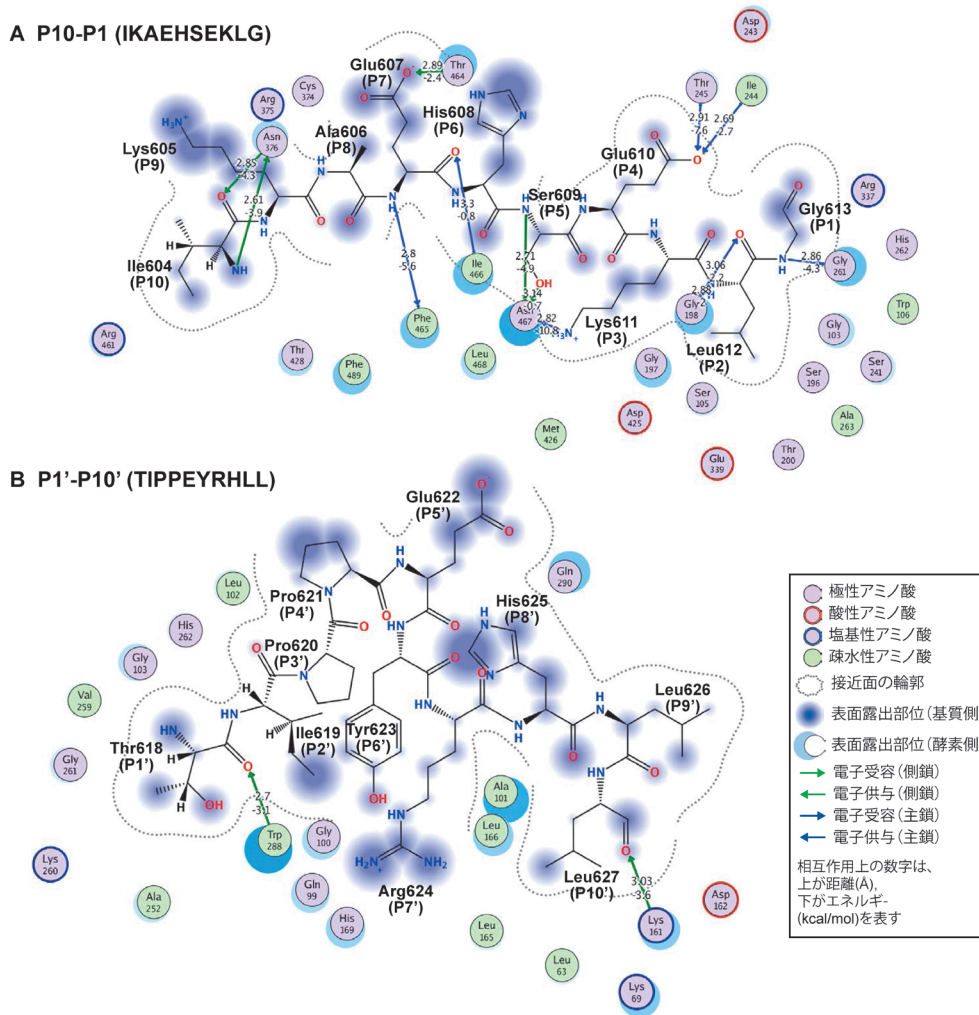


図3 カルパイン-2と基質 (CAST) との相互作用
 カルパイン-2の活性化状態の立体構造 (図2参照, 3BOW) から, CASTを基質と見立て, P10-P10'に当たる残基とカルパイン側の残基との相互作用 (原子間距離 $<4.5 \text{ \AA}$, エネルギー $<-0.5 \text{ kcal/mol}$) を模式的に表した (MOE Ver.2015.10による描画). ほとんどのカルパイン側の残基はCASTのバックボーン原子に相互作用している.

一方, CAPN3とミニCAPN1がCASTに阻害されないことから, CASTとCBSWドメインとの相互作用の重要性が示唆される. CASTの構造から, P3およびP5以前の部位 (切断部位のすぐN末端側のアミノ酸をP1, その前をP2…と, 逆にC末端側のアミノ酸をP1', その後ろをP2'…と呼ぶ) はCysPcからはみ出してCBSWドメインと相互作用しているため, この部分が安定で特異的な阻害に必要と推定される (図2). ミニCAPN1にはCBSWドメインが存在せず, CAPN3ではIS1という挿入配列のために, CysPc-CBSWドメインの位置関係が他の古典型カルパインとは異なっている可能性がある. そのためCASTはこれらを阻害できないのだろう.

CASTとの複合体の立体構造から明らかとなったもう一つの特徴は, カルパイン側の原子が基質のアミノ酸側鎖原子とほとんど相互作用していない, という点である (図3). CysPc, CBSWドメインと相互作用するCASTのアミノ酸側鎖は, ほぼすべてがカルパインからみて外側に位置しており, カルパインと直接相互作用しているのはペ

チド結合の酸素, 窒素原子であった^{17, 18)}. これは, カルパインには基質特異性が存在するにも関わらず (たとえば, ある基質タンパク質においては, 一定の条件では特定の分解部位が存在する), 基質のアミノ酸配列に明示的なルールが見いだせないという現象 (後述) の構造的な理由となる. その中で, わずかにP2部位 (CASTではLeu) の側鎖は, 弱いながらも広範囲でカルパイン分子表面の原子と疎水的相互作用をしており, 過去に開発され有効性が認められた多くのカルパイン阻害剤がP2部位にLeuまたは疎水性のアミノ酸を持つことも矛盾しない.

しかしながら, P2側鎖との疎水性相互作用は多くのClan CAプロテアーゼ [パパイナやCysカテプシン (カテプシンの中でCysプロテアーゼである分子種) などの総称, MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) におけるペプチダーゼ分類法による] に共通するため, これらも阻害してしまう. すなわち現状では, 「カルパイン阻害剤」と呼ばれるものはCASTを除いてすべて特異性に問題があるといわざるをえない. この, カルパイン阻害剤の特異性の向上

という課題は、いつの時代も多くの化学者を巻き込んで追及されており、最近では、いくつかの新展開がみられている(後述)。難しい問題ではあるが、CASTという模範解答が存在するのだから、解のない絶望的な問題ではなく、道はあるはずだ。

5. 基質特異性にどう向き合うか?

カルパインによる基質分解は限定分解と称され、基質の機能・構造を変換・調節する効果をもたらす。いい換えると、カルパインはモジュレータープロテアーゼであるため、その基質特異性、すなわち、カルパインが“何の”タンパク質を“どの部位”で切断するか、という情報はカルパインの生理機能の本質である。問題は、それがなかなか明示できない(既述のように、そもそもカルパインが側鎖をほとんどみていない)ことであるが、最近、新しい方向性が見えてきた。実際、カルパインの基質特異性の研究の歴史は古く、どのようなタンパク質を切断するか、というアプローチに始まり²⁴⁻²⁶⁾、基質の切断部位配列解析^{27, 28)}、さらにアラインメントによる詳細な解析(たとえば部位特異的スコア行列などを用いた方法)が行われてきた²⁹⁾。しかし、これらは既述のP2に疎水性のアミノ酸が比較的多いということ以上に目立った成果をもたらしていない。一方、近年のコンピュータと生物情報学の発達に伴い、プロテアーゼ研究においても機械学習という手法が注目されてきている。ペプチドライブラリーなどを併用して、カルパインの基質特異性に関してもいくつかの解析がなされ、切断部位予測器の作出に至っている³⁰⁻³⁷⁾。たとえば、我々は、基質配列由来のペプチドアレイを用いた定量的活性構造相関

(quantitative activity-structure relationship : QSAR) 解析により、陽性的中率(切断すると予測した部位の何%が切断されるか) 87.5%という高い値を持つ切断部位予測器を実現した。特に、立体構造が明らかにされている場合には、新規基質における切断部位(の少なくとも一部)の予測が可能であり、P2に加えてP3'およびP4'が切断効率に重要であるということも明らかとなった³³⁾。

ただし、*in vivo*においてカルパインが基質タンパク質を切断する状況は、ほとんど構造をとらないペプチドを切断する状態とは著しく異なっているうえ、生化学的に*in vitro*でカルパインに切断されやすいタンパク質や部位が、必ずしも*in vivo*でも同様に切断されているとは限らない。将来的には、カルパインと基質タンパク質がどのように細胞内局在するか、足場タンパク質としてどのようなものと相互作用しているか、局所的なCa²⁺濃度がどのように変化するか、などの条件も(きわめて困難と考えられるが)切断予測器に加味することが必要である。同時に、カルパインという酵素の基本的なスペックを評価するために、上記*in vitro*基質特異性の解析を有効活用すべきであろう。実際の*in vivo*と*in vitro*での切れ方の比較から、なぜカルパインがわざわざ切れにくい(やすい)部位を切る(切らない)ようになったのか、ということに対する進化的、化学量論的なヒントが得られるかもしれない。たとえばG-タンパク質は酵素としての性能(回転数)を極端に落とすことで多彩な生理機能を果たすようになったとされる³⁸⁾。同様の歴史(未来)が、カルパインのプロテアーゼとしての性質にも起きた(起きる)のかもしれない。

表2 カルパインノパチー

遺伝子	発現	遺伝子変異と関連する疾患	文献
<i>CAPN1, Capn1</i>	全細胞	痙性対麻痺, 血小板不全 (<i>in vitro</i>)	103, 164)
<i>Capn2</i>	ほぼ全細胞	胎生致死	165, 166)
<i>Capns1</i>	全細胞	胎生致死	167, 168)
<i>CAPN3, Capn3</i>	主に骨格筋	筋ジストロフィー <i>etc.</i>	85, 87, 169, 170)
<i>CAPN5, Capn5</i>	ほとんどの細胞	硝子体網膜症	90, 95)
<i>Capn6</i>	主に胎生筋, 胎盤	発育過度	139)
<i>CAPN7</i>	ほとんどの細胞	np*	—
<i>Capn8</i>	主に胃腸	胃出血	19)
<i>Capn9</i>	主に胃腸	胃出血	19)
<i>CAPN10</i>	ほとんどの細胞	2型糖尿病	161)
<i>CAPN11</i>	主に精巣	np	—
<i>CAPN12</i>	主に毛包, 皮膚	魚鱗症	196)
<i>CAPN13</i>	ほとんどの細胞	np	—
<i>CAPN14</i>	主に食道	好塩基球性食道炎	96)
<i>CAPN15/SOLH</i>	ほとんどの細胞	np	—
<i>CAPN16/ADGB/C6orf103</i>	主に精巣	np	—

*CAPNx*および*Capnx*は各々ヒト, マウスの遺伝子を示す。

*np: ヒト, マウス両方ともまだ報告がない。

6. カルパインが関与するさまざまなヒト疾患

カルパインが関与する疾患は次の3通りに大別される。

- (1) ヒトの標準型カルパインの活性が疾患の増悪に関与するもの。神経変性疾患, 心・筋疾患, 虚血性疾患, がん, 眼疾患など。
- (2) カルパイン遺伝子の病原性変異によって起こる遺伝性疾患 (「カルパインノパチー」と呼ばれる, 表2)。肢帯型筋ジストロフィー (limb-girdle muscular dystrophy :

LGMD) 2A型 (LGMD2A), 常染色体優性新生血管炎症性硝子体網膜症 (autosomal dominant neovascular inflammatory vitreoretinopathy : ADNIV), 魚鱗症 (ichthyosis), 好塩球性食道炎 (eosinophilic esophagitis : EoE), 遺伝性痙性対麻痺 (hereditary spastic paraplegia : HSP) など。

- (3) 寄生虫・病原性微生物が原因となる疾患, つまり感染症で, ヒトのカルパインあるいは自身のカルパインが病原体の生存や感染などに必須なもの。マラリア, トリパノソーマ症, ジストソーマ (住血吸虫) 症, カンジダ

表3 カルパイン阻害剤の効果に関する報告 (抜粋, 2010年以降)

阻害剤, ワクチン	改善がみられた疾患モデル (悪影響がみられた現象)	発症/感染 後の処置*	標的カルパイン	文献
ALLNal	コクサッキーウイルス B3 感染 (子宮着床)	x	n/a**	171)
	滑脳症	x	CAPN2	172)
	網膜色素変性症	x	n/a	173)
ALLNal, PD150606	網膜色素変性症	x	n/a	174)
ALLNal, calpeptin	乳がん	x	CAPN1	175)
Calpeptin	パーキンソン病		n/a	176)
	多発性硬化症	x	n/a	177, 178)
	特発性炎症性筋疾患	x	n/a	179)
	肺線維症	x	n/a	180)
MDL28170, calpeptin	黒色腫	x	n/a	181)
MDL28170	心虚血-再灌流		CAPN1	54, 182)
	慢性心疾患	x	n/a	183)
	リーシュマニア症	x	<i>L. amazonensis</i> カルパイン	147)
	アフリカ睡眠病	x	<i>T. cruzi</i> カルパイン	184)
	子癩前症		n/a	185)
	脊髄損傷	x	n/a	186)
	網膜色素変性症	x	n/a	187)
	自己免疫性脳炎・多発性硬化症	x	n/a	188)
SNJ1945	網膜虚血	x	n/a	189)
	滑脳症		n/a	47)
	心虚血-再灌流		n/a	190)
	外傷性脳障害	x	n/a	191)
	マカドジョセフ病		n/a	192)
BDA-410	加齢症候群	x	CAPN1	80)
	鎌形赤血球症	x	CAPN1	193)
	腹部大動脈瘤・アテローム性動脈硬化症	x	CAPN1	58)
	白内障	x	n/a	72)
Macrocyclic aldehyde (CAT811)	網膜色素変性症	x	CAPN1	194)
NH ₂ -GRKKRRQRRRPP QPDALKSRTLRL-COOH (Tat- μ CL), PD150606	マラリア	x	<i>Pf</i> カルパイン(?)	195)
Dipeptidyl α,β -unsaturated ester	マラリア	x	<i>Pf</i> カルパイン(?)	145)
Hypervalent organotellurium compound (RF19)	ジストソーマ症	x	Smp_157500 (<i>S. mansoni</i> カルパイン)	150, 151)

* 「x」は, 報告した論文において, 発症後・感染後に阻害剤を投与して効果をみていることを表す。

** n/a : 特定のカルパイン分子種に限定されない。

症、歯周病など。

これらの疾患に対して、どのような治療戦略が可能だろうか。まず、(1)のほとんどの疾患に対して、ヒトの標準型カルパインの阻害剤が治療薬となりうる。また、(2)では変異型カルパインの機能不全もしくは過剰活性化が発症原因と考えられる。そのため、遺伝子治療などでその活性を正常化することが究極の治療であるが、過剰活性化に対処するにはカルパイン阻害剤が有効と考えられる。また、特定の活性実体に着目した、活性賦活化の可能性も示唆されている(後述)。(3)においては、いわばハイジャックされた状態ともいえるヒト(=宿主)のカルパインに対して(1)と同様の戦略で対処するとともに、寄生虫・微生物自身のカルパインを標的とした治療法が検討されている。

以下でも引用しているが、阻害剤ではなくカルパインあるいはCASTの遺伝子改変[ノックアウトあるいは過剰発現トランスジェニック(Tg)]マウスを用いた疾患研究は、因果関係を明確に示せる点で非常に優れている。ただし、これらの系は阻害剤に比べると極端な状況となるため、そのデータの解釈には注意を要する。以下、各カテゴリーを代表する疾患例を概説するが、紙面の都合上、疾患モデルにおいて検討された阻害剤と合わせて表3とした。

1) カルパイン活性による症状増悪(神経変性疾患, 心・筋疾患, がん, 眼疾患)

カルパインは、多くの神経変性疾患(アルツハイマー病, パーキンソン病, 滑脳症など, 表3参照)において、増悪因子として位置づけられる³⁹⁻⁴³⁾。ただし、アルツハイマー病の発症機序におけるカルパインの関与は限られたものと、現在では考えられているようである⁴⁴⁻⁴⁶⁾。また、遺伝性疾患の滑脳症では、責任遺伝子産物の一つであるLIS1がモータータンパク質ダイニンの制御に関与しており、カルパインにより分解される非常に半減期の短いタンパク質であることが明らかとなった。一方のアリルにLIS1の機能損失型変異を持つヘテロ接合体では、正常アリルからのLIS1だけではタンパク質量が不足するため、細胞内輸送が破綻をきたし発症すると考えられている。カルパイン阻害剤の投与によってLIS1の減少を抑制すると症状が緩和されることから、投与時期を適切に設定することにより、発症を予防する効果が注目されている^{47, 48)}。

多くの心疾患(急性および慢性)において、カルパインの活性は心筋タンパク質の過剰分解などにより症状を悪化させることが示されてきた⁴⁹⁻⁵⁴⁾。また、動脈硬化モデルにおいてもカルパインの活性化が見いだされている。そのため、これらの疾患に対して、発症前後からカルパインを阻害することが症状緩和や治療効果をもたらすと期待されている⁵⁵⁻⁵⁸⁾。ただし、遺伝子改変マウスの表現型、CAST過剰発現Tgマウスが拡張性心筋症と癒痕治療障害を示し、心筋特異的な*Capn1*ノックアウトマウスでは血流ストレスにより脆弱となること、には要注意である^{59, 60)}。また、カルパインのタイムリーな活性化が心筋症状や心筋毒性の

克服に、たとえば免疫系の調節を通じて必要であることも示されている^{61, 62)}。

同様に、カルパイン-CAST系ががんの病態機序に関与することは古くから知られており、多くの場合、がんの進行に伴ってCAPN1, CAPN2, あるいはCAPNS1の高進が報告されているが、逆にCASTの高進も観察されている^{63, 64)}。また、がん組織などでよくみられる病的血管新生がCASTの抑制によるカルパイン-2の高進によって増強されるという報告⁶⁵⁾や、非標準型カルパインであるCAPN3の黒色腫細胞株における発現変動に関する報告⁶⁶⁻⁶⁸⁾など、その役割(活性ががんを促進するか抑制するか)や細胞種依存性について、混沌としつつも新たな知見が蓄積されつつある。

カルパイン阻害剤を眼疾患の治療に用いる試みも盛んである。これは、主にカルパインにより部分分解されたクリスタリンの凝集が白内障の原因となるためである。第一世代阻害剤であるE-64⁶⁹⁾, SJA6017(第二世代)⁷⁰⁾を経て、最近では大環状分子構造を持つ阻害剤(第三世代)について検証モデルでの好成績が報告された^{71, 72)}。カルパイン阻害剤の治療薬としての実用化が最も近い分野の一つといえる。他に、カルパイン阻害が有効と考えられる眼疾患として、ロドプシンやホスホジエステラーゼなどの遺伝子変異により発症する網膜色素変性症がある。この疾患では、カルパインの下流でカスパーゼやカテプシンも活性上昇し^{73, 74)}、熱ショックタンパク質HSP70の発現量が低下していること⁷⁵⁾も増悪因子である。これらに対する処置をカルパイン阻害剤に組み合わせるといふ、治療戦略が想定される。

一方、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy: DMD)は長らくカルパインの阻害により症状が緩和すると信じられてきたが、最近のマウスモデル⁷⁶⁾やイヌ(ゴールデンリトリバー)モデル⁷⁷⁾の結果によると、カルパインはDMDにおいて活性上昇していても、治療標的とするのは難しいことが示されている⁷⁸⁾。ただし、DMDのマウスモデル(*mdx*マウス)やDMD患者の骨格筋では、早老症の責任遺伝子産物である*α-klotho*の発現が減少しており、*mdx*マウスに*α-klotho*を発現させると筋ジストロフィーの症状が緩和されることが最近見いだされた⁷⁹⁾。*α-klotho*はCa²⁺恒常性をつかさどっており、その欠損によるカルパイン-1の過剰活性化が早老症の発症に大きく寄与し、カルパイン阻害剤によってその症状が緩和されることも明らかとなっている⁸⁰⁾。そのため、筋ジストロフィーにおいて*α-klotho*を補償する薬剤とともにカルパイン阻害剤を使用することは、大きなメリットがあるかもしれない。

2) カルパインパチー(LGMD2A, ADNIV, EoE, その他)

LGMDは四肢の近位筋に症状が集中する筋ジストロフィーであり、LGMD2Aは常染色体劣性のLGMDの1つである^{81, 82)}。世界的には最も頻度の高いLGMDであり

(約20人/100万人), バスク国, レユニオン島など特定の地域では, かなり高い罹患率 (50~10,000人/100万人) を示す^{83, 84)}. 1995年, 骨格筋に偏って発現するCAPN3遺伝子の変異がLGMD2Aを引き起こすことが発見⁸⁵⁾され, カルパインの機能損失がヒト疾患を引き起こす, いわゆる「カルパインパチー」の最初の例となった⁸⁵⁻⁸⁷⁾. LGMD2Aでは, ほとんどの場合CAPN3が機能不全となっており⁸⁶⁾, このことも他の筋ジストロフィーでは標準型カルパインの活性が症状の悪化につながっている事実⁷⁸⁾とまさに対照的である. その後, LGMD2Aマウスモデル (*Capn3*^{-/-}, および*Capn3*^{C129S/C129S})を用いた実験により, CAPN3はプロテアーゼ機能とは独立に筋細胞のCa²⁺動態制御にも関与することが示された^{88, 89)}. よって, LGMD2Aの場合はCAPN3を阻害するのではなく, CAPN3の機能を遺伝子治療などで回復させることが必要である.

ADNIVは網膜症から失明に至る重篤な優性遺伝性疾患であり, CAPN5が責任遺伝子産物となっている^{90, 91)}. CAPN5はほぼすべての細胞に発現するが, 中枢神経系での発現が高い^{92, 93)}. ADNIVではこれまでにCAPN5の病原性変異としてR243L, L244P, K250Nが同定されているが⁹¹⁾, このうちR243Lは機能獲得型の過剰活性化体であることが示唆されており, 構造機能相関の視点からも興味深い. 実際に, CAPN5:R243Lを発現するTgマウスは, 組織学・生理学的にADNIV様症状を呈する一方⁹⁴⁾, *Capn5*^{-/-}では顕著な表現型が観察されていない⁹⁵⁾. このTgマウスでは症状が顕著になる以前から炎症関連遺伝子の発現変動が認められており, ADNIV発症の初期機構や共通の症状を示すブドウ膜炎の病態解析に有効なモデルマウスとしても注目されている. 以上よりADNIVの治療には, 過剰なCAPN5活性を阻害することが有効と考えられる. 他の眼疾患への取り組みが参考となる一方で, CAPN5の活性を標準型カルパインの活性と見分けることが課題とされる.

EoEは, 近年, 世界的に発症増加が報告されているアレルギー性の消化管疾患である. ゲノムワイド関連解析によりCAPN14遺伝子の一塩基置換 (single nucleotide polymorphism: SNP) がリスク因子の一つとして同定された^{96, 97)}. CAPN14は, *in vitro*ではIL-4によって発現誘導される. しかし, マウスでは偽遺伝子となっていることもあり, あまり注目されてこなかった⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾. しかし, 食道に偏って発現すること, EoEで発現が高進しており, *in vitro*ではIL-13によっても発現が誘導されることが明らかとなった⁹⁶⁾. 現時点では発症機序はまったく不明であるが, 高リスク型のSNPでは, 発症時の発現高進が抑制されているという興味深い現象が起きている. CAPN14がプロテアーゼとして機能している可能性について, 現時点では間接的にのみ示されている. そのため, 今後の機能解析により, EoE治療の標的として, CAPN14の活性 (機能) を阻害または賦活する方法論がみえてくると期待される.

ヒト遺伝性疾患との関連はまだ報告されていないが, 消化器官機能との関係において胃粘膜に局在するCAPN8,

CAPN9も注目に値する^{19, 101)}. 遺伝子改変マウスの実験より, *Capn8*^{-/-}, *Capn9*^{-/-}, あるいは*Capn8*^{C105S/C105S}は, 野生型マウスよりアルコールストレスによる胃出血傾向が顕著に高い¹⁹⁾. また, CAPN8と9は複合体G-カルパイン (CPAN8/9) を形成しており, 一方の欠損でG-カルパインの機能は損なわれてしまう¹⁹⁾. すでに, ヒトCAPN8, CAPN9とも多くのSNPが報告されていて, その一部はCAPN8, 9の活性を失わせる¹⁹⁾. つまり, これらのSNPを持つ人でストレス性胃出血傾向の増加がある可能性, その治療としてはLGMD2Aと同様にカルパインの活性回復・賦活が有効であることが示唆されている¹⁰²⁾.

ごく最近, CAPN1が常染色体劣性遺伝性疾患であるHSPの責任遺伝子 (*SPG76*に相当) として報告された¹⁰³⁾. また, CAPN1のSNPがヒトおよびイヌの脊髄小脳変性症にリンクしていることも明らかとなってきた^{104, 105)}. 遺伝形式およびモデル生物での解析結果より, これらの疾患においてもCAPN1を補完することが適切な治療方針であることが示されている. さらに, CAPN12の活性損失型変異が魚鱗症に関与するという報告もなされた¹⁹⁶⁾. 現時点ではCAPN12の病態生理機能は不明で, 他の魚鱗症責任遺伝子 (脂質トランスポーターの*ABCA12*など) の修飾遺伝子 (modifier gene) の可能性もあり, 今後の解析が待たれる.

3) カルパインを介した感染症 (マラリアから歯周病まで)

寄生虫や病原性微生物による疾患はいまだに世界的な脅威である. 特筆すべきことに, これらの生物には多様なカルパイン分子種が存在し, その病原性や感染・生存に重要な役割を果たしており, 前途有望な治療標的となっている¹⁰⁶⁾. 以下に述べる疾患のうち, トリパノソーマ症, リーシュマニア症, およびジストソーマ症は, 世界保健機関 (World Health Organization: WHO) によって「顧みられない熱帯病 (neglected tropical diseases: NTD)」と定められており, 世界で10億人以上を苦しめている. 関連する研究成果を予防・治療へと応用することが, 世界レベルでの包括的取り組みへの一助として期待されている.

マラリアは, アピコンプレックス門の胞子虫*Plasmodium falciparum*に感染したハマダラカによって媒介され, 発熱, 貧血, 脾腫などを引き起こす最も重篤な寄生虫病の一つである. *P. falciparum*にただ一種あるカルパイン (*Pf*-カルパイン) は細胞周期に関与しており, 生存に必須である¹⁰⁷⁾. 他にも宿主 (ヒト) のヘモグロビンを消化して生き延びるために重要なAspおよびCysプロテアーゼが複数同定されており¹⁰⁸⁾. これらのプロテアーゼに対する阻害剤開発と併用が主要な治療戦略とされる. 一方, 感染された宿主のカルパイン-1の役割については不明確で, *P. falciparum*の増殖に必要なものであるという報告¹⁰⁹⁾, および, それを反証する報告¹¹⁰⁾がある.

トリパノソーマ症およびリーシュマニア症は, ユーグレノゾア門*Trypanosoma*属や*Leishmania*属によるもので,

それぞれ複数の病型がある。いずれも昆虫によって媒介され、たとえば、アフリカ睡眠病は、ツェツェバエにより媒介された *Trypanosoma brucei* により発症、睡眠周期攪乱から昏睡・死に至るもので、代表的なNTDである¹¹¹⁾。驚くべきことに、これらの寄生虫はカルパイン遺伝子を18~27種も有するが、そのほとんどで活性中心を形成すべきCys, His, またはAsn残基が他のアミノ酸に置換している¹¹²⁾。本稿の定義では、これらもカルパインであり(2節参照)、実際に、寄生虫の生活環において重要な機能を担っているようである[例: *T. brucei* のClpGM6は、CysPc (His→GlnあるいはCys→Gly) およびCBSWドメインを各三つずつと二つのMITドメインの他に、68アミノ酸からなる繰り返しユニットが70回以上繰り返した構造を持つ820kDaの巨大タンパク質で、形態変化に必須である¹¹³⁾。図1参照]。今後、これらのやや変則的なカルパイン分子種についても、機能に関する知見に基づいた治療・予防手段の開発が期待されている。

ジストソーマ症は、扁形動物門の住血吸虫 *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* がヒラマキガイによって媒介されて発症し、尿路線維症、腎炎、下痢・血便、肝硬変などの慢性症状を呈する¹¹⁴⁾。 *S. mansoni* は七つのカルパイン遺伝子を持ち、そのうち四つは古典型カルパインを、一つはCAPN7ホモログをコードする¹¹⁵⁾。すでに、古典型カルパインの一つ、Smp_157500 (図1) は有望なワクチン候補として注目されているが、その生理機能自体はまったく不明である。

カビ・酵母では、その多くに(本稿執筆時点で全ゲノム解析済みの真菌類449属のうち431属)カルパイン遺伝子が1コピー以上見いだされている(しかし、カルパインは、*Schizosaccharomyces* や *Pneumocystis* などには存在しない。3節参照)。真菌類には、白癬(水虫・たむしなど)の原因菌(*Trichophyton tonsurans* など)から、重篤な感染症、特に日和見感染によって致死的な全身症状を引き起こすもの(*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis* など)が含まれる。

真菌の多くは低pH(酸性)環境で育成していることが多いため、ヒト組織に寄生するためには高pH(中性)側に環境適応をする必要がある。何とその経路で機能するのが、前述のように、真菌のカルパインRim13/PalBであり¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾、これらはヒトCAPN7のホモログである(表1)¹¹⁹⁾。高pH適応シグナル経路の要はRim13/PalBがリクルートされた転写調節因子のRim101/PacCを限定切断・活性化して、適応に関わる遺伝子群の発現を切り換えることである¹¹⁹⁻¹²¹⁾。このカスケードは、真菌感染の防止・関連疾患の治療にきわめて効果的な標的を提示するものであるが、細胞ストレスに反応してカルパインが活性化する機構を遺伝学的に明示した初めて(現在でもほぼ唯一の)の例としても重要である。

以前より指摘されていることだが、細菌のカルパインホモログは少なく、現時点で解読されている4000以上の細

菌の全ゲノム上にわずか67遺伝子(55の細菌)しか存在しない¹²²⁾。その中で、ヒトの健康・疾患に関わるものとして、歯周病を引き起こす *Porphyromonas gingivalis* が有するTpr (thiol proteaseの略) というカルパインホモログ遺伝子があげられる。Tprは菌の生存や感染に必須であり、実際にCa²⁺依存的なCysプロテアーゼ活性を持つ。また、ヒトの補体タンパク質などを基質とするため、口腔内の免疫系から逃れるために機能することが示唆されている¹²³⁾。

7. カルパインを標的とした治療戦略

カルパイン関連疾患のほとんどについて、カルパイン阻害剤が治療の第一戦略となる。阻害剤の特異性、作用機序の理解や扱いやすさは、現在、どのレベルに達しているのか。また、カルパイン遺伝子変異による疾患、カルパインパッチーの中でLGMD2Aは機能欠失が発症原因だと確認されている。つまり、CAPN3の活性を補完することが必要となる。現在までのCAPN3に関する知見は、治療戦略にどのような可能性を与えるだろうか。

1) カルパインをやっつけろ！(できれば特異的に)

第一世代阻害剤(ロイペプチン、E-64やその誘導体¹⁾)は、カルパインに特異的ではなく、他のパパイーン様プロテアーゼ¹²⁴⁻¹²⁶⁾のみならず、たとえばマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase: MMP)²¹²⁷⁾などに対しても広い阻害活性を示す。続いて、SJA6017⁷⁰⁾やPD150606¹²⁸⁾などの第二世代阻害剤が開発されているが、残念ながら特異性はまだ十分ではない。しかし、その後の構造生物学の発展により、非常に有望な第三世代阻害剤が開発されている。たとえば、既述のようにCASTによるカルパインの阻害は、部分的な α ヘリックス構造形成が特異性を担保する。これに倣い、ペプチドの側鎖の一部に分子内架橋を施して α ヘリックス構造を固定し、カルパインへの特異性向上に成功したことが報告されている¹²⁹⁾。また、大環状の分子を用いた阻害剤は目的外のプロテアーゼへの誘導適合が起こりにくく、カルパイン以外にもさまざまなプロテアーゼに特異的な阻害剤の開発に応用されている^{71, 130, 131)}。カルパイン阻害剤では、白内障治療薬に向けてきわめて有望な結果が得られている⁷²⁾。

特異性の点で希望の光を投げかけるような、ひと味違うアイデアとして、カルパイン自身の一部の配列を阻害剤に用いるという方法論は興味深い¹³²⁾。安定化因子(一種のシャペロン)との相互作用が競合的に阻害されると、そのカルパイン分子が不安定化・不活性化するというものである。また、既存の阻害剤は、ほぼすべて活性中心を標的としているため、逆に特異性を下げる一因となっている(カルパインは基質のアミノ酸側鎖をほとんど認識しないし、P2の疎水性残基嗜好性は他のパパイーン様プロテアーゼでも保存されているため)。しかし、狙い方を工夫することで、特異性を果たせることはできないだろうか。たと

えば、カルパインの活性化とは、すなわちPC1とPC2が近づいてCys-His-Asnからなる活性中心トライアッドを形成することなので、不活性化状態のカルパインのPC1とPC2の間隙に入り込んでこの配置変換を阻害する物質は、カルパインにきわめて特異的なものとなりうるのではないか。

一方、阻害剤を用いて得られる結果については、「本当にカルパインが標的なのか」という点に検討の余地があるだろう。よく使われるALLNalやMDL28170（各々カルパイン阻害剤1および3とも呼ばれる）を含め、カルパイン阻害剤のほとんどはCysカテプシンの多くをよく阻害する。そのため、阻害剤による生物学的な効果ではカルパインとカテプシンの寄与が見分けられず、あいまいになっている報告が山のようにある。たとえば、カテプシンにある程度特異的な阻害剤（カテプシンB, K, S, Lに対して、各々Ca-074, odanacatib, CLIK-060, CLIK-148などが知られている¹³³⁻¹³⁵）を用いて検証すべきではないか。その結果、ALLNalと同様の効果があれば、実はカテプシンが増悪因子である可能性が高い。

繰り返しになるが、現在のところCASTが唯一、完全にカルパインに特異的な分子である。CASTの存在は、きちんとカルパインだけを阻害する薬剤は開発可能であることを示している。もちろん、実用に耐えるために解決せねばならない課題は（物性・価格など）ある。

もう一つ興味深い視点は、アロステリック（活性中心とは別の部位に作用する）阻害剤である。これまでに、 α -メルカプトアクリル酸誘導体（PD150606など）がPEFドメインに結合し、非競合的にカルパインを阻害することが明らかとなっている¹²⁸。ところが最近、PD150606はCysPcドメインからのみなるミニカルパインの活性を阻害することから、やはり活性領域に作用していることが判明した¹³⁶。残念ながら、その詳細な阻害機構は不明であるが、ジスルフィド結合により二量体化した α -メルカプトアクリル酸誘導体は、単量体に比べて数百倍強いカルパイン阻害活性を示すことが報告されている¹³⁷。これらの阻害剤に関する知見を合理的に応用し、新たなアロステリック阻害剤を開発する可能性が期待される。実際、CycPcドメインと立体構造の類似するカテプシンKでは、生物情報学的手法でアロステリック阻害剤の開発に成功しており¹³⁸、カルパインにおいても十分実現可能と考えられる。

さらにまったく別のコンテキストから、CAPN6の抑制というストラテジーも興味深い。CAPN6は、ヒトカルパインの中で唯一活性中心のCysがLysに変異しており、プロテアーゼ活性を有しないユニークな分子で、胎生筋・骨や成体の胎盤に発現している。Capn6ノックアウトマウスでは骨格筋の有意な肥大に伴う体重の増加が観察されており、CAPN6は骨格筋の発達抑制に関与すると考えられる¹³⁹。そのため、ミオスタチン（筋発達を抑制するサイトカイン）の抑制ストラテジー^{140, 141}と同様に、DMDやLGMD2AにおいてCAPN6の抑制による筋量増加が治療効果を与える可能性が考えられている。興味深いことに、

CAPN6はマクロファージでmRNAスプライシングに関与しており、その抑制によりアテローム性動脈硬化を有意に改善できるため¹⁴²、新しい標的カルパインとして大きな注目を浴びている。

2) 寄生虫・病原性微生物のカルパインもやっつけろ！（活性はともあれ）

既述のとおり、ヒトに深刻な疾患をもたらす寄生虫・病原性微生物の多くにおいてもカルパインは、生存、増殖、感染などに必須の機能を担っている。これらは、厳密にはヒトカルパインとは異なる性質を持つことが予想されるので、疾患治療における特異的な標的として非常に有望である。中には、ヒトカルパインに対する阻害剤が効くものもある。また、宿主が発現するヒトカルパインが寄生虫・病原性微生物の感染、増殖のためにハイジャックされている場合には、ヒトカルパインに対する阻害剤が一石二鳥の効果をあげることも予想される。たとえば、マラリアの原因となる*P. falciparum*のPfカルパインも生存に必須であるが、ALLNal, ALLMal, BDA-410など従来のカルパイン阻害剤が*P. falciparum*の赤血球への侵入や増殖を抑制したという報告がある^{143, 144}。最近ではTeを含む超原子価有機テルル化合物がPfカルパインを阻害するという報告もある¹⁴⁵。肝心のPfカルパインの活性や機能については不明な点が多く、最近確立された活性を持つ組換えPfカルパインの発現系を用いた解析に興味を持たれる¹⁴⁶。同様に、カルパイン阻害剤MDL28170は、宿主細胞への毒性はほとんどなく、*Trypanosoma*や*Leishmania*の増殖を抑制する効果が報告されている^{147, 148}。しかしながら、これらの寄生虫のカルパインは活性中心残基のいずれかを失っているものがほとんどのため¹¹²、MDL28170が何に作用しているのかは不明であり、宿主のカルパイン阻害が上記の効果を引き起こしている可能性も大きい。

*S. mansoni*のカルパインSm-p80（細胞膜上に提示されているカルパインSmp_157500のC末端80kDa部分）は、ジストソーマ症の有望なワクチン候補の一つとなっている^{149, 150}。残念ながらこのカルパインの生理機能については明らかではないが、ヒビを用いた感染実験やさまざまな属の住血吸虫を用いた実験から、ワクチンとしての優秀性と属を超えた広汎性が示されている^{150, 151}。寄生虫のカルパインを標的とした、特異的戦略の例である。

真菌類、細菌（歯周病菌）のカルパインは上記寄生虫のカルパインよりもさらにヒトカルパインとの構造の差異が著しいため、特異的阻害剤のデザインにはもってこいであると考えられる。特に、抗生物質の使いにくい真菌類の引き起こす日和見感染などに対して貢献できる可能性がある。現時点では、これらのカルパインに対する阻害剤の解析はほぼ皆無で、立体構造解析も行われていない。“宝の山”となる可能性を秘めた分野に思える。

3) カルパインの活性を取り戻せ！（でも、どうやって？）

現在のところ、LGMD2Aは唯一、ヒトカルパイン遺伝子の機能損失型変異で生じることが確認されている遺伝病「カルパインパチー」である。この疾患の治療にはCAPN3の活性を補完することが必要となる。ヒトでの疾患ははまだ確認されていないが、CAPN8, 9, 11, 12, 13, 15, 16に起因するカルパインパチー（もしあれば、であるが）も、同様にカルパインの活性を取り戻すことが必要と考えられる。カルパインの分子量が現存するウイルスベクターに入りうるサイズ（～100kDa）であることと、カルパインにはよい活性化剤が存在しないことから、現状では遺伝子治療が第一選択となる^{140, 152, 153}。

LGMD2Aの遺伝子治療にあたって、CAPN3のプロテアーゼ活性の制御機構がまだに不明であることは、大きなデメリットである。たとえば、CAPN3発現AAVベクターを用いた遺伝子治療開発の過程で、骨格筋はCAPN3の外部からの発現を許容する（制御できる）が、心筋その他の組織ではそうではなく、CAPN3の発現が組織を損傷してしまうことが明らかとなった^{59, 153}。解決法として、発現ベクターのプロモーターの骨格筋特異性を（たとえば、CAPN3の遺伝子領域を用いるなどして）高めることなどが模索されている¹⁵³。これに関連して、活性のある完全長のCAPN3を外来遺伝子として発現させることに危険が伴うとすれば、点変異のLGMD2Aの場合（全LGMD2Aの1/3以上に当たる）には、遺伝子編集技術とiPS細胞の技術を用いて、変異を修正するということが今後視野に入ってくるだろう¹⁵⁴。

一方、CAPN3には分子間相補（intermolecular complementation: iMOC）という特筆すべき性質が存在する¹⁵⁵（図4）。CAPN3は強力な自己分解活性を持っており、*in vitro*では半減期10分未満で消失してしまう。この分解によって、約35kDaのN末端断片（C3N）と約58kDaのC末端断片（C3C）が生じる。前者には活性中心のCys残基が、後者にはHis, Asn残基が含まれるため、それぞれだけではプロテアーゼ活性を持ちえない。

しかしながら、CAPN3の両断片は再び会合して活性を回復できるのである。さらに、C3NとC3Cの間でのiMOCに加えて、全長とC3N（あるいはC3C）との間でもiMOCが生じる。すなわち、点変異により不活性となった全長CAPN3は、その点変異の位置を含む野生型断片（C3NまたはC3C）が存在するとiMOCにより活性を取り戻すことができることとなり、LGMD2Aの遺伝子治療を野生型断片（C3N, C3C）の発現で行えるかもしれない。これらの野生型断片は単独では活性がないため、CAPN3を発現していない骨格筋以外の組織では活性を持ちえないと期待される。これは安全性の面で大きな利点であろう。

iMOC自体は、ちょうど大腸菌のβ-ガラクトシダーゼのα相補と同様の機能であるが、自己分解を経ての相補という現象は、原核・真核細胞のプロテアーゼでは、現在のと

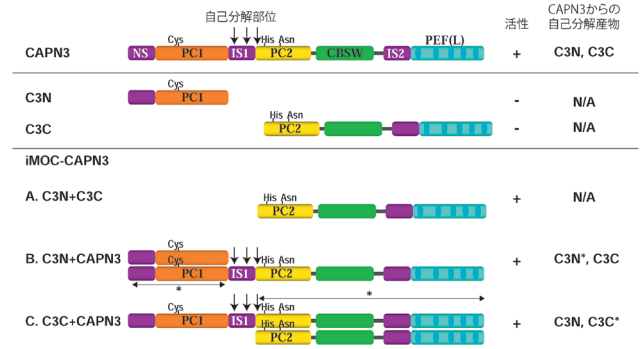


図4 CAPN3のiMOC

CAPN3は、強力な自己分解活性を持つ。主要な自己分解部位はIS1に存在し、それぞれPC1とPC2のみを含む、活性のないC3N, C3Cとなる。分子間相補により構築されるiMOC-CAPN3は構成成分によって、(A) C3NおよびC3C, (B) C3NとCAPN3, (C) C3CとCAPN3の3形態が考えられる。(B)および(C)では、CAPN3の自己分解が起きた後、(A)の形態によって活性が回復されると考えられる。そのため、CAPN3においてC3N, あるいはC3Cに対応する部分に変異(*)が存在している場合、その影響が打ち消される可能性がある。C3C: CAPN3 C-terminal fragment, C3N: CAPN3 N-terminal fragment, CBSW: Calpain-type β-sandwich domain, iMOC: intermolecular complementation, IS1/2: insertion sequence 1/2, NS: N-terminal sequence, PC1/2: protease core domain 1/2, PEF: penta-EF-hand domain.

ころ唯一の例であり、他にサイトメガロウイルス（CMV）と単純ヘルペスウイルス（HHV, HSV）のプロテアーゼ（アセンブリンと呼ばれる）で報告^{156, 157}があるのみである。カスパーゼ、ヤクラミジアのプロテアーゼ（CPAF）なども前駆体が2断片に切断されて分子内二量体を形成して活性化するが、CAPN3のように両断片を溶液中で混合するだけで活性を取り戻すことはない。このように、特異な性質であるため、自己分解とiMOCという性質を利用した治療法の可能性を現実化するためには、いつ、どこで、どのような形でCAPN3が活性を発現するのかについてもっと研究を進める必要がある。

一方、LGMD2A型変異CAPN3の中には活性が野生型よりも高進しており、過剰な自己分解によりCAPN3タンパク質が消失してしまっている^{86, 158}というケースも存在している。これらの多くはPEFドメインに点変異体がみられるため、前述のPD150606などの、PEFドメインに相互作用する分子を利用して過剰活性化型変異体CAPN3の活性を部分的に阻害すると、CAPN3が安定化されて症状が軽減するという可能性も考えられる。

8. おわりに

プロテアーゼがさまざまな疾患治療の標的となりうることはすでに周知のこととなっている¹⁵⁹。その中で、カルパインに関しては、酵素としての実態・生理機能理解のところで少し立ち遅れていることは否めない。今回、あえてCAPN10と2型糖尿病（T2DM）に関しては言及しなかったが、それは、CAPN10がどのようにT2DMに関与してい

るのか、治療に際して補完するべきか阻害するべきか、がまったく不明なままであるからだ¹⁶⁰⁻¹⁶²。今後の研究の進展が要注目である。

本稿では、阻害剤の特異性についてしばしば言及したが、「使える」阻害剤という概念はその目的（疾患治療 vs 純粋科学的実験）によっても変わる^{131, 163}。疾患治療を考えれば、阻害剤に特異性がなくても、副作用なく症状を緩和できるなら、まったく問題ないともいえる。たとえばカルパインとカテプシンの両方が症状悪化をもたらしているケースも少なくないが、このような場合はむしろ両者に広く効く阻害剤の方が望ましいとさえいえる。

しかしながら、対症療法ならではの後手感や未知の因子に対する脆弱性は除かれるべきだし、長期的な視点からも、思わぬ副作用を避けるため、阻害剤の特異性は十分に磨かれるべきものであると考える。また、疾患モデルにおけるカルパイン阻害剤の効果は、使用目的に応じて、発症前からの投与と発症後の投与による治療効果をそれぞれ評価することが、「使える」阻害剤を見分けるために必要であろう。理想的なカルパイン阻害剤を目指して、特異性を高めるための可能性はいくつかあげたとおりである。筆者らはカルパインがどのように基質特異性を発揮するのかという観点から、今後の開発を下支えしたいと思う。

カルパイン阻害剤の開発が望まれる一方、カルパイン阻害による副作用も忘れてはならない。特に心筋、免疫系、胎盤などにおけるカルパイン活性の重要性は、比較的最近に認識されてきたことであり、新たなカルパインパッチメカニズムを内包している可能性がある。さらには、カルパインの阻害・活性化と、他の分子の阻害・活性化とを合理的に組み合わせることを、治療効率という観点から検討することもありうるのではないだろうか。

現段階では、カルパインの生理機能に関する基礎的な理解がまだまだ不足していることを痛感する。しかし、原石にハズレはなく、正しい順番で拾うと綺麗に光るようである。カルパイン自体の解析はもちろん、それが関与する現象・ネットワークを広く理解することが今後のカルパイン研究の発展につながると考えられる。

謝辞

筆者らがカルパイン研究を始めることができ、今日まで続けることができたのは偏に鈴木紘一先生の思いやり溢れたご指導の賜物で、本総説は天国の先生に捧げます。また、研究へのご指導・ご協力をいただいた旧東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門の榎森康文博士、本間好博士、川崎博史博士、秋田朗子博士、大海忍博士、大野茂男博士、西道隆臣博士、阿部啓子博士、旧東京大学分子細胞生物学研究所生体超高分子研究分野の石浦章一博士、川原裕之博士、前田達哉博士、東京都医学総合研究所の田中啓二博士、米川博通博士、多屋長治博士、正井久雄博士、共同研究で大変お世話になりました饗場篤博士、荒畑喜一博士、家村俊一郎博士、大島泰郎博士、木村澄子博士、小

松雅明博士、崎村建司博士、反町典子博士、千葉智樹博士、夏目徹博士、埜中征哉博士、林由紀子博士、畠山鎮次博士、原孝彦博士、牧正敏博士、馬見塚拓博士、丸山工作博士、水島昇博士、村上誠博士、村田茂穂博士、柳田光昭博士、Siegfried Labeit博士、Jacques Beckmann博士、Henk Granzier博士、Carol Gregorio博士、Isabelle Richard博士に深謝申し上げます（紙面の都合で現所属を割愛させていただきました）。そして、カルパイン研究に邁進し、共にサイエンスしてくれる(た)同志、すなわち現旧全ラボメンバーに心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ono, Y., Saido, T. C., & Sorimachi, H. (2016) *Nat. Rev. Drug Discov.*, in press.
- 2) Guroff, G. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 149-155.
- 3) Murachi, T., Tanaka, K., Hatanaka, M., & Murakami, T. (1981) *Adv. Enzyme Regul.*, **19**, 407-424.
- 4) Murachi, T. (1989) *Biochem. Int.*, **18**, 263-294.
- 5) 鈴木紘一 (1991) *細胞工学*, **10**, 545-551.
- 6) Suzuki, K., Hayashi, H., Hayashi, T., & Iwai, K. (1983) *FEBS Lett.*, **152**, 67-70.
- 7) Hosfield, C.M., Elce, J.S., Davies, P.L., & Jia, Z. (1999) *EMBO J.*, **18**, 6880-6889.
- 8) Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K., & Bode, W. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 588-592.
- 9) Ono, Y., Iemura, S., Novak, S.M., Doi, N., Kitamura, F., Natsume, T., Gregorio, C.C., & Sorimachi, H. (2013) *J. Mol. Biol.*, **425**, 2955-2972.
- 10) Zhao, S., Liang, Z., Demko, V., Wilson, R., Johansen, W., Olsen, O.A., & Shalchian-Tabrizi, K. (2012) *BMC Evol. Biol.*, **12**, 193.
- 11) Maeda, T. (2012) *FEBS J.*, **279**, 1407-1413.
- 12) Maemoto, Y., Kiso, S., Shibata, H., & Maki, M. (2013) *FEBS J.*, **280**, 2594-2607.
- 13) Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J.S., Davies, P.L., Elce, J.S., & Cygler, M. (1997) *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 532-538.
- 14) Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K., Carson, M., Jin, L., Yuen, P.W., Takano, E., Hatanaka, M., DeLucas, L.J., & Narayana, S.V. (1997) *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 539-547.
- 15) Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C.C., Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K., & Narayana, S.V. (2003) *J. Mol. Biol.*, **328**, 131-146.
- 16) Hata, S., Sorimachi, H., Nakagawa, K., Maeda, T., Abe, K., & Suzuki, K. (2001) *FEBS Lett.*, **501**, 111-114.
- 17) Hanna, R.A., Campbell, R.L., & Davies, P.L. (2008) *Nature*, **456**, 409-412.
- 18) Moldoveanu, T., Gehring, K., & Green, D.R. (2008) *Nature*, **456**, 404-408.
- 19) Hata, S., Abe, M., Suzuki, H., Kitamura, F., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Sakimura, K., & Sorimachi, H. (2010) *PLoS Genet.*, **6**, e1001040.
- 20) Lee, H.J., Tomioka, S., Kinbara, K., Masumoto, H., Jeong, S.Y., Sorimachi, H., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**, 22-31.
- 21) Hata, S., Doi, N., Kitamura, F., & Sorimachi, H. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 27847-27856.
- 22) Ono, Y., Kakinuma, K., Torii, F., Irie, A., Nakagawa, K., La-

- beit, S., Abe, K., Suzuki, K., & Sorimachi, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 2761–2771.
- 23) Moldoveanu, T., Hosfield, C.M., Lim, D., Elce, J.S., Jia, Z., & Davies, P.L. (2002) *Cell*, **108**, 649–660.
- 24) Ishiura, S., Sugita, H., Suzuki, K., & Imahori, K. (1979) *J. Biochem.*, **86**, 579–581.
- 25) Sasaki, T., Kikuchi, T., Yumoto, N., Yoshimura, N., & Murachi, T. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 12489–12494.
- 26) Wang, K.K., Roufogalis, B.D., & Villalobo, A. (1989) *J. Membr. Biol.*, **112**, 233–245.
- 27) Takahashi, K. (1990) in *Intracellular Calcium Dependent Proteolysis* (Mellgren, R.L., Murachi, T., eds), pp. 571–598, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- 28) Carafoli, E. & Molinari, M. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 193–203.
- 29) Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilagyi, A., Banoczi, Z., Hudecz, F., & Friedrich, P. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 20775–20785.
- 30) Cuerrier, D., Moldoveanu, T., & Davies, P.L. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 40632–40641.
- 31) Thomas, D.A., Francis, P., Smith, C., Ratcliffe, S., Ede, N.J., Kay, C., Wayne, G., Martin, S.L., Moore, K., Amour, A., & Hooper, N.M. (2006) *Proteomics*, **6**, 2112–2120.
- 32) Cuerrier, D., Moldoveanu, T., Campbell, R.L., Kelly, J., Yoruk, B., Verhelst, S.H., Greenbaum, D., Bogoy, M., & Davies, P.L. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 9600–9611.
- 33) Shinkai-Ouchi, F., Koyama, S., Ono, Y., Hata, S., Ojima, K., Shindo, M., duVerle, D., Ueno, M., Kitamura, F., Doi, N., Takigawa, I., Mamitsuka, H., & Sorimachi, H. (2016) *Mol. Cell. Proteomics*, **15**, 1262–1280.
- 34) Verspurten, J., Gevaert, K., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (2009) *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 319–323.
- 35) Liu, Z., Cao, J., Gao, X., Ma, Q., Ren, J., & Xue, Y. (2011) *PLoS ONE*, **6**, e19001.
- 36) Fan, Y.X., Zhang, Y., & Shen, H.B. (2013) *Proteins*, **81**, 622–634.
- 37) duVerle, D.A., Ono, Y., Sorimachi, H., & Mamitsuka, H. (2011) *PLoS ONE*, **6**, e19035.
- 38) Pils, B. & Schultz, J. (2004) *J. Mol. Biol.*, **340**, 399–404.
- 39) Lipton, P. (1999) *Physiol. Rev.*, **79**, 1431–1568.
- 40) Lai, T.W., Zhang, S., & Wang, Y.T. (2014) *Prog. Neurobiol.*, **115**, 157–188.
- 41) Ma, M. (2013) *Neurobiol. Dis.*, **60**, 61–79.
- 42) Cagmat, E.B., Guingab-Cagmat, J.D., Vakulenko, A.V., Hayes, R.L., & Anagli, J. (2015) in *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects* (Kobeissy, F.H., ed), Boca Raton (FL).
- 43) Yokota, M., Tani, E., Tsubuki, S., Yamaura, I., Nakagaki, I., Hori, S., & Saido, T.C. (1999) *Brain Res.*, **819**, 8–14.
- 44) Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Ito-hara, S., Iwata, N., & Saido, T.C. (2014) *Nat. Neurosci.*, **17**, 661–663.
- 45) Nilsson, P., Saito, T., & Saido, T.C. (2014) *ACS Chem. Neurosci.*, **5**, 499–502.
- 46) Saito, T., Matsuba, Y., Yamazaki, N., Hashimoto, S., & Saido, T.C. (2016) *J. Neurosci.*, **36**, 9933–9936.
- 47) Toba, S., Tamura, Y., Kumamoto, K., Yamada, M., Takao, K., Hattori, S., Miyakawa, T., Kataoka, Y., Azuma, M., Hayasaka, K., Amamoto, M., Tominaga, K., Wynshaw-Boris, A., Wani-buchi, H., Oka, Y., Sato, M., Kato, M., & Hirotsune, S. (2013) *Sci. Rep.*, **3**, 1224.
- 48) Yamada, M., Yoshida, Y., Mori, D., Takitoh, T., Kengaku, M., Umeshima, H., Takao, K., Miyakawa, T., Sato, M., Sorimachi, H., Wynshaw-Boris, A., & Hirotsune, S. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 1202–1207.
- 49) Letavernier, E., Zafrani, L., Perez, J., Letavernier, B., Haymann, J.P., & Baud, L. (2012) *Cardiovasc. Res.*, **96**, 38–45.
- 50) Sorimachi, H. & Ono, Y. (2012) *Cardiovasc. Res.*, **96**, 11–22.
- 51) Chen, M., Won, D.J., Krajewski, S., & Gottlieb, R.A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 29181–29186.
- 52) Khalil, P.N., Neuhof, C., Huss, R., Pollhammer, M., Khalil, M.N., Neuhof, H., Fritz, H., & Siebeck, M. (2005) *Eur. J. Pharmacol.*, **528**, 124–131.
- 53) Kang, M.Y., Zhang, Y., Matkovich, S.J., Diwan, A., Chishti, A.H., & Dorn, G.W. 2nd. (2010) *Circ. Res.*, **107**, 903–912.
- 54) Thompson, J., Hu, Y., Lesnefsky, E.J., & Chen, Q. (2016) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **310**, H376–H384.
- 55) Ni, R., Zheng, D., Xiong, S., Hill, D.J., Sun, T., Gardiner, R.B., Fan, G.C., Lu, Y., Abel, E.D., Greer, P.A., & Peng, T. (2016) *Diabetes*, **65**, 255–268.
- 56) Letavernier, E., Perez, J., Bellocq, A., Mesnard, L., de Castro Keller, A., Haymann, J.P., & Baud, L. (2008) *Circ. Res.*, **102**, 720–728.
- 57) Miyazaki, T., Taketomi, Y., Takimoto, M., Lei, X.F., Arita, S., Kim-Kaneyama, J.R., Arata, S., Ohata, H., Ota, H., Murakami, M., & Miyazaki, A. (2011) *Circulation*, **124**, 2522–2532.
- 58) Subramanian, V., Uchida, H.A., Ijaz, T., Moorleghen, J.J., Howatt, D.A., & Balakrishnan, A. (2012) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **59**, 66–76.
- 59) Galvez, A.S., Diwan, A., Odley, A.M., Hahn, H.S., Osinska, H., Melendez, J.G., Robbins, J., Lynch, R.A., Marreez, Y., & Dorn, G.W. 2nd. (2007) *Circ. Res.*, **100**, 1071–1078.
- 60) Wan, F., Letavernier, E., Le Saux, C.J., Houssaini, A., Abid, S., Czibik, G., Sawaki, D., Marcos, E., Dubois-Rande, J.L., Baud, L., Adnot, S., Derumeaux, G., & Gellen, B. (2015) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **309**, H1883–H1893.
- 61) Perez, J., Dansou, B., Herve, R., Levi, C., Tamouza, H., Vandermeersch, S., Demey-Thomas, E., Haymann, J.P., Zafrani, L., Klatzmann, D., Boissier, M.C., Letavernier, E., & Baud, L. (2016) *J. Immunol.*, **196**, 168–181.
- 62) Zhang, S., Meng, T., Liu, J., Zhang, X., & Zhang, J. (2015) *Medicine*, **94**, e445.
- 63) Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G., & Maellaro, E. (2014) *Arch. Biochem. Biophys.*, **564**, 26–36.
- 64) Raimbourg, Q., Perez, J., Vandermeersch, S., Prignon, A., Hannon, G., Haymann, J.P., Baud, L., & Letavernier, E. (2013) *PLoS ONE*, **8**, e60469.
- 65) Miyazaki, T., Taketomi, Y., Saito, Y., Hosono, T., Lei, X.F., Kim-Kaneyama, J.R., Arata, S., Takahashi, H., Murakami, M., & Miyazaki, A. (2015) *Circ. Res.*, **116**, 1170–1181.
- 66) Weeraratna, A.T., Becker, D., Carr, K.M., Duray, P.H., Rosenblatt, K.P., Yang, S., Chen, Y., Bittner, M., Strausberg, R.L., Riggins, G.J., Wagner, U., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., Morin, P.J., & Meltzer, P.S. (2004) *Oncogene*, **23**, 2264–2274.
- 67) Gollob, J.A., Sciambi, C.J., Huang, Z., & Dressman, H.K. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 8869–8877.
- 68) Moretti, D., Del Bello, B., Allavena, G., Corti, A., Signorini, C., & Maellaro, E. (2015) *PLoS ONE*, **10**, e0117258.
- 69) Shearer, T.R., Azuma, M., David, L.L., & Murachi, T. (1991) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **32**, 533–540.
- 70) Fukiage, C., Azuma, M., Nakamura, Y., Tamada, Y., Nakamura, M., & Shearer, T.R. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1361**, 304–312.
- 71) Abell, A.D., Jones, M.A., Coxon, J.M., Morton, J.D., Aitken,

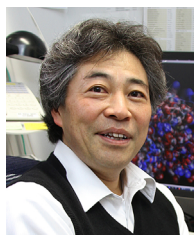
- S.G., McNabb, S.B., Lee, H.Y., Mehrtens, J.M., Alexander, N.A., Stuart, B.G., Neffe, A.T., & Bickerstaffe, R. (2009) *Angew. Chem.*, **48**, 1455–1458.
- 72) Morton, J.D., Lee, H.Y., McDermott, J.D., Robertson, L.J., Bickerstaffe, R., Jones, M.A., Coxon, J.M., & Abell, A.D. (2013) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **54**, 389–395.
- 73) Rodriguez-Muela, N., Hernandez-Pinto, A.M., Serrano-Puebla, A., Garcia-Ledo, L., Latorre, S.H., de la Rosa, E.J., & Boya, P. (2015) *Cell Death Differ.*, **22**, 476–487.
- 74) Shinde, V., Kotla, P., Strang, C., & Gorbatyuk, M. (2016) *Cell Death Dis.*, **7**, e2085.
- 75) Koriyama, Y., Ogai, K., Sugitani, K., Hisano, S., & Kato, S. (2016) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **854**, 237–243.
- 76) Selsby, J., Pendrak, K., Zadel, M., Tian, Z., Pham, J., Carver, T., Acosta, P., Barton, E., & Sweeney, H.L. (2010) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **299**, R1192–R1201.
- 77) Childers, M.K., Bogan, J.R., Bogan, D.J., Greiner, H., Holder, M., Grange, R.W., & Kornegay, J.N. (2011) *Front. Pharmacol.*, **2**, 89.
- 78) Hollinger, K. & Selsby, J.T. (2013) *Acta Physiol. (Oxf.)*, **208**, 234–244.
- 79) Wehling-Henricks, M., Li, Z., Lindsey, C., Wang, Y., Welc, S.S., Ramos, J.N., Khanlou, N., Kuro, O.M., & Tidball, J.G. (2016) *Hum. Mol. Genet.*, in press.
- 80) Nabeshima, Y., Washida, M., Tamura, M., Maeno, A., Ohnishi, M., Shiroishi, T., Imura, A., Razzaque, M.S., & Nabeshima, Y. (2014) *Sci. Rep.*, **4**, 5847.
- 81) Bushby, K.M. (1999) *Brain*, **122**, 1403–1420.
- 82) Fanin, M. & Angelini, C. (2015) *Muscle Nerve*, **52**, 163–173.
- 83) Fanin, M., Nascimbeni, A.C., Fulizio, L., & Angelini, C. (2005) *Neuromuscul. Disord.*, **15**, 218–224.
- 84) Stehlikova, K., Skalova, D., Zidkova, J., Mrazova, L., Vondracek, P., Mazanec, R., Vohanka, S., Haberlova, J., Hermanova, M., Zamecnik, J., Soucek, O., Oslejskova, H., Dvorackova, N., Solarova, P., & Fajkusova, L. (2014) *BMC Neurol.*, **14**, 154.
- 85) Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougereuse, F., Chianilkulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., Hillaire, D., Passos-Bueno, M.-R., Zats, M., Tischfield, J.A., Fardeau, M., Jackson, C.E., Cohen, D., & Beckmann, J.S. (1995) *Cell*, **81**, 27–40.
- 86) Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saido, T.C., Beckmann, J.S., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 17073–17078.
- 87) Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdigui, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., Lefranc, G., Fardeau, M., Sebille, A., & Beckmann, J.S. (2000) *J. Cell Biol.*, **151**, 1583–1590.
- 88) Kramerova, I., Kudryashova, E., Wu, B., Ottenheijm, C., Granzier, H., & Spencer, M.J. (2008) *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3271–3280.
- 89) Ojima, K., Ono, Y., Ottenheijm, C., Hata, S., Suzuki, H., Granzier, H., & Sorimachi, H. (2011) *J. Mol. Biol.*, **407**, 439–449.
- 90) Mahajan, V.B., Skeie, J.M., Bassuk, A.G., Fingert, J.H., Braun, T.A., Daggett, H.T., Folk, J.C., Sheffield, V.C., & Stone, E.M. (2012) *PLoS Genet.*, **8**, e1003001.
- 91) Bassuk, A.G., Yeh, S., Wu, S., Martin, D.F., Tsang, S.H., Gakhar, L., & Mahajan, V.B. (2015) *PLoS ONE*, **10**, e0122352.
- 92) Dear, N., Matena, K., Vingron, M., & Boehm, T. (1997) *Genomics*, **45**, 175–184.
- 93) Singh, R., Brewer, M.K., Mashburn, C.B., Lou, D., Bondada, V., Graham, B., & Geddes, J.W. (2014) *J. Biol. Chem.*, **289**, 19383–19394.
- 94) Wert, K.J., Bassuk, A.G., Wu, W.H., Gakhar, L., Coglán, D., Mahajan, M., Wu, S., Yang, J., Lin, C.S., Tsang, S.H., & Mahajan, V.B. (2015) *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 4584–4598.
- 95) Franz, T., Winckler, L., Boehm, T., & Dear, T.N. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 1649–1654.
- 96) Kottyan, L.C., Davis, B.P., Sherrill, J.D., Liu, K., Rochman, M., Kaufman, K., Weirauch, M.T., Vaughn, S., Lazaro, S., Rupert, A.M., Kohram, M., Stucke, E.M., Kemme, K.A., Magnusen, A., He, H., Dexheimer, P., Chehade, M., Wood, R.A., Pesek, R.D., Vickery, B.P., Fleischer, D.M., Lindbad, R., Sampson, H.A., Mukkada, V.A., Putnam, P.E., Abonia, J.P., Martin, L.J., Harley, J.B., & Rothenberg, M.E. (2014) *Nat. Genet.*, **46**, 895–900.
- 97) Sleiman, P.M., Wang, M.L., Cianferoni, A., Aceves, S., Goncalves, N., Nadeau, K., Bredenoord, A.J., Furuta, G.T., Spergel, J.M., & Hakonarson, H. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 5593.
- 98) Dear, T.N. & Boehm, T. (2001) *Gene*, **274**, 245–252.
- 99) Ueta, M., Mizushima, K., Yokoi, N., Naito, Y., & Kinoshita, S. (2010) *Br. J. Ophthalmol.*, **94**, 1239–1243.
- 100) Ueta, M., Sotozono, C., & Kinoshita, S. (2011) *Jpn. J. Ophthalmol.*, **55**, 405–410.
- 101) Sorimachi, H., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 19476–19482.
- 102) Liu, K., Li, L., & Cohen, S.N. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 31093–31098.
- 103) Gan-Or, Z., Bouslam, N., Birouk, N., Lissouba, A., Chambers, D.B., Veriepe, J., Androschuck, A., Laurent, S.B., Rochefort, D., Spiegelman, D., Dionne-Laporte, A., Szuto, A., Liao, M., Figlewicz, D.A., Bouhouche, A., Benomar, A., Yahyaoui, M., Ouazzani, R., Yoon, G., Dupre, N., Suchowersky, O., Bolduc, F.V., Parker, J.A., Dion, P.A., Drapeau, P., Rouleau, G.A., & Bencheikh, B.O. (2016) *Am. J. Hum. Genet.*, **98**, 1038–1046.
- 104) Forman, O.P., De Risio, L., & Mellersh, C.S. (2013) *PLoS ONE*, **8**, e64627.
- 105) Wang, Y., Hersheson, J., Lopez, D., Hammer, M., Liu, Y., Lee, K.H., Pinto, V., Seinfeld, J., Wiethoff, S., Sun, J., Amouri, R., Hentati, F., Baudry, N., Tran, J., Singleton, A.B., Coutelier, M., Brice, A., Stevanin, G., Durr, A., Bi, X., Houlden, H., & Baudry, M. (2016) *Cell Rep.*, **16**, 79–91.
- 106) Hotez, P.J., Pecoul, B., Rijal, S., Boehme, C., Aksoy, S., Malcecel, M., Tapia-Conyer, R., & Reeder, J.C. (2016) *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **10**, e0003895.
- 107) Russo, I., Oksman, A., Vaupel, B., & Goldberg, D.E. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 1554–1559.
- 108) Rosenthal, P.J. (2011) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **712**, 30–48.
- 109) Chandramohanadas, R., Davis, P.H., Beiting, D.P., Harbut, M.B., Darling, C., Velmourougane, G., Lee, M.Y., Greer, P.A., Roos, D.S., & Greenbaum, D.C. (2009) *Science*, **324**, 794–797.
- 110) Hanspal, M., Goel, V.K., Oh, S.S., & Chishti, A.H. (2002) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **122**, 227–229.
- 111) Berthier, D., Breniere, S.F., Bras-Goncalves, R., Lemesre, J.L., Jamonneau, V., Solano, P., Lejon, V., Thevenon, S., & Bucheton, B. (2016) *Trends Parasitol.*, **32**, 157–168.
- 112) Ersfeld, K., Barraclough, H., & Gull, K. (2005) *J. Mol. Evol.*, **61**, 742–757.
- 113) Hayes, P., Varga, V., Olego-Fernandez, S., Sunter, J., Ginger, M.L., & Gull, K. (2014) *J. Cell Biol.*, **206**, 377–384.
- 114) Cai, P., Gobert, G.N., You, H., & McManus, D.P. (2016) *Int. J. Parasitol.*, **46**, 453–463.
- 115) Sorimachi, H., Hata, S., & Ono, Y. (2011) *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, **87**, 287–327.
- 116) Davis, D., Wilson, R.B., & Mitchell, A.P. (2000) *Mol. Cell*

- Biol.*, **20**, 971–978.
- 117) Li, M., Martin, S.J., Bruno, V.M., Mitchell, A.P., & Davis, D.A. (2004) *Eukaryot. Cell*, **3**, 741–751.
- 118) Ost, K.S., O'Meara, T.R., Huda, N., Esher, S.K., & Alspaugh, J.A. (2015) *PLoS Genet.*, **11**, e1005159.
- 119) Futai, E., Maeda, T., Sorimachi, H., Kitamoto, K., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1999) *Mol. Gen. Genet.*, **260**, 559–568.
- 120) Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suarez, T., Tilburn, J., Arst, H.N. Jr., & Penalva, M.A. (2002) *EMBO J.*, **21**, 1350–1359.
- 121) Hayashi, M., Fukuzawa, T., Sorimachi, H., & Maeda, T. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 9478–9490.
- 122) Rawlings, N.D. (2015) *Biol. Direct*, **10**, 66.
- 123) Staniec, D., Ksiazek, M., Thogersen, I.B., Enghild, J.J., Sroka, A., Bryzek, D., Bogyo, M., Abrahamson, M., & Potempa, J. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 27248–27260.
- 124) Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, A., Kawamura, K., Konodo, S., Hamada, M., Maeda, K., & Umezawa, H. (1969) *J. Antibiot.*, **22**, 283–286.
- 125) Hanada, K., Tamai, M., Ohmura, S., Sawada, J., Seki, T., & Tanaka, I. (1978) *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 523–528.
- 126) Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E., & Katunuma, N. (1980) *J. Biochem.*, **88**, 1805–1811.
- 127) Ali, M.A., Stepanko, A., Fan, X., Holt, A., & Schulz, R. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **423**, 1–5.
- 128) Wang, K.K., Nath, R., Posner, A., Raser, K.J., Buroker-Kilgore, M., Hajimohammadreza, I., Probert, A.W. Jr., Marcoux, F.W., Ye, Q., Takano, E., Hatanaka, M., Maki, M., Caner, H., Collins, J.L., Fergus, A., Lee, K.S., Lunney, E.A., Hays, S.J., & Yuen, P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6687–6692.
- 129) Jo, H., Meinhardt, N., Wu, Y., Kulkarni, S., Hu, X., Low, K.E., Davies, P.L., DeGrado, W.F., & Greenbaum, D.C. (2012) *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 17704–17713.
- 130) Chen, H., Jiao, W., Jones, M.A., Coxon, J.M., Morton, J.D., Bickerstaffe, R., Pehere, A.D., Zvarec, O., & Abell, A.D. (2012) *Chem. Biodivers.*, **9**, 2473–2484.
- 131) Jones, S.A., Neilsen, P.M., Siew, L., Callen, D.F., Goldfarb, N.E., Dunn, B.M., & Abell, A.D. (2013) *ChemMedChem*, **8**, 1918–1921.
- 132) Ozaki, T., Nakazawa, M., Yamashita, T., & Ishiguro, S. (2015) *PLoS ONE*, **10**, e0130986.
- 133) Murata, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K., Towatari, T., Nikawa, T., & Katunuma, N. (1991) *FEBS Lett.*, **280**, 307–310.
- 134) Duong, L.T., Leung, A.T., & Langdahl, B. (2016) *Calcif. Tissue Int.*, **98**, 381–397.
- 135) Katunuma, N. (2011) *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, **87**, 29–39.
- 136) Low, K.E., Karunan Partha, S., Davies, P.L., & Campbell, R.L. (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 3367–3373.
- 137) Adams, S.E., Robinson, E.J., Miller, D.J., Rizkallah, P.J., Hallett, M.B., & Allemann, R.K. (2015) *Chem. Sci. (Camb.)*, **6**, 6865–6871.
- 138) Novinec, M., Korenc, M., Cafilisch, A., Ranganathan, R., Lenarcic, B., & Baici, A. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 3287.
- 139) Tonami, K., Hata, S., Ojima, K., Ono, Y., Kurihara, Y., Amano, T., Sato, T., Kawamura, Y., Kurihara, H., & Sorimachi, H. (2013) *PLoS Genet.*, **9**, e1003668.
- 140) Bartoli, M., Poupiot, J., Vulin, A., Fougereuse, F., Arandel, L., Daniele, N., Roudaut, C., Noulet, F., Garcia, L., Danos, O., & Richard, I. (2007) *Gene Ther.*, **14**, 733–740.
- 141) Mendell, J.R., Sahenk, Z., Malik, V., Gomez, A.M., Flanigan, K.M., Lowes, L.P., Alfano, L.N., Berry, K., Meadows, E., Lewis, S., Braun, L., Shontz, K., Rouhana, M., Clark, K.R., Rosales, X.Q., Al-Zaidy, S., Govoni, A., Rodino-Klapac, L.R., Hogan, M.J., & Kaspar, B.K. (2015) *Mol. Ther.*, **23**, 192–201.
- 142) Miyazaki, T., Tonami, K., Hata, S., Aiuchi, T., Ohnishi, K., Lei, X.F., Kim-Kaneyama, J.R., Takeya, M., Itabe, H., Sorimachi, H., Kurihara, H., & Miyazaki, A. (2016) *J. Clin. Invest.*, **126**, 3417–3432.
- 143) Olaya, P. & Wasserman, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1096**, 217–221.
- 144) Li, X., Chen, H., Jeong, J.J., & Chishti, A.H. (2007) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **155**, 26–32.
- 145) El Chamy Maluf, S., Melo, P.M., Varotti, F.P., Gazarini, M.L., Cunha, R.L., & Carmona, A.K. (2016) *Parasitol. Int.*, **65**, 20–22.
- 146) Soh, B.Y., Song, H.O., Lee, Y., Lee, J., Kaewintajuk, K., Lee, B., Choi, Y.Y., Cho, J.H., Choi, S., & Park, H. (2013) *Malar. J.*, **12**, 47.
- 147) Marinho, F.A., Goncalves, K.C., Oliveira, S.S., Goncalves, D.S., Matteoli, F.P., Seabra, S.H., Oliveira, A.C., Bellio, M., Oliveira, S.S., Souto-Padron, T., d'Avila-Levy, C.M., Santos, A.L., & Branquinha, M.H. (2014) *PLoS ONE*, **9**, e87659.
- 148) Sengenito, L.S., Menna-Barreto, R.F., CM, D.A.-L., Santos, A.L., & Branquinha, M.H. (2014) *PLoS ONE*, **9**, e113957.
- 149) Andresen, K., Tom, T.D., & Strand, M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 15085–15090.
- 150) Karmakar, S., Zhang, W., Ahmad, G., Torben, W., Alam, M.U., Le, L., Damian, R.T., Wolf, R.F., White, G.L., Carey, D.W., Carter, D., Reed, S.G., & Siddiqui, A.A. (2014) *J. Infect. Dis.*, **209**, 1929–1940.
- 151) Karmakar, S., Zhang, W., Ahmad, G., Torben, W., Alam, M.U., Le, L., Damian, R.T., Wolf, R.F., White, G.L., Carey, D.W., Carter, D., Reed, S.G., & Siddiqui, A.A. (2014) *Vaccine*, **32**, 1296–1303.
- 152) Bartoli, M., Roudaut, C., Martin, S., Fougereuse, F., Suel, L., Poupiot, J., Gicquel, E., Noulet, F., Danos, O., & Richard, I. (2006) *Mol. Ther.*, **13**, 250–259.
- 153) Roudaut, C., Le Roy, F., Suel, L., Poupiot, J., Charton, K., Bartoli, M., & Richard, I. (2013) *Circulation*, **128**, 1094–1104.
- 154) Li, H.L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., Yamamoto, T., Yamanaka, S., & Hotta, A. (2015) *Stem Cell Rep.*, **4**, 143–154.
- 155) Ono, Y., Shindo, M., Doi, N., Kitamura, F., Gregorio, C.C., & Sorimachi, H. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E5527–E5536.
- 156) Hall, M.R. & Gibson, W. (1996) *J. Virol.*, **70**, 5395–5404.
- 157) Hall, M.R. & Gibson, W. (1997) *Virology*, **227**, 160–167.
- 158) Ermolova, N., Kudryashova, E., DiFranco, M., Vergara, J., Kramerova, I., & Spencer, M.J. (2011) *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 3331–3345.
- 159) Drag, M. & Salvesen, G.S. (2010) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 690–701.
- 160) Baier, L.J., Permana, P.A., Yang, X., Pratley, R.E., Hanson, R.L., Shen, G.Q., Mott, D., Knowler, W.C., Cox, N.J., Horikawa, Y., Oda, N., Bell, G.I., & Bogardus, C. (2000) *J. Clin. Invest.*, **106**, R69–R73.
- 161) Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N.J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., Lindner, T.H., Mashima, H., Schwarz, P.E., del Bosque-Plata, L., Horikawa, Y., Oda, Y., Yoshiuchi, I., Coliilla, S., Polonsky, K.S., Wei, S., Concannon, P., Iwasaki, N., Schulze, J., Baier, L.J., Bogardus, C., Groop, L., Boerwinkle,

- E., Hanis, C.L., & Bell, G.I. (2000) *Nat. Genet.*, **26**, 163–175.
- 162) Urbanek, M. (2007) *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, **3**, 103–111.
- 163) Siklos, M., BenAissa, M., & Thatcher, G.R. (2015) *Acta Pharm. Sin. B*, **5**, 506–519.
- 164) Azam, M., Andrabi, S.S., Sahr, K.E., Kamath, L., Kuliopulos, A., & Chishti, A.H. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2213–2220.
- 165) Dutt, P., Croall, D.E., Arthur, S.C., De Veyra, T., Williams, K., Elce, J.S., & Greer, P.A. (2006) *BMC Dev. Biol.*, **6**, 3.
- 166) Takano, J., Mihira, N., Fujioka, R., Hosoki, E., Chishti, A.H., & Saido, T.C. (2011) *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 4097–4106.
- 167) Arthur, J.S., Elce, J.S., Hegadorn, C., Williams, K., & Greer, P.A. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 4474–4481.
- 168) Zimmerman, U.J., Boring, L., Pak, J.H., Mukerjee, N., & Wang, K.K. (2000) *IUBMB Life*, **50**, 63–68.
- 169) Kramerova, I., Kudryashova, E., Tidball, J.G., & Spencer, M.J. (2004) *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 1373–1388.
- 170) Ojima, K., Kawabata, Y., Nakao, H., Nakao, K., Doi, N., Kitamura, F., Ono, Y., Hata, S., Suzuki, H., Kawahara, H., Bogomolovas, J., Witt, C., Ottenheijm, C., Labeit, S., Granzier, H., Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, M., Suzuki, K., Maeda, T., Abe, K., Aiba, A., & Sorimachi, H. (2010) *J. Clin. Invest.*, **120**, 2672–2683.
- 171) Li, M., Wang, X., Yu, Y., Xie, Y., Zou, Y., Ge, J., Peng, T., & Chen, R. (2014) *Virus Res.*, **179**, 177–186.
- 172) Kaneko, Y., Murphy, C.R., & Day, M.L. (2014) *Histochem. Cell Biol.*, **141**, 423–430.
- 173) Sebe, J.Y., Bershteyn, M., Hirotsune, S., Wynshaw-Boris, A., & Baraban, S.C. (2013) *J. Neurophysiol.*, **109**, 429–436.
- 174) Mizukoshi, S., Nakazawa, M., Sato, K., Ozaki, T., Metoki, T., & Ishiguro, S. (2010) *Exp. Eye Res.*, **91**, 353–361.
- 175) Chen, Y., Li, Z., He, Y., Shang, D., Pan, J., Wang, H., Chen, H., Zhu, Z., Wan, L., & Wang, X. (2014) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **275**, 176–181.
- 176) Samantaray, S., Knaryan, V.H., Shields, D.C., Cox, A.A., Haque, A., & Banik, N.L. (2015) *Mol. Neurobiol.*, **52**, 1054–1066.
- 177) Guyton, M.K., Das, A., Samantaray, S., Wallace, G.C. 4th, Butler, J.T., Ray, S.K., & Banik, N.L. (2010) *J. Neurosci. Res.*, **88**, 2398–2408.
- 178) Das, A., Guyton, M.K., Smith, A., Wallace, G. 4th, McDowell, M.L., Matzelle, D.D., Ray, S.K., & Banik, N.L. (2013) *J. Neurochem.*, **124**, 133–146.
- 179) Nozaki, K., Das, A., Ray, S.K., & Banik, N.L. (2011) *J. Neurosci. Res.*, **89**, 536–543.
- 180) Tabata, C., Tabata, R., & Nakano, T. (2010) *Clin. Exp. Immunol.*, **162**, 560–567.
- 181) Del Bello, B., Toscano, M., Moretti, D., & Maellaro, E. (2013) *PLoS ONE*, **8**, e57236.
- 182) Guo, A., Hall, D., Zhang, C., Peng, T., Miller, J.D., Kutschke, W., Grueter, C.E., Johnson, F.L., Lin, R.Z., & Song, L.S. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 17946–17955.
- 183) Undrovinas, A., Maltsev, V.A., & Sabbah, H.N. (2013) *PLOS ONE*, **8**, e54436.
- 184) Ennes-Vidal, V., Menna-Barreto, R.F., Santos, A.L., Branquinha, M.H., & d'Avila-Levy, C.M. (2011) *PLoS ONE*, **6**, e18371.
- 185) Huang, Q., Chen, H., Wang, F., Brost, B.C., Li, J., Gao, Y., Li, Z., Gao, Y., & Jiang, S.W. (2014) *Cell. Mol. Life Sci.*, **71**, 3151–3164.
- 186) Brocard, C., Plantier, V., Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bouhadfane, M., Viallat-Lieutaud, A., Vinay, L., & Brocard, F. (2016) *Nat. Med.*, **22**, 404–411.
- 187) Paquet-Durand, F., Sanges, D., McCall, J., Silva, J., van Veen, T., Marigo, V., & Ekstrom, P. (2010) *J. Neurochem.*, **115**, 930–940.
- 188) Trager, N., Smith, A., Wallace Iv, G., Azuma, M., Inoue, J., Beeson, C., Haque, A., & Banik, N.L. (2014) *J. Neurochem.*, **130**, 268–279.
- 189) Suzuki, R., Oka, T., Tamada, Y., Shearer, T.R., & Azuma, M. (2014) *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **30**, 419–428.
- 190) Takeshita, D., Tanaka, M., Mitsuyama, S., Yoshikawa, Y., Zhang, G.X., Obata, K., Ito, H., Taniguchi, S., & Takaki, M. (2013) *J. Physiol. Sci.*, **63**, 113–123.
- 191) Bains, M., Cebak, J.E., Gilmer, L.K., Barnes, C.C., Thompson, S.N., Geddes, J.W., & Hall, E.D. (2012) *J. Neurochem.*, **125**, 125–132.
- 192) Simoes, A.T., Goncalves, N., Nobre, R.J., Duarte, C.B., & Pereira de Almeida, L. (2014) *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 4932–4944.
- 193) De Franceschi, L., Franco, R.S., Bertoldi, M., Brugnara, C., Matte, A., Siciliano, A., Wieschhaus, A.J., Chishti, A.H., & Joiner, C.H. (2013) *FASEB J.*, **27**, 750–759.
- 194) Ozaki, T., Ishiguro, S., Hirano, S., Baba, A., Yamashita, T., Tomita, H., & Nakazawa, M. (2013) *PLoS ONE*, **8**, e71650.
- 195) Mallik, S.K., Li, Y., Cui, M., Song, H.O., Park, H., & Kim, H.S. (2012) *Arch. Pharm. Res.*, **35**, 469–479.
- 196) Bochner, R., Samuelov, L., Sarig, O., Li, Q., Adase, C. A., Isakov, O., Malchin, N., Vodo, D., Shayevitch, R., Peled, A., Yu, B. D., Fainberg, G., Warshauer, E., Adir, N., Erez, N., Gat, A., Gottlieb, Y., Rogers, T., Pavlovsky, M., Goldberg, I., Shomron, N., Sandilands, A., Campbell, L. E., MacCallum, S., McLean, W. H., Ast, G., Gallo, R. L., Uitto, J., & Sprecher, E. (2016) *J. Invest. Dermatol.*, in press.

著者寸描

●反町 洋之 (そりまち ひろゆき)



公益財団法人東京都医学総合研究所カルパインプロジェクトプロジェクトリーダー, 参事研究員, 博士 (農学).

■略歴 1963年神奈川県に生る. 86年東大理学部卒. 88年同大学院理学系研究科修士修了. 88~92年都臨床研研究員. 92~97年東大分生研助手. 97~2004年東大農学部助教授. 04~11年都臨床研副参事 (09年~参事) 研究員. 11年~現職.

■研究テーマと抱負 研究テーマはカルパイン. 抱負は, 忙中閑あり, 苦中楽あり. また, 中学のバスケット部で流行った「死んでも命」というフレーズは, 意味不明ながら, 時々思い出しては気合いを入れています.

■ウェブサイト <http://www.igakuken.or.jp/calpain/>

■趣味 ワイン, ビール, カメラ, 車, 野球, 水泳, 黒子のバスケ, 攻殻機動隊, ガリレオ, 1Q84, 奥様は魔女, カルパイン.

●小野 弥子 (おの やすこ)



公益財団法人東京都医学総合研究所カルパインプロジェクト副参事研究員, 博士 (理学).

■略歴 大分県出身. 99年東大大学院理学系研究科博士修了. 99~2003年日本学術振興会研究員 (東大分生研・アリゾナ大). 04~11年都臨床研主任 (08年~主席) 研究員. 11~都医学研主席研究員. 16年~現職.

■研究テーマ カルパイン.

■研究テーマと抱負 Be curious and critical, but also respect the accomplishments of others (どこかで読んだ). 「自分に厳しく」「自分大好き」のバランスを取って, シャキッと.

■ウェブサイト <http://www.igakuken.or.jp/calpain/>

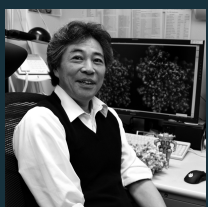
■趣味 バレエ, 語学番組, ラジオ, Percy Jackson & the Olympians, ハリーポッター, カルパイン.

Impact Objectives

- Develop a better understanding of the molecular mechanisms of calpainopathies by investigating the physiological functions of calpains
- Clarify the physiological functions of calpains
- Delve deeper into the complexities of calpain molecules as a means of ultimately developing effective drugs and therapies for calpain-related diseases

Insights into the complex world of calpains

The CALPAIN project is investigating the role of calpains in basic cellular functioning and disease development. Here Dr Hiroyuki Sorimachi discusses his ongoing research and addresses uncertainties around calpains



Could you give a brief explanation of what a calpain is and the background and key goals behind the CALPAIN project?

A calpain is an intracellular Ca^{2+} -dependent protease and is involved in diverse aspects of cellular functions. Calpain homologs exist in almost all eukaryotes and constitute a super-family. For human and mouse calpains, genetic defects cause various deficiencies, termed calpainopathies.

The CALPAIN project constitutes one of the research activities at the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Japan. Our project specifically aims to understand molecular mechanisms of calpainopathies. We investigate physiological functions of calpains in three key areas: biological consequences of calpain-mediated proteolysis of substrates; regulation of calpain activity; and substrate specificities.

Although there are some human calpain species we specifically focus on, we try to keep any calpain species within the scope of our interest. We intend to transform our research outcome into more concrete basic knowledge about calpains, and support the development of therapeutic means for correcting aberrant calpain functions manifested as calpainopathies.

What biological processes are calpains linked to and what diseases can arise from their malfunction?

Some calpain substrate proteins play important roles in cytoskeletal remodelling, cell growth, signal transductions for cell cycle regulation and stress responses (adaptation). For example, it has been suggested CAPN3 is involved in stress responses to boost muscle adaptation, and malfunction of CAPN3 by genetic mutation causes muscular dystrophy. Another example is Eosinophilic oesophagitis, caused by a deficiency of CAPN14, which regulates immune response in esophagus. In addition, our study using KO (knockout) mice suggests that some gastric dysfunction is linked to insufficient activity of CAPN8 and CAPN9 complex, and that deprivation of CAPN6 makes muscles slightly bigger.

On the other hand, hyperactivation of calpains can also be a type of malfunction. For example, excess activity of CAPN5 is causative for vitreoretinopathy.

There are several diseases that do not stem from calpain malfunction (neurodegenerative disorders, ischemia of the brain and the heart, myopathies, cancers), but the symptoms of which are exacerbated by calpain activities. These relationships are derived from the fact calpain substrates are involved in the above-mentioned biological processes.

Can you explain the importance of this work in real-world terms?

I would like to update the general concept surrounding calpains as much as possible. In the past, the outcomes of calpain research have been appreciated based on the beneficial effects of calpain inhibition

on several disease symptoms. Many actions of calpains have been left in a black box. It is our role to understand and decrease the contents of such a black box.

In line with this, the principle of our project allows us to study calpains as a family of protease, providing us with the general impression. Since some calpain species have diverged structures and/or functions, an important finding may come from a different direction. We hope our approach will help to determine how to appreciate such a spin-off.

What is next for your research in the coming five to 10 years?

Thanks to genome sequencings, calpain sequences from various living organisms have been revealed. I think now is the time to think about evolutionary aspects of calpain molecules. Precise structural comparison of calpains from various organisms will shed light on structure-function relationships of this molecule. This approach may ultimately answer the questions; what are calpains, and why are they (not) required for living organisms?

As long as the situations surrounding the research permits, I would like to continue the way we have been conducting our research, thereby focusing on the molecule/calpain of interest. Identification of substrates and nailing down the one (or some), which are critical for the phenotype of KO mice, will be a great achievement for us and will allow us to eventually think about the evolutionary importance of calpains.

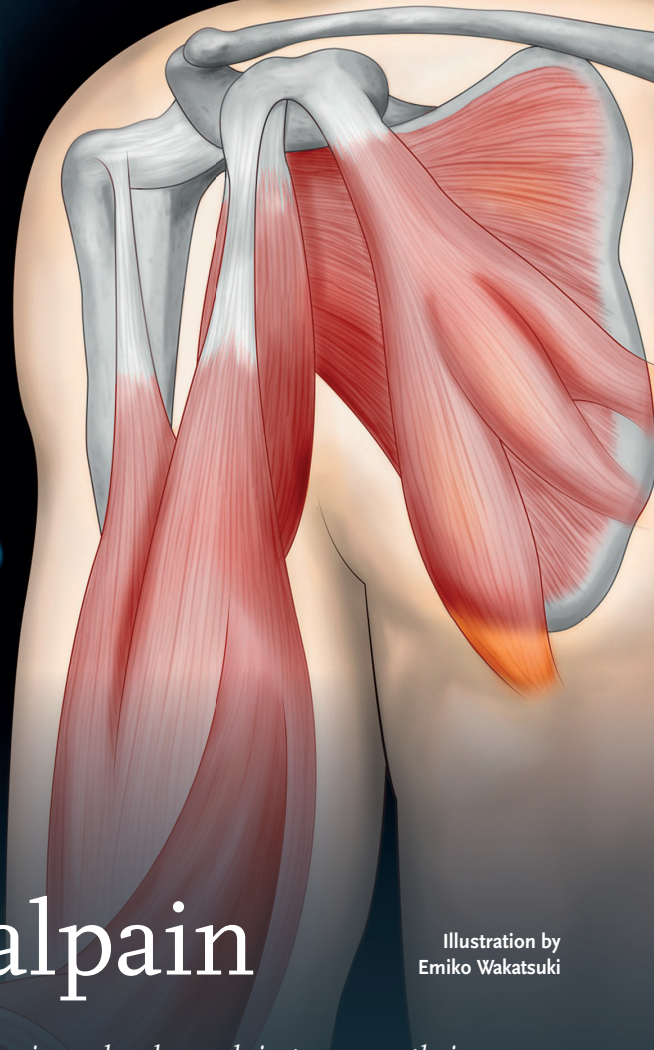


Illustration by Emiko Wakatsuki

Unravelling the calpain

The CALPAIN project aims to unravel the complexity of calpain molecules and, in turn, use their discoveries to generate effective drugs and therapies for calpain-related diseases

In an effort to further scientific understanding of calpains and their vital biological roles, the CALPAIN project was established within the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science in Japan. Led by Department Head Dr Hiroyuki Sorimachi, the CALPAIN project's goals include analysing the mechanisms of calpains at a molecular level; clarifying their physiological functions; analysing diseases marked by calpain deficiency using genetically-modified mice; and developing future diagnosis and treatment plans for calpain-related diseases.

Sorimachi's career began in the late Dr Koichi Suzuki's lab, which was dedicated to studying and cloning calpains. With the help of his colleagues, Suzuki became a pioneer within the field by discovering the complete primary structure of a calpain. Since then, the CALPAIN project has grown significantly and now includes: Associate Director Dr Yasuko Ono who is particularly interested in investigating the function of CAPN3/calpain-3 in muscle tissues; Chief Researcher Dr Shoji Hata whose focus lies with the physiological function of mammalian calpains that have specific structures or expressions; and Senior Researcher Dr Fumiko Shinkai-Ouchi, who explores dynamic modulation of protein, including calpain itself, as readout of calpain functions by proteomic approach. Sorimachi meanwhile, is currently

engaged with the structure-function relationships and substrate specificities of calpains.

Along with studying the basic structure and function of a calpain, researchers are working to unravel the molecular mechanisms behind calpain-related diseases. By discovering the pathology of these diseases, members of the CALPAIN project can aid in the development of novel strategies for predicting, preventing, diagnosing and treating various disorders.

AN ENIGMATIC ENZYME

Originally discovered in 1964 by noted biochemist Gordon Guroff, calpains are a super-family of proteases that are expressed in almost all eukaryotes and bacteria. The term 'protease' refers to the main function of a calpain – to perform proteolysis and breakdown substrates into smaller polypeptides and amino acids. However, unlike most other proteases, calpains have limited proteolytic activity. As opposed to completely breaking the substrates down, the calpain modulates the substrates' function and structure. Thus, calpains have earned the name 'modulator proteases'. The modulation of substrates is an essential intracellular process. Calpains have a vital role to play and any deficiency can lead to major medical issues.

Although the role of a calpain as a cellular

housekeeper is well known, their mechanistic features are still poorly understood. To address this issue, one of the CALPAIN project's main objectives is to recognise calpains as: 'a word representing the family of enzymes, rather than just the conventional calpains,' Sorimachi explains.

So far, scientists have discovered that humans have 15 calpain genes. Two of these genes, CAPN1 and CAPN2, are known as conventional calpains, as they are the most ubiquitous and well-studied sub-units. Yet there are also unconventional classical and unconventional non-classical calpain types. Unconventional classical calpains are molecules with an identical structure to CAPN1 and CAPN2, but a different function. The unconventional non-classical calpains are the most dissimilar group, as their structures diverge from conventional calpains.

Until the late 1980s, scientists believed that CAPN1 and CAPN2 were the only calpain species. However, since the CALPAIN project discovered CAPN3 in 1989, unconventional calpains have become a hot topic in the field. It has been demonstrated that they can be intriguing molecules that offer researchers a greater insight into calpains' physiological functions and calpain-related diseases.

Functional calpains allow cells to function like well-oiled machines. When a calpain malfunctions, diseases called 'calpainopathies' arise

DEFICIENT CALPAINS

Along with trying to label calpain sub-units, researchers are also interested in the effect of deficient calpains on biological systems.

Functional calpains allow cells to function like well-oiled machines. However, when a calpain malfunctions, diseases called 'calpainopathies' can arise. Calpainopathies can result from either the loss of calpain function – for example, limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A) is caused by the inactivation of CAPN3 – or the addition of a function – for example, autosomal dominant neurovascular inflammatory vitreoretinopathy is caused by the excessive activation of CAPN5. Calpainopathies can be separated into three groups: those exacerbated by human calpain activity, such as neurodegenerative disorders and cancers; those caused by parasites and pathogenic microorganisms that use the host and/or their own calpain for infection and survival, such as malaria; and those caused by deficiencies in calpain genes, such as muscular dystrophy.

Many studies of calpainopathies have used 'transgenic', or genetically-modified mice. 'The original idea of introducing these research subjects was to expand the dimension of functional analysis of calpains,' Sorimachi explains. Researchers in the CALPAIN project analyse both 'knockout' (KO) mice (those without a calpain gene) and 'knock-in' (KI) mice (those who have undergone a one-for-one substitution of a gene). This method allows them to study and observe the symptoms of different calpainopathies.

The hope within the CALPAIN project is to translate these findings to human models and develop strategic therapies that can target the dysfunctional calpains and alleviate symptoms and disease progression.

TARGETING FAULTY CALPAINS

Calpain-targeting strategies encompass two key approaches: calpain inhibition and calpain activation. The therapeutic method depends on the type of calpainopathy being treated. For calpainopathies that result from either human calpain activity or parasites, calpain inhibition is the primary choice. For calpainopathies that result from a defective

calpain, calpain activation is the most effective therapeutic choice.

However, these therapies are complicated and require a great deal of testing. An example of one of the ongoing complications is CAPN3-target therapy for LGMD2A. The goal of this therapy is to restore and compensate for the loss of CAPN3 function in order to prevent LGMD2A. However, researchers at the CALPAIN project are still trying to find the exact link between CAPN3 deficiency and LGMD2A. Additionally, scientists need to answer how CAPN3 functions as a protease in muscle cells, what the targets of CAPN3 are and what biological pathways CAPN3 is involved in. Without answers to these questions, therapies will be far less accurate and could impact proteases other than CAPN3.

CONTINUING TO UNRAVEL CALPAINS

Sorimachi notes that one of the key goals of his team's work is to uncover more about the structure of calpains because: 'If the structures of more calpains are clarified, they will give us greater information about structure-function relationships, not only of calpains, but also of general proteins.'

Ultimately, the project aims to expose calpains for what they truly are: a vital enzyme that has the capability of either supporting or greatly damaging biological systems. With this information, researchers can address global health concerns by developing practical and accessible drugs for patients with calpain-related diseases. Creating therapies that target a specific calpain is a challenging task. However, the CALPAIN project has worked vehemently towards this goal and will continue to be a great contribution towards the fields of genetics, pharmacology and enzymology in future years.

Project Insights

FUNDING

This research is supported by JSPS KAKENHI, Takeda Science Foundation Research Grant and the Cross-ministerial Strategic Innovation Promotion Program.

It has also received the following funding: Open Partnership Joint Projects of the JSPS Bilateral Joint Research Projects; the research grant of the Naito Foundation; the Collaborative Research Program of the Institute for Chemical Research, Kyoto University; Toray Science and Technology Grant; CREST; and a Kato Memorial Bioscience Foundation research grant.

LAB MEMBERS

Dr Yasuko Ono, Dr Shoji Hata and Dr Fumiko Shinkai-Ouchi

CONTACT

Dr Hiroyuki Sorimachi
Project Leader

T: +81 353163277 (direct)
T: +81 353163124 ext. 2590
F: +81 353163163
E: sorimachi-hr@igakuken.or.jp
A: Calpain Project [Room 206, Box 26]
Department of Advanced Science for Biomolecules, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

PROJECT LEADER BIO

Hiroyuki Sorimachi started working on calpains in 1988 in the late Professor Koichi Suzuki's lab at Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science (Rinshoken/Igakuken) when he was a Master's student. In 1992, he received a PhD from the University of Tokyo, Japan, after which he was appointed Assistant Professor in the same university, and in 1997, became an Associate Professor. In 2004, he returned to Rinshoken/Igakuken as a project leader of the 'Calpain Project', and in 2008, he became a department head. He was awarded a Lifetime Achievement Award from FASEB SRC Calpain meeting in 2016. His research interests include biochemistry and genetics of all kinds of calpains.



JSPS

追悼メッセージ / **In memory of Dr. Sorimachi**

さようなら（反町洋之博士の死を悼む）

（公財）東京都医学総合研究所 理事長 田中 啓二

反町洋之博士の余りにも早すぎる黄泉の国への旅立ちに、いまなお驚きを禁じ得ません。彼の朗らかで絶えることのない満面の笑みはいつまでも忘れ難く、すでに彼が鬼籍に入ったことさえ信じられないというのが正直な思いです。私と反町博士との出会いは、四半世紀以上の遙か昔に遡ります。彼が師事した故鈴木紘一先生が旧臨床研にラボを構えていた当時であり、彼はまだ初々しい大学院生でした。タンパク質分解という同じ研究領域の仲間でもあったことから、彼との交流は時の流れとともに次第に深まってゆきました。私が約20年前に上京した時には、すでに鈴木先生のグループは東大分生研（当時）に異動されていましたが、親しい関係を築くに至ったのは、鈴木先生が代表者であった科研費・重点領域研究「タンパク質分解のニューバイオロジー」が発足してからでした。私は反町博士を含む仲間たちと、ニューズレター誌「ぷろておりす」を編集するなど、この研究班を運営する責任者の一人として、頻繁に分生研を訪れる機会があり、彼との交流も急速に増加してゆきました。数年後、私が反町先生を旧臨床研のPIに招いたことが一つの契機となって、夢のような交歓は年を経るごとに確固たるものに発展してゆきました。反町博士との思い出は数え切れないものでしたが、何と言っても忘れ難いことは幾度となく催した宴会での語りでした。彼のワインについての造詣の深さに感銘したこともさることながら、「なんと楽しくお酒に酔いしれるのであろうか」という感慨であり、「これこそお酒の飲み方」という真髓を心底から教えられました。お酒を通しての本当に楽しかった時間の共有は、私の人生をも豊かにしてくれました。彼との交流には語り尽くせない挿話が幾多もあり、それらひとつひとつが忘却しえない記憶として残り続けています。その若い友人との永劫の別離が不意に訪れようとは、まさに青天の霹靂でした。病因の顕在化から闘病は2年を越え、私は月に2度程度、メールでの遣り取りを続けてきましたが、その間にも合言葉のように呟いていたことは、「回復後に、ワインで乾杯を！」との決して挫けることのない希望に満ちた熱い気持ちでした。その約束が終に果たせなかったことは、本当に心残りというほか、言葉はありません。私は、逝去された直後、医学研のホームページに万感の思いを込めて追悼文を掲載しました。その文章に認めた感謝と訣別の思いは、五ヶ月を経た今日でも、聊かも変わることはありません。反町博士への永訣の言葉として、その追悼文を再喝させていただきます。

追悼：反町洋之先生 一友人として一

当研究所の生体分子先端研究分野長（兼カルパインプロジェクトリーダー）の反町洋之先生におかれましては、平成30年1月6日（土）の夜にご逝去されました。約2年前に大腸がんが発見され、その後、闘病生活を続けながら研究活動を行ってこられました。薬石効なく、年明けに病状が急変、終に帰らぬ人となりました。享年54歳というあまりにも早すぎる旅立ちでした。この間、奥様、お嬢様の献身的な介護に支えられてきましたが、ご家族のお話ですと、反町先生は「最後まで強く優しく彼らしい覚悟で終わりを迎えた」とのことです。病魔に冒されてからの経過を具にみてきた一友人として思い起こしますことは、限りない不安と苦痛に苛まれながらも、一言も弱音を吐かなかった反町先生の精神的な強さ・不屈の闘志に深く驚愕するものであります。そして、そのような状況下にあってもご家族や周囲の方々へ、深い愛を投げつけてこられました。このような反町先生の激しくも穏やかな生き様には、慎み深い「男の真骨頂」を感得し、ただただ感歎するばかりであります。生と死は抗うことのできない自然の摂理ですが、反町先生が大切にされてこられたご家族との豊饒な時間が突然に断ち切られたことの不条理に、無常を感じざるを得ません。

私は、反町先生とは、タンパク質分解という同じ研究領域であったために、公私に亘り非常に懇意にさせていただいてきました。個人的な感想を申し上げますと、反町先生は正しく「気配りの人」であり、多くの先輩・友人・同僚・弟子の皆様から心から慕われ、長い年月を通して、先生から他人を批判する言葉や、また先生が批判される言葉などを聞いたことがありませんでした。そして国内のみならず、欧米を中心に国外にも多くの共同研究者・友人たちがおられ、その幅広い交流は、真の国際研究者として面目躍如でありました。

反町先生は、1986年に東京大学理学部を卒業された後、同大学大学院理学系研究科修士修了（1988）、その後、東京都臨床医学総合研究所研究員（1988-1992:1992年、東京大学博士号取得）、東京大学分子細胞生物学研究所助手（1992-1997）、同大学農学部助教授（1997-2004）を務められました。この間、一貫して、

故鈴木紘一先生（東京大学名誉教授）に師事し、鈴木先生が開拓してこられましたカルパイン研究の後継者として、常に世界の第一線で活躍してきました。その後、2004年に東京都臨床医学総合研究所副参事研究員（2009参事研究員）として自身のラボを運営、2011年、同研究所が東京都医学総合研究所に統合した後、今日まで継続してカルパイン研究に邁進してこられました。反町先生は、日本のカルパイン研究を世界のカルパイン研究に押し上げた最大の功労者であり、カルパイン研究という日本が誇る独創的な伝統を守り続けてきました。実際、反町先生に対する「カルパイン研究の第一人者」という称号には、国内外を問わず誰も異論を挟まないと思われまます。反町先生の手腕が効を奏して、カルパイン研究が、まさに新しい興隆期を迎えつつあった矢先の訃報であり、先生の無念を慮りますと、涙を禁じ得ないのであります。しかし反町先生のカルパイン研究は、次世代の研究者たちに引き継がれ、今後も永続的に発展してゆくことを信じて疑いません。

反町先生は、濃密な時間をもってカルパイン研究に邁進され、人生を力強く駆け抜けて行きました。反町先生の人懐っこい笑顔、誠実を絵に描いたような明朗快活な風貌、それらひとつひとつが、後に遺されたものの心に未来永劫、刻印されて生き続けてゆくことでしょう。

反町洋之先生のご逝去に際し、ここに謹んで哀悼の意を表するとともに、ご冥福をお祈り致します。

合掌

反町 洋之 先生を偲んで

東京都医学総合研究所・所長

正井久雄

まだお正月気分も抜けきらない今年の1月7日、その前夜に反町先生が旅立たれたという連絡を典子夫人から受けました。あまりのショックに机に突っ伏して、ただただ涙があふれでました。こんな不条理なことがあってよいのか、現実であってほしくない、夢なら早く覚めてほしい。しかし、あの素晴らしい笑顔に接することはもうできません。

反町先生は、大学の同じ学部・学科の5年後輩ですが、臨床研に赴任して初めて知己を得ました。私はすぐに、反町先生の、溢れるような笑顔と、いつも周りの人々に気遣いをされるお人柄、そして研究所のいろいろな仕事も嫌な顔ひとつせず、積極的に、そして完璧に遂行されるその御人格に、魅了されました。後輩とはとても思えず、困った時には、まずは反町先生に相談すれば、助け舟を出していただける、と、いつも大変頼りにしていました。

2年程前、反町先生に結腸癌が発見され、それもステージが進行しているというお話を伺い、とてもショックを受けたことを覚えています。その時には、とにかく治療が奏効し、1日も早く回復されることを祈ることしかできませんでした。また、きっと元気になって戻ってきてくれると信じていました。実際、その後の反町先生は、手術、治療など、おそらく口では言えないほど、大変な日々を過ごされていたと思いますが、退院されたらすぐに出勤され、何事もなかったようにいつもの笑顔で私達にご挨拶くださいました。調整会議・管理職会議にも参加され、周りに、ご自身のご病気のこと余計な心配をさせないようお願いされているようでした。治療が大変であることは、私も承知していましたが、反町先生の笑顔を拝見するだけで、とても嬉しくて、きつともうすぐ全快して戻ってきてくれるんだ、と、自分に言い聞かせ、それだけを信じていました。

反町先生はカルパインの研究を一筋に行い、世界中で『Calpain といえば、Sorimachi』という、研究領域を築いてこられました。遺伝子の単離から始まり、生化学的な反応機構の解析、そして、ノックアウトマウスの解析により、カルパインファミリーの生体機能を次々と解明されました。その業績は、カルパイン研究に燦然と輝けるものです。研究室では、さらに新しい発見が続々とされており、その研究が大輪の花を咲かせようとしている段階でした。また、世界で初めてカルパインの切断部位の同定アルゴリズムを開発され、どのくらい正確に予測できるかの判定を楽しみにされていたと伺いました。去年の暮れ、病院で、ご覧になっていた computer を閉じられ、「これで俺もおわりだな」とつぶやかれたというお話を、典子夫人から伺いました。この時の反町先生のお気持ちを想像すると、どれだけ無念であったか、どれだけ悔しかったか、私の心もかきむしられるような痛みを感じるとともに、涙があふれます。これからのご自身のカルパイン研究の発展を自分で見届けることのできない悔しさ、何十年にもわたって、典子夫人とお嬢様の優理子さんとともに、いろいろな楽しい人生のイベントがあるのにそこにご自身がいることのできない無念さ、そしてご家族の悲しみを考えると、神さまは、どうしてももう少し反町先生に時間を与えて下さらなかったのか。その運命の残酷さを恨めしく思います。

反町先生あの笑顔にもうお会いすることはできません。いろいろなご相談をして、良き助言をいただくこともできません。一緒に、ワインをいただくこともできません。反町先生のご逝去は、研究所にとってはもちろんのこと、生命科学の研究にとっても、とてつもなく大きな損失です。私には反町先生の分まで頑張ります、などと簡単にいうことはできません。反町先生との思い出を胸に、ご助言を必要とする時には、先生ならどうお考えになるだろう、どんなアドバイスをいただけるだろう、と考えながらこれから歩んで行きたいと思います。先生は、いつまでも私たちの心の中で生き続けてくださいます。反町先生、どうか安らかに眠りください。そして、いつまでもその優しい笑顔で私たちを天国から見守ってください。

反町 洋之 先生、有り難うございました

東京都医学総合研究所
カルパインプロジェクト

反町先生はいつもよい研究環境を維持して、研究に向き合えるように鼓舞して下さっていました。そして、各自が研究に集中し、その他の業務にもしっかり取り組みながら、いつでも自由に笑える良い空気をラボスペース全体に与えて下さっていました。2016年春にご病気が分かり、それまで以上にお忙しいスケジュールをこなされるようになってからも、一層強いお心遣いとリーダーシップで、プロジェクトの士気を上げ続けられました。私たちは、先生の一挙手一投足から病気を絶対に克服するとの前向きな姿・強い決意を感じ、尊敬の念を新たにしていました。今でも、いつものように先生が笑顔で「おはようございます！」と研究室に出勤される姿が見られるような気がしてなりません。

反町先生と私たちの出会いは、東大分生研の鈴木紘一研究室において新規カルパイン分子種の研究が加速しつつあった時からや、都医学研・カルパインプロジェクトにおいて基質特異性予測という *in silico* でのカルパイン研究が開始された時から、と様々です。一貫して「自分で課題を考え、実験を組み立ててデータを取り、論文を書く」ことの重要性を厳しく教えて頂きました。また、先生には理想の研究者像があって「自分もそのようにしたいんですよ」とおっしゃっていたことが、昨日のように思い出されます。

サイエンスを熱く語る先生の姿は、ラボの全てのメンバーに強い印象として残っています。2017年に反町先生に憧れて来日、長期滞在して研究に没頭した海外の大学院学生2人も同感だったようです。先生のカルパイン研究（及びワイン）に対する *passion* や国際性のある日本人としての *hospitality* に触れた彼らのはしゃぎ方に触発され、先生に率いられてきたラボメンバー達は「ここはカルパインの総本山なのだ」ということを改めて自覚しました。

昨年のクリスマスには、入院中の先生から贈られてきたツリー入りのお菓子やケーキを皆で食べながら、2018年も *Team Sorimachi* として発展すべく英気を養いました。それが年明け早々に、突然、旅立たれてしまいました。この訃報はまさに青天の霹靂であり、国内外において先生と共に歩んできた弟子や仲間から希望を奪い取りました。しかし反町先生、研究室では私達後進の者が先生が目指された独創的な研究を継承し、先生と鈴木先生が築き上げてこられたカルパイン研究の発展に向け日々頑張っております。

本集の作成にあたり、研究所の色々な部署の方々が「反町先生のためなら」、と力を尽くされました。先生のような真に強いリーダーのもとに集まったこと、そして最後まで一貫したお心遣いのご指導に感謝申し上げます。今まで本当にありがとうございました。

ご冥福を心よりお祈り申し上げます。

小野弥子

秦勝志

大内史子

知人・友人達より

反町洋之博士のご功績に心より敬意を表します。

藍澤科学館
藍澤 広行

反町さんは、80年代後半から90年代の初めにかけて、臨床研の故鈴木紘一先生の研究室で熱意溢れる研究に取り組んでおられた若き研究員のおひとりでした。笑顔と礼儀を欠かすことのないお人柄で、どの年代の方からもどのポジションの方からも親しみを寄せられていらっしゃいました。東大に出られて、その後再び研究所に戻られてからも、優れた業績を挙げられトップリーダーとしての地位にありながら、誰にでも謙虚な笑顔を絶やさないうばらしい方でした。同じ研究室に所属したことはありませんでしたが、私は川島誠一先生のご指導の下、カルパイン阻害剤を用いた実験に携わったこともあり、反町さんの書かれた緻密な総説を拝読して多くの知見を頂いたことを思い出します。また報告会の後に、メールで丁寧なアドバイスを頂戴したことも大変ありがたく、鮮明な記憶として残っております。

2015年の8月に病態プロテアーゼ学会でお目にかかったのが最後となりました。ご病気のことは全く存じ上げませんでしたので、ご訃報に驚きました。カルパインとプロテアーゼ研究を牽引し、発展と推進に尽力なさった若い反町さんが、研究の場にもうおられないことは大きな損失であり、とても残念なことです。しかしながらこれからは、カルパインの新たな機序の解明に向けて、遠くから光明を示し導いて下さると信じております。

ご冥福を心よりお祈り申し上げます。

合掌

芦野洋美

千葉大学大学院・医学研究院・遺伝子生化学

(元 都臨床研/医学研・分子制御研究室/がん治療 PT/動物実験開発室等所属)

反町先生の優しい笑顔は決して忘れられません。
いつもどこかで見ていてくださっているように感じています。
いろいろとお世話になり、ありがとうございました。

公益財団法人 東京都福祉保健財団 事業者支援部 事業者指定室
穴田 豊子

私が大学院生だった頃、日曜日になると反町先生は私を分生研の草野球チームの試合に連れて行ってくださいました。反町先生お気に入りのトヨタ・ソアラに乗って、当時甲子園で大活躍していた松坂大輔の決め球であるスライダーについて、熱く語り合った思い出があります。私が苦勞して大学院の入試をパスした時も、ご自分の身内のように喜んでくださいました。修士論文と博士論文の作成においては、信じられないくらい丁寧に、詳細にご指導くださいましたし、普段の研究生活においても、いつも少し離れたところから、研究者として、人間としての成長を見守ってくださいました。反町先生の、あの大きな人間愛に触れることができた私は、幸せな大学院生であったと感じています。本当にありがとうございました。心よりご冥福をお祈りいたします。

ソニー株式会社
阿部 友照

医学研で3年間、知財センターで外部委託研究費の事務を担当させていただきました安齊と申します。

私の医学研在職中、反町先生はいくつかの外部研究費を獲得されていて私が委託先との事務手きを行う際にたいへんお世話様になりました。そのなかで私がしでかした提出書類漏れや計算ミスでいく度となくご迷惑をおかけしてしまいましたが、その都度先生は私の急な御願いにもかかわらず素早く対応して下さり、なおかつ失策に恐縮する私に優しいお言葉をかけてくださいました。とてもありがたかったです。今年突然のご逝去の報に接し驚きと悲しみを禁じ得ませんでした。いまはただご冥福をお祈りするのみです。

島しょ保健所 総務課
安齊 伸也

ソリさん

いつも明るい笑顔でいろいろと気を遣って頂き、本当にありがとうございました。
たんぱく CREST 同期生で、お互い切磋琢磨の中、楽しい時間をたくさん共有させて頂きました。

同じく同期生だった吉森さんに一緒に呼んでもらった微研ジョイントセミナー後の飲み会はいまだに語りぐさです。

サイエンスと赤ワインの楽しみ方、今後も学ばせてもらったとおりに実践します。

どうぞ安らかに。

東京大学・大学院薬学系研究科・研究科長 細胞情報学教室・教授
一條秀憲

私は研修生としてカルパインプロジェクトに所属させていただき、修了直前までお世話になっておりました。私にとって、反町先生は安心感を与えてくれる人間的な優しさと、研究者として真実を追求し続ける厳格さを併せ持つ先生でいらっしゃいました。そのため、私が研究室に配属されてすぐに研究室になじむことができましたが、研究の面では時折自らの不出来さに苦心するときもありました。私が修了する前、反町先生は長い間研究室にいらっしゃらない期間がありました。体調がすぐれていらっしゃらないことはわかっておりましたが、反町先生はそんな時でさえ、様々な手を尽くして最後まで私の研修をサポートしてくださいました。反町先生は、その一年前に「何があっても君の面倒は最後まで見る」とおっしゃっており、その約束を守り通してくださったことに気づきました。

3年間の研修を通して、反町先生は、研究の内容はもちろんのこと、私は人間としてのふるまい方についても多くのことを教えていただきました。

株式会社 OKI ソフトウェア（元カルパインプロジェクト研修生）
伊藤 義城

反町先生の笑顔の絶えない温和なお姿が今も忘れられずにおります。初めてお会いしたのは反町先生の恩師の鈴木絃一先生が代表を務められておられた重点領域研究の時だったと思います。20年以上前だと思います。それ以後、CREST、特定領域研究などでご

一緒しましたが、温和な中にもカルパインに対する愛情、情熱を持ち研究を進められるお姿に感服いたしておりました。反町先生のお弟子さんがカルパインの仕事を継続して牽引して行かれると伺っております。良かったですね。

私事になりますが、私が学部学生時代にカルパインの命名者で鈴木・反町先生グループのライバルだった村地孝先生の研究室に出入りしたことがあるのですが、そのような私にも優しく接していただきましたこと、本当に感謝いたしております。

ご冥福をお祈りいたします。

京都大学・大学院医学研究科・細胞機能制御学
岩井 一宏

反町洋之先生の思い出

1995年に故鈴木紘一先生がプロテオリスの班研究を組織されたとき、初めて反町先生にお目にかかった。なんと言っても若々しく、健康的な快男児という面影に圧倒された思いが有る。とても礼儀正しく、いつも応対にあたって真っ直ぐこちらを向いてにこやかに話される人柄がとても印象に残っている。同じタンパク分解を研究する人間として見るとき、カルパインは本当に難しい研究テーマであると感じる。学会などでカルパインのセッションを聴きながら、自分だったらこの仕事にどう取り組むかと考えてもほとんどアイデアが浮かんでこない。そういう難解な分野で次々と新しいカルパインを発見され着実に研究を推し進めて行かれるのを見て大変な努力家だと感心させられることが多かった。

研究以外での反町先生の思い出はやはりお酒である。順天堂の私の研究室では金曜日の夜にお酒を呑みながら集うことが多く、反町先生が小野先生を伴って参加されたのを思い出す。まったく酔っ払った事が無く健康そのものに見えた先生が、病に倒れられ亡くなられたことは大変な衝撃である。今はただただ感謝の気持ちとともにご冥福をお祈りするばかりである。

順天堂大学研究基盤センター生体分子研究室
上野 隆

反町先生の思い出

反町先生が、東京都臨床研の鈴木研究室で研究を開始した時期からしばらくして、岩手医大の私の研究室を訪れた。カルパインの分子種のうちで、消化器系特に胃で発現するカルパインの局在を検討して欲しいということで、様々な抗体を使って、全身の臓器を検索したことを思い出す。あれから25年以上の時が経ちました。反町先生とはその後班会議などで度々ご一緒しましたが、物腰が柔らかで、何時も大きな身体に満面の笑顔を湛えた先生のお姿が忘れられない思い出として残ります。先生の研究の歴史というか、毎年、お伺いした先生の講演の折にカルパインファミリーの数と質が次第に増えていくのをいつも感じていました。素晴らしい結果で、カルパイン研究をこれまでに伸ばし、世界をリードしたことの証との印象をいつも持っていました。先生の早すぎる旅立ち、残念で仕方ありません。

私の研究室では、反町先生は、カルパインの研究者としてだけでなく、ワインの帝王としてもよく知られ、教室にあるワインは、彼に推薦して頂いた銘柄を揃えています。先生のことを思い出しつつ、杯を空けたいと思います。

心より先生のご冥福をお祈りいたします。

順天堂大学
内山安男

2018年になって間もない日、あまりにも突然の悲報に驚きました。反町さんとは、野球、ソフトボール、お酒・・・、研究外の活動でも大変お世話になりました。若かりし日々の様々な思い出が頭を駆け巡ります。その全てが一生懸命で、豪快で、周囲へは人一倍気を遣われ、今でも“うめだあ〜！”と笑顔で呼んでいただいたあの日々の笑顔、笑い声が忘れられません。まだまだやりたいことがたくさんあったことと思います。とても残念でなりません。在りし日のお姿を偲びつつ、心からご冥福をお祈りいたします。

梅田達也

研究推進課普及広報係に配属された際には、「都民講座」をはじめ「サイエンスカフェ」などのイベントでも、常に積極的に御対応くださり大変感謝しておりました。

「サイエンスカフェ」の後の懇親会なども病気の後にも関わらず企画なさってください嬉しかった思い出があります。

怒った顔を見たことがないほどいつも笑顔でいらっしゃったことが印象に残っています。

ありがとうございました。

東京都福祉保健局 総務課広報担当

榎本 宏昭

反町さんへ

反町洋之先生（以下呼び慣れた反町さんとさせていただきます）の追悼に際し一言申し上げます。反町さんとは「生化学」という共通の分野でした。したがって若い頃からの知り合いでしたが、お互い研究対象とする物質は異なっていました。カルパインと糖鎖、それぞれが難病である筋ジストロフィーの原因であるという事や、東京都の研究所に勤務と研究環境も同じということで親しくお付き合いをさせていただきました。ブタペストで開催された FEBS のミーティングで鈴木絃一先生とともに楽しい一夜を過ごしたことを思い出します、あのいつもニコニコの笑顔とともに。改めてご冥福をお祈り申し上げます。

東京都健康長寿医療センター研究所
所長代理 遠藤玉夫

反町先生は私が研究室に配属された時の助教授でいらっしゃいました。

直接の指導は受けませんでしたが、学生だった私は、先生の研究に取り組む姿勢、豊富な知識に圧倒されました。

また、何よりもその明るくて、丁寧で、気遣いをされて、チャーミングな人柄が素敵でした。

同じ研究者の道に進んでからずっと目標とする方のお一人です。

研究室旅行やソフトボール大会、そしてお酒の席で楽しそうにされていた姿が思い出されます。

4年ほど前にお会いした時にはお元気そうでしたのに、本当に残念でなりません。
ご冥福をお祈りいたします。

東京大学 大学院農学生命科学研究科 ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」
岡田 晋治

反町洋之先生のご逝去を悼む

反町先生のあまりにも若い御遠行に、私は痛惜の念を禁じ得ません。反町先生は、今堀和友先生の後継者であった鈴木紘一先生の薫陶を受けた、タンパク質分解酵素 calpain 研究の泰斗として、多くの人の仰ぎ見る実験者であり、指導者でした。

今堀先生が東大医学部の教授に就任されてから間もなくから、私はそのグループの研究に関心がありました。それは、私は、それ以前に calpain の前身の CAF と Ca の問題に関係するテーマに関わっていたことと、後年筋ジストロフィーの研究に入り込んだということにあります。時間が経つにつれて、反町先生ともいろいろな接触を持つようになりました。私はまだ若かった反町先生のお仕事の素晴らしさに感服するようになりました。時が経って、彼が筆頭著者としてのお仕事である p94 遺伝子が、肢帯型筋ジストロフィーの原因遺伝子として、フランスで同定され、筋ジストロフィーの世界でも名声を轟かせ、多くの人々に反町先生のお名前を強く印象付けました。これは彼のほんのわずかな部分に過ぎません。研究者としての彼としては、まだまだ突き詰めたい問題が山積していただろうと本当に残念に思います。私と語り合った問題では「calpain が実際に筋ジストロフィーの発症機構に関わっているのか」という問題などは、未解決のままに残されてしまいました。それは私としても残念でなりません。

反町先生は、旅立ってしまわれました。心からご冥福をお祈りいたします。

国立精神神経医療研究センター・神経研究所
小澤 鏝二郎

2004年から2008年まで反町研究室でポスドクをしていました。反町研を離れて10年近く経ちますが、思い返すと反町さんには感謝することばかりです。私にポスドクとして研究する機会をくださったこと、カルパインの奥深さを教えてくださったこと、ラボミーティングでは的確で具体的なアドバイスをくださったこと、成果の出ない私を大目

に見てくださったこと、ワインのすごさを教えてくださったことなど際限がありません。また、反町研を離れた後もカルパインの研究を続けることができたのも反町さんのおかげです。本当にありがとうございました。これからも一緒に仕事ができると思っていたのに残念です。

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門 畜産物研究領域
尾嶋 孝一

ご家族、研究室の皆様のご心痛、お察し申し上げます。
反町洋之博士とは、東京大学理学部生物化学科井上康男先生の研究室で一緒しました。研究室のセミナーで、詳細な実験報告をされていた様子が思い出されます。大変ご活躍でしたのに、こんなに早く旅立たれるとは本当に残念です。きっと、今頃は井上先生とゆっくり語り合われていることと思います。反町博士が邁進されたご研究がこれからも発展されることをお祈り申し上げます。

東海大学工学部生命化学科
金森 審子

反町洋之先生を想って

反町先生と初めて一緒したのは、1997年の夏、故鈴木紘一先生が領域長を務められておられた特定領域研究「蛋白質分解のニューバイオロジー」班会議の席でありました。その折、反町先生と同室（しかも二人部屋）させて頂く僥倖を頂き、初めての班会議に緊張するばかりの私に、早速、明け方までビールを御馳走して下さったことが思い出されます。実は私、反町先生が鈴木先生と共著で著された総説を学生の頃に必死で勉強したことがあり、その中に掲載されていた著者紹介のお写真（バターボックスでまさにホームランを打たんとされているお姿）の印象も鮮烈で、そのことを反町先生に告白したら大笑いされていました。初めてお会いした気が全くしないことが不思議でしたが、後日、同じ研究室で身近に接する機会を頂いた後も、周りの方々を包み込むような反町先生のお人柄は変わることがありませんでした。

ご自身から漏れ伺ったところによれば、反町先生もお若い頃は気性の激しい、特に研究の進め方に対しては潔癖ともいえる厳しいお方であったようです。その片鱗は、私の

不勉強があらわになった折の先生の表情からも伺うことが出来ました。しかし、わたくしのご一緒させて頂いた20年、反町先生は常に人の立場を思い、人を励まし花をもたせ、人知れず心を使って下さる方でありました。私などは反町先生のお言葉に何度救われたか、枚挙に暇がありません。一方、その優しさと繊細さ、責任感の強さ故に、ご自身に対して、あまりにも過酷な日々を過ごされることも多かったのではないかと拝察します。何もご恩返しが出来なかった自分を恥じ入るばかりです。

数年前、拙宅に荷物が届き、その中に反町先生が高校生の頃に愛用されていたカメラレンズ一式が入っていました。私が今も銀塩フィルムで写真を撮っているとどこかで話したことを覚えていて下さったようです。それ以来、同じファインダーから今も子供の写真を撮らせて頂いていることをまだ充分にご報告出来ていません。19年前の野球大会、反町先生のキャッチャーミットに向かって、思い切ってボールを投げさせて頂きました。その日の勝敗は忘れてしまいましたが、大きく構えてボールを受けて下さったお姿を忘れることが出来ません。お互いに齢をとってから、反町さんの教え子たちの活躍、また思い出の写真と野球などを肴に、お酒の相手をさせて頂きたいと思っておりましたが、それも叶わぬ願いとなってしまいました。

首都大学東京 大学院理学研究科 生命科学専攻
川原 裕之

反町先生には大変お世話になりました。
心からお悔やみ申し上げます。

佐賀大学
北垣浩志

反町洋之君の思い出

本年2018年の1月初旬に小野弥子さんから反町洋之君が旅立ったとの知らせをいただきました。耳を疑うような知らせに時が止まりました。それからしばらく時が過ぎましたが、未だに腑に落ちない日々を過ごしております。2014年5月24日に第78回日本生化学会中部支部シンポジウムで、「カルパインによる筋肉のホメオスタシス制御」という講演をしてくださいました。「挑戦と情熱が切り開く生化学研究の魅力」というこの

シンポジウムのタイトルは、「カルパインには特異的な役割があるはずであると信じ続けてとうとう実態を掴み取った」彼の生き様に感銘して私が命名したものです。実際、彼が名古屋に来てくれたときには、本当にうれしかった。満足に接待もできないし、指導教員とその周辺との不快な出来事など学生の時から何かとすまないと思う状態が少なからずあった中で、それでも喜んで来てくれると言ってくれたことには、ただただうれしかったです。頑固で、執念があつて、人には絶対に頼らないくせに、頼んだら自分が大変な時でも駆けつけてくれる。そんな信頼できる数少ない友人であることを再確認した瞬間でした。

彼が大学4年生の夏、生物化学専攻の大学院入学試験で明日が合格発表という真夜中に、事務室の薄暗い廊下で掲示板を凝視する姿がありました。私が驚いて「何やっているの？」と聞くと、「試験ができなかったので就職先でも捜そうかと思って見ていました。」との返答で心配したのですが、蓋を開ければ最優秀の成績で合格だったと聞いて2度驚かされました。学業優秀であることは言うまでもなく研究のセンスと能力も人並みはずれておりました。高い能力に裏付けられた余裕からかも知れませんが、彼の特徴は、いつも自分のことは後回しで、他人の手助けやお節介を優先することでした。私が博士論文の仕上げの時期に、恥ずかしながら締切りの数日前になっても完成せず焦っていた時に、当時 M1 の彼は普段は朝から深夜まで東京都臨床研で研究をして忙しい最中に、何と夜中にラボにやって来て、毎晩ワープロでの入力を手伝ってくれたのです。また、こうと決めたらひたすらやり抜き、自分が納得できないことは絶対に納得しない頑固な性格でした。年上だからと言って憚ることなく、おかしいと思う、と言って議論している姿も目撃しました。弱者に心を寄せるにせよ、強者と対峙するにせよ、彼は何かと神経を擦り減らす状況に陥りやすく、それを強い意志で克服するようなある意味自分を窮地に追い込むような生き様であったように思います。一方、その対岸に行く特徴として、不思議な存在感を醸しておりました。まず、何と言っても人懐っこい性格で、いつも何が本当かわからないような冗談を言って人を惑わせたり、笑わせたりしておりました。和文雑誌「生化学」の記事の著者プロフィールの趣味紹介欄には、普通はテニスなどと書くのですが、「ちょっと太めの女の子」のようなことが書いてありました。また、自動車の運転が趣味で、夏にはガンガンに冷房を効かせて徘徊運転をすることがありました。今から思うと違法でしょうか、ハラハラするようなドライブ経験を一緒にさせてもらったことが思い出されます。時々家に遊びに来てくれて、お酒を飲んでともに前後不覚になることもありました。

これらは彼が大学院生から若手研究者の頃の思い出で、随分と昔のことになりました。思えば、私が彼と出会ってから 30 年余りになります。活躍のほどはよく聞こえてきましたが、長らく音信不通でした。ここ数年の彼の噂は知人から聞きましたが、聞けば聞くほど、若き日の彼と違わぬ「彼らしい」としかいいようがない生き様であったことが、わかってきました。私には、良きに悪しきに頑固に曲げない時のあの表情が見えますし、

冗談を言いつつ明るく振る舞う言動とは裏腹の大きな孤独に身を委ねる姿が目には浮かびます。個人的には壮絶な日々だったんだろうなと思い、そぞろに胸が騒ぎます。しかし、実際には、若き日とは周囲の状況が変わり、愛するご家族や志を同じくする研究仲間にも囲まれているのだから、静かに覚悟をして、最後は心穏やかだったのかなあとも思います。スケールが大きな人間で最も尊敬する後輩である一方、扱いにくい後輩であり、そして私の大好きな人物でした。それにしても、ちょっと早すぎないかい？

東京大学理学部生物化学科井上研出身
北島健
(名古屋大学生物機能開発利用研究センター)

反町さんとは、大学院時代にかぶることはありませんでした。が、よく井上康男先生がこういう人だったとお話しされていたので、とても親近感を持たせて頂いておりました。最近の生化学会でもお声がけ頂き、嬉しかったです。心よりご冥福をお祈りいたします。

福島県立医科大学・新医療系学部設置準備室
北爪しのぶ

訃報をお聞きして、想像もしていなかったことに言葉もありませんでした。反町先生のご冥福を心よりお祈り申し上げます。

サントリーウエルネス（株）品質部
城處 絢子

お加減が悪いとは伺っていましたが、まさかこんなにも早く悲報を受け取るとは思ってもいませんでした。大変驚くとともに、ただただ悲しく呆然とするばかりです。

学生時代は公私にわたり大変お世話になりました。バッテリーを組んで臨んだソフトボール大会、分生研の停電に乗じて行ったバッティングセンター、改装中のトイレに忍び込んで取った写真など、思い出を挙げればきりがありません。

反町さんと過ごした日々が、今の私をどれだけ支えていることか…。しこたまお世話になったのに、何のご恩返しもできず口惜し限りです。

在りし日の姿を偲び、心よりご冥福をお祈り申し上げます。

京都大学複合原子力科学研究所・放射線生化学
木野内 忠稔

反町先生が卓越した研究者であることは、多くの方の知ることだと思います。ですが反町先生には権威的なところはなく、反町先生ではなく反町さんと呼んでほしいと学生に仰っていました。文武両道で野球などの運動もお得意で、研究室対抗のソフトボール大会ではいつも活躍をされていました。エレクトーンを習われていたというお話も伺ったことがあります、本当にいろいろな才能に恵まれていらっしゃるのだと思います。反町先生は学生をご自宅でのホームパーティーに招待されたこともありました。ワインがとてもお好きで、出張先の京都でワインの専門店を見つけられた際には、お店の人といろいろ話をしながら、時間をかけてワインを選んでおられました。研究会が北海道で行われた際には、研究室の皆で同じ便の航空券を予約して参加しました。しかし、雨で電車が遅れたため私は飛行機に乗れませんでした。当時はまだ携帯電話が普及していない時であったため連絡はとれないものの、空港に着いてみると反町先生が飛行機をキャンセルして待っていてくれたのでした。研究室に戻った後、余分にかかってしまった航空券代を反町先生に払おうとしたところ、それには及ばないということで、受け取って頂くことができませんでした。そのためご自宅に郵送して受け取って頂けたということもありました。いろいろとご指導頂いた反町先生がご逝去されたことは本当に信じられませんが、ご冥福をお祈り申し上げさせていただきます。

農業・食品産業技術総合研究機構
木村映一

反町洋之先生
一緒にワインや食事を楽しませて頂いたこともありました。いつも終始にこやかでした。抜群に優れた研究者であると同時に、抜群のお人柄の稀有な方でいらっしゃいました。

ご家族、研究室の方々、友人、研究所の方々、そしてサイエンティフィックソサエティも、誰もかれも皆無念の思いだと思います。ご冥福をお祈り申し上げます。

静岡大学農学部
木村洋子

反町先生がおられなかったら今の私はなく、深謝しております。
10年程前になりますが1年間雇用して頂き、次に繋がるように助けて下さいました。研究スタッフと学生の方々も熱心に研究に励まれていましたが、反町先生は毎夜遅くまでお仕事される姿が印象的でした。ただただ、お疲れさまでしたと申し上げたいです。残されたご家族と、研究室の方々に慰めと平安がありますようにお祈りしております。

東京大学大学院医学系研究科免疫学（学術支援員）
楠畑かおり

思い出されるのは反町先生の人懐っこい笑顔です。学生時代に初めて反町先生にお会いしましたが、こんなに邪気のない笑顔をする大人がいるもんだと感心してしまうくらいの笑顔でした。心よりご冥福をお祈り申し上げます。

大阪大学大学院医学系研究科遺伝学教室
久万 亜紀子

学生時代、谷中にあった君のアパートに行き、よく夜更けまで話し込んだ。
深夜、君の運転で、箱根、時には九十九里浜まで行き、とんぼ返りで直接、大学に朝帰りしたこともあった。
お互い、遠い未来の途方もない夢を大言壮語していたように思うが、その後、君は謙虚さをもって、自らの道を進み、際立った研究実績を残されたと聞く。
「見果てぬ夢」は、心残りな夢ではなく、最後まで終わらない夢であって欲しい。
多感な青春時代のひと時を、君と一緒に過ごせたことに深く感謝したい。

Neo.Hiro.Consulting Inc. CEO
小池克宏

反町先生の突然の悲報に接し、悲しみにたえません。心よりご冥福をお祈り申し上げます。

医薬品医療機器総合機構 新薬審査第四部

小池 恒

反町洋之先生、本当にありがとうございました

このような文章を書いているのが未だに信じられません。私にとって反町先生は上司であり、共同研究者であり、良き相談者であり、目標であり、兄のような本当に頼もしい存在でした。その存在はあり続けると思っていたので、本当に大きな衝撃を受けております。

反町先生と私との付き合いはそう古くはありません。私もタンパク質分解研究者の端くれですので、“カルパインの反町洋之”といえは大学院生の頃から存じ上げておりました。ですが、お話しさせて頂く機会が増えたのは、駒込から松沢へ研究所が移転した頃です。当時、私は都医学研のプロジェクトチーム (PT) リーダーでしたが私の PT を含む幾つかの PT を取りまとめる分野長を務めていらっしやったのが反町先生でした。其れに託けて何かとご相談やお願いに反町先生のお部屋にお伺いしていました。お忙しい中、嫌な顔一つせず、寧ろ「よく来てくれました～」と向かい入れてくれました。研究所の中にとどまらず、YKSO の会を発足して、永福町、千歳烏山、下高井戸、新宿などのお店の開拓にもお付き合い頂き、公私ともにお世話になりました。反町先生の受け答えは常に相手を尊重し、論理的だが攻撃的にならず、また見下すこともなく、そこにいる人を気持ち良くさせてくれました。私の研究生活だけでなく人生において大きな影響を与えたお一人です。私が 2014 年に新潟に転出するときも親身になっていただき、ご助言をいただきました。2016 年の 2 月には新潟大学で行われたカンファレンスの特別講演をお願いし、新潟にも来ていただきました。「腰が痛いんだよ～」と言われていましたが、朝からカンファレンスに参加いただき、懇親会、二次会、その後二人で話そうとバーで深夜までお話しさせていただきました。その帰り、反町先生は「新潟は良い街だな～」とおっしゃられ、ハグをしたのが強烈に印象に残っています。最後に頂いたメールが 2017 年の 10 月 23 日でした。その中で、

メールを有難うございます！

東京に戻れるとのこと、大変嬉しい限りです！！

もう少ししたら治りますので、そうしましたら是非また！！

とございました。実現できなかったことが本当に残念でなりません。反町先生、本当にお世話になりました。ありがとうございました。

新潟大学医歯学系 分子遺伝学
小松雅明

臨床研から医学研まで長年にわたって評価委員会に参加させていただき、毎回、楽しく皆様のお仕事や反町さんのカルパイン研究の進展を聞かせてもらってきました。このような特殊なお付き合いではありますが、反町さんのお人柄はよくわかっているつもりです。案外この種の委員会の方が人間性が伝わってくるものかもしれません。正に責任感の強い英国紳士という印象でした。研究ですから、期待以上に進展するときも中だるみの時もありますが、今は急上昇中という時期だったので、そこから離れるのは辛いことだったと思います。

闘病生活を送っておられるというのを聞いたのは、かなり前のことでした。ところが、今年の委員会の前突然訃報が伝えられ、驚きました。何と言っても反町さんはまだ若かった。スポーツで鍛えた頑強な体格とか、ワイン通とかのイメージから言っているのではなく、実年齢からの実感です。本当に若い、惜しいと言っても始まりませんが、残念であります。ただ、委員会でのご発表の場面は生き生きとし、素晴らしい記憶として残っております。同世代の仲間のように接して頂いたことも、うれしい思い出です。ありがとうございました。

新潟大学医学部
木南 凌

暮れに連絡を取る機会があり、メールをしたところ直ぐに返事をいただき、その文面も元気いっぱいのものでした。直後の免疫学会に奥様の典子さんが来ていなかったのが心配になったのですが、このようなことになってしまい、大変ショックを受けています。

国立研究開発法人 理化学研究所
小安重夫

反町先生

先生には、研究だけではなく、人に対する気遣いやお酒の美味しさなど、本当に多くのことを教えていただきました。先生の研究に対する厳しさや、ワインを飲みながら雑談している時の包容力のある笑顔など、先生にご指導頂いた日々の記憶が、鮮明に思い出されます。

長年の親身なご指導とたくさんの温かい思い出を、本当に有難うございました。また、これからもどうか見守っていてください。先生のご冥福を心からお祈り申し上げます。

旭化成ファーマ株式会社

小山 傑

反町さんのご冥福と、ご家族のご安寧を心よりお祈り申し上げます。

東海大学工学部生命化学科

笹川 昇

大学院修士課程でお世話になりました。実験の事をはじめ様々なことを広い心で教えていただきました。本当に感謝で一杯です。

佐藤太亮

反町先生の研究や生き様を尊敬していました。
ご冥福をお祈りいたします。

名古屋大学生物機能開発利用研究センター

佐藤ちひろ

反町先生のご逝去を悼み、謹んでお悔やみ申し上げますとともに、心からご冥福をお祈りいたします。

東京大学

佐藤弘泰

反町先生が本専攻に助教授で在任中に、同じく助教授として関連研究室におりました。学生実習の当番を短い間ではありましたがご一緒させていただき、思い出は尽きることはありません。いつも笑顔を絶やさない柔和なお人柄は、周りのみんなを幸せにするお力を持っておられました。そんな先生が早逝されたことに不条理の感を禁じえません。とにかく残念です。

東京大学大学院農学生命科学研究科・応用生命化学専攻
佐藤隆一郎

私は反町先生の前で3年間カルパインの実験のお手伝いをさせていただいたのですが、学生の頃からカルパインに携わってきた私にとって、反町先生は憧れの存在でした。貴重な経験をさせていただき、感謝の気持ちでいっぱいです。

反町先生は、カルパインに情熱を注がれ、一方で、ワインを片手にワハハと大きな声で笑っておられた元気なお姿が印象的で、今もありありと思い出されます。突然の訃報を聞き、驚き、戸惑い、今でもまだ信じられず、悲しい気持ちでいっぱいです。

心からご冥福をお祈りいたします。

2008年～2011年3月までカルパイン研究室実験補助
柴田(高谷)恵美

ご連絡をいただいたとき、受け取ったメールのタイトルに、始業前の職場で「えっ」と思わず大きな声を出してしまいました。たいへん驚きました。

反町先生には、学部4年生から修士2年生まで、東京大学の生物機能開発化学研究室にてお世話になりました。研究テーマが異なっておりましたので、常にというわけではありませんけれども、特にタンパク質の扱い方についてご指導いただきました。ゼミやディスカッションの場では、未熟な私にていねいに説明してくださり、優しく励ましてくださいました。

普段実験をしている部屋が異なっておりましたので、私にとっては、ご研究に対する厳しいお姿よりも、飲み会でのお姿や農学部ソフトボール大会で活躍されるお姿などが、より印象に残っています。私の記憶にある反町先生は、大きな口をあけて笑っていらっしやいます。

生物機能開発化学研究室を“卒業”したのは、反町先生と同じ2004年でした。学位記授与式の後、農学部2号館215号室の奥に、同期と一緒にご挨拶に伺ったことを覚えています。やはり笑顔で励ましてくださり、握手をしてくださったと思います。あたたかくて大きくてユーモアがあり、そしてお嬢様のことが大好きな反町先生。いまでも信じられない思いです。心よりご冥福をお祈り申し上げます。

数研出版株式会社
白須賀有香子

反町さん：偉大な井上研究室の先輩

反町さんとは直接研究でお世話になることはなかったですが、東大生化 井上研の先輩として学生時代からよくお名前を伺っていました。特に当時井上研の助手であった北島健先生が反町さんのことを(井上研卒業生の中で)ピカーだと褒めておられたことを今も思い出されます(滅多にそういうことはおっしゃられない先生なので、余計に印象に残りました)。

反町さんの訃報を耳にしたのは1月10日のことでした。ご闘病のことを全く知らなかった私にとって、あまりのことに唯々愕然としたのを覚えております。その前の年の8月にサイエンスカフェで都医学研にお邪魔したときに反町さんにお会いした時も、恥ずかしいことにご病気のことは全く気づきませんでした。お体の状態がどうであれ、いつも通り研究に邁進されていた反町さんの研究者スピリットを、後になって気づかされました。

反町さんのご逝去の後、思わぬところで海外の研究者から反町さんのことが話題に上がったことが1度ならずありました。反町さんが国際的にいかに著名で活躍されていたかが改めて感じられた出来事でした。

まだまだ研究でやりたいことは沢山あったであろうに、反町さんの無念はいかばかりであったかを想像するにつけ、胸が締め付けられる思いです。ご冥福を心よりお祈り申し上げます。

理化学研究所
鈴木 匡

この度は、突然の訃報に接し、残されたご家族の皆様のご心情をお察しすると、言葉がありません。

反町さんとは、東大の生物化学科の学友としてご一緒させて頂きましたが、みんなから慕われ、頼られる反町さんは、いつも同期の中心的存在でした。

反町さんから学ばせて頂いた、人として何事にも真っ直ぐ向き合う姿勢や仕事人として未来を切り拓く深い情熱は、私にとっても一生の宝物です。

反町さんがいらっしゃらない、という現実には、本当につらいものですが、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

(株) プラネットプラン

須藤 実和

私は学生時代の3年間、カルパインプロジェクトでお世話になりました。反町先生の悲報に接し、初めて研究室へ伺った際、先生がこだわりのコーヒーで迎えて下さり、とても丁寧に研究所を案内下さったことを思い出しました。気難しいイメージがある研究者とは異なり、反町先生は、社交的で、学生にまで気を配られる方でした。本当にありがとうございました。ご冥福をお祈りいたします。

田尾 あすみ

先生のご訃報に接し、心よりお悔やみ申し上げます。生前は快くカルパインの実験の相談に応じていただき、ご厚情に深く感謝すると共に、ご冥福をお祈りいたします。

サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社

高野 二郎

突然のことでとても驚き、大変ショックを受けています。

カルパインのバイオインフォマティクスプロジェクトで 大変お世話になりました。初めて研究室を一人で訪問させて頂いた際、何も知らなかった私は大変不安に思っていました。明快で分かりやすい説明や紹介と、明るく気さくな雰囲気でも迎えていただ

きとても感激しました。夜には美味しい食事に誘っていただき、小野さん含め3人で色々とお話したときの明るく優しく力強いイメージをこの間のように思い出しています。

そうした全ては先生のご研究とともに私たちの中に刻まれて、一生生き続け、節目節目を力強く支えてくれるように思っています。本当にどうもありがとうございました。心よりご冥福をお祈りいたします。

北海道大学情報科学研究科

瀧川 一学

これまで、先生の素晴らしい研究成果を拝見させていただいており、これからますますのご発展を楽しみに致しておりました。あまりにも早すぎて、残念な気持ちでいっぱいです。改めて、先生の成果をふりかえらせていただきたくとともに、ご冥福を心からお祈りさせていただきます。

東京理科大学 理工学部応用生物科学科

田口速男

反町先生のご逝去を悼み、謹んで哀悼の意を捧げます。反町先生のご厚情に深く感謝し、ご功労に敬意を表します。ご生前の数々のご功績を偲ぶとともに、心よりご冥福をお祈りいたします。

東京大学

武富芳隆

ワインを片手にサイエンスの話をたくさんさせていただいたこと、本当に懐かしく思います。いつもパワフルで、笑顔の絶えない反町先生から、たくさん元気をいただいていた。本当に残念です。

反町先生が切り開いてこられたカルパインの世界が、ますます発展していくこと、心より願っております。謹んで哀悼の意を表し、心からご冥福をお祈りいたします。

中外製薬株式会社

辰巳 加奈子

反町さんと最初にお会いしたのは、20年以上前、タンパク分解の班会議でした。反町”先生”とお呼びすると、そういうのはやめましようと言われ、非常に気さくなお人柄でした。お会いするといつでも笑顔で、いろいろなお話をしていただいたのを今でも覚えております。研究に関しても、柔らかな語り口の中に確固たる信念を持ちながら、淡々と研究を積み重ねるスタイルで、まさに尊敬すべきものでした。そうして積み重ねた足跡がカルpain研究の第一人者と地位を確固とし、これからまだまだ研究が発展しそうな時に突然の訃報を聞き、愕然といたしました。

反町さんはワイン通とのことで、ワインを買う時はいろいろアドバイスを頂いたり、何度か飲みに誘っていただきました。特に東京駅近くのワインバーで美味しいワインを味わったことは今でもいい思い出です。どんな居酒屋に行っても、ビールよりはワインを選ぶほどのワイン好きで、その徹底した態度が研究スタイルと通じるものがありました。また飲みましよう、と言いつつ、何年もお会いしないまま、次の機会が永遠に来なくなってしまったことはとても残念であり、寂しいことでもあります。きちんとお礼もいえないまま、お別れのときが来てしまいました。本当にありがとうございました。反町さんのご冥福をお祈りいたします。

順天堂大学医学部神経生物学・形態学講座

谷田以誠

反町洋之さんの思い出

反町洋之さんのご逝去を知った時は、とてもショックでした。数年前に合った時には、いつもの人懐っこい笑顔で対応してくれたので、これほど急に他界されたことについては、未だに信じられない思いです。

反町さんとは、東京都臨床研の同期入所ということもあり、実験が終わった後に、よく飲みにいっていました。話す内容は、研究のことよりも音楽や読んだ本の話などで、いつも笑顔の反町さんとの時間は、本当に楽しいものでした。1年後には私が所属していた免疫研究部門（宮坂昌之先生）に、遠山先生（後の反町夫人）が入所され、いつの間にか3人で飲みに行く機会が増えました。お二人は、最初に会った瞬間から意気投合し、あっという間に結ばれました。結婚された後も私の妻と4人でスキーに行くなど、家族ぐるみの付き合いをしていただきました。

その後、反町さんは鈴木紘一先生とともに東京大学に移られ、私も都臨研を出てしまったので、なかなか会うことができなくなりました。ただ反町さんは、東大そして都臨研に戻られてラボを運営するようになられてからも、カルpain研究の第一人者として大活躍されていたので、ことあるごとに噂は耳にしていました。そしてたまに会ったときには、昔と同じように気さくに話し相手になってくれました。

昨年末の免疫学会に反町典子先生のお姿がなく、どうしたのだろうと置いていたところ、今回の訃報に接することになりました。まだ五十代前半で、研究もまさにこれからという時期であり、本人は本当に心残りであったろうと思います。今はそのご冥福をお祈りすることしか出来ず、友を失った悲しみにうちひしがれています。

玉谷 卓也（順天堂大学大学院医学研究科・P5 株式会社・ソニー株式会社）

反町先生の思い出

反町先生のありし日のお姿を偲び、心から感謝と尊敬の気持ちを表し、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

反町先生といえば、穏やかな笑顔と温かく茶目っ気のある語り口、プロジェクトリーダーとしての貫録や漢気、御家族のことをお話されるときに優しい眼差しが思い出されます。

病院等連携研究センターの開設に当たり、研究計画や結果の信頼度を高めるための統計相談を始めた頃のことです。反町先生は、プロジェクトのメンバーの方やご自身の研究をさらに高めたい、良いヒントがないかと気を配られており、統計相談をよく利用してくださいました。クラスターを利用した統計解析の手法が、先生の研究計画にぴったりはまったことがありました。そのときの先生の破笑と驚きよう、ギリシア彫刻のようなたたずまいに、「エウレカ！」ってこんな感じだったのかな？と思ったことがあります。

反町先生、そちらの世界でも、新しい「エウレカ！」を日々体験されていらっしゃることでしょう。またいつか、先生のお話や講演を伺えることを楽しみにしております。

東京都教育庁都立学校教育部特別支援教育課 統括課長代理（管理担当）

田村陽子

反町先生には、田中啓二先生のプロテアソーム研究班でお世話になりました。お会いするたびに、温かく接していただき、今も反町先生のお人柄をなつかしく思い出します。反町先生のお好きな赤ワインの銘柄は何だったのか、もっといろいろお話しできるチャンスもあったのに、あまりにも早いご逝去に、ただただ悔やんでおります。

お茶の水女子大学

千葉和義

反町先生の思い出

私が反町先生の御指導を仰いだのは、1995年から1996年までの1年間でした。当時の私は東大理学部生物化学の高橋健治先生の研究室でプロテアーゼの研究をしておりました。博士2年時に高橋先生が東大を定年退官となったため、同じくプロテアーゼ研究者である東大分子細胞生物学研究所の鈴木紘一先生が、博士3年時の身元を引受けてくださいました。このようなご縁で私は鈴木研の一員となり、助教授の石浦章一先生、助手の反町洋之先生、優秀な大学院生の方々と博士最終年度を楽しく過ごすことができました。

当時はプロテアーゼを活性中心残基の種類によって分類しており、セリン・システイン・金属・酸性プロテアーゼ（一般名称はアスパラギン酸プロテアーゼですが、当時の高橋研では新規グルタミン酸プロテアーゼを研究していたのでこう呼ばせて下さい）の4種類に大別されていました。高橋研のメインテーマは微生物の酸性プロテアーゼであり、私自身は哺乳類の膜結合セリンプロテアーゼと金属プロテアーゼの研究を行っていました。反町先生から「あとはカルパインを研究すればプロテアーゼを全制覇できますね」と楽しいお言葉を頂いたのを覚えています。私自身はカルパイン研究に直接関わることはできませんでしたが、同じくシステインプロテアーゼであるカスパーゼと、新たに分類に加わったトレオニンプロテアーゼであるプロテアソームには、研究の色々な局面で出くわします。いつかお会いして「先生！プロテアーゼを全制覇しました！」と報告したかったのですが、反町先生は雲の上からそんな私に苦笑いしていることでしょう。流行に振り回されずカルパイン研究を極めていく姿や、力強いリーダーシップは私の憧れでした。心よりご冥福をお祈りいたします。

東邦大学医学部生化学講座生化学分野
土屋 勇一

反町洋之先生のご逝去、誠に残念です。生前は大変お世話になりました。ご冥福をお祈り致します。

株式会社エービーサイエックス
津幡 卓一

1980年代のCANPとcalpainの熾烈な競争は、反町先生と同世代のプロテアーゼ研究者として、大変印象深いものでした。この様な中でも、反町先生は鈴木先生を支え、穏やかでお洒落に研究を語られておられました。その後は、カルパインの多様な生理機能や疾患との関わりを明らかにされ、正にトップリーダーとして研究領域を牽引されておられました。さぞ、さらにご家族やカルパイン研究の行く末を見たかったことと存じます。謹んでご冥福をお祈り申し上げますとともに、反町先生の高潔さをいつまでも心に刻みたいと存じます。

大阪市立大学大学院医学研究科分子病態学
徳永 文稔

反町先生の柔らかな優しい笑顔が偲ばれます。
謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

東京都 福祉保健局 高齢社会対策部 介護保険課
戸田 三保子

反町さんには、特定領域研究「タンパク質分解」でご一緒させて頂いていた頃に、大変お世話になりました。反町さんのカルパインにかかる情熱、研究に向き合う姿勢に大変刺激を受け、また、沢山のことを教わりました。いつもエネルギッシュで快活で、人間的にも大変魅力あふれる方でした。こんなに早くに亡くなられるとは残念でなりません。ご冥福を心よりお祈り申し上げます。

京都大学大学院理学研究科
枳尾 豪人

反町先生のご逝去に際し、謹んで哀悼の意を表します。反町先生には平成22年4月から3年間、カルパインPTにてご指導を頂きました。カルパイン6と言う酵素活性部位を持たないカルパインの研究をしたいと門を叩いた私に、先生は惜しみないご支援と励

ましを与え続けて下さいました。お陰様で都医学研では、私のそれまでの研究者生活の中で最も充実した時間を過ごさせて頂き、研究者として次のステップを踏み出すことが出来ました。反町研は私が初めて学位を取った研究室以外のラボでお仕事をさせて頂いた所で、至らぬところが多い私にいつも優しさ、温かさ、そしてときに厳しさをもってご指導下さいました。手のかかるポストドクであったと思いますが、私がいま研究者としての日々を過ごしていただけるのは反町先生のご支援、ご指導があったからです。また、研究に対して謙虚に誠実に取り組むこと、周りの人たちへの心配りを忘れないこと、楽しむ時は大いに楽しむことなど、言葉にされることはありませんでしたが、先生のお姿からたくさんのことを学ばせて頂きました。そして、それらは今でも私の中で毎日の支えとなっています。素晴らしいものを残して下さった反町先生に心から感謝申し上げたいと思います。

東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻 代謝生理化学分野
礪波 一夫

反町先生と南アフリカのワイナリーで開催された国際プロテアーゼ学会をご一緒できたのが、何よりも楽しい思い出でした。気さくに話しかけていただき、とても嬉しかったです。ご冥福を心よりお祈り申し上げます。

東京大学大学院薬学系研究科機能病態学教室
富田 泰輔

反町さんには研究に取り組む姿勢など多くのことを学びました。活動するフィールドは変わりましたが、教えて頂いたことを忘れずに、反町さんに認めて頂けるような仕事を成したいと思います。

ソニー株式会社
中川和博

反町先生は私が東京大学農学部で卒論配属された際に助教授で阿部啓子先生の研究室におられました。また、修士2年のときに臨床研に異動されたので約3年間、私自身はカルパインの研究テーマではありませんでしたが、同じ研究室で過ごさせていただきました。先生は学生である私たちにも非常に丁寧に接してくださいました。また一方、印象的なのは科学に対する情熱と、それに基づき学生や後輩を激励する姿です。先生の突然の訃報は大きなショックでしたが、その姿を再度思いだし、自分も頑張らなければと思いました。

自然科学研究機構 生理学研究所
中島 健一郎

先生のご訃報を、驚きと悲しみをもって聞きました。
研究室でご一緒したときの穏やかな笑顔が、もう見られないと思うと残念でなりません。
私は直接ご師事したわけではありませんでしたが、
厳しさと優しさを兼ね備えた、とても魅力的な先生とっておりました。
ソフトボールや野球の豪快な一発も、とても懐かしいです。
ご冥福をお祈りいたします。

高崎健康福祉大学 健康福祉学部
永井 俊匡

反町先生は東大生化の先輩でした。僕を指導してくれていた鈴木さんと反町先生が懇意だったこともあり、非常に可愛がっていただきました。毎日研究室でふざけたり、私の実家に鈴木さんと同期の馬見塚君と一緒に遊びに来ていただいたこともありました。反町先生が改造された車体の低いスポーツカーで、東大竜岡門の右脇の狭い道を時速80kmで走って非常に怖かったことも覚えております。反町先生が臨床研に移られてからは、お会いすることも少なくなりましたが、臨床研セミナーに講師として呼んでいただいたこともありました。今年の2月に、学科の先輩である饗場先生から、反町先生の訃報をお聞きし、寝耳に水で腰が崩れる思いでした。先生の穏やかで屈託のない笑顔は今でも瞼の裏に焼きついています。未だに信じられない思いですが、どうか安らかにお眠りください。

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻
濡木理

反町先生には旧分生研において 1992 年から 2 年間お世話になりました。細胞培養からプラスミド作製など分子生物学の基礎をご教授いただいた思い出深い期間でした。大学院修了後も何度か実験のご相談に乗っていただき感謝しております。先生のご冥福をお祈りいたします。

小野薬品工業（株）
橋本 学爾

この度は思いがけないお知らせをいただきました。御逝去をいたみ御冥福をお祈り申しあげます。

北海道大学大学院医学研究院生化学分野医化学教室
畠山鎮次

2005 年～2007 年の 3 年間カルパインプロジェクトでお世話になりました。それまでご縁がない中飛び込んだ私を温かく受け入れご指導くださったことは感謝してもしきれません。カルパインとワインへの情熱を熱く語る姿と笑顔をあの頃のまま思い出します。

国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）
林 智佳子

大きな身体で頼りがいがある、とてもやさしくて、人懐っこくて、ワインが大好きな反町さん。私はお酒は強くはありませんが、楽しい飲み会は大好きです。反町さんの研究室で何回かおいしいワインをごちそうになりました。臨床研を卒業するとき、私の誕生年のワインをいただきました。私の思い出の反町さんはいまでも満面の笑顔です。

大阪大学蛋白質研究所
原田慶恵

大学卒業後はあまりお目にかかる機会がなく、近年は年賀状のやりとりのみになっていましたが、素晴らしいご活躍には折に触れ敬服していました。研究も大いに進展しているなか、早すぎる旅立ちは大変悲しく残念でなりません。ゆっくりお話しする機会がないままになってしまいましたのが心残りであります。心よりご冥福をお祈りいたします。

日本大学工学部生命応用化学科
春木 満

2年前、あるプロジェクトに関してご意見を伺いに反町先生をご訪問させていただきました。

初対面にも関わらず、非常に丁寧に私どもの質問に対応していただき、また、サイエンスのディスカッションをさせていただきました。

また、昨年、体調がすぐれない中、私たちのデータに関してのアドバイスもいただきました。

先生のテーマ、データに対する熱意が、すごく伝わってきたのを覚えております。

本当にありがとうございました。心よりご冥福をお祈り申し上げます。

日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所
判谷吉嗣

東大・理・生物化学科（生化）で反町さんの同期生だった私は、4年生の卒業研究時、反町さんの向かいの研究室におりました。反町さんは着実に自分の研究を進めるだけでなく、生化の五月祭の企画のまとめ役を快く引き受け、また毎日のように失敗を繰り返す私たちを大きな声と笑顔で励ましてくれました。学部での生活を共にしたのはわずか2年ほどですが、将来が見通せない中で研究漬けで過ごした濃密な日々を反町さんと共有できたことは、大変貴重であったと今になって思います。

故人のご冥福をお祈りするとともに、反町さんが全精力を傾けて取り組まれたカルパイン研究の流れがさらに発展することを祈念いたします。

星薬科大学薬学部薬学科 生化学研究室
東 伸昭

反町さんの突然の訃報に驚き、また、非常に残念な気持ちで一杯です。私は Cdk5 活性化サブユニット p35 がカルパインによって限定分解されることから、反町さんと共同研究をさせていただきました。反町さんに使わせてもらったカルパイン関連の発現プラスミド、そして、助言により、p35 のカルパインによる限定分解が p35 のリン酸化に依存して制御されるという結果を発表できました。その由縁もあって、首都大学東京の連携客員教員にも 5 年間なっただけでした。残念ながら、実際に研究指導していただく大学院生はいませんが、定期的に連絡を取らせていただき、反町さんとカルパインを身近に感じることができました。P35 の p25 へのカルパインによる限定分解は Cdk5 を異常活性化し、神経細胞死を引き起こす悪玉役になっています。会うたびにカルパインは良い役割もしていないですかね？と気にしていました。最近、p25 への限定分解はシナプス活動の制御に必要という良い役割も報告されています。カルパインが正義の味方であることが明らかになる日を楽しみに、安らかにやすみください。

首都大学東京 生命科学専攻 神経分子機能研究室
久永眞市

反町先生を偲んで。

このたび、反町洋之先生の訃報に接して大変驚いております。反町先生におかれては、僕が LIS1 とカルパインの研究を進める過程で大変お世話になりました。また、その後も共同研究を進めていましたが、僕は反町先生のお体の具合が悪いことは全く知らず、周囲に知らせないように気を使われたのだらうと思います。反町先生は研究者として優れているだけではなく、大変な人格者で研究に行き詰まった時も、やさしく励ましていただき前へ進む勇気をいただきました。反町先生が亡くなられたことは研究の分野での大きな喪失であり、大変残念でなりません。だからこそこれからは自分たちが反町先生の遺志を受け継ぎ、研究の発展に努めなければならないと思いを強くしているところです。故人のご冥福を心からお祈り申し上げます。

大阪市立大学・大学院医学研究科
細胞機能制御学
広常 眞治

反町洋之君、

大変ご無沙汰しています。

直接お会いすることが出来ないので、手紙を書きます。君に手紙を書くのは随分久しぶりですね。考えてみると、僕たちが一緒に栄光学園に通ったのはもう40年も前のことなんですね。三つ子の魂百までと言いますが、たくさんの方々がよく知っている君の原形がもうあの頃あったように思うので、少し思い出話をさせて下さい。

僕たちが最初に出会ったのは、栄光学園（中学）入学後間もない頃、帰りの東海道線の上り列車のデッキだったと思います。どういうわけか、あの時の君の様子を今でもはっきり覚えています。真新しい制服に帽子を目深にかぶって、ちょっと寸足らずで、君はどこから見てもまさに一年生でしたね。僕もきつと似たようなものだったのでしょうか。君はチラチラこっちを見ながら目が“こいつも一年生だな”って言っていましたよ。お互いシャイなのでコクッと会釈しただけでしたが（君はいつものはにかみ笑顔で）。そのうち君は文庫本を取り出して読んでいました。僕も本好きだったので、次の日から本を持って通うようになりました。後で筒井康隆にハマったのも確か君の影響でした。対照的に、行きに一緒になったのは6年間一度もありませんでしたね。君はきちんと歩いていける時間に登校していたようですが、僕の方はいつも遅刻ギリギリで大船駅から走っていましたから。僕のギリギリ癖はなかなか治らず、君は多分知らなかったでしょうが、君の結婚式にもギリギリで、走って行くところをお父様に見つかってしまい、「遅刻だぞ、相変わらずだな」などと言われてしまったこともありました。

さて、一年生の時は僕の方が背が高かったのに、君はその性格そのままに、まっすぐぐんぐん背が伸びて、身体検査の度に身長伸び比べで負け続けているうちにとうとう抜かれてしまいました。あれは君がバスケット部だったからでしょうか？バスケ部といえ、毎学期あったクラス対抗スポーツ大会の時、君はバスケットボールの審判でしたね。君はとても校正なジャッジで、ホイッスルを片手に張り切ってやっていたのを覚えています。そういえば、いやというほどハッキングを取られました。今 MBA とか March Madness とか見ていると微妙なところがありますよね。え、文句じゃないですよ。ただ、文句を言ったりしたら君がどうリアクションするかつい想像してしまいました。思えば、栄光学園は体にいいことを色々やらせてくれましたね。中間体操！毎日中休みに真冬でも上半身裸で体操するのは辛かったですが、風邪に対する抵抗力は強まったでしょうね。あれ、隣の山のS女学院から見られていたって知っていますか？（シスターに見つからないようにこっそりと見るそうです。）

先生方に申し訳ないので、少し授業の話もしましょう。お互い理系、特に化学の授業は好きでしたね。後で君は家でさらに数レベル上のことをやっていたということを知りましたが。僕は文系はどちらかという好みではなかったのですが、君はどの授業もき

ちんとノートを取ってましたね。君のノートはとてもきれいで、わかりやすかったのを覚えてます。一度、倫理社会のノートを試験の前に貸してくれたことがありました。どういうわけか僕の方が良い点をもらってしまって、君が憤慨したことがありました。(怒った顔はしていませんでしたが) あれは、君のノートがよく出来ていたのと、あの頃僕は抜群の短期記憶力があつたからですよ。

学校の授業や課外活動で色々楽しいことがありましたが、休みの日にお互いの家に遊びに行ったのが何と言っても抜群に楽しかったですね。(僕たちは皆長距離通学で、近所にはいなかったの) 君の家に行った時、君が家で大学の教養課程の化学の実習でやるようなことをして遊んでいることを知りました。目から鱗が落ちるとはまさにこのことで、僕は想像もしなかったことでした。早速、薬品をお裾分けしてもらって、僕も家で化学の実習遊びの真似事を始めました。代わりに僕が君に提供したのはモデルガンとかプラモデルといった俗な趣味でしたが、君は結構はまってしまいましたよね。ご両親はさぞ迷惑だったろうと申し訳なく思っています。

そうこうしているうちに僕たちの学年も進み、とうとう大学受験がやってきました。君は第一志望校に難なく合格しましたが、僕は希望と現実の乖離を解消すべく浪人することになりました。僕が仲良くしていた友達も君を含めて皆、赤門のある学校に入ってしまったので、僕の周りで浪人したのは僕の他にあまりいなかったように思います。当時はあまり意識していませんでしたが、毎日友達に会うのが当たり前の生活から、孤独で先行きの保証のないストレスを抱える生活に変わりました。実はその後も随分長い間、当時の夢を見ることがあつたんですよ。さて、そんな僕がS予備校に通いだして程ない頃、家に分厚い包みが郵便で届きました。それが君からの手紙第1号でした。包みの中には4種類ほどのラベルのない薬品と分厚い手紙の束が入っていました。手紙の中には未知検体の同定をする実験手順が丁寧に説明してありました。浪人中の友達を励ますために、化学実習をさせる(指導する)友達って世界中探しても反町君ぐらいでしょうね。でも僕にとってこれほど有り難いチャレンジはありませんでした。実験のことからはじまって、もう何を書いたか忘れてしまいましたが、随分長い手紙のやり取りをしましたね。同定出来た未知検体が何だったかはもう忘れてしまいましたが、最後に降参したのがストロンチウムだったのはよく覚えています。火にかざして色を見なきゃいけないんですよ。当時は今時の若い人のような多彩なコミュニケーション手段はありませんでしたし、電話をする習慣もなかったの、君の長〜い手紙とあの化学実験が僕の命綱でした。お陰様で、浪人生活を乗り切って、翌年無事志望校に入学することができました。本当に感謝しています。ちなみに、大学の化学の実習はおかげで、お茶の子さいさいでしたよ。

さて、君の方はといえば、理科2類でも成績優秀で、医学部に進学できたはずですが、いつ聞いても「いやー」でしたね。僕の方は家庭の事情もあつて、医者になるのは規定事項だったので、できれば君を引き入れたかったんですが、やっぱり研究がしたかった

んですよね。結局は僕の方が、反町君を見習って、ハーバード留学を機会に研究者になっ
てしまいました。(居座っただけですよ)

研究方面に進んでからの合言葉は「どうしてる?」「試験管振ってる。」でしたね。研究
領域が違うので学会で会うこともないし、僕も日本にはたまにトンボ帰りするだけなの
で、随分お会いしてないうちに、その機会を逸してしまいました。

反町君、僕は君ほど誠実で、優しく、思いやりに溢れて、研究に強い情熱を持っている
人を他に知りません。僕が今日あるのは多分に君と交友を持てた幸運によると思ってい
ます。お話しする機会はありませんでしたが、君の病気の新しい治療法を研究していま
す。君に出来なかった恩返しの代わりに、進行を遅らせるだけではなく、一人でも多く
の患者さんを治癒することを目指して頑張ります。

反町君、君とはいつまでも僕たちの楽しい思い出と心の中で一緒です。

福村 大

栄光学園 30 期

Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School

反町さんのご逝去を悼む

カルパイン研究の分野を切り開いた鈴木紘一先生の後を引き継いだ反町さん
が、54 歳の若さで亡くなられるとはとても信じられない事でした。国内外のカルパイ
ン研究のリーダーとして、その酵素学、作用メカニズム、生理機能などの研究で素晴ら
しい業績を上げ、最近では、ブレークスルー的な発見で新しい局面を拓きつつあった時
に、研究を断念しなければならなくなったことは、反町さんにとって、いかに心残りで
あったかは、察するに余りあることでした。

反町さんは気配りの人でした。毎年の研究成果発表会の時には、控えめなイン
トロダクションに始まって、内容の濃い独創的な結果を発表して、審査委員や聴衆に強
い感銘を与えるのが常でした。亡くなられる直前まで、研究室に現れてコンピューター
のキイを叩いていたという話を聞きました。カルパインの研究に一途に打ち込んでいた
反町さんの姿が思い浮んできます。

反町さんの推し進めて来たカルパインの研究は、これから反町さんの育てて来
られた若い研究者に引き継がれて、大きく飛躍的に発展して行くことを信じています。

ここに、謹んで哀悼の意を示すとともに、ご冥福をお祈り申し上げます。

藤井義明

大学院生としてご指導いただいた日から、いつの日か、一研究者として、反町先生と一緒に研究させていただきたいと願っていました。それが叶わない状況になってしまったのがとても残念です。これからは、反町先生に面白いと言っていただけの様な研究をすることを目指して、若い世代の研究者と一緒に研究していこうと思っています。ご冥福をお祈り申し上げます。

東北大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻分子細胞科学講座 分子酵素学研究室
准教授

二井 勇人

反町先生のご冥福をお祈りいたします。

先生と最初にお目にかかったのは、おそらく 1990 年代中頃に学士会館分館で開催された故金澤一郎先生（東大神経内科教授）が研究代表の厚生省精神・神経疾患研究の班会議だったように記憶しております。先生は、故鈴木紘一先生の代理でカルパインの研究について話されるために出席されていました。細りと長身の穏やかなお姿がとても印象的でした。その後、直接お話しすることはなかったように思いますが、東京都臨床医学総合研究所でご活躍されているご様子は常々拝見し、当時にお会いしたお姿が脳裏に浮かんできました。また、先生には、私が現在勤務する東京理科大の客員教授として、長らく本学の学生・院生の教育研究にご尽力をいただきました。感謝をお伝えすることができず無念です。先生のご冥福をお祈りいたします。

東京理科大学理工学部応用生物科学科

古市貞一

学生時代、いつも周囲に気を配っていたこと、ワインがお好きだったこと、思い出します。早すぎる死に驚いていますが、人の人生は長さではかれるものではなく、そのあり方なのであろうと思います。

心からご冥福をお祈りいたします。

公益財団法人 神戸医療産業都市推進機構

先端医療研究センター 神経変性疾患研究部長

星 美奈子

強く、賢く、優しくあった貴兄は、これまでも、これからも、私にとっての規範です。

19歳に駒場で出会って以来、私の一番の友人でいてくれたことに感謝します。

前田達哉

反町先生とは calpain-7 の研究で共同研究させていただいておりました。

つい、この間も東京薬科大学の助教に異動したことを報告したばかりでした。

タンパク質分解班会議で当時学生であった私と一緒に大浴場に行き、研究の話をしていただいたことは、昨日のことのようです。

その時の calpain の話をしている生き生きとされた姿が目に残ります。

突然の悲報に接し、悲しみにたえません。心よりご冥福をお祈り申し上げます。

東京薬科大学 生命科学部

前本佑樹

反町洋之先生へ

先生は天国へ旅立たれて既に幾日か経ちますが、鈴木絃一先生や Darrel Goll 先生、そして私のカルpain研究の師であった村地孝先生にはもうお会いになられましたでしょうか。私の方が10歳ほど年上でしたが、学会や班会議等ではいつも貴重な質問や助言をして頂き、また、企画されたシンポジウムに度々招いて頂くなど、とても勇気づけられて来ました。アルコールが入るとさらに楽しく話が弾んだことを思い出します。この度まさか、先生ご自身の追悼記念講演会が開かれ、私が招かれることになるろうとは思ってもありませんでした。鈴木先生が現役を引退された後は、日本のカルpain研究を一身に背負って来られましたね。先生はカルpain研究の新興外国勢との競争に晒されながらも、独自の観点から本道を突き進まれました。愉快的先生もさぞかし気苦労も多かったと思いますし、悔しい思いをされたこともありましたね。その点、私は脇道を進んで気が楽でした。どうぞ天上界ではゆっくりとワインでも飲みながらお休みください。そしてときどき下界を眺めるといいアイデアが浮かぶかも知れません。そのときは是非とも残された若手研究者に靈感で伝えてやって下さい。再び日本でカルpain研究に大きな花が咲き開くことになればと祈念しています。

名古屋大学

牧正敏

去年の秋に、生化の同級生数名で飲みに行こうというやり取りをしました。私からの誘いに対して、反町から下記の返事が来ました。

「本当にもの凄く皆さんにお会いしたいのですが、実は、ちょっと前から体調を崩してしまって、情けないことにまだお酒を飲むことが難しい状態なのです。。。徐々に良くなっていますので、もう少ししたら飲めると思うのですが。。。そのようなわけで、次回には必ず参加させてください！また、大変勝手なことで申し訳ないのですが、ひょっとしたら少しなら飲めるようになるかもしれませんので、今回も日が決まりましたら教えて頂けたらとても嬉しいです（ちょっと難しい感じではあるのです。。。）」

何となく心に引っ掛かるものがあったのですが、反町が参加できないのなら無理に集まる必要もないと思い、また春にでも日程調整をしようと考えこの会を開催することができませんでした。

この時のメールでのやり取りが最後となるのは、思いもよりませんでした。

反町は、私が過去に交流させて頂いた友人の中でも、もっとも心の優しい人物でした。おそらく今後もそれは変わらないと思います。

早く亡くなり過ぎです。今でもやっぱり辛いです。

旭化成ファーマ（株）

松崎 修

2008年、東京理科大学学部3年時に、私は反町先生とカルパインに出会いました。この時に、私はカルパインへ興味を持ち、また、大学とは異なる環境で研究にチャレンジしたいという想いを抱きました。反町先生は、そんな私の想いを受け止めていただき、私にカルパイン PT で研究する機会を与えてくださいました。学部4年から修士2年までの3年間、反町先生のご指導の下、私はカルパイン研究を通じてかけがえのない経験をさせていただきました。

研究以外にも、ワイン好きな反町先生からワインをいただいたことがきっかけで、私はワインの美味しさを知りました。私が大学卒業後に、ワイン会社に就職できたことも、反町先生と出会ったからこそ、ワインとの縁が生まれた結果であると、今でも思っています。

今の私があるのは、反町先生のおかげです。本当にありがとうございました。心よりご冥福をお祈り申し上げます。

キリン(株)ワイン技術研究所商品開発グループ 兼 メルシャン(株)藤沢工場技術課
松下剛

この度は反町さんを偲ぶ会のご連絡を下さり、どうもありがとうございました。渡米して以来反町さんとお会いする機会がなく、療養されていたことも存じませんでしたので、今年一月に訃報に接した時はあまりに突然で非常にショックでした。私の知る反町さんは病気とは無縁でしたし(二日酔い以外で体調が悪いところを見たことがありません)、研究所のホームページの写真も白髪が増えた以外は昔のままの人懐っこい表情で健康そのものに見えましたので、狐につままれたような気がしました。

研究テーマが異なっていたので直接反町さんの指導を受けたことはありませんが、同じ研究室で反町さんから学ばせてもらったことは少なくありません。優秀な研究者ということよりも、私は反町さんの人間臭いところが結構好きでした。もう一度会って、飲みながら色々と話したかったです。人生を終えるには早過ぎます。本当に残念です。

追悼記年シンポジウムおよび偲ぶ会は、鈴木先生が興し、反町さんが発展させたカルパイン研究を小野さん、秦君をはじめとする次世代がさらに発展させようと新たに決意する機会となることと思います。また、それが反町さんへの最大の供養となることでしょう。

残念ながら、米国在住のため皆さんと一緒に反町さんを偲ぶことはかないませんが、同日は私も一人こちらで反町さんを偲びたいと思います。

Monell Chemical Senses Center

松本一朗

約30年前に学部学生としてお会いして、お会いした頃に反町さんの考え方に触れた衝撃は今でも忘れられません。反町さんに教えていただいたことは「常識にとらわれず、1地球人として何が正しいのかを考え、その正しいと思うことを行動にうつす」ということかと思っています。当たり前に感じられるかもしれませんが、今まで当たり前と思っていたことを常に疑い、時として単に周りに流されてしまいがちで全体主義を容認することを固く戒めていたと思います。今まで、反町さんのこの考え方をいつも反芻し自分の考え方や行動がそれに反していないかを確認しつつ生きてきたように思います。学生時代が終わってからは、お会いした回数はそれほど多くなかったかと思いますが、各回、とても印象に残っています。お会いした時には、いつも美味しいものを飲食させていただき、また楽しい時間を過ごさせていただきました。本当に感謝しております。どうもありがとうございました。同時に、私の心の中では、いつもでも反町さんは生き続け、これからも時々会話させていただくのではないかと思います。不束者ですが、どうぞよろしく願います。

京都大学化学研究所

馬見塚 拓

反町洋之先生を偲んで

反町先生がご逝去されたとの知らせに驚き言葉を失いました。反町先生は日本のプロテオリシス研究の中心にいて、カルパインの研究からいつも刺激を受けていました。多くの生理機能を持つカルパインの生体機能に正面から取り組み、さらに個々のカルパインを超えてファミリー分子全てを見据えた包括的な視点で研究するアプローチは迫力満点でした。カルパインから見た生命観を、反町先生から直接聞けなくなったのは残念でなりません。ご自身のカルパイン研究のスタイルのごとく、研究分野全体を見渡してプロテオリシスコミュニティーへの献身的な貢献をされている姿には頭が下がりました。大変な仕事をいくつもされているにも関わらず、反町先生はいつも笑顔を絶やさず先生と話をするといつも爽やかな気持ちになりました。同じ分野の研究者として先生の研究に向かう姿勢は目標となっています。反町先生に心から感謝の気持ちを申し上げるとともに、謹んでご冥福をお祈りいたします。

東京大学大学院薬学系研究科
三浦正幸

笑顔の反町さんに感謝

反町洋之さんとはタンパク質分解のコミュニティーで20年近くのおつきあいがありましたが、特に親しくさせていただくようになったのは2004年4月からでした。東京都臨床医学総合研究所の新しい室長として反町さんと私の2名が採用されたのです。しかし、新室長といっても格違いで、反町さんはすでにご自身のグループを率いておられ、臨床研での研究経験もお持ちでした。一方の私は文字通り独立したばかりで、臨床研は右も左もわからない状況でした。同期採用といいつつも、反町さんはもっとも身近な先輩であり、私に多くのことを常に丁寧にやさしく教えてくれました。そしてどういうわけか、教えてもらう側の私よりも、教える側の反町さんの方がずっと丁寧なのです。ご自身の研究や研究室の整備にお忙しいはずなのですが、それを全く感じさせない気さくさに甘えてしまいました。また、私が担がれて文科省の特定領域研究の代表となってしまったときにも、反町さんは豊富なご経験を基にして多方面から助けてくださいました。私にはあまりに重かった荷が、ずいぶん軽くなったと思います。この他、反町さんにお世話になったことをあげればきりがありません。そのようなことを書くと、「全然そんなことないですよー」といつものように笑顔で謙遜される様子が目に浮かびます。一方で、研究に対しては厳密で妥協しない姿勢を貫いていました。扱いにくい酵素であるカルパインの性質を、精緻で論理的な実験で着々と解き明かしていく様子をそばで拝見していました。いち早くご自身で質量分析器も導入され、生化学、マウス遺伝学、ヒト

疾患と、研究の構えの広さを感じました。まさに世界のカルパイン研究のリーダーとして、残されている多くの課題を解き明かしているまだ最中だったと思います。本物の学者である反町さんを失うことは、カルパインやタンパク質分解の分野はもちろんのこと、より広範囲の生命科学の研究にとって大きな喪失です。そして私にとっても、あの笑顔の反町さんから学び、反町さんと楽しく議論する機会がもうないというのは想像できない喪失です。反町さんに感謝を申し上げるとともに、ご冥福を心よりお祈り申し上げます。

東京大学
水島昇

反町さん。たくさん話して、たくさん笑って、たくさん飲みましたね。そして、私を戦友だと言ってくださいました。とても嬉しかったです。楽しくて、懐かしくて、温かい思い出です。その気遣い、優しさ、厳しさ、男らしさを決して忘れません。本当にお世話になりました。ありがとうございました。

嶺田志乃

血管系疾患を研究する途上でカルパインが同疾患に関わる可能性を見出し、2011年の秋に初めて反町研を尋ねました。カルパイン研究の大家ということで、上北沢駅からの道すがら何をお話しすれば良いか考えながら緊張して歩いたことが思い出されます。その際に共同研究を快諾いただきましたが、リソースの提供はもちろんのこと、カルパインの酵素学的な特性などについて丁寧に教えていただき、その知識の膨大さに驚いたことを記憶しています。その後のディスカッションでも、反町先生は私にとって基本的にフランクで優しい印象でしたが、カルパインの命名法だけはとても厳格で、スライドや論文を何度も直していただいたことが思い出されます。共同研究の成果も無事出版され、次の研究提案についてディスカッションしていただこうと思っていた矢先の訃報で、ただ愕然としています。反町先生から生前賜ったご指導に深謝するとともに、心よりご冥福をお祈り申し上げます。

昭和大学医学部生化学教室
宮崎 拓郎

反町洋之先生には生化学会の関連で大変お世話になりました。2010年12月に日本分子生物学会と日本生化学会の合同大会 BMB2010 が神戸で開催された際に、反町先生は生化学会の側で田中啓二先生を、私は分生の側で谷口維紹先生をお手伝いさせていただき、一緒に仕事をしたのが反町先生とゆっくりお付き合いした最初だったと思います。当時は生化学会と分生の関係がなかなか難しかったのですが、現場ではともに楽しく運営に関わらせていただきました。その縁で2013年9月に横浜で開催された第86回日本生化学会大会のお世話をするようになった時には、当時私の教室の准教授と一緒に仕事をしていた宮澤恵二先生と相談し、反町先生に大会の幹事補佐としてご協力をお願いしました。この大会は予算が厳しく、反町先生にはいろいろと大変お世話になりました。反町先生は本当に素晴らしい方でした。心より感謝しております。

2010年に一緒に学会の仕事をするまでは、カルパイン研究の第一人者ということで反町先生のお名前は知っていましたが、お会いする機会はありませんでした。研究分野としては、私は奥様の典子先生の方が近く、典子先生とは会合などでお会いしておりました。2010年以降は、私が学生時代に講義を聴いた鈴木紘一先生のお弟子さんということで勝手に親近感を持ってしまい、反町先生に生化学会の雑誌 JB の review を書いていただいたり、JB の表紙を作成していただいたりして楽しく付きあわせていただきました。2013年9月号 (Vol. 154, Issue 3) の JB の表紙は反町先生に作成していただいたものです。

反町洋之先生の訃報を聞き、たいへん残念な思いでいっぱいです。ご冥福をお祈りいたします。

東京大学大学院医学系研究科
宮園 浩平

反町洋之さんと過ごした日々

反町さんの、明るく優しく繊細な心と秀でた頭脳を宿す、抜きん出て頑健に見えた身体が、大変な努力にも関わらず失われてしまった事に深い悲しみと無念を覚え、大変ショックです。彼と最初とともに日々を過ごしたのは、東京大学の3年生になって同じ理学部・生物化学科に進学した時でした。ほぼ毎日一緒に授業を受けそれぞれの研究室で実験をし、以来大切な友人として、またタンパク質生化学者の同類として3分の1世紀以上を近くで過ごしてきました。同級生ゆえの気軽さと親しみと尊敬を込めてずっとお互いを君付けで呼んできたので、ここでもそう呼ぶことにします。大学卒業後も生物化学専攻の大学院生として同じ場所で時間を過ごし、修士終了後に当時駒込にあった東京都臨床研の異なる研究部門で働きながら博士号を取得するなど、研究者としてのスタートを近い場所で近い境遇で一緒に過ごしたことは私にとって大切な思い出です。何の拍子

だったか一緒に富士山に行ったりした事もありました。共に切磋琢磨しながら、時にはお酒を酌み交わしながらまじめな研究の話から青年の良くする馬鹿話まで、いつも明るく楽しい時間を持ってました。時にはトイレに並んで用を足すこともあり、その最中に彼の手が後ろから伸びてきて私のお尻を叩くなんてこともありました。優秀でユーモラスで勤勉な同僚でした。近年は東西に離れていて会う機会が多くはありませんでしたが、学会後に飲みに行ったり、同じ科研費研究グループの密度の高くてしんどい班会議の最中、お互いの気安さに心なごむ時間を過ごしたこともありました。それぞれ愛娘一人をかかえて研究に邁進する同士としての連帯を感じたものです。何年か前、学会参加のためにスイス・ジュネーヴの空港で、別の便で別の学会に参加する反町さんと偶然にばったり会ったのも懐かしい思い出です。昨年人づてに彼の闘病の事を聞き、心配はしながらもどこか彼の強さ・明るさに理不尽に縋って良い方向に向かうと能天気信じていたため、お別れの気持ちを秘して彼とまみえる機会を持てなかったのが悔やまれます。ただ、大きな体にそぐわず意外とシャイで普段から愚痴や不平を言うことの少ない反町くんが、病気について自分からは多く語らなかったのも理解できるような気がします。彼の早すぎる死去により、傑出した生命科学者を、大事な友人を失うことになりました。謹んで反町くんのご冥福を心よりお祈りします。

京都大学・大学院生命科学研究科・シグナル伝達学分野
宮田 愛彦

故・反町洋之先生を偲ぶ

病状を案じつつ、今年の年始も例年通り反町洋之先生に謹賀新年の挨拶メールを送った。いつもはすぐに返信があり、そこから雑談メールを何回か交わすのに、この時は一切返信がなかった。嫌な予感がした。ご夫人の反町典子先生から訃報の連絡が届いたのは、そのわずか数日後のことだった…。

反町先生と私は同じ年に東京大学に入学し、学部こそ異なるとはいえ共に生命科学を志ざし、まさに同じ時代を過ごした同期生である。加えて、ご夫人の反町典子先生は私の同郷の高校の後輩である。酒をよく飲む点でも同じ。このことから、反町ご夫妻とはことさら話がよく合い、研究以外でも色々とお世話になった。医学研（当時臨床研）のプロジェクトリーダーの着任は、私よりも反町先生の方が1年早い。着任当時、新しい環境で勝手がわからず右往左往している私を、先輩の反町先生が常に支えてくださった。反町先生はタンパク質分解酵素（カルパイン）、私は脂質分解酵素（ホスホリパーゼ）を専門としてきた。扱う物質は異なるとはいえ、「基質を限定分解して生理活性物質を生み出す酵素」を研究対象としている点では共通していた。酵素の生化学から始まり、遺伝子改変マウスへと展開するアプローチも同じであった。だからこそ、急速に発展する生命科学の激流の中で、研究上の悩みや辛さ、そして喜びを理解し合えた。医学研で

の研鑽を通じて、お互いに関連領域を牽引する立場に成長したと思う。とはいえ、私は反町先生を常に頼っていた。分野長として、面倒な事務仕事を嫌な顔ひとつせず引き受けてくださった。反町先生といえば笑顔の姿しか思い出せない。誰もが惹きつけられる温かみがあった。医学研のアンケート調査で「理想の上司 No. 1」に選ばれたのも納得できる。反町先生がすぐ隣のラボにいることが安心であった。まさに兄のような存在であった。日常的に不健康の塊である私に対し、筋肉隆々の反町先生は病気とは無縁の存在に思われた。健康面の共通点といえば、二人とも腰痛を抱えていたことぐらいであろうか。その反町先生が、まさか私よりも先に命を蝕む病魔に襲われるとは。強靱な精神力と体力で度重なる手術にも耐え、弱音を吐かず、笑顔を決やさなかった。一時的に分野長に復帰されたと聞いていた。ご家族やラボの方々の献身的な支えがどれほど反町先生の力になったことであろう。「元気になったらまた一緒に飲みましょう」がお互いの合言葉であった。いつかその日が来ることを願っていた。しかし、それは叶わなかった。最愛のご家族、まだこれからの研究を残して逝くことはどんなに無念であったことか。同年齢であるがゆえに尚更、胸が締め付けられる想いである。

先日、ほぼ1年ぶりに医学研を訪ねた。長年通い続けたN棟2階にふと足が向いた。カルパインPTと(旧)脂質代謝PTが隣り合わせて並ぶ空間、そこは反町先生と頻りに談笑した場所である。懐かしい思い出が頭の中を駆け巡った。しかし、もうそこに反町先生はいない。

反町洋之先生のご冥福を心からお祈り申し上げます。

平成30年6月15日

東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター 教授

(旧脂質代謝プロジェクト プロジェクトリーダー)

村上 誠

反町先生とは20余年、タンパク質分解研究領域および臨床研のつながりで親しく交流させていただきました。私のような若輩者に対しても常に謙虚で気さくで、研究のことから世間話まで気兼ねなくお話をいただき、兄のように慕っておりました。大学院講義にも何度も来ていただき、「カルパインという名前を覚えて帰ってもらえれば、後は寝てもらっても構いません」という、反町先生らしいユーモア溢れる言葉が思い出されます。未だに、明朗快活に微笑みかけてくる反町先生のお顔がふと臉に浮かんでくれば、無念さと悲しさで一杯になります。反町先生の研究への情熱を少しでも引き継げるよう務めるとともに、心からご冥福をお祈りいたします。

東京大学薬学系研究科・教授

村田 茂穂

新研究所ができたばかりの頃、先生がプロジェクトリーダーとしてカルパイン研究の発表をされた時の鮮烈な印象を忘れることができません。

私にはとても難しい内容でしたが、にこやかな語り口のなかに、燃えるような情熱を秘めたプレゼンテーションだったからです。

以来、先生とはお酒の席などで楽しい会話をする機会が幾度となくありましたが、とても温かいお人柄に魅せられていました。

どうか先生の教えを受けた若手の研究者の皆さんが、先生の研究への夢を叶えていただくようお願いばかりです。

元医学研事務局長

八木憲彦

いまだに、反町先生にもうお会い出来ない事が現実でないような気がします。研究だけでなく、ワインにソフトボールに、明るく楽しく日々忙しく過ごしていらしたお姿が懐かしく思い出されます。数々のご功労に敬意を表しますとともに、心からご冥福をお祈りいたします。

中外製薬株式会社

矢野淳子

反町洋之先生の訃報に際しとても残念でなりません。

いつも声をかけてくださり、時にはワインパーティーに招いてくださり、私を励ましてくれたこと、大変感謝しています。研究者の先輩として人生の先輩として、まだまだ導いていただきたかったです。

心よりご冥福をお祈りいたします。

徳島大学大学院社会産業理工学研究部

山本圭

反町先生の訃報に接し大変心が痛みます。鈴木絃一先生の後を継いで、カルパイン研究に全身全霊をささげておられた反町先生のお姿が目には浮かびます。ご冥福をお祈りいたします。

横沢 英良

反町先生のご冥福を心よりお祈りいたします。

1月中旬、思いもよらぬ訃報に接し、ただ茫然とするばかりでした。遠方のため、病気を患っておられたことさえ気が付かず、反町さんからの季節の挨拶状が遅れているのは、いつものようにお仕事がお忙しいのだろうと思っておりました。奥様の典子さんと娘さんを残して逝ってしまうのは、どれほど無念だったことかと思うと言葉もでません。

医学総合研究所が発足の際、いつの日かまたお仕事と一緒にできること、趣味の野球をして、大好きなビールをまた一緒に飲める日のことを想い、楽しく語らせて頂きました。しかし、私にとってその日が直接お話しする最後の機会になるとは、到底想像することができず、近年ご訪問できなかつたことを、本当に悔やんでおります。

反町さんには、基礎研究についてたくさんのことを教えていただきました。そのおかげで、今もなお、創薬研究に従事しています。反町さんとの出会いが無ければ、私は研究職以外の道を歩んでいたと思います。反町さんをはじめ、反町さんの最初の弟子になるきっかけを作ってくださった故 鈴木先生に対してさえも、私は与えられるばかりで、何も恩返しすることができませんでした。せめて、残された教え子の皆さんと力を合わせて、少しでも反町さんの遺志を継ぐことができればと思います。

反町さん、親身なご指導と、たくさん温かい思い出をありがとうございました。辛いけど、反町さんに最後のお別れを、全ての教え子と共に言わなければなりません。

さようなら、そして、どうか安らかに眠り下さい。

小野薬品工業株式会社 創薬研究部 第三研究室 室長
吉澤敏男

私はオートファジーの研究者なので分解繋がりで以前から反町先生は存じ上げていましたが、JST-CRESTで一緒になったときからとても仲良くなりました。いつも明るく人懐こくて、気持ちの細やかな他人に思いやりのある人でした。たびたび酒を飲み、たわ

いの無い話で盛り上がりました。ソリさんと一緒だと心の底から笑えました。一度、東大の一條先生と反町先生を大阪にお呼びし講演して頂いて、夜は3人でホルモン焼きを食べに行きました。大いに食べて大いに飲んで大いにしゃべり、すっかり飲みすぎましたがあんな楽しかった夜は後にも先にもありません。あまりに早いお別れが今でも信じられません。向こうから豪快なソリさんの笑い声が聞こえてきそうです。どうか安らかに、そして空の上から日々右往左往している私たちを見守って下さい。私がそちらにいったら、また飲もう、ソリさん。

大阪大学大学院 医学系研究科 遺伝学／生命機能研究科 細胞内膜動態研究室
吉森保

反町さんの訃報を受け取った時には、大きなショックを感じ、心が真っ白になりました。あまりにも早い反町さんとの別れに、今でも言葉がありません。

反町さんご夫妻とは、私が東京都臨床研に在籍していた30年ほど前からの知り合いです。反町さんは強く信頼できる後輩として、また会う度に心が洗われる思いを抱かせてくれる大好きな人物として、私の心の中に居続けていましたし、これからも居続けてくれると思います。大変優しい心を持つ反町さんですが、一方では自らの筋を決して曲げない大変気骨のある人物であると、いつも感じていました。

私は1992年に臨床研を去ったのですが、その日が反町さんも臨床研を去る日（また戻られましたが）と同じであり、二人で一緒に研究所の中を挨拶してまわったことが思い出されます。その時には、反町さんが本当に多くの人達に大変愛されていると強く感じました。反町さんともう会うことがないのだと考えると大変残念で寂しい思いしかありませんが、あんなに仲の良い奥さんや凄くかわいがっておられたお子さんと別れることになってしまった反町さん自身が一番無念な思いを抱いているのだらうと思います。ただただ残念で、どうしてなんだという思いも湧いてきますが、いまはただご冥福を祈らせていただき、追悼のメッセージとさせていただきます。

京都大学薬学研究科ナノバイオ医薬創成科学講座
米原 伸

反町さんと初めてお会いしたのは、東京都の野球大会だったと記憶しています。優しい表情とは対照的な豪快なバッティングがとても印象に残っています。私が臨床研を退職

する時には、奥様と一緒に送別会を開いてくださり、生まれ年のブランデーで送別してくれました。最後にお会いしたのは、野本明男先生の追悼シンポジウムで私が医学研へ出向いた時でした。わざわざお部屋へ呼んでくださり、コーヒーを飲みながらシンポジウム開始ぎりぎりまでお話ししましたね。いつも優しかった笑顔が臉に焼き付いています。本当にありがとうございました。またいつかどこかで飲みましょう！ 合掌

千葉大学真菌医学研究センター感染免疫分野
米山光俊

長きにわたり、東京理科大学，理工学研究科，応用生物科学専攻の連携教員として学生の指導にご協力下さり，大変ありがとうございました。これまで直接指導を賜った学生共々，応用生物科学科教員として，深く感謝いたします。

ご冥福をお祈りいたします。

東京理科大学 理工学部応用生物科学科
和田直之

Dearest Hiro (and allow me one last time to say) or dearest Hiro-Sensei,

How strange it is to think that from where you are, you will not be able to read these lines. But we know, you don't need to read them to know how we feel, how much we miss you and your stimulating laughs and cheerful spirits. There are people one meets, and one immediately feels or knows that something will happen, something creative and productive will come out of this new relationship. These close encounters are not that numerous but really precious. Fortunately, in our scientific milieu, these happen now and then. Ours belongs to this class. We met early 1995 (I don't remember the exact date, but this was my first ever visit to Tokyo) when, during one of these binational symposia gathering scientists and MDs from France and Japan interested in neuromuscular diseases. It was most probably during the first evening, prior to the diner where all lecturers were invited. I knew I wanted to meet you and was happy to see that you were part

of the crowd. My lab had just stumbled upon very hot and exciting data that overlapped with your research interests. I asked you whether we could both go outside, in the street as I wanted to discuss these matters with you personally, even before the meeting. We left the dining place, and once outside I told of the exciting and still unpublished preliminary results we just obtained: Calpain 3, a protease you and your mentor Koichi Suzuki had been studying for a number of years, had its “titre de noblesse”: it had an inherited disease associated to it. This protein, p94 as your lab referred to it, was far from being an obvious candidate and we failed to comprehend why and how it could cause this disease (to a large extent, this is still true today some twenty odds years later). But lack of calpain 3 was unambiguously demonstrated to be responsible for what was then called the Reunion type of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. Your reaction was stunning. I can’t remember what you said, but it probably was not far from your legendary “Oh really !!!”, said with a large smile and a great trace of excitement. This brief discussion was the seed of what would become a beautiful relationship, collaboration and friendship. You immediately called your mentor to inform him; like you, Koichi was thrilled to see a physiological function assigned to this until then elusive protein.

Our labs started to collaborate in full transparency. Your younger colleagues spent a few months in our lab in the suburbs of Paris. We had numerous exchanges, and the strongest imprints that remain with me today are not only your constantly positive attitude towards science, your extraordinary creativity, your scientific and eclectic inquisitive spirit, your integrity, but also the generous and joyful human being behind it all: the colleague whom I could fully trust, the honest person with whom I could freely discuss, the likeable cheerful friend whom I respected for his joie de vivre, his finesse in food and wine, his openness, his sense of humor and his irresistible smile and laughs.

Hiro, we may not have seen each other lately as often as in the past. While you delved deeply in the mysteries and beauties of the vast world of calpains, a field that will always remain associated to your name, I left the calpain world in 2000 and moved to other scientific horizons. It is not because I left the calpain field, that our friendship diminished. Geographical and occupational

distances can't erode these warm feelings. Despite these separations, we were never really far from each other's. We never stopped interacting. I knew I could contact you, write to you, consult you, or that if we would meet, it would be as if our paths never diverged. And vice versa.

But now you're no longer there. The lottery of sickness has taken you, way too early, away from your family and from all of us. The calpain world has lost one of its fathers, one of its pioneers. Your close colleagues and disciples will dearly miss you. So will I, who has lost a dear friend.

There are a few people who are like milestones in one's path, and you were one of them... Hiro, I know that the last thing you want is for us to sit and mourn. You'd rather see us continue to strive and fight for the values you cherished so much and end the day with a great smile and a glass of good Burgundy.

Your memory and smile are deeply imprinted in my brain and you will remain deep in my heart as the "mensch" (as we say in Yiddish) you were. Shalom Haver.

University of Lausanne
Jacques S. Beckmann

Tribute to a friend

I consider it my great honor and privilege to have known Dr. Hiroyuki Sorimachi. I will always fondly remember the warm welcome he extended to me when I attended my first calpain meeting. As a new comer to the field, I knew only a couple attendees at that meeting. Hiro had that natural ability to put you at ease in an instant with his broad shining smile; and you quickly realized you'd just made a new friend. Although neither of us were particularly adept at the others language, there was never any difficulty when it came to sharing our enthusiasm for new discoveries. Hiro taught us many new things about calpain over his remarkable career, but perhaps just as important, he showed us how to treat others as members of a greater family of explorers, each striving to

push back the veil of darkness and learn new things about how life works. To be able to share those new discoveries with others was probably the most exciting part of research for him. I sometimes look at my adult friends and colleagues and try to imagine what they were like as small children finding their way in the world; looking under stones, hoping to see something new for the first time. The expression on Hiro's face as he greets his colleagues and friends is how I image we all looked as children when finding something new and exciting under that stone. Thank you Hiro for helping me to remember that we are all children at heart; and that is a very good thing for us to remember as we find our way in the world.

Cancer Research Institute, Queen's University, Canada

Peter Greer

I first met Hiro Sorimachi in 1999 at the FASEB summer conference on calpains. At the time, he was still in the early years of his career but he had already made significant discoveries in the calpain field. We met again in 2001 in Paris, at a meeting on calpain 3. He was very excited to be in Paris, and to tour the Bourdeaux region, as he loved red wine. When I came to Japan with my family in 2002, he was not able to meet, but he made the effort to send a large bouquet of flowers and a special gift for my son. I was so touched. We continued to see each other every few years at meetings and there was always fondness and respect. The last time I saw him was in Vermont in 2013. He had brought me a T-shirt with Japanese writing on it that said "Boss". After the meeting, everyone was having fun playing pool and joking around. Hiro was a wonderful and talented scientist and generous colleague who made important advances in the calpain field, but the thing I remember most fondly is his sense of humor and his love of life.

David Geffen School of Medicine, UCLA, USA

Melissa Spencer

知人・友人達より（所内）

反町洋之先生

私は、旧臨床研のころより反町先生とお付き合いさせていただいておりました。私が知的財産活用推進室の所属となってからは、お目にかかる度に「先生、実用化につながりそうな研究成果はありませんか。」とお尋ねすると、多少困ったような表情で、しかし、いつものどおりとてもにこやかに『なかなかないですよ。』とおっしゃってくださったことを思い出します。

医学研に移ってからは、カルpain研究での最先端を走っていらっしゃった反町先生の研究成果、特に各種のカルpainやその抗体が、企業からも注目を受けるようになり、知的財産活用センターからは頻繁にご連絡を差し上げるようになっておりました。そのようなときにでも、終始優しくご対応いただきましたので、知的財産活用センター内での反町先生の評判はすこぶる良好なものでした。また、反町先生のおかげで成長することができたアソシエイトもおりました。

反町先生は突然旅立たれてしまいましたが、反町先生が築かれた研究業績は輝きを失うことはありませんし、反町先生が生み出された研究ツールは、これからも永くカルpain研究に取り組む世界の研究者を支えていくことと思っております。

これまでのご尽力に感謝するとともに、ご冥福を心からお祈り申し上げます。

知的財産活用センター

青木 一正

追悼メッセージ

反町洋之先生、謹んでご逝去を悼み、時には先生から温かいお言葉を頂きましたこと、あらためて感謝申し上げます。今年の1月に先生の訃報を知った時はまさかという思いがいたしました。先生が病と闘いながらも研究生活に向き合っている姿やフロアでお会いした時の先生の笑顔が思い起こされます。一日も早く研究にご復帰されますようにと願っておりましたがとても残念でなりません。反町洋之先生、これからもどうか研究所、そして私達をお見守りください。ご冥福を心から祈っております。どうぞ安らかにやすみください。

統合失調症プロジェクト

新井 誠

反町先生追悼文

敬愛なる反町洋之先生のご冥福を心よりお祈り申し上げます。

反町先生の訃報を知った時はしばらく茫然自失でした。あまりに残念で今でも反町先生が亡くなられたことを認められない認めたくない現実逃避した気持ちになります。

反町先生とは旧 3 研究所統合準備のころの 2010 年ごろから会議などでご一緒させていただくことがありました。素晴らしい研究業績をお持ちなのに人一倍謙虚でいらっしやり、会議でもいつも建設的で慈愛に満ちたご発言をされていらっしやりました。また、いつも明るくされていらっしやり、誰からも好かれておられました。医学研に統合されてからは、調整会議やイベントなどご一緒させていただく機会が増え、反町先生の完璧かつ愛されるお人柄に接することができたことは、本当に幸運でした。特に、一緒にお酒を飲んだ時の楽しい思い出が忘れられません。2015 年 2 月の第 1 回医学研リトリートでは、朝 4 時ごろまでいろいろなお話をさせていただきました。反町先生の立ち振る舞われ方からも本当に多くのことを学ばせていただき、感謝の気持ちで一杯です。

反町先生と同じ研究所で研究ができたことを誇りに思います。反町先生が心血を注がれてご研究をされた場である医学研が、今後もしっかり発展することを願っております。

反町先生が作られた医学研の雰囲気はいつまでも引き継がれていくことと思います。

反町先生、本当にお世話になりました。どうぞ安らかにお眠りください。

2018 年 5 月

依存性薬物プロジェクト

池田和隆

反町先生とはタンパク質分解分野の学会や研究会でお話させて頂いたのをきっかけに、研究のアドバイスなど長い間お世話になってきました。

先生の温かいお人柄を思いますと、残念でなりません。

これまでの御指導に深く感謝するとともに、ご冥福を心よりお祈り申し上げます。

蛋白質代謝研究室

大竹 史明

反町先生は、特に親しいとはいえない私にも、いつでも遠くからでも、あの丸顔に溢れる笑顔で挨拶してくださる方でした。先生の笑顔は不二家のペコちゃんに似ていると思います・・・とお伝えする機会は失われてしまいました。でも今この瞬間もきっと、ご家族や身近な方々の記憶の中で、鮮やかに生き続けておられることでしょう。

運動障害プロジェクト

笥 慎治

追悼 反町洋之先生

反町先生が東京都臨床研から東京大学分生研に異動された 1992 年、私は東京都臨床研の研究員になりました。東大医科研の博士課程では C キナーゼの研究をしておりましたため、鈴木紘一先生のラボにいらした反町先生のことを学生の頃から存じ上げていました。先生は筋肉特異的カルパインを自ら発見し、筋ジストロフィーの発症に関わっていることをつきとめられました。生体分子の基礎研究が様々な疾患メカニズムの解明につながっていくことを目の当たりにした私は、非常に大きな感銘を覚えたことを昨日のことのように思い出します。その後、東京都臨床研に戻られた先生はラボを運営され、世界のカルパイン研究を牽引されてこられました。2010 年からは細胞膜研究室の室長を兼務いただき、長いあいだ大変お世話になりました。常に温かい目でご指導賜りましたことに尊敬と感謝の念に堪えません。先生に追隨して少しでも基礎研究から疾患メカニズムを解明できますよう精進してまいります。

在りし日のお姿を偲び、心よりご冥福をお祈り申し上げます。

(公財) 東京都医学総合研究所 細胞膜研究室 副室長
笠原浩二

医学研に着任早々の頃、反町先生と一度面談させていただきました。

私にとってはそれが最初で最後に反町先生と一対一でお話しさせていただく機会となりました。

緊張しながらお部屋に向かったのですが、先生の笑顔で緊張の糸も一気に緩み、安心感を覚えたことが昨日のように思い出されます。

またお亡くなりになる半月前には、私たちのプロジェクトで主催したサイエンスカフェで使用するミキサーを快く貸してくださいました。

反町先生はご自身が大変な最中であっても、いつでも他人のことに心を砕くことを大切にされる方でした。

突然の訃報に悲しみが薄れることはありませんが、優しい先生のお人柄や思い出はこれからも私たちの心の中に生き続けることと思います。

心よりご冥福をお祈り申し上げます。

再生医療プロジェクト
加藤 朋子

反町先生、とても素晴らしい人柄の持ち主でした。
心よりご冥福をお祈りします。

認知症プロジェクト
亀谷富由樹

ご逝去を悼み、謹んでお悔やみ申し上げます。いつも、私どもの研究に興味を持っていただき、貴重なアドバイスをいただきました。感謝しております。心よりのご冥福をお祈りいたします。

幹細胞プロジェクト
北島 健二

同じ出戻り組として可愛がって頂き、また、何度も飲み連れて行って頂き本当に感謝しております。いまだに信じられませんが、ご冥福を心よりお祈り申し上げます。

哺乳類遺伝プロジェクト
吉川欣亮

反町先生が旧臨床研遺伝情報研究部門で学生をされていた頃からおつきあいさせていただきました。あまりにも早く旅立たれてしまったことはただただ残念です。反町先生で一番印象的なのは所内の発表会等での質問です。他の部門の研究者、或は若い発表者に対しても、その発表者の研究の発展を考えて質問をされているのが伝わってくる暖かい質問が多かったのが印象的でした。ご冥福をお祈りいたします。

ウイルス感染プロジェクト
小池 智

短いお付き合いでしたが、真摯の研究するお姿と誠実なお人柄、無邪気な笑顔が印象的でした。道半ばで逝かれた無念さは察するに余りあるかと存じます。今後先生の研究が後進の方の活躍により、さらに大きく進展することを信じ、ご冥福をお祈りします。

学習記憶プロジェクト

齊藤 実

反町先生には駒込の旧臨床研時代より大変お世話になっておりました。毎週土曜日午後で開催される田中先生の宴会に、いつも反町先生は参加されていて、常にニコニコしてワインをお飲みになっておられました。先生は何でもご存じで、お酒の酵母からマウス遺伝学、はては当時最先端だった質量分析解析まで、そしてカルパインだけではなくプロテアーゼ全般の勉強をさせていただきました。はじめてのビックラボに参加したばかりの当時の私は、カルチャーショックばかりでびくびくしていたと思いますが、反町先生の穏和かつサイエンスに対する真摯な姿勢に勇気付けられるとともに強いあこがれの念を抱いたことを覚えております。私のブレークスルーとなった論文も、反町先生が研究所に質量分析計を導入してくださったお蔭でした。先生のご体調が優れないことは数年前より感じてはおりましたが、お聞きすることもできず、そしてこの余りにも急なご逝去にただ茫然としております。ユビキチンとカルパインの接点もみつきり、共同研究を通じてまたいろいろと勉強させていただこうと思っていた矢先でした。また、プロテアソームも分子研究から個体を用いた生理学的な研究に再び挑戦する時期となっており、是非先生のご意見をお伺いしたかったです。その機会を永遠に失ったことはただただ残念でなりません。先生が私の心に灯してくださった火を絶やさぬように努力します。心からご冥福をお祈り申し上げます。

蛋白質代謝研究室

佐伯 泰

反町先生は、いつも優しい笑顔で話しかけて下さいました。また私だけでなく、知人の研究に関する相談にも快く応じて下さいました。細やかなお心遣いに感謝の言葉もございません。謹んで哀悼の意を表します。

先生、有難うございました！

糖尿病性神経障害プロジェクト

三五 一憲

突然のことで、今でも研究所で反町先生とお会いできるのではないかと思ってしまう
す。

いつも優しい笑顔で、温かいお言葉をかけて下さいました。

それがいつまでも忘れられず、もっと教を乞いたかったのですが大変残念です。

今はただ、ご冥福をお祈り致します。

脳卒中ルネサンスプロジェクト

七田 崇

所内発表会で発表した後、声をかけていただき研究発表した CXCL14 と CpG DNA の抗癌
作用についてヒトではどうなのかという質問をされたのが、お話しした最後となってし
まいました。いつも反町先生はにこやかに質問をされ、聞かれる側としてはほっとする
ことが多かったのですが、この際もおだやかに笑顔で話されていたのを覚えています。
内心はどのような思いだったのかはわかりませんが、今後、ヒトに応用できるような
研究にしたいと思いを新たにしました。謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

幹細胞プロジェクト

種子島 幸祐

カルパイン研究において多くの業績を残し、研究の発展に寄与させていただきに大変残
念に思います。

ご冥福をお祈り致します。

知財センター

塚原 涼子

反町先生はお忙しいにも関わらず、廊下などですれ違うといつも優しい笑顔で挨拶をし
てくださり、研究員になりたてであった私を気にかけて下さいました。あの優しい笑
顔をもう二度と見るできないと思うと、残念でなりません。心からご冥福をお祈
りいたします。

蛋白質代謝研究室

土屋 光

突然の悲報に接し、信じられない思いです。
ご逝去を悼み、心よりご冥福をお祈り申し上げます。

糖尿病性神経障害プロジェクト
新見 直子

反町先生とは、医学研になってからのお付き合いになりますが、誠実で正義感があって優しいお人柄、カルパイン研究に情熱を注ぐ熱い気持ち、セミナーでは難しい内容でも非常に丁寧で的確なご質問をされる頭脳明晰なお姿、宴会では参加する人がみんな喜び楽しんでもらうよう配慮する細心のお気遣いなど、先生の振る舞いには敬服させられることばかりでした。ほんとうに残念でなりません。心よりお悔やみ申し上げますと共にご冥福をお祈り申し上げます。

認知症プロジェクト
長谷川 成人

臨床研の時代から、それぞれのラボを背負って闘ってきましたね。すべての思い出は、一緒に飲んだ赤ワインの味とともに永遠に忘れることはありません。

幹細胞プロジェクト
原 孝彦

反町先生のご冥福を心よりお祈りいたします。

認知症プロジェクト
平井久美子

いつも笑顔を忘れずにお話くださった反町先生の面影がまだ心に残っています。自分の勉強不足からカルパインの研究はこの研究所に来てその意義と奥深さを知りました。大変有意義な研究とっております。しかし志し半ばでのご逝去、さぞ無念であると思えます。先生の遺志を継いだ研究は、今後医学研で継続され大きな成果が実ることを期待しております。自分の気持ちに正直に、素晴らしい人生を送られた反町先生のご冥福を謹んでお祈りしたいと思います。

花粉症プロジェクト

廣井 隆親

私の中で、反町先生の印象は暖かく周囲を照らす太陽のような存在である。旧臨床研の先生の中で、最初に親和会の会長職をお引き受けいただいた。(新任だった星先生とともに)2代前の会長として反町先生のもとにお願いにあがった際に、「まさかの夢であつたらよいな」といいつつ快く引き受けて下さった。

カルパインについて、あたかも自分の子供であるかのようにお話されるのが強く印象に残る。臨床医や臨床研究者は、特定の疾患や患者を中心とする研究がライフワークとなる。反町先生の姿を通じて、基礎研究者は自分が発見した分子に深い愛情・愛着をよせ、その全容解明がライフワークになるのだと実感した。

反町先生の成し遂げた仕事や周囲に与えた感動は、この世に生を受けた一人の人間が、自らの持てる力をつくして精一杯生きた大きな足跡として、同時代をともに過ごした者の胸に生き続けると思われる。

睡眠プロジェクト

本多真

反町先生のご冥福を心よりお祈り申し上げます。

知的財産活用センター

牧野泰子

短い間でしたが、カルパインプロジェクトでの経験は誠に勉強になりました。
謹んで哀悼の意を表するとともに、ご冥福をお祈り致します。

哺乳類遺伝プロジェクト

松岡 邦枝

反町先生 追悼メッセージ

分野長でいらした反町先生の中には、事務手続きに関する相談ごとやお願いごとで、何
度も伺う機会がありました。どんな時にも先生は澁刺とされていて、明るくにこやかに
応対して下さいました。反町先生からは周囲を明るくする“陽の気”が溢れ出ている、
そういう魅力を持っていらしたと思います。反町先生の恵まれた体躯と明るい笑顔を拝
見すると、夏の青空を背景にまっすぐに伸びた大輪のひまわりを見た時のような、何だ
かうきうきとした気持ちになりました。そのような魅力的な先生が夭折されたことは本
当に残念でなりません。反町先生の部屋に伺った時のあの気持ちを思い出すと、胸が締
め付けられると同時に、何故、という悔しい思いがこみ上げてきます。

ユビキチンプロジェクト

松田憲之

私は、昨年(2017年)5月30日、胃の不調から受診した病院ですい臓がんであることを
告げられて、治療後、本年2月1日に復職するまで入院および自宅療養の8カ月を過ご
しましたが、その間反町さんのことを勝手に戦友(少し先輩の)のように感じていまし
た。

2年前だか、3年前だかすっかり忘れましたが、反町さんの病気を私がまだ全く知らな
かった頃、医学研の飲み会で、妻が飲んで美味しかったと言った「フルボディの白ワイ
ン」について尋ねたりしながら歓談していました。いつものように大変腰の低い、それ
でいて笑顔の魅力的な反町さんでしたが、時折腰が痛そうな様子を見せていたのが忘れ
られません。その後、私自身、ガンと知らされるしばらく前から入院後もしばらくの間、
夜中とか背中が筋肉痛のように痛くて目覚め、背中ストレッチをすると多少楽になる
という状態が続いていました。私の場合はすい臓がんの影響で胆管が詰まって肝臓がダ
メージを受け、そのせいで背中が痛くなったと分かったのは、治療の過程で肝臓の具合
が良くなると嘘のように背中痛みが無くなったからでした。

入院する半年くらい前(2016年)に反町さんがガンであると何となく知りました。そう言う訳で、自分がガンだと知り入院した時以来、彼は私にとって(先輩の)戦友でした。私が抗がん剤治療の後、臍頭十二指腸切除術から生還し、もう少しで復職できるという希望を持った昨年の12月も末に、小安さんから医学研にいる人について尋ねるメールが来ました。実は自分はガン治療で休職中なので答えられないと返信したのですが、すぐに小安さんから反町さんから返答があったので大丈夫ですとメールがあり、ああ、戦友の反町さんの方は私より元気なんだと嬉しくなりました。そう思っていた矢先、2018年になって程なく反町さんの訃報が届き、驚き、とても悲しくなりました。臨床研で鈴木紘一さんのラボにいらした時から腰が低くて笑顔の素敵で反町さんの記憶も、また当時私のいた細胞生物の隣の宮坂昌之さんのラボにいらした元気な遠山さんの記憶も鮮明に思い出せます。とても悲しいです。反町さんが最後は自分で納得されたことを希望します。

ゲノム動態プロジェクト

松本 清治

反町先生とは医学研に来て初めてお話しさせて頂きましたが、いつも笑顔で優しい語り口がとても印象的でした。ワインがお好きでまたとても詳しくて、先生が主催のイブニングミキサーではワイングラスの販売もしていらしたので買わせて頂きました。今でも家で使っております。もっともっとたくさんのお話しをお聞きしたかったのにとっても残念です。これからは空の上から医学研を見守っててください。これまでありがとうございました。心よりご冥福をお祈り申し上げます。

神経回路形成プロジェクト

丸山千秋

もっと多くのことを反町先生から学びたかったです。短い期間になってしまいましたが、反町先生から教えていただいたことをこれからの研究人生に活かしていきます。

再生医療プロジェクト

宮岡 佑一郎

私は医学研に最近就職したので、反町先生にお会いしたのはサイエンスカフェでの1回だけでした。サイエンスカフェでは参加していた子供達に優しく教えていた姿を覚えております。またその時既にご病気だったと思うと、色々私としても考えてしまいます。心からお悔やみ申し上げます。

睡眠プロジェクト

宮川 卓

分生研時代のお話をもっとお聞きしたかったです。ご冥福をお祈り致します。

感染制御プロジェクト

棟方 翼

臨床研の頃より、常に優しく接して頂きまして、誠に有難うございました。謹んでお悔やみ申し上げますとともに、心からご冥福をお祈りいたします。

感染制御プロジェクト

安井 文彦

反町先生のご訃報に接し、誠に残念な思いです。
ご生前の笑顔ばかりが思い出され胸が痛みます。
ご指導いただきたいことが沢山ありましたのに残念でなりません。
心よりご冥福をお祈りいたします。

蛋白質代謝研究室

安田さや香

どなたにも優しく、穏やかな物腰で接して下さる方でした。
質量分析をはじめ機械に強く、カルパイン研究にもMSを駆使して精力的に研究をされました。
特に、臨床研時代は所全体の質量分析環境の整備に当たられました。
マニュアルを作られ、ご自分のノウハウを他の研究者に提供されていました。

機器の導入、管理などの業務にボランティアで当たられ、臨床研ではどれだけの人数の研究者が恩恵に預かっただろうかと思います。

反町先生の研究室を訪問し、HPLC にかけるサンプル調製法について直接ご指導いただいたこともありました。

今考えるとかなり図々しく、迷惑だったのかなと申し訳なく思いますが。

土足禁止のちり一つ無い研究室に、土曜日だったのかビートルズが流れていて別世界のように感じました。

研究所近くのプールで一緒することもありました。

ご病気のことを知っていれば時間を惜しんでお話ができたのに、と思います。

今でもちょっと信じられず、廊下でひょっこりお会いしそうな気がします。

ご冥福をお祈りいたします。

ゲノム動態プロジェクト

吉沢直子

5ヶ月たった今もまだ信じるできません。

あまりにも早すぎる旅立ちです。

論文を読んでいて Calpain の文字を見つけたとき、ビンテージワインを開けると、ふと、喪失感で胸が痛くなります。

反町洋之先生と絆の強く理想的な研究者カップルであった典子さん、お父様お母様を尊敬し研究者の道を目指している優理子さんのご心痛を思うと本当に辛くてたまりません。

ご冥福をお祈りいたします。

ユビキチンプロジェクト

吉田 雪子

反町さんと赤ワイン

「ですよねぇ」、反町さんのこの言葉が耳に今も残っている。話が興に乗ってくると弾ける笑顔と共にこの言葉が連発された。彼と私は 18 歳も歳が離れ、研究上の接点もあまり無かったのに、彼の人懐っこさに惹かれ、いつの間にか友達になっていた。「先生行きましょう」と飲みにも良く誘ってもらっているうち、彼を中心に仲良し 4 人組、秘密結社「よこそこの会」ができた。1~2ヶ月に1度、京王沿線のパブなどでワインやビールを飲み、美味しい料理を楽しみながら、いろいろな話をした。彼は飲んでも人を悪

くいわないので、一緒に飲んでいて本当に楽しいお酒だった。

私が反町さんと最初に飲んだのは、王子にある「北とびあ」のパブで、反町さん、奥様の典子さんと私たち夫婦の4人で飲んだビールだった。

反町さんは、その後ワインスペシャリストという資格を取られ、一緒に飲む度、ワインのことをいろいろと教えていただいた。その圧巻は、私の退職パーティーで提供するワインを選んで下さいとお願いしたときだった。彼は、比較的高価な品から普通の品まで40~50本を選び、そして購入もして下さった。それらのワインが好評だったことは言うまでも無い。解説付きのワインリストも時間をかけて作って下さった。「あのリストをいただいておけば」と今も後悔している。

最後に飲んだのは、反町研がサイエンスカフェの担当になって、その夜のご苦労さん会の時だった。その時はすでになんが重篤化し、お酒が飲めない身体だった。でも、その時は、コップの底から2cmくらい赤ワインを注いで、それを愛おしそうに飲まれていた。

「また、いつか飲もうね」、お互い別れるときの決まり言葉だった。その約束を果たせないまま、反町さんは逝ってしまった。

基盤技術研究センター 遺伝子改変動物室
米川博通

Dr. Sorimachi will always be one of the best memories that I have from Japan and someone that I am sure I will be company. I have known him for only a few years, but his cheerfulness and interested in helping other will always be an inspiration to me.

When I first met him, I was completely unable to understand Japanese and he took the time to talk to me in several events and invite me to meet with his group to discuss science and appreciate wonderful wines. Soon after, he went out of his way to help me with a surprise to my wife. This not only increase my appreciation for him but created important memories for me and my wife. I was eager to have a closer friendship with him and know more about him and his family, and despite this wasn't possible I am sure the memories with him will growth in meaning with time, in the same way as the wines he loved.

ユビキチンプロジェクト
Bruno B Queliconi

