

厚生労働科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化に伴うカルパイン活性制御不全の機構解明

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 遠藤玉夫

平成15（2003）年 3月

目 次

I. 総括研究報告 老化に伴うカルパイン活性制御不全の機構解明 遠藤玉夫	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	2
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	3

老化に伴うカルパイン活性制御不全の機構解明

主任研究者 遠藤 玉夫 (助) 東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所、副参事研究員

研究要旨 *Klotho* 変異マウスは寿命が短く、ヒトの老化症状に類似した多彩な症状を示すことから早期老化モデルマウスとして位置づけられている。このことから、*klotho* 遺伝子の機能を解析することにより老化及び老化に伴う病態の分子機構を解明するための重要な知見が得られることが期待される。そこで、*klotho* の変異による各臓器のタンパク質レベルでの変化を解析したところ、変異マウスの肺と腎臓で α II spectrin が著しく分解されていることを明らかにした。 α II spectrin は calpain によって分解されることが報告されているので、*klotho* マウスにおける calpain の活性化について検討した。その結果、変異マウスの肺と腎臓では μ -calpain がほぼ完全に活性化されており、calpain の内在性阻害物質である calpastatin が消失していた。さらに、同様の傾向が自然老化マウスでも観察されたことから、*klotho* 蛋白質の減少を起因とする一連の蛋白質分解反応が自然老化における腎障害等に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

Klotho 遺伝子変異マウスは寿命が短く、ヒトの老化症状に類似した多彩な症状を示すことから早期老化モデルマウスとして位置づけられている。このことから、*klotho* 遺伝子の機能を解析することにより老化及び老化に伴う病態の分子機構を理解するための重要な知見が得られることが期待される。そこで、*klotho* 遺伝子の変異による、各組織の分子レベルでの変化について解析し、老化との関連について検討した。

B. 研究方法

Klotho 変異マウス(野生型 $KL^{+/+}$ 、ヘテロ接合型 $KL^{+/-}$ 、ホモ接合型 $KL^{-/-}$)を用いて、各臓器の膜面分蛋白質を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色を行った。 $KL^{+/+}$ と $KL^{+/-}$ で発現量が異なるバンドについて、アミノ酸シーケンスおよびマススペクトルにより蛋白質の同定を試みた。さらに、同定した蛋白質と関連する蛋白質の発現をウェスタンブロットで解析した。さらに自然老化マウスを用いて老化との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物の使用に関しては、動物愛護に十分配慮するとともに所内実験動物委員会に実験計画書を申請し承認を受ける。

C. 研究結果及び考察

膜面分蛋白質の SDS-PAGE の結果 $KL^{+/-}$ の腎臓で著しく減少しているバンドが観察された。そのバンドについてアミノ酸部分配列を決定した結果、 α II spectrin (α SpII) であることが明らかとなった。 α SpII に対する特異抗体を用いて各臓器をウェスタンブロットで調べたところ、 α SpII の減少は肺と腎臓で著しく、他の臓器ではほとんど観察されなかった。また、 $KL^{+/-}$ の肺と腎臓で約 150kDa 付近に抗 α SpII 抗体に反応する新たなバンドが検出された。 α SpII

は calpain によって分解され 150kDa の分解物を生じることが知られている。そこで、 $KL^{+/-}$ における α SpII の分解に calpain が関与しているか検討した。その結果、 $KL^{+/-}$ の肺と腎臓では μ -calpain が著しく活性化し、 μ -calpain の内在性阻害物質である calpastatin が消失していることが明らかとなった。さらに $KL^{+/-}$ を用いた解析から、 μ -calpain の活性化の割合は *klotho* 蛋白質の発現量の減少に伴って上昇することが分かった。また、自然老化マウスを用いて同様の解析を行ったところ、*klotho* 蛋白質は老化によって減少し、それに伴って μ -calpain が活性化することが明らかになった。

以上の結果から、*klotho* 蛋白質の欠失や減少により、臓器特異的に calpain-calpastatin を介した蛋白質分解系が活性化し、 α SpII の分解が促進されることが明らかとなった。このとき腎臓の HE 染色像では組織の傷害が見られなかったことから、一連の分解反応が *klotho* マウスにおける肺気腫や腎障害の原因となることが示唆された。また、*klotho* 蛋白質の減少を起因とする一連の蛋白質分解反応が自然老化における腎障害等にも関与する可能性が示唆された。

D. 結論

klotho 蛋白質は calpain の活性制御に関わっており、老化過程で *klotho* 蛋白質が減少することにより、calpain の活性化を制御できなくなることが、腎障害等の老化関連疾患の要因となっていることが示唆された。

E. 研究発表

論文発表

J. Biol. Chem., 277(38), 35503-35508, 2002

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Manya, H., Inomata, M., Fujimori, T., Dohmae, N., Sato, Y., Takio, K., Nabeshima, Y., <u>Endo, T.</u>	Klotho protein deficiency leads to overactivation of μ -calpain.	Journal of Biological Chemistry	277	35503-35508	2002

20020188

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.2の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。