

2004-00314A

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 遠藤 玉夫

平成17(2005)年3月

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 遠藤玉夫

平成17(2005)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	

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 (東京大学高齢者研究・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* 遺伝子が老化の制御に深く関与することが考えられている。我々はこれまでに、*klotho* 変異マウスの腎臓と肺における  $\mu$ -calpain の異常活性化と、その内在性阻害物質である calpastatin の消失を明らかにし、 $\mu$ -calpain による細胞骨格系の分解が腎および肺障害の原因であることを示した。さらに、RNAi 効果により細胞レベルで *klotho* 蛋白質の発現を制御するシステムを構築し、*klotho* 蛋白質の減少を起因とする  $\mu$ -calpain 活性制御異常の分子機構の解明を目指してきた。本年度は RNAi による *klotho* 蛋白質の発現制御システムに加えて、アンジオテンシン II およびビタミン D<sub>3</sub> など *klotho* 蛋白質の発現に影響を与える分子を用いて、腎尿細管細胞における  $\mu$ -calpain の活性化およびカルシウム輸送への影響を調べた。その結果、*klotho* 蛋白質の発現量の変化は細胞内外へのカルシウムの流動量を増加させることが明らかとなった。この影響により、細胞内カルシウム濃度も上昇する傾向にあり、 $\mu$ -calpain 活性化の原因となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

*klotho* 変異マウスの腎臓と肺では  $\mu$ -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こ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、本研究では *klotho* 蛋白質と細胞内カルシウム濃度調節機構との関係、および *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の解明を目指す。

平成 15 年度の当研究事業において、内在性に検出可能なレベルで *klotho* 蛋白質を発現している培養細胞株の取得に成功し、RNAi 効果による *klotho* 蛋白質の発現制御システムを構築したことから、細胞レベルでの研究が可能となった。本年度は上記システムに加えて、アンジオテンシン II およびビタミン D<sub>3</sub> など *klotho* 蛋白質の発現に影響を与える分子を用いて、腎尿細管細胞における  $\mu$ -calpain の活性化およびカルシウム輸送への影響を調べた。

B. 研究方法

- 1) *klotho* 遺伝子ノックダウン培養細胞株の作製：テトラサイクリン誘導プラスミドベクター系を用いて、*klotho* 遺伝子の siRNA 発現ベクターを作製し、腎尿細管由来培養細胞株に導入した。
- 2) siRNA およびアンジオテンシン II、ビタミン D<sub>3</sub> による *klotho* 蛋白質の発現制御：半透膜で培地を上層と下層に区切った培養器を使用し、上記 1) で作製した細胞あるいは腎尿細管細胞を半透膜上で培養した。上層あるいは下層に各試薬と <sup>45</sup>Ca を添加し、1-数日間の培養後、上層-下層間のカル

シウム流動量と細胞内カルシウム濃度の変化を <sup>45</sup>Ca の放射活性により測定した。また、ウェスタンブロットで *klotho* 蛋白質の発現量を確認した。

C. 研究結果および考察

siRNA 導入細胞へのテトラサイクリンの添加、および尿細管細胞へのアンジオテンシン II の添加により、添加後 3 日目から *klotho* 蛋白質の発現の減少が観察された。一方、尿細管細胞へのビタミン D<sub>3</sub> の添加では、添加後 3 日目より *klotho* 蛋白質の顕著な発現増加が観察された。

そこで、*klotho* 蛋白質の発現に変化が見られた、添加後 3 日目以降の細胞を用いて、<sup>45</sup>Ca を上層もしくは下層に添加し 30 分間におけるカルシウム流動量を測定した。アンジオテンシン II およびビタミン D<sub>3</sub> 添加の両方の場合において、添加しない対照細胞に比較して、上層-下層間のカルシウム輸送が亢進することが明らかとなった。また、カルシウム輸送の亢進に伴って、細胞内カルシウム濃度も上昇する傾向があることが分かった。siRNA による *klotho* 蛋白質発現抑制の影響については現在解析中である。なお、上層-下層間のカルシウム流動量の増加が、アンジオテンシン II の影響で細胞が縮小するなどして細胞間隙が増大したことによる偽効果ではないことは確認した。

以上の結果から、*klotho* 蛋白質の発現量と腎尿細管細胞におけるカルシウム輸送には密接な関係があることが明らかとなった。また、カルシウム輸送量の増加にともない細胞内カルシウム濃度も上昇することから、*klotho* 変異マウスなどにおいて *klotho* 蛋白質の発現異常が長期的に続く場合、細胞内カルシウム濃度も持続的に上昇することによって、 $\mu$ -calpain の活性化が誘導されている可能性が考えられる。

D. 結論

*klotho* 蛋白質の発現量を制御し、実際に検出でき

る培養細胞を用いた実験系を構築した。この実験系により、腎尿細管細胞において、klotho 蛋白質の発現量の変化と、カルシウム輸送の亢進および細胞内カルシウム濃度の上昇が同時に起こることが明らかとなった。さらに、klotho 蛋白質の発現量の変化が

持続することによる、細胞内カルシウム濃度の持続的な上昇が、 $\mu$ -calpain の活性化の原因となる可能性を示唆した。