

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15年度 総括研究報告書

主任研究者 遠藤玉夫

平成16(2004)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	-----	1
遠藤玉夫		
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 (財)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* 変異マウスは多彩な老化症状を呈することから、*klotho* 遺伝子の機能がヒト老化疾患解析の重要な鍵となっている。平成 14 年度の当研究事業において、*klotho* 変異マウスの腎臓と肺では μ -calpain が異常に活性化され、その内在性阻害物質である calpastatin が消失していることを明らかにした。この μ -calpain の活性化による細胞骨格系の分解が腎及び肺障害の原因と考えられる。そこで、Klotho 蛋白質の減少を起因とする calpain 活性制御異常の分子機構の解明を目指し、本年度は RNAi 技術による細胞レベルでの Klotho 蛋白質の発現を制御する実験系を検討した。これまで、培養細胞での *Klotho* の発現は、mRNA でしか検出することができず、Klotho 蛋白質の細胞レベルでの研究がほとんど行われてこなかった経緯がある。本研究では、まず内在性に検出可能な量の Klotho 蛋白質を発現している細胞を検索することにより、細胞レベルでの実験を可能にした。さらに、Klotho 蛋白質の発現を強力に阻害する siRNA 配列を見だし、RNAi 効果による Klotho 蛋白質の発現制御システムを構築した。

A. 研究目的

klotho 変異マウスの腎臓と肺では μ -calpain が異常に活性化され、その内在性阻害物質である calpastatin が消失している。こうした calpain の活性制御の異常が、細胞骨格系の分子を分解し、組織の正常な機能を損ねている可能性が考えられる。calpain は細胞内カルシウム濃度の上昇により自己消化を起し活性化することから、*klotho* 変異マウスでは細胞内カルシウム濃度調節に異常があると予想される。そこで、Klotho 蛋白質と細胞内カルシウム濃度調節機構との関係、及び Klotho 蛋白質減少からカルパイン活性化に至るシグナル伝達機構を明らかにすることを目的に、RNAi 技術による細胞レベルでの Klotho 蛋白質の発現制御を試みた。

B. 研究方法

1) 内在性に Klotho 蛋白質を発現している細胞株の検索：*klotho* mRNA の発現が報告されている各組織由来の細胞より膜蛋白質画分を調製し、抗 Klotho 蛋白質抗体を用いたウェスタンブロットにより、各細胞株における Klotho 蛋白質の発現を調べた。

2) RNAi による Klotho 蛋白質の発現制御：*klotho* 遺伝子配列を基に 6 種類の siRNA を作製し、上記 1) において Klotho 蛋白質の発現が確認された細胞株に導入した。1～数日間の培養後、ウェスタンブロットで Klotho 蛋白質の発現阻害効果を確認した。

C. 研究結果及び考察

細胞レベルで Klotho 蛋白質の発現制御を行うためには、Klotho 蛋白質を内在性に発現している細胞が必要である。しかし、蛋白質レベルで Klotho の発現が確認されている培養細胞株はこ

れまでに全く報告がない。そこで、細胞株の検索を行った。マウスにおける Klotho 蛋白質の主要発現臓器である腎臓を中心に、*klotho* mRNA の発現が報告されている各組織由来の培養細胞株についてウェスタンブロットで調べた。その結果、ヒト腎臓由来の細胞株から Klotho 蛋白質が検出可能な株を発見した。

次に、Klotho 蛋白質の発現阻害効果を持つ RNA 配列を検討した。ヒト *klotho* 遺伝子の配列を基に 6 種類の siRNA を合成し、上記細胞株に導入した。その結果、4 種類の siRNA で Klotho 蛋白質の顕著な発現阻害効果が見られた。経時的な観察から、この効果は導入後 1～2 日が最も高いことが分かった。現在、これらの siRNA を用いて、Klotho 蛋白質の発現を抑制した場合の細胞内カルシウム濃度や μ -calpain の活性への影響を解析している。また、恒常的な Klotho 蛋白質の欠乏による細胞の変化を解析するため、ベクター系を用いて siRNA を持続的に発現させる培養系の確立を試みている。

D. 結論

Klotho 蛋白質を検出可能なレベルで発現している培養細胞株を見いだした。本細胞株は今後の Klotho 蛋白質の機能研究における重要なツールとなることが期待される。また、RNAi 効果を利用した Klotho 蛋白質発現制御の実験系を構築した。

E. 研究発表

1. 論文発表
基礎老化研究, 27(2), 91-98, 2003

2. 学会発表
The 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, November 24-28, 2003, Tokyo, Japan.

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
萬谷博、遠藤玉夫	<i>Klotho</i> 遺伝子による proteolysisの制御と老化	基礎老化研究	27巻2号	91-98	2003

20030200

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