

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～16年度 総合研究報告書

主任研究者 遠藤 玉夫

平成17(2005)年3月

Z00400314B

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～16年度 総合研究報告書

主任研究者 遠藤玉夫

平成17(2005)年 3月

目 次

I. 総合研究報告		
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	-----	3
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	4

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（勸東京都高齢者研究・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、*klotho* 遺伝子の変異による各臓器におけるタンパク質の変化を解析し、*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。さらに、活性化した μ -calpain が α II-spectrin などの細胞骨格系分子を分解することを示した。また、同様の現象が自然老化マウスでも起こることを見だし、*klotho* 蛋白質の減少を起因とする一連の異常な蛋白質分解反応が、自然老化における腎臓や肺の障害に関与する可能性を示した。そこで、*klotho* 蛋白質による μ -calpain の活性制御機構の解明を目指し、培養細胞で *klotho* 蛋白質の発現を制御し影響を解析するシステムを構築した。このシステムを用いて、*klotho* 蛋白質の発現とカルシウム輸送の関係を解析し、*klotho* 変異マウスに見られる μ -calpain の活性亢進機構について検討した。その結果、*klotho* 蛋白質の発現量の変化は細胞のカルシウム輸送を亢進させることが明らかとなった。さらに、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観察され、 μ -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

急激に高齢化が進む日本において、高齢者を疾患から守り、高齢者の生活の質（Quality of life）を高くすることは現代医療の最重要課題の一つである。しかし、老化には環境的要因や遺伝的要因が複雑に関与していることから、その分子機構を理解し研究することは難しい。近年、老化モデル動物を用いた、老化関連遺伝子の探索や機能解析の研究が数多く行われるようになってきた。こうした背景の中、単一遺伝子欠損により多彩な老化症状を呈する変異マウスが作成され、その原因遺伝子として *klotho* が同定された。*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およ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。

B. 研究方法

1) *klotho* 遺伝子の変異による、各組織における蛋白質の発現変化の解析：*klotho* 変異マウス（野生型 $KL^{+/+}$ 、ヘテロ接合型 $KL^{+/-}$ 、ホモ接合型 $KL^{-/-}$ ）の各臓器から膜画分蛋白質を抽出し、SDS-PAGE の後 CBB 染色を行った。 $KL^{+/+}$ と $KL^{+/-}$ で発現量が異なる分子について、アミノ酸シーケンスおよびマスペクトルにより同定を試みた。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た。

2) *klotho* 蛋白質の発現減少による μ -calpain 活性への影響および自然老化との関連の検討：活性型と

非活性型の calpain を区別する特異抗体、抗 calpastatin 抗体、抗 *klotho* 抗体を用いたウェスタンブロットにより、*klotho* 変異マウスの各臓器における calpain の活性化と *klotho* 蛋白質の発現量の関係について解析した。自然老化マウスを用いて同様の実験を行い老化との関連を検討した。

3) 内在性に *klotho* 蛋白質を発現している細胞株の検索：*klotho* 蛋白質の主要発現組織由来の細胞について、抗 *klotho* 抗体を用いたウェスタンブロットを行い、*klotho* 蛋白質の発現を確認できる細胞株を探索した。

4) *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。

5) siRNA およびアンジオテンシン II、ビタミン D₃ 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 4) 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 ⁴⁵Ca 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 ⁴⁵Ca 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

klotho 蛋白質の機能を知るための最初のアプローチとして、*klotho* 遺伝子の変異による、各組織における蛋白質の発現の変化について解析した。その結果、膜画分蛋白質の SDS-PAGE の CBB 染色像から $KL^{+/-}$ の腎臓で著しく減少している分子を見いだした。そこで、その分子についてアミノ酸

部分配列を決定し、 α II-spectrin であることを明らかにした。さらに、抗 α II-spectrin 抗体を用いたウェスタンブロットにより、 $KL^{+/+}$ では肺と腎臓において α II-spectrin が著しく分解されていることが分かった。

α II-spectrin は細胞内に存在する蛋白質分解酵素である calpain により分解されることが知られている。そこで、*klotho* 変異マウスにおける α II-spectrin の分解にも 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、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。自然老化マウスを用いて同様の解析を行ったところ、老齢マウスでも *klotho* 蛋白質の減少が観察され、腎臓と肺で μ -calpain の活性化が観察された。

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 μ -calpain が活性化することが明らかとなった。腎臓の HE 染色の結果、 μ -calpain の活性化が組織の傷害よりも早い時期に起こっていたことから、 μ -calpain による蛋白質分解反応が肺気腫や腎障害の原因となることが示唆された。

一般的な calpain の活性化機構として細胞内カルシウム濃度の上昇による自己消化が知られている。したがって、*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pain 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、培養細胞で *klotho* 蛋白質の発現制御する実験系の構築を試みた。

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、検出可能な量の *klotho* 蛋白質を発現している培養細胞株はこれまでに全く報告がなかった。そこで、*klotho* 蛋白質の主要発現組織由来の細胞について、抗 *klotho* 抗体を用いたウェスタンブロットにより、*klotho* 蛋白質の発現を確認できる細胞株を探索した。その結果腎臓由来の細胞から *klotho* 蛋白質を検出可能な株を発見した。

上記細胞を用いて、RNAi 効果による *klotho* 蛋白質の発現制御システムを構築した。また、*klotho* 蛋白質の発現に影響を与えることが知られている、アンジオテンシン II およびビタミン D_3 を用いて、腎尿細管細胞における μ -calpain の活性化およびカルシウム輸送への影響を調べた。

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_3 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、 ^{45}Ca 添加後 30 分間におけるカルシウムの流動量を測定した。アンジオテンシン II およびビタミン D_3 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、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。

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し、 μ -calpain の活性化が誘導される可能性が考えられる。

D. 結論

本研究により、*klotho* 蛋白質が μ -calpain の活性制御に関わっていることが示唆された。*klotho* 遺伝子の変異や加齢による *klotho* 蛋白質の減少を起因として、 μ -calpain の活性亢進が誘導され、その結果生じる蛋白質分解反応が腎・肺障害等の老化関連疾患の要因となっていることが考えられる。

また、*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。

さらに、上記細胞を用いることにより *klotho* 蛋白質の発現量を制御する実験系を構築した。この実験系により、腎尿細管細胞において、*klotho* 蛋白質の発現量が変化すると、カルシウム輸送が亢進し細胞内カルシウム濃度が上昇することが明らかとなった。このことから、*klotho* 蛋白質の発現量の持続的な変化によって、細胞内カルシウム濃度の持続的に上昇することが、 μ -calpain の活性化の原因となる可能性を示唆した。

E. 研究発表

1. 論文発表

J. Biol. Chem., **277**(38), 35503-35508, 2002
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
Manya, H., Inomata, M., Fujimori, T., Dohmae, N., Sato, Y., Takio, K., Nabeshima, Y., Endo, T.	Klotho protein deficiency leads to overactivation of μ -calpain.	Journal of Biological Chemistry	277	35503-35508	2002
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

ISSN 0021-9258 (print)
ISSN 1083-351x (electronic)
JBCHA3 277(38) 34655-35778

The Online Version of
This Issue Contains
Supplemental Material

The Journal of Biological Chemistry

SEPTEMBER 20, 2002 VOLUME 277 NUMBER 38



PUBLISHED BY THE AMERICAN SOCIETY FOR
BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Founded by Christian A Herter and Sustained in Part by the Christian A Herter Memorial Fund

The cover shows a 7-week-old normal mouse (*left*) and a *klotho* mouse, an animal model that shows multiple phenotypes resembling human aging. *Klotho* protein deficiency (*top panel* in Western blot) leads to the overactivation of μ -calpain (*second* and *third panels*), a decrease of calpastatin (*fourth panel*), and the cleavage of α -spectrin (*fifth panel*), which in turn result in growth retardation, inactivity, and premature death at 8-9 weeks. Similar phenomena are observed in normal aged mice. For details see the article by Manya *et al.*, pages 35503-35508.

Klotho Protein Deficiency Leads to Overactivation of μ -Calpain*

Received for publication, June 18, 2002
Published, JBC Papers in Press, July 15, 2002, DOI 10.1074/jbc.M206033200

Hiroshi Manyá†, Mitsushi Inomata§, Toshihiko Fujimori¶, Naoshi Dohmae‡, Yuji Sato‡, Koji Takio‡, Yo-ichi Nabeshima¶**, and Tamao Endo‡ ††

From the †Glycobiology and §Biomembrane Research Groups, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Foundation for Research on Aging and Promotion of Human Welfare, Tokyo 173-0015, Japan, the ¶Department of Pathology and Tumor Biology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8501, Japan, the ‡Division of Biomolecular Characterization, RIKEN (Institute of Physical and Chemical Research), Saitama 351-0198, Japan, and the **Core Research for Evolutional Science & Technology (CREST), Saitama 332-0012, Japan

The *klotho* mouse is an animal model that prematurely shows phenotypes resembling human aging. Here we report that in homozygotes for the *klotho* mutation ($kl^{-/-}$), α_{II} -spectrin is highly cleaved, even before the occurrence of aging symptoms such as calcification and arteriosclerosis. Because α_{II} -spectrin is susceptible to proteolysis by calpain, we examined the activation of calpain in $kl^{-/-}$ mice. m-Calpain was not activated, but μ -calpain was activated at an abnormally high level, and an endogenous inhibitor of calpain, calpastatin, was significantly decreased. Proteolysis of α_{II} -spectrin increased with decreasing level of Klotho protein. Similar phenomena were observed in normal aged mice. Our results indicate that the abnormal activation of calpain due to the decrease of Klotho protein leads to degradation of cytoskeletal elements such as α_{II} -spectrin. Such deterioration may trigger renal abnormalities in $kl^{-/-}$ mice and aged mice, but Klotho protein may suppress these processes.

The *klotho* ($kl^{-/-}$) mouse shows multiple phenotypes resembling human aging caused by the mutation of a single gene (1). This mutation is caused by the insertion of ectopic DNA into the regulatory region of the *klotho* gene. The *klotho* gene encodes a type I membrane protein that is expressed predominantly in the kidney and brain. The extracellular domain of Klotho protein consists of two internal repeats that share sequence similarity to the β -glucosidases of both bacteria and plants (1, 2). As a result of a defect in *klotho* gene expression, the $kl^{-/-}$ mouse exhibits multiple age-associated disorders, such as arteriosclerosis, osteoporosis, skin atrophy, pulmonary emphysema, short life span, and infertility. However, the mechanism by which the *klotho* gene product suppresses the aging phenomena has not been identified. Analysis of the pathophysiology of $kl^{-/-}$ mice is expected to give clues not only to understanding the mechanisms of individual diseases associated with aging but also the relationship between these mechanisms during human aging.

Non-erythroid spectrin is a heterodimeric actin-binding pro-

tein that consists of α_{II} - and β_{II} -spectrin and is usually found on the cytoplasmic side of the plasma membrane (3, 4). It is thought to participate in the establishment and maintenance of cell polarity, shape, and receptor distribution (5). Recently, it was proposed that spectrin retained and stabilized various proteins at specific regions on the cell surface (6–9). α_{II} -Spectrin has been shown to be cleaved by calpain and/or caspase during apoptosis and necrosis (10–13).

Calpain, a calcium-dependent cytosolic cysteine protease, is involved in many physiological and pathological processes (14–16). Calpain mediates proteolysis of various cellular proteins, including cytoskeletal proteins, and causes irreversible cell damage (10–13, 17, 18). Thus, calpain overactivation may contribute to the pathology of cerebral and cardiac ischemia, Alzheimer's disease, arthritis, and cataract formation (19, 20). Calpain has been shown to be regulated by both calcium ion and calpastatin (16). Two types of isozymic calpain, μ -calpain and m-calpain, are ubiquitously distributed in mammalian cells. The former is activated by micromolar concentrations of calcium and the latter is activated by millimolar concentrations of calcium. Calpastatin is an endogenous inhibitor specific for calpain, but is slowly degraded by calpain (21). Here, we report the cleavage of α_{II} -spectrin due to the continuous activation of μ -calpain in $kl^{-/-}$ mice. Furthermore, we also observe similar phenomena in normal aged mice.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of Mouse Tissue Extracts—Kidneys were obtained from 2- and 3-week-old $kl^{+/+}$, $kl^{+/-}$, and $kl^{-/-}$ mice and from 4-week-old and 29-month-old C57BL/6 mice. Brain, lung, heart, liver, and kidney were obtained from 4-week-old and 8-week-old $kl^{+/+}$ and $kl^{-/-}$ mice. Tissue samples were homogenized with 9 volumes (weight/volume) of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose. After centrifugation at $900 \times g$ for 10 min, the supernatant was subjected to ultra centrifugation at $100,000 \times g$ for 1 h. The supernatants and precipitates were used as the cytosolic fraction and microsomal membrane fraction, respectively. Protein concentration was determined by BCA assay (Pierce). All experimental procedures using laboratory animals were approved by the Animal Care and Use Committee of Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Amino Acid Sequencing of 280-kDa Protein—Kidney microsomal fraction (250 μ g) from 4-week-old $kl^{+/+}$ and $kl^{-/-}$ mice was subjected to SDS-PAGE under reducing conditions followed by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. A protein band of ~280 kDa was excised and treated with 0.1 μ g of *Achromobacter* protease I (lysylendopeptidase) at 37 °C for 12 h in 0.1 M Tris-HCl, pH 9.0, containing 0.1% SDS and 1 mM EDTA (22). The peptides were separated on columns of DEAE-5PW (1 \times 20 mm; Tosoh, Tokyo, Japan) and CAPCELL PAK C18 UG120 (1 \times 100 mm; Shiseido, Tokyo, Japan). Solvent A was 0.085% (v/v) trifluoroacetic acid in distilled water, and solvent B was 0.075% (v/v) trifluoroacetic acid in 80% (v/v) acetonitrile. The peptides were eluted at a flow rate of 30 μ l/min using a linear gradient of 1–60% solvent B. Selected peptides were subjected to Edman degradation

* This work was supported by Health and Labor Sciences Research Grants for Comprehensive Research on Aging and Health from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan (to T. E.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

†† To whom correspondence should be addressed: Glycobiology Research Group, Tokyo Metropolitan Inst. of Gerontology, Foundation for Research on Aging and Promotion of Human Welfare, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan. Tel.: 81-3-3964-3241 (ext. 3080); Fax: 81-3-3579-4776; E-mail: endo@tmig.or.jp.

using a Procise 494 cLC protein sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on a Reflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA) in linear mode using 2-mercaptobenzothiazole as a matrix.

Antibodies—Rabbit antibodies specific to the pre- and post-autolytic forms of μ -calpain (anti-pre- μ and anti-post- μ , respectively) were raised against synthetic peptides as described previously (23). Antibodies specific to the pre- and post-autolytic forms of m-calpain (anti-pre-m and anti-post-m, respectively) were produced using synthetic peptides corresponding to the N-terminal 21 residues (AGIAAKLAKDREAAEGLG-SHE) of the intact form and the N-terminal 6 residues (KDREAA) of the autolytic form, respectively. A cysteine residue was added to the C terminus of each peptide so that the antigenic peptide could be conjugated to keyhole limpet hemocyanin. The entire amino acid sequence and the autolytic cleavage site of human m-calpain were obtained from previous reports (24, 25). Antibodies specific to the calpain-generated N- and C-terminal fragments of α_{11} -spectrin (136 and 148 kDa, respectively) were produced by the peptide antigens QQQEVY (anti-BDP-136) and GAMPRD (anti-BDP-148), respectively (see Fig. 2). A cysteine residue was added to the N terminus of QQQEVY peptide or was added to the C terminus of GAMPRD peptide. The amino acid sequence and the cleavage site in mouse α_{11} -spectrin by calpain were as determined by others previously (22, 26). An antibody against domain IV of human calpastatin was produced using a synthetic peptide corresponding to residues 601–630 (AEHRDKLGERDDTIPPEYRHLDDNGQDKP) (27) with a cysteine residue added to the C terminus. Rabbits were immunized with the antigenic peptide-keyhole limpet hemocyanin conjugates. Affinity purification of polyclonal antibodies was carried out using antigenic peptides immobilized on epoxy-activated Sepharose 6B (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Anti-human- α_{11} -spectrin polyclonal antibody C-20 from goat was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-*Klotho* monoclonal antibody (KM2076) from rat was a generous gift from Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd (28).

Western Blot Analysis—The cytosolic and microsomal fractions (15 μ g each) were separated by SDS-PAGE (10 and 5% gel for cytosolic and microsomal fractions, respectively), and proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane, after blocking in phosphate-buffered saline containing 5% skim milk and 0.5% Tween 20, was incubated with each antibody. Then the membrane was treated with anti-goat (Santa Cruz Biotechnology), anti-mouse or anti-rabbit (Amersham Biosciences) IgG conjugated with horseradish peroxidase. Proteins bound to antibody were visualized with an ECL kit (Amersham Biosciences).

Northern Blot Analysis—Total RNA was isolated from 4-week-old $kl^{+/+}$ and $kl^{-/-}$ mice kidney by the guanidinium thiocyanate method using Isoegen (Nippon Gene, Toyama, Japan). Total RNA (15 μ g) was electrophoresed through a 1% agarose-formaldehyde denaturing gel and transferred to a nylon membrane, Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences). Northern blot analysis was performed using The Gene Images AlkPhos Direct (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instruction. Probe DNA fragments for mouse α_{11} -spectrin, calpastatin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were prepared by reverse transcriptase-PCR and nested PCR using total RNA from the $kl^{+/+}$ mouse kidney. Outer primers of α_{11} -spectrin were 5'-AACAGCA-CAAACAAGGATTGGTGG-3' and 5'-TGCAGATCATGGGAGTCAACCAAT-3'; inner primers were 5'-GGTTTCGTGCCAGCTGCATA-3' and 5'-ACCCAATTGGCCTTGGCCT-3'. Outer primers of calpastatin were 5'-TTTCGCTGCGTTTTCCCGCA-3' and 5'-TTCTCCTGGGGGAACAGA-3'; inner primers are 5'-TTCACCGAAAAATGCCAGCCCGG-3' and 5'-GGTCACTCCTGCAGACTGAGCTTTG-3'. Primers of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were 5'-TGAAGTCCGGTGTGAACGGATTGGC-3' and 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'.

Histological Examination—Four-week-old and 3-week-old ($kl^{+/+}$ and $kl^{-/-}$) mice were examined. The kidneys were excised, fixed with 10% formaldehyde, embedded in paraffin, sectioned in 4- μ m slices and stained with hematoxylin-eosin and von Kossa staining.

RESULTS

Decrease of α_{11} -Spectrin in the Kidney of $kl^{-/-}$ Mice—To determine whether mouse homozygotes of the *klotho* gene mutation ($kl^{-/-}$) have a different pattern of proteins in the kidney, we examined the kidney microsomal fractions from 4-week-old mice by SDS-PAGE. A band of about 280 kDa was found to be significantly weaker in $kl^{-/-}$ mice than in $kl^{+/+}$ mice (Fig. 1A). Similar results were obtained with five other $kl^{-/-}$ mice. The

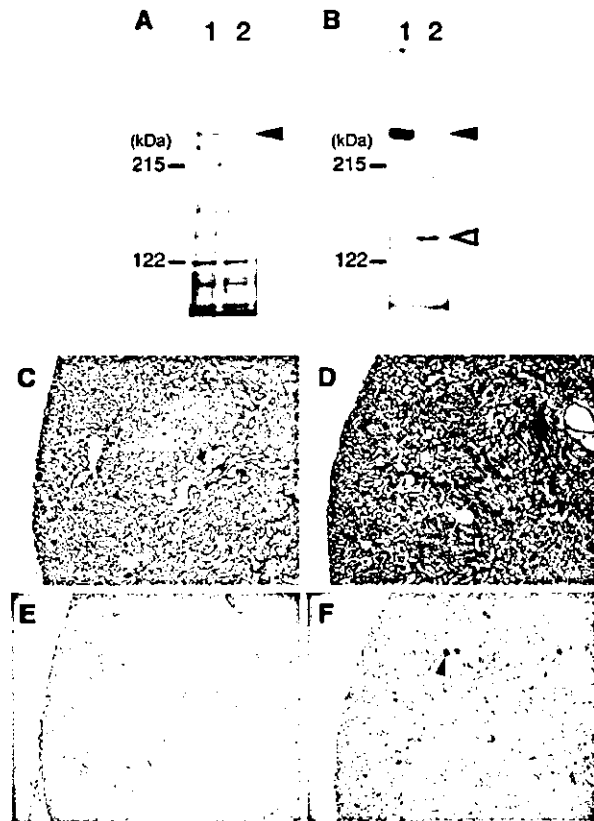


FIG. 1. Decrease of α_{11} -spectrin in the $kl^{-/-}$ kidney before morphological change. A, SDS-PAGE of kidney microsomal fractions of 4-week-old male mice, stained with Coomassie Blue. B, Western blot analysis of gel assessed with anti- α_{11} -spectrin (C-20) antibody. Lane 1, $kl^{+/+}$; lane 2, $kl^{-/-}$. Arrowheads indicate the position of α_{11} -spectrin. Open triangle in B indicates the position of the degraded product of α_{11} -spectrin. Molecular mass markers are indicated on the left. C–F, histological examination of kidney sections. C, 4-week-old $kl^{+/+}$ mice, hematoxylin-eosin. D, $kl^{-/-}$ mice, hematoxylin-eosin. E, 4-week-old $kl^{+/+}$ mice, von Kossa staining. F, $kl^{-/-}$ mice, von Kossa staining. Arrowhead in F indicates calcium (stained by von Kossa staining). Bar, 20 μ m.

280-kDa protein band was subjected to in-gel lysylendopeptidase digestion (22), and the sequences of two of the resulting peptides were determined to be LQTASDESYK and KHEAFETDFTVHK by a combination of Edman degradation and mass spectrometry. A data base search of protein sequences revealed that these peptide sequences were homologous to those of human α_{11} -spectrin (GenBankTM accession number AAB41498).

A Western blot using an anti- α_{11} -spectrin antibody (C-20) confirmed that the 280-kDa protein is α_{11} -spectrin and that the reactivity of the antibody was drastically decreased in $kl^{-/-}$ mice (Fig. 1B). The antibody also stained a 145-kDa band in $kl^{-/-}$ mice, but this band was below the detectable level in $kl^{+/+}$ mice (Fig. 1B). Because the anti- α_{11} -spectrin antibody recognizes the C terminus of α_{11} -spectrin, it is likely that the 145-kDa band is a C-terminal fragment of α_{11} -spectrin. Although the kidney of 4-week-old $kl^{-/-}$ mice was not morphologically different from that of $kl^{+/+}$ mice, it did show a small amount of calcification (Fig. 1, C–F).

Decrement of α_{11} -Spectrin and Calpastatin with Increased Activation of μ -Calpain— α_{11} -Spectrin was previously shown to be cleaved at a particular site by calpain (29), yielding 136- and 148-kDa fragments. To determine whether calpain is involved

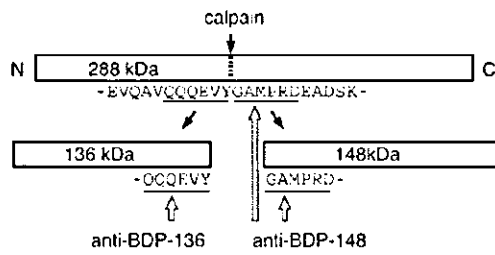


FIG. 2. Design of synthetic peptides for antibodies to the 136- and 148-kDa fragments of α_{II} -spectrin cleaved by calpain. Antigenic peptides were designed to correspond to the C-terminal sequence (QQQEVY) of the 136-kDa fragment and the N-terminal sequence (GAMPRD) of the 148-kDa fragment of α_{II} -spectrin cleaved by calpain.

in proteolysis of α_{II} -spectrin in the kidney of *kl*^{-/-} mice, we prepared specific antibodies to sequences on either side of the cleavage site (Fig. 2). The anti-BDP-136 antibody, which was produced against a sequence (QQQEVY) in the C-terminal region of BDP-136, recognized only the 136-kDa fragment of α_{II} -spectrin. BDP-136 was detected only in *kl*^{-/-} mice (Fig. 3A). On the other hand, the anti-BDP-148 antibody, which was produced against a sequence (GAMPRD) in the N-terminal region of BDP-148, recognized not only the 148 kDa fragment but also full-length α_{II} -spectrin. BDP-148 was detected only in *kl*^{-/-} mice (Fig. 3B). These results indicated that α_{II} -spectrin was degraded by calpain in the kidney of *kl*^{-/-} mice.

To determine which of the calpain isozymes were activated in the *kl*^{-/-} kidney, we made a Western blot of kidney cytosolic fractions using antibodies against four types of calpain: the inactive and active forms of μ -calpain (pre- and post- μ -calpain) and the inactive and active forms of m-calpain (pre- and post-m-calpain). Pre- μ -calpain was detected in *kl*^{+/+} mice but not in *kl*^{-/-} mice (Fig. 3C). Post- μ -calpain was detected in *kl*^{-/-} mice but not in *kl*^{+/+} mice (Fig. 3D). Pre-m-calpain was detected in both *kl*^{+/+} and *kl*^{-/-} mice with no significant difference between them (Fig. 3E). Post-m-calpain was barely detected in either *kl*^{+/+} or *kl*^{-/-} mice (Fig. 3F). These results indicate that μ -calpain, but not m-calpain, was specifically activated in the *kl*^{-/-} kidney. Interestingly, calpastatin, which is an endogenous inhibitor of calpain, was barely detected in *kl*^{-/-} mice (Fig. 3G). The triplet bands at about 122 kDa in Fig. 3G are probably alternative splicing forms of calpastatin (30).

The expression levels of mRNAs of calpastatin (Fig. 3H) and α_{II} -spectrin (Fig. 3I) were not different between *kl*^{-/-} and *kl*^{+/+} mice, which suggests that the decreases of calpastatin and α_{II} -spectrin in *kl*^{-/-} mice were due to increased degradation rather than a down-regulation of transcription.

Activation of μ -Calpain Depends on *Klotho* Protein Level—To elucidate the relation between the amount of *Klotho* protein and the degree of μ -calpain activation, we examined the mouse heterozygotes for the *klotho* mutation (*kl*^{+/-}). The expression level of *Klotho* protein in 2-week-old *kl*^{+/-} mice (Fig. 4A, lane 2), was approximately half that in 2-week-old *kl*^{+/+} mice (lane 1). A similar relation was found in 3-week-old mice (lanes 5 and 4, respectively). The levels of expression of pre- μ -calpain, post- μ -calpain, and calpastatin in 2-week-old *kl*^{+/-} mice (lane 2) were intermediate between those of *kl*^{+/+} mice (lane 1) and those of *kl*^{-/-} mice (lane 3). Similar results were obtained in 3-week-old mice (lanes 5, 4, and 6, respectively). These results showed that the expression level of *Klotho* protein affected the activation of μ -calpain and the amount of calpastatin (Fig. 4B).

To elucidate the process of calpain activation, calpastatin decrement, and α_{II} -spectrin proteolysis, we examined mice that were less than 4 weeks old. In *kl*^{-/-} mice, pre- μ -calpain and calpastatin were present at low levels at 2 weeks (Fig. 4A, lane

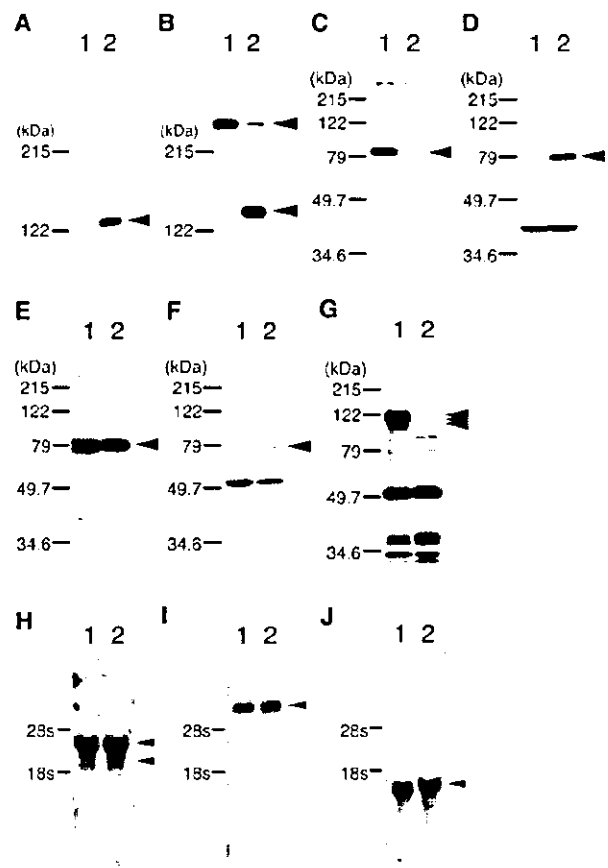


FIG. 3. Changes of α_{II} -spectrin, μ -calpain, and calpastatin in the *kl*^{-/-} kidney. A and B. Western blots of kidney cytosolic fractions of 4-week-old male mice using antibodies. A, anti-BDP-136 antibody. B, anti-BDP-148 antibody. C–G. Western blots of kidney cytosolic fractions of 4-week-old male mice using antibodies. C, anti-pre- μ -calpain antibody; D, anti-post- μ -calpain antibody; E, anti-pre-m-calpain antibody; F, anti-post-m-calpain antibody; G, anti-calpastatin antibody. H–J. Northern blot analyses of 4-week-old mice kidney. H, α_{II} -spectrin. I, calpastatin. J, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Lanes 1, *kl*^{+/+}; lanes 2, *kl*^{-/-}. Arrowheads indicate the positions of the corresponding molecules. Molecular mass markers or ribosomal RNA bands are indicated on the left.

3) but were undetectable at 3 weeks (lane 6), while the amount of cleaved α_{II} -spectrin was much higher at 3 weeks (lane 6) and 4 weeks than at 2 weeks (lane 3). In 2- and 3-week-old *kl*^{+/-} mice (lanes 2 and 5), the amount of cleaved α_{II} -spectrin was much higher at 3 weeks (lane 5) than at 2 weeks (lane 2), while the levels of pre- μ -calpain and calpastatin at 3 weeks were slightly less than those at 2 weeks. These findings suggest that: 1) pre- μ -calpain and calpastatin were originally expressed in *kl*^{-/-} mouse kidney and that μ -calpain was gradually activated and calpastatin was gradually decreased during development, and 2) α_{II} -spectrin was hardly cleaved in the presence of calpastatin, but intensive cleavage of α_{II} -spectrin was observed after the complete disappearance of calpastatin (Fig. 4B). No calcification was observed in 3-week-old *kl*^{-/-} mice (data not shown), indicating that degradation of α_{II} -spectrin in the kidney of *kl*^{-/-} mice preceded the occurrence of any tissue damage.

Organ-specific Calpain Activation—The susceptibility and degree of proteolysis due to the *klotho* mutation varied among different organs. Changes in the lung of 4-week-old *kl*^{-/-} mice (Fig. 5) were similar to those observed in the kidney. The intensity of intact α_{II} -spectrin drastically decreased and lower

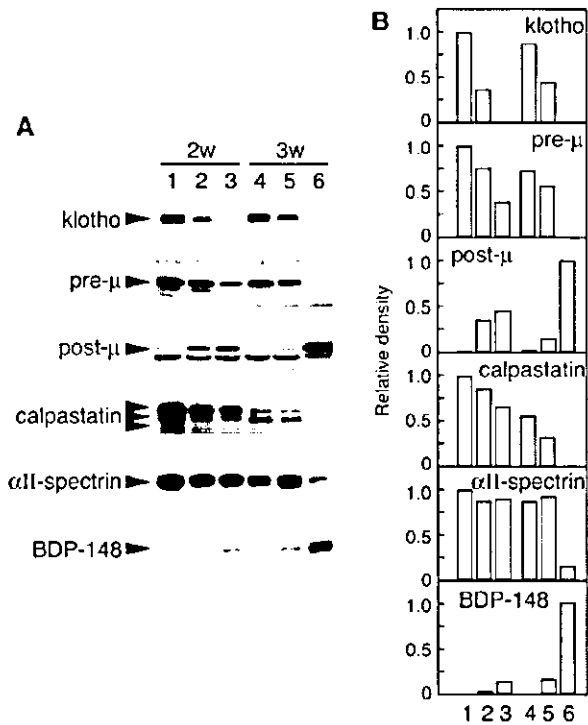


FIG. 4. Dependence of calpain, calpastatin, and α_{II} -spectrin on Klotho protein. A, Western blots of kidney cytosolic and microsomal fractions of 2- and 3-week-old male mice using anti-Klotho antibody and other antibodies described in Fig. 3. Lanes 1 and 4, $kl^{+/+}$; lanes 2 and 5, $kl^{-/-}$; lanes 3 and 6, $kl^{+/-}$. Arrowheads indicate the positions of each molecule. B, intensities of bands in A were measured by densitometric scanning using a densitometer and NIH Image 1.61/ppc software.

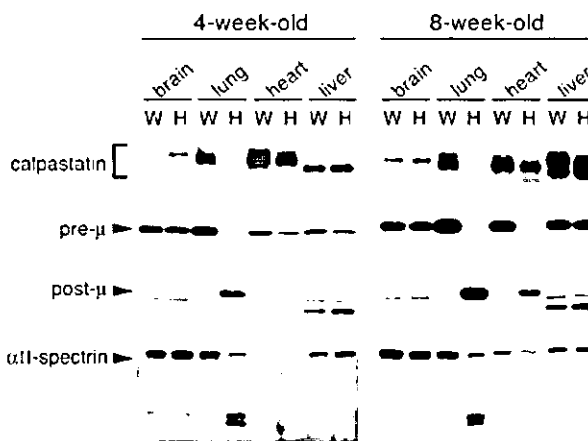


FIG. 5. Organ-specific differences in calpastatin, calpain, and α_{II} -spectrin between $kl^{+/+}$ and $kl^{-/-}$ mice. Western blots of organ extracts of 4- and 8-week-old male mice with antibodies. Lanes W, $kl^{+/+}$; lanes H, $kl^{-/-}$.

molecular weight bands newly appeared. In addition, post- μ -calpain, but not pre- μ -calpain, was detected, suggesting that significant proteolysis occurred in the lung. It may be relevant to that the first observation of the pulmonary emphysematous changes occurs at 4 weeks of age in $kl^{-/-}$ mice (31). In the heart, partial activation of calpain was observed at 4 weeks, and only post- μ -calpain was detected at 8 weeks. However, α_{II} -spectrin was not cleaved in the heart. These results suggest that the heart has a sufficient amount of calpastatin to prevent

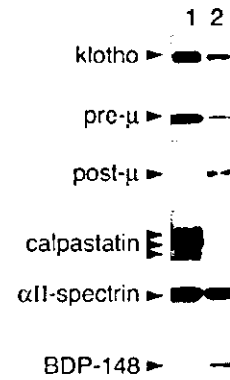


FIG. 6. Changes in the kidney of aged normal mice. Western blots of 4-week-old (lane 1) and 29-month-old (lane 2) C57BL/6 mice. Antibodies are described in the legend to Fig. 4. Arrowheads indicate the positions of the corresponding molecules.

α_{II} -spectrin degradation. On the other hand, no α_{II} -spectrin degradation or calpain activation was observed in the brain or liver at 8 weeks.

Calpain Activation in Aged Normal Mice—Changes similar to those observed in $kl^{-/-}$ mice occurred in aged normal (C57BL/6) mice. As normal mice aged from 4 weeks to 29 months, the expression of Klotho protein decreased, the activation of μ -calpain increased, the level of calpastatin considerably decreased, and the degradation of α_{II} -spectrin increased (Fig. 6). Similar changes were observed in five other mice.

DISCUSSION

Our results show that the aberrant activation of μ -calpain and the decrease of calpastatin in the kidney are caused by the *klotho* mutation, and such changes lead to the cleavage of α_{II} -spectrin. These phenomena are well correlated with the expression level of Klotho protein. Our results also show that similar changes in μ -calpain, calpastatin, and α_{II} -spectrin occur in normal aged mice. The abnormal activation of μ -calpain in the kidney occurs at an early age: in $kl^{-/-}$ mice, changes in μ -calpain activation and α_{II} -spectrin degradation started to occur one to 2 weeks before the appearance of abnormal phenotypes, and in $kl^{+/-}$ mice, μ -calpain was gradually activated as they aged, even though these mice have a normal phenotypic appearance.

Our finding that μ -calpain, but not m-calpain, was activated in the kidney of $kl^{-/-}$ mice suggests that the concentration of intracellular calcium ions in these mice is in the micromolar range. Normally calpain is activated temporarily and calpain-catalyzed proteolysis leads to modulation rather than destruction of the substrate proteins. Therefore, continuous activation of μ -calpain is unusual and elucidation of the mechanism is essential to understanding its pathophysiological role. One possible mechanism is that μ -calpain overactivation causes a deficiency of calpastatin, and another is that a decrease in calpastatin causes an increase in μ -calpain activation. Since the transcription levels of calpastatin are the same in $kl^{-/-}$ and $kl^{+/+}$ mice, the latter possibility is unlikely, but we cannot completely rule it out. μ -Calpain activity, in addition to being regulated by the calcium ion concentration, is usually also regulated by the binding of calpastatin (16). Thus, a deficiency of calpastatin may induce the overdestruction of substrates such as α_{II} -spectrin by calpain. The mechanism by which Klotho protein might regulate μ -calpain activity and calpastatin level in the kidney is unknown. However, it is possible that this regulation is mediated by nitric oxide (NO). NO has been shown to inhibit calpain-mediated proteolysis (32), and sys-

temic NO synthesis is decreased in $kl^{-/-}$ mice (33, 34). Furthermore, adenovirus-mediated *klotho* gene delivery increased NO production and restored vascular endothelial dysfunction (35). It is noteworthy that calpain overactivation in $kl^{-/-}$ mice is not caused by ischemia due to arteriosclerosis, while ischemia would cause overactivation of calpain (13). A previous study revealed that, in $kl^{-/-}$ mice, arteriosclerosis first appeared around 4 weeks after birth and progressed gradually with age (1). However, in the lung and kidney in $kl^{-/-}$ mice, arteriosclerosis could not be the cause of overactivation of μ -calpain, because the latter occurred as early as 2–3 weeks.

The degree of proteolysis and of activation of calpain caused by the *klotho* mutation varied among different organs. Both α_{II} -spectrin degradation and calpain activation were observed in the kidney and lung as early as 2–3 weeks. Spectrin was not cleaved in the heart even at 8 weeks, while overactivation of calpain was observed. The time course of activation of calpain in the heart seemed to be proceeded slower than in the lung and kidney. However, it is impossible to examine this possibility, because $kl^{-/-}$ mice die at ~8–9 weeks (1). On the other hand, no α_{II} -spectrin degradation or calpain activation was observed in the brain or liver at 8 weeks. In addition, an organ's susceptibility to the *klotho* mutation did not necessarily correspond to its expression of *klotho* mRNA. Taken together, these results suggest that Klotho protein or its metabolites may function as a humoral factor. In support of this hypothesis, both mice and human have a secretory form of Klotho protein (28, 36, 37), and the exogenous *klotho* gene expressed in the brain and testis could improve systemic aging phenotypes in $kl^{-/-}$ mice (1, 38). It is important to identify and characterize a target molecule (receptor) that is responsive to Klotho protein or its metabolites. Thus, it may be that the factor most responsible for an organ's sensitivity to the *klotho* mutation is the density of such a receptor.

Our finding that normal aged mice show changes similar to those in $kl^{-/-}$ mice suggests that the decrease of Klotho protein is closely related to aging processes. Recent studies revealed that the expression of *klotho* gene was gradually reduced in the rat kidney during long term hypertension (39) and that calpastatin was gently degraded also in the kidney of hypertensive rats (40). Furthermore, humans with chronic renal failure commonly develop multiple complications resembling phenotypes observed in $kl^{-/-}$ mice (41–45), and the expression of *klotho* mRNA and the production of Klotho protein were severely reduced in these patients (46). Taken together, these results suggest that Klotho protein in the kidney protects the progress of age-related renal disorders.

Based on the above results, we propose that tissue deterioration during aging is caused by a decrease of Klotho protein, which leads to a decrease of calpastatin and activation of μ -calpain, which leads to a degradation of cytoskeletal components such as spectrin. The magnitude of each of these effects correlates with the amount of Klotho expression. A decrease of calpastatin accelerates the activation of μ -calpain and vice versa. Such deterioration may trigger tissue abnormalities in $kl^{-/-}$ mice and aged mice, but Klotho protein may suppress these processes, while the detailed mechanism is not clear yet. Very recently Yoshida *et al.* (47) reported that calcium and phosphorus homeostasis could be regulated through Klotho function via the action of 1,25-dihydroxyvitamin D due to the impaired regulation of 1 α -hydroxylase gene expression. This deterioration in the vitamin D₃ endocrine system may participate in many of the phenotypes in $kl^{-/-}$ mice via toxicity due to increased levels of calcium, phosphorus, and 1,25-dihydroxyvitamin D. It should be noted that when serum concentrations of calcium, phosphorus, and 1,25-dihydroxyvitamin D are re-

stored to normal levels, many of phenotypes are improved despite Klotho protein deficiency.¹ Thus, Klotho protein may be a regulator of calcium homeostasis via the vitamin D₃ endocrine system. Alternatively, based on the homology to β -glucosidase (1, 2), Klotho protein may function as a glycosidase-like enzyme and modify the glycan moieties of ion channels. Since it is known that glycosylation appears important for the function of ion channels (48–50), the change of glycosylation may affect calcium homeostasis. In any case, the abnormal activation of calpain due to the decrease of Klotho protein leads to degradation of cytoskeletal elements such as α_{II} -spectrin is likely to be integral to the pathogenic sequence in $kl^{-/-}$ mice and recapitulates effects seen in normal aging. Future studies are needed to determine the definitive role of Klotho protein in the regulation of calcium metabolism as well as of intracellular calcium concentration. Such studies will also lead to a better understanding of age-related renal abnormalities and to prevent renal diseases in the future.

Acknowledgments—We thank Dr. Koichi Suzuki and Dr. Akira Kobata for helpful discussions.

REFERENCES

- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohshima, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., and Nabeshima, Y. I. (1997) *Nature* **390**, 45–51
- Grabnitz, F., Seiss, M., Rucknagel, K. P., and Staudenbauer, W. L. (1991) *Eur. J. Biochem.* **200**, 301–309
- Winkelmann, J. C., and Forget, B. G. (1993) *Blood* **81**, 3173–3185
- Goodman, S. R., Zimmer, W. E., Clark, M. B., Zagon, I. S., Barker, J. E., and Bloom, M. L. (1995) *Brain Res. Bull.* **36**, 593–606
- De Matteis, M. A., and Morrow, J. S. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 2331–2343
- Beck, K. A., and Nelson, W. J. (1996) *Am. J. Physiol.* **270**, C1263–C1270
- Hannmarlund, M., Davis, W. S., and Jorgensen, E. M. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 931–942
- Moorthy, S., Chen, L., and Bennett, V. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 915–930
- Dubreuil, R. R., Wang, P., Dahl, S., Lee, J., and Goldstein, L. S. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 647–656
- Blomgren, K., Zhu, C., Wang, X., Karlsson, J. O., Leverin, A. L., Bahr, B. A., Mallard, C., and Hagberg, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10191–10198
- Doctor, R. B., Bennett, V., and Mandel, L. J. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, C1003–C1013
- Saïdo, T. C., Yokota, M., Nagao, S., Yamaura, I., Tani, E., Tsuchiya, T., Suzuki, K., and Kawashima, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25239–25243
- Tsuji, T., Ohga, Y., Yoshikawa, Y., Sakata, S., Abe, T., Tabayashi, N., Kobayashi, S., Kohzaki, H., Yoshida, K. I., Suga, H., Kitamura, S., Taniguchi, S., and Takaki, M. (2001) *Am. J. Physiol.* **281**, H1286–H1294
- Vanderklisch, P. W., and Bahr, B. A. (2000) *Int. J. Exp. Pathol.* **81**, 323–339
- Carafoli, E., and Molinari, M. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 193–203
- Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) *Biochem. J.* **328**, 721–732
- Bednarski, E., Vanderklisch, P., Call, C., Saïdo, T. C., Bahr, B. A., and Lynch, G. (1995) *Brain Res.* **694**, 147–157
- Liu, X., Rainey, J. J., Harriman, J. F., and Schnellmann, R. G. (2001) *Am. J. Physiol.* **281**, F728–F738
- Liu, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., and Tsai, L. H. (2000) *Nature* **405**, 360–364
- Wang, K. K., and Yuen, P. W. (1994) *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 412–419
- Nakamura, M., Inomata, M., Imajoh, S., Suzuki, K., and Kawashima, S. (1989) *Biochemistry* **28**, 449–455
- Masaki, T., Tanabe, M., Nakamura, K., and Soejima, M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **660**, 44–50
- Saïdo, T. C., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Sorimachi, H., Murofushi, H., Tsuchiya, T., Ito, H., and Suzuki, K. (1992) *J. Biochem. (Tokyo)* **111**, 81–86
- Imajoh, S., Aoki, K., Ohno, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Sugihara, H., and Suzuki, K. (1988) *Biochemistry* **27**, 8122–8123
- Brown, N., and Crawford, C. (1993) *FEBS Lett.* **322**, 65–68
- Sri Widada, J., Asselin, J., Colote, S., Marti, J., Ferraz, C., Trave, G., Haiech, J., and Liautard, J. P. (1989) *J. Mol. Biol.* **205**, 455–458
- Asada, K., Ishino, Y., Shimada, M., Shimojo, T., Endo, M., Kimizuka, F., Kato, I., Maki, M., Hatanaka, M., and Murachi, T. (1989) *J. Enzyme Inhib.* **3**, 49–56
- Kato, Y., Arakawa, E., Kinoshita, S., Shirai, A., Furuya, A., Yamano, K., Nakamura, K., Iida, A., Anazawa, H., Koh, N., Iwano, A., Imura, A., Fujimori, T., Kuro-o, M., Hanai, N., Takeshige, K., and Nabeshima, Y. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 597–602
- Harris, A. S., Croall, D. E., and Morrow, J. S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15754–15761
- Takano, J., Kawamura, T., Murase, M., Hitomi, K., and Maki, M. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 339–345

¹ T. Fujimori, H. Tsujikawa, and Y. Nabeshima, unpublished results.

31. Suga, T., Kurabayashi, M., Sando, Y., Ohyama, Y., Maeno, T., Maeno, Y., Aizawa, H., Matsumura, Y., Kuwaki, T., Kuro, O. M., Nabeshima, Y., and Nagai, R. (2000) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 26–33
32. Koh, T. J., and Tidball, J. G. (2000) *Am. J. Physiol.* **279**, C806–C812
33. Saito, Y., Yamagishi, T., Nakamura, T., Ohyama, Y., Aizawa, H., Suga, T., Matsumura, Y., Masuda, H., Kurabayashi, M., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., and Nagai, R. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 324–329
34. Nagai, R., Saito, Y., Ohyama, Y., Aizawa, H., Suga, T., Nakamura, T., Kurabayashi, M., and Kuroo, M. (2000) *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 733–746
35. Saito, Y., Nakamura, T., Ohyama, Y., Suzuki, T., Iida, A., Shiraki-lida, T., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Kurabayashi, M., and Nagai, R. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 767–772
36. Matsumura, Y., Aizawa, H., Shiraki-lida, T., Nagai, R., Kuro-o, M., and Nabeshima, Y. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 626–630
37. Shiraki-lida, T., Aizawa, H., Matsumura, Y., Sekine, S., Iida, A., Anazawa, H., Nagai, R., Kuro-o, M., and Nabeshima, Y. (1998) *FEBS Lett.* **424**, 6–10
38. Shiraki-lida, T., Iida, A., Nabeshima, Y., Anazawa, H., Nishikawa, S., Noda, M., and Kuro-o, M. (2000) *J. Gene Med.* **2**, 233–242
39. Aizawa, H., Saito, Y., Nakamura, T., Inoue, M., Imanari, T., Ohyama, Y., Matsumura, Y., Masuda, H., Oba, S., Mise, N., Kimura, K., Haegawa, A., Kurabayashi, M., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., and Nagai, R. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 865–871
40. Averna, M., De Tullio, R., Salamino, F., Minafra, R., Pontremoli, S., and Melloni, E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 38426–38432
41. London, G. M., and Drueke, T. B. (1997) *Kidney Int.* **51**, 1678–1695
42. Rostand, S. G., and Drueke, T. B. (1999) *Kidney Int.* **56**, 383–392
43. Milliner, D. S., Zinsmcister, A. R., Lieberman, E., and Landing, B. (1990) *Kidney Int.* **38**, 931–936
44. Urena, P., and De Vernejoul, M. C. (1999) *Kidney Int.* **55**, 2141–2156
45. Kuizon, B. D., and Salusky, I. B. (1999) *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1680–1690
46. Koh, N., Fujimori, T., Nishiguchi, S., Tamori, A., Shiomi, S., Nakatani, T., Sugimura, K., Kishimoto, T., Kinoshita, S., Kuroki, T., and Nabeshima, Y. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1015–1020
47. Yoahida, T., Fujimori, T., and Nabeshima, Y. (2002) *Endocrinology* **143**, 683–689
48. Gurnett, C. A., De Waard, M., and Campbell, K. P. (1996) *Neuron* **16**, 431–440
49. Thornhill, W. B., Wu, M. B., Jiang, X., Wu, X., Morgan, P. T., and Margiotta, J. F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19093–19098
50. Bennett, E., Urean, M. S., Tinkle, S. S., Koszowski, A. G., and Levinson, S. R. (1997) *J. Gen. Physiol.* **109**, 327–343

【総説】

Klotho 遺伝子による proteolysis の制御と老化

萬谷 博、遠藤 玉夫

東京都老人総合研究所 糖蛋白質研究グループ

要約

Klotho 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* 遺伝子及び遺伝子産物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。筆者らは、*klotho* 遺伝子の変異による各臓器の蛋白質レベルでの変化を解析し、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。

キーワード : *klotho*, calpain, calpastatin, spectrin, calcium homeostasis

1. はじめに

急激に高齢化が進む日本において、高齢者を疾患から守り、高齢者の生活の質 (Quality of life) を高くすることは現代医療の最重要課題の一つである。そのため、老化の分子機構の解明に多くの期待が寄せられているが、老化には環境的要因や遺伝的要因が複雑に関与していることから、その機構を理解し研究することは大変難しい。近年、線虫の寿命決定遺伝子やヒト早老症遺伝子の同定など、著しい遺伝子解析技術の進展を背景に、老化機構がようやく分子レベルで語られるようになってきたが、高度に分化した細胞によって構築されている多細胞生物の老化過程は未だ良く分かっていない。

1997年、鍋島らによって、単一遺伝子欠損により多彩なヒト老化症状を呈する変異マウスが作成された¹⁾。その原因遺伝子が同定され *klotho* と命名されたことから、そのマウスは *Klotho* マウスと呼ばれている。*Klotho* マウスは寿命が8~10週と短く、その短い寿命の間に骨粗鬆症や動脈硬化というようなヒトの老化症状に類似した多彩な症状を示す。この表現型は一種の早老症と考えられ、ヒト老化のモデル動物としての可能性が注目されて

いる。このマウスに見られる多様な病態が、*klotho* というたった一つの遺伝子の下流で制御されていることは非常に興味深い。また、ヒトの *klotho* 遺伝子座に SNPs (single nucleotide polymorphisms) がいくつか見つかри、それらの遺伝子型が寿命の長さに影響することが報告されるなど²⁾、ヒトの老化においても *klotho* 遺伝子の関与が明らかにされつつある。これらのことから、*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。

最近、筆者らは *Klotho* マウスの解析から、*Klotho* マウスでは臓器特異的に蛋白質分解酵素の一種である calpain の異常な活性亢進が起こっており、spectrin 等の細胞骨格系が著しく分解されていることを明らかにした³⁾。さらに、自然老化マウスでも *Klotho* 蛋白質の減少に伴って同様の活性化が起こることを明らかにし、*Klotho* 蛋白質の発現減少による calpain 制御機構の破綻が老化に伴う様々な疾患の原因となっている可能性を示した³⁾。

本稿では、*Klotho* 蛋白質が calpain の活性制御に関与しているという新知見を中心に、*klotho* 遺伝子と老化の関係について述べる。

2. *klotho* 遺伝子と *Klotho* 蛋白質

Klotho マウスは *klotho* 遺伝子の上流における外来遺伝

連絡先 : 〒 173-0015 東京都板橋区栄町 35-2
Tel: 03-3964-3241; fax: 03-3579-4776
E-mail : manya@tmig.or.jp

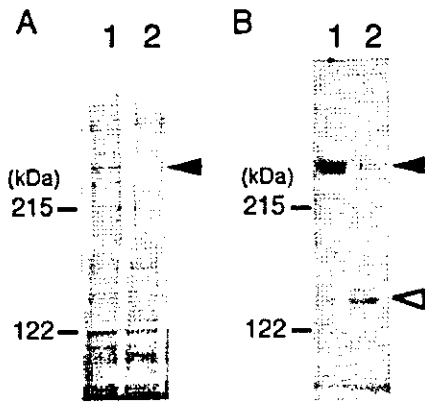


Fig. 1. Decrease of α_{II} -spectrin in the $klf^{-/-}$ kidney. (A) SDS-PAGE of kidney microsomal fractions of 4-week-old male mice, stained with Coomassie Blue. (B) Western blot analysis of gel assessed with anti- α_{II} -spectrin (C-20) antibody. Lane 1, $klf^{+/+}$; lane 2, $klf^{-/-}$. Arrowheads indicate the position of α_{II} -spectrin. Open triangle in *b* indicates the position of the degraded product of α_{II} -spectrin. Molecular mass markers are indicated on the left.

子の挿入突然変異によって *klotho* 遺伝子の発現が停止したマウスである¹⁾。ヒトの多彩な老化症状に類似した変異表現型を示すことから、老化モデル動物として個体老化の研究に用いられるようになった。Klotho 蛋白質は β -glucosidase と相同性を有する 2 つのドメインから構成され、膜結合型及び分泌型として発現している^{1,4)}。Klotho 遺伝子の発現は腎尿細管、脳の脈絡膜、副甲状腺、心臓の一部に限局している。変異マウスでは *klotho* 遺伝子の発現部位と異常が生じる組織が一致しないことから、Klotho 蛋白質は分泌型として機能することが予想されている。

3. *klotho* 遺伝子の変異と α_{II} -spectrin の分解

Klotho 蛋白質の機能を知る手掛かりを得るための最初

のアプローチとして、筆者らは、*klotho* 遺伝子の変異による蛋白質レベルでの変化について網羅的な解析を試みた。その結果、4週齢の野生型マウス($klf^{+/+}$)とホモ変異型マウス($klf^{-/-}$)を比較したところ、腎臓の約280kDaの蛋白質が $klf^{-/-}$ マウスで著しく減少していることを見いだした (Fig. 1A)。この蛋白質をアミノ酸シーケンス及び質量分析計により同定し α_{II} -spectrinであることを明らかにした。さらに、抗 α_{II} -spectrin抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、 $klf^{-/-}$ マウス腎臓では α_{II} -spectrinの消失と同時に約150kDaの蛋白質が新たに検出されることが分かった (Fig. 1B)。この蛋白質は α_{II} -spectrinの分解物と考えられ、 $klf^{-/-}$ マウスの腎臓では α_{II} -spectrinの分解が著しく亢進しているものと推測される。このとき (4週齢) の $klf^{-/-}$ マウスの腎臓組織染色において、石灰化や組織の損傷、構造の異常がないことが確認されたことから、 $klf^{-/-}$ マウスにおける α_{II} -spectrinの分解は組織の傷害等に先立って起こり、腎障害の要因となっていることが示唆された。

α_{II} -spectrinは非赤血球型spectrinの構成分子であり、 β_{II} -spectrinとヘテロ二量体を形成して存在する。spectrinは形質膜の内側でアクチン等と結合して細胞骨格系を構成する細胞の裏打ち蛋白質として知られており、赤血球に存在する赤血球型とそれ以外の細胞に存在する非赤血球型とに区別される^{5,6)}。spectrinの機能としては一般的に細胞の極性や形体の維持に関与すると考えられているが⁷⁾、最近、spectrinには細胞表面の様々な蛋白質を細胞膜の裏側から支えて、それらの特異的な領域に安定に保持させる働きがあることが報告されている^{8,10)}。

4. *Klotho* 遺伝子の変異と μ -calpain の異常活性化

α_{II} -spectrinはcalpain (細胞質に存在するカルシウム依存性cysteine protease)によって分解されることが知られている。その分解作用によって約140kDaと約150kDaの分解産物を生じることが報告されていることから¹²⁾、 $klf^{-/-}$ マウスにおける α_{II} -spectrinの分解にcalpainが関与し

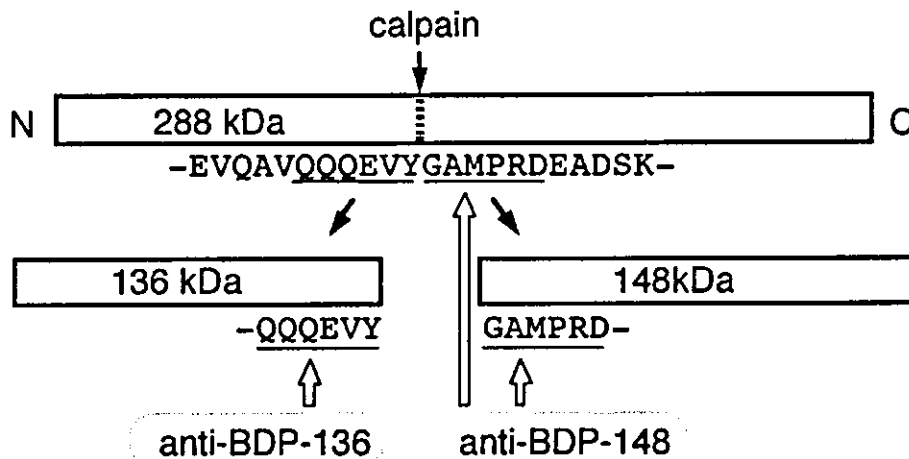


Fig. 2. Design of synthetic peptides for antibodies to the 136 kDa and 148 kDa fragments of α_{II} -spectrin cleaved by calpain. Antigenic peptides were designed to correspond the C-terminal sequence (QQQEVY) of the 136 kDa fragment and the N-terminal sequence (GAMPRD) of the 148 kDa fragment of α_{II} -spectrin cleaved by calpain.

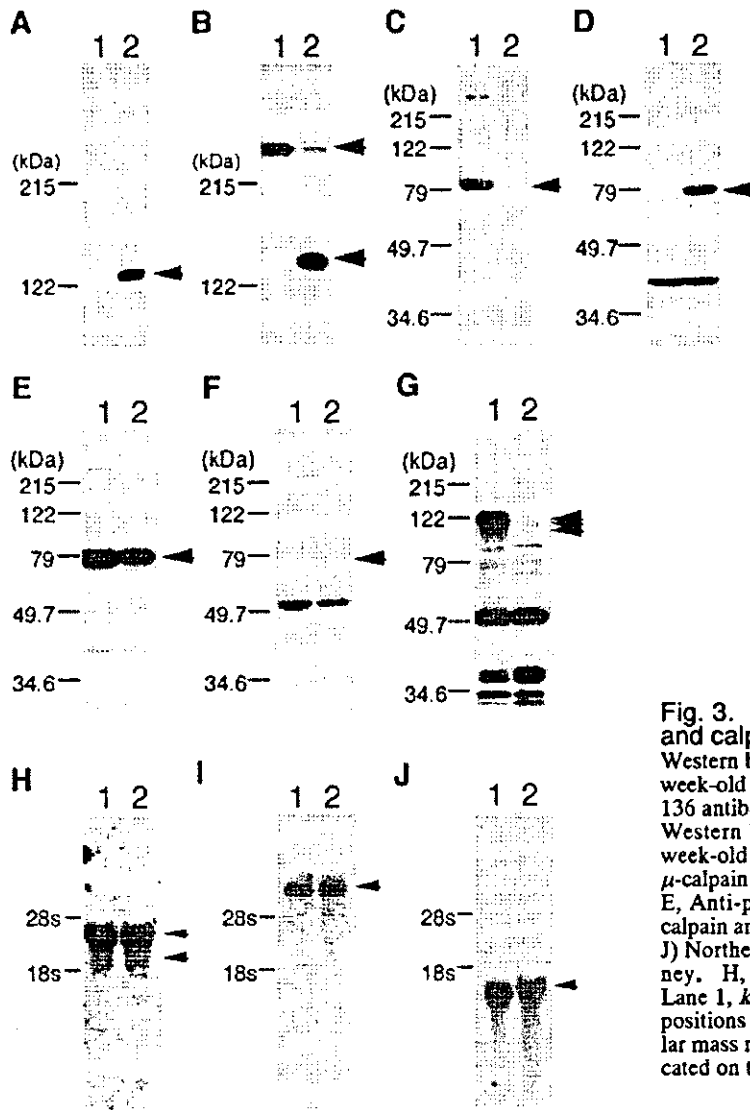


Fig. 3. Changes of α_{II} -spectrin, μ -calpain and calpastatin in the k^{fl} kidney. (A and B) Western blots of kidney microsomal fractions of 4-week-old male mice using antibodies. A, Anti-BDP-136 antibody. B, Anti-BDP-148 antibody. (C-G) Western blots of kidney cytosolic fractions of 4-week-old male mice using antibodies. C, Anti-pre- μ -calpain antibody, D, Anti-post- μ -calpain antibody, E, Anti-pre- m -calpain antibody, F, Anti-post- m -calpain antibody, G, Anti-calpastatin antibody. (H-J) Northern blot analyses of 4-week-old mice kidney. H, Calpastatin. I, α_{II} -Spectrin. J, G3PDH. Lane 1, $k^{fl/kfl}$; lane 2, k^{fl} . Arrowheads indicate the positions of the corresponding molecules. Molecular mass markers or ribosomal RNA bands are indicated on the left.

ているか検討した。 α_{II} -spectrin上のcalpainによって切断される部分のアミノ酸配列が報告されているので¹²⁾、まず、calpainにより切断されて生じるペプチド断片の新たな末端部分のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体 (Fig. 2) を作成した。この抗体を用いたウェスタンブロットから、 k^{fl} マウスにおける α_{II} -spectrin分解はcalpainによることが判明した (Fig. 3A, B)。

calpainは α_{II} -spectrin等の細胞骨格系をはじめ細胞内の様々な蛋白質の分解反応に関与し、その分解反応がapoptosisやnecrosisなどの細胞死を誘導するシグナル伝達の引き金となることが多数報告されている¹³⁻¹⁸⁾。また、生体内における様々な生理現象や病態への関与が示されている¹⁹⁻²³⁾。哺乳類において組織普遍的に発現しているcalpainには2種のisozymeが存在し、*in vitro*での活性化に必要なカルシウム濃度が μ Mレベルの μ -calpainとmMレベルの m -calpainに区別される。これらのcalpainの活性化機構については未だ不明な点が多いが、N末端の自己消化により活性化になる機構が知られている^{21, 24-26)}。

そこで、 k^{fl} マウスの腎臓におけるcalpainの活性化について調べた (Fig. 3C-F)。その結果、 α_{II} -spectrinの分解が起こっていた4週齢の k^{fl} マウスの腎臓では μ -calpainがほぼ完全に活性化型になっていることが明らかとなった。一方、 m -calpainの活性化型はほとんど検出されなかった。通常calpainの活性化は分子全体の1~2%に留まり、一過性のカルシウムイオンの細胞内への流入により説明されており、今回の解析で観察された μ -calpainの異常な活性化は驚くべき結果である。また、通常の活性化は一時的であり、細胞内に存在するcalpastatinによって速やかに不活性化され、過剰な活性化が起こらないように巧みに制御されている。calpastatinはそれ自身がcalpainの基質となることで強力な阻害物質となることから、calpainに特異的な内在性調節蛋白質であると考えられている^{21, 27)}。興味深いことに、 k^{fl} マウス (4週齢) の腎臓ではcalpastatinの消失も観察された (Fig. 3G)。calpastatinの消失がcalpainの異常な活性化によるものなのか、calpastatinが消失することがcalpain活性化の引き金にな

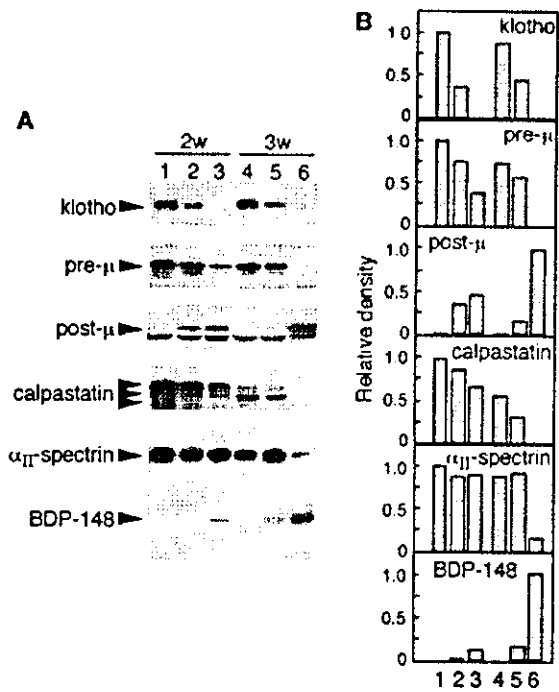


Fig. 4. Dependency of calpain, calpastatin and α_{II} -spectrin on Klotho protein. (A) Western blots of kidney cytosolic and microsomal fractions of 2- and 3-week-old male mice using anti-Klotho antibody and other antibodies described in Fig. 3. Lanes 1 and 4, $kl^{+/+}$; lanes 2 and 5, $kl^{+/}$; lanes 3 and 6, $kl^{/-}$. Arrowheads indicate the positions of each molecule. (B) Intensities of bands in A were measured by densitometric scanning using a densitometer and NIH Image 1.61/ppc software.

るのか、現時点でははっきりとした結論はでていないが、calpastatin mRNA の発現量には $kl^{+/}$ と $kl^{+/}$ マウスの間で差が見られないことから、calpain の強力な活性化によって calpastatin が次々と分解され制御できない状態であると考えられる。

5. Klotho 蛋白質と μ -calpain 活性化の関係

Klotho 蛋白質が μ -calpain の活性制御に関与していることをより明確にするために、異常が現れる以前の若い週齢のマウスとヘテロ変異型マウス ($kl^{+/}$) を用いて解析を行った (Fig. 4)。 $kl^{+/}$ マウスにおける多くの変異表現型は 4 週齢頃から観察されるようになり、3 週齢までは外見上 $kl^{+/}$ と区別がつかず、腎臓の石灰化等も全く観察されない¹⁾。2~3 週齢のマウスについて調べた結果、 $kl^{+/}$ マウスでは 2 週齢頃から μ -calpain の活性化と calpastatin の減少が始まり、3 週齢までには 4 週齢と同程度まで μ -calpain の活性化、calpastatin の消失、 α_{II} -spectrin の分解が進行することが明らかとなった。一方、 $kl^{+/}$ マウスにおける Klotho 蛋白質の発現量は $kl^{+/}$ マウスの約 1/2 程度であった。このとき μ -calpain は $kl^{+/}$ マウスの約半分程度の割合で活性化しており、calpastatin は $kl^{+/}$ マウスより減少していた。このように、Klotho 蛋白質の減少に伴って活性型 μ -calpain が増加していたことから、Klotho 蛋白質の発現量と μ -calpain の活性化には明らかな相関関係があることが示された。つまり、Klotho 蛋白質には μ -calpain の活性化を抑制する働きがあるようである。



Fig. 5. Organ-specific differences in calpastatin, calpain, and α_{II} -spectrin between $kl^{+/}$ and $kl^{/-}$ mice. Western blots of organ extracts of 4- and 8-week-old male mice with antibodies. Lane W, $kl^{+/}$; lane H, $kl^{/-}$.

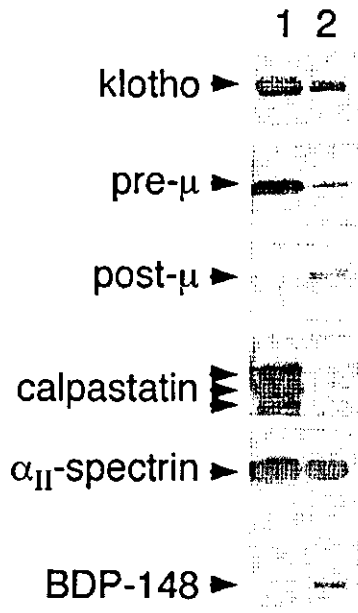


Fig. 6. Changes in the kidney of aged normal mice. Western blots of 4-week-old (lane 1) and 29-month-old (lane 2) C57BL/6 mice. Antibodies are described in Fig. 4. Arrowheads indicate the positions of the corresponding molecules.

また、calpastatinが残存している間は α_{II} -spectrinの分解はほとんど起こっておらず、calpastatinの消失後に分解が亢進することも分かった。*kf*マウスでの外見上の明らかな異常は α_{II} -spectrinの分解が進行した4週齢以降から現れることから、 μ -calpainの活性化が*kf*マウスにおける様々な異常の要因となっている可能性が考えられる。*kf*マウスはほとんど野生型と変わらずに成長し、寿命が少し短いことが分かっているが¹⁾、これもcalpastatinの残量で説明できるかもしれない。

ところで、*Klotho*マウスの血管障害の要因として血管内皮細胞における一酸化窒素(NO)の産生障害が報告されている^{28,29)}。また、アデノウイルスを用いて*Klotho*蛋白質を異所性に発現させるとNO産生が増加し*Klotho*マウスの血管障害が緩和されるということも報告されている³⁰⁾。さらに、NOにはcalpainの蛋白質分解を抑制する効果があることが報告されており³¹⁾、*Klotho*蛋白質によるcalpain活性化の抑制にNOが関与することも考えられる。

6. μ -calpain 活性化の臓器特異性

α_{II} -spectrinの分解が腎臓で見つかった現象であったので、ここまでは腎臓での解析について述べてきた。では、他の臓器ではどうなのか？*kf*マウスの各臓器について調べてみた (Fig. 5)。4及び8週齢マウスを用いたところ、肺において腎臓と同様の現象が観察された。*kf*マウスは4週齢頃から肺気腫様の病変が観察されることが報告されており³²⁾、 μ -calpainの活性化が関与していることが考えられる。一方、脳と肝臓では全く変化は観

察されなかった。心臓では4週齢で非常に弱く μ -calpainが活性化しており、8週齢でほぼ完全に活性化していたが、calpastatinは残っており、 α_{II} -spectrinも分解されていなかった。このように、*kf*マウスにおける μ -calpainの異常活性化には臓器特異性が認められ、腎臓と肺に非常に特異的な現象であることが分かった。先に述べたように*klotho*遺伝子の肺での発現は認められないことから、*Klotho*蛋白質が分泌型として作用し、*Klotho*蛋白質感受性の組織には受容体のようなものが存在することを示唆している。

ところで、腎臓と*klotho*遺伝子の関係について、ヒトの慢性腎疾患では*Klotho*マウスに見られる症状が報告されており^{33,37)}、そのような患者では*klotho*遺伝子の発現低下が認められていること³⁸⁾、高血圧ラットの腎臓では*klotho*遺伝子の発現低下とともにcalpastatinが減少すること^{39,40)}、など興味深い知見がいくつか報告されている。これらの知見から、*Klotho*蛋白質が腎臓の機能維持に作用している可能性も考えられ、*Klotho*蛋白質の機能と老化との関連を考える上で腎臓における機能が重要な鍵となるかも知れない。

7. 自然老化と μ -calpainの活性化

筆者らは*Klotho*マウスを老化モデル動物として解析することにより、老化や老化に関連した疾患の分子機構を明らかにすることを目的としている。そこで、*Klotho*マウスで観察された*Klotho*蛋白質の減少を起因とする μ -calpainを介する蛋白質分解系の亢進現象が自然老化の過程にも関与しているか検討した (Fig. 6)。C57BL/6マウスの4週齢と29月齢を比較したところ、29月齢では*Klotho*蛋白質の発現減少と、 μ -calpainの活性化、calpastatinの消失、 α_{II} -spectrinの分解が観察され、自然老化マウスも*Klotho*マウスと同様の傾向を示すことが明らかとなった。

8. *Klotho*とカルシウム

calpainの活性化という観点から単純に考えると、*Klotho*マウスの腎臓や肺では細胞内カルシウム濃度が上昇していることが予想される。*Klotho*マウスにおいて骨粗鬆症のようなカルシウム・リン酸代謝異常に基づく変異表現型が顕著に観察されることや¹⁾、実際に血清中のカルシウムとリンの濃度が高い傾向にあることなど⁴¹⁾、*klotho*遺伝子の変異によってカルシウムホメオスタシスに異常をきたすことが示されている。最近、*Klotho*マウスでは活性型ビタミンD合成制御機構に異常があることが報告され⁴²⁾、カルシウムホメオスタシス異常の要因と考えられている。また、*klotho*遺伝子の主要な発現部位がカルシウムホメオスタシスの維持に重要な腎尿管、脳の脈絡膜、副甲状腺である点も非常に興味深い。しかし、血清カルシウム濃度が正常よりも高い傾向があることを、細胞内カルシウム濃度上昇の直接の原因として考えるのは些か早計であろう。*Klotho*マウスでのcalpainの活性化に顕著な臓器特異性があることから、*Klotho*に特異的なシグナル伝達機構が存在することが予想される。例えば、*Klotho*蛋白質は β -glucosidaseに相同性があ

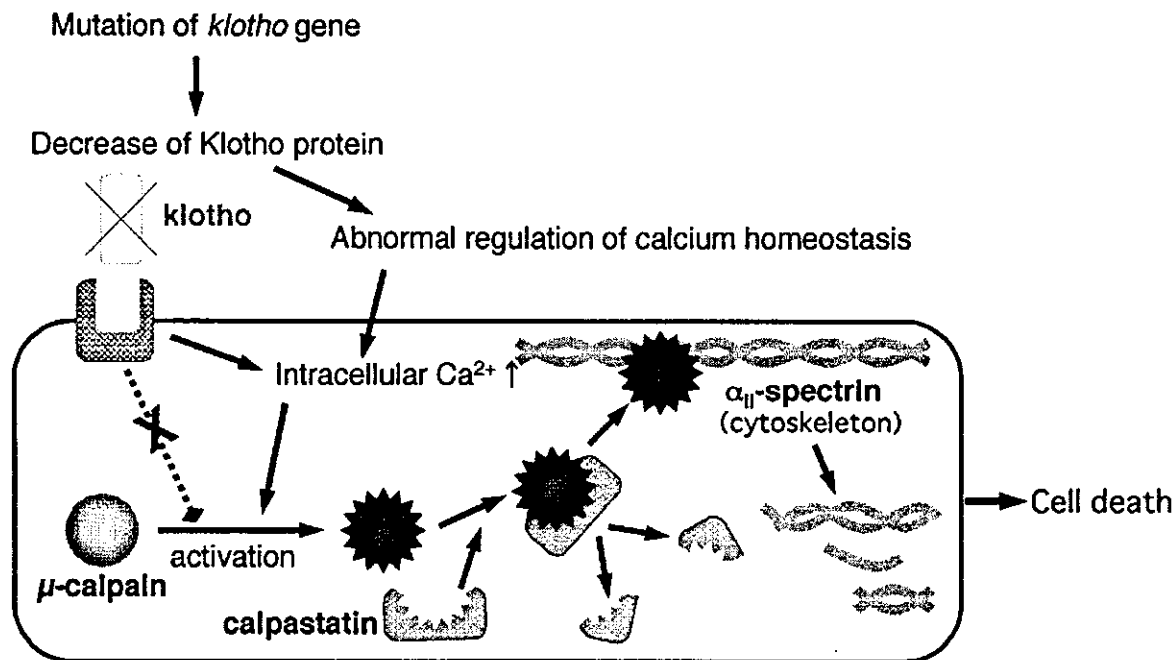


Fig. 7. Klotho protein deficiency leads to overactivation of μ -calpain. The aberrant activation of μ -calpain and the decrease of calpastatin in the kidney are caused by the *klotho* mutation, and such changes lead to the cleavage of α_{II} -spectrin.

るが、酵素活性を有するかは未だ明らかにされていない。糖鎖分解酵素が至適条件以外で糖結合蛋白質として働くことも知られていることから、Klotho蛋白質が特定の糖鎖を認識する可能性が考えられる。全く憶測の域をでないが、Klotho蛋白質がカルシウムチャネル上の糖鎖を認識し、カルシウム透過性等を制御しているのかもしれない。事実、カルシウムチャネルの機能にその糖鎖が影響していることは報告されている⁴²⁻⁴⁴⁾。

9. 結語

Klotho蛋白質がcalpainやカルシウムホメオスタシスの制御に関与することが生化学的に示されたことによって、これまで断片的にしか見えていなかったKlotho蛋白質の機能の全体像が見え始めてきた。しかし、Klotho蛋白質の発現が低下すると、なぜ μ -calpainが活性化するのか？あるいは、その現象が老化の分子機構にどのように関わってくるのか？など、依然として機能の核心には程遠いのが現状である。これらの課題が今後の研究によって明らかになることを期待している。

引用文献

1. Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R. & Nabeshima, Y. I. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45-51 1997.
2. Arking, D. E., Krebsova, A., Macek, M., Sr., Macek, M.,

- Jr., Arking, A., Mian, I. S., Fried, L., Hamosh, A., Dey, S., McIntosh, I. & Dietz, H. C. Association of human aging with a functional variant of *klotho*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 856-861 2002.
3. Many, H., Inomata, M., Fujimori, T., Dohmae, N., Sato, Y., Takio, K., Nabeshima, Y. & Endo, T. Klotho protein deficiency leads to overactivation of μ -calpain. *J. Biol. Chem.* 277, 35503-35508 2002.
4. Grabnitz, F., Seiss, M., Rucknagel, K. P. & Staudenbauer, W. L. Structure of the beta-glucosidase gene *bglA* of *Clostridium thermocellum*. Sequence analysis reveals a superfamily of cellulases and β -glycosidases including human lactase/phlorizin hydrolase. *Eur. J. Biochem.* 200, 301-309 1991.
5. Winkelmann, J. C. & Forget, B. G. Erythroid and nonerythroid spectrins. *Blood* 81, 3173-3185 1993.
6. Goodman, S. R., Zimmer, W. E., Clark, M. B., Zagon, I. S., Barker, J. E. & Bloom, M. L. Brain spectrin: of mice and men. *Brain Res. Bull.* 36, 593-606 1995.
7. De Matteis, M. A. & Morrow, J. S. Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 13), 2331-2343 2000.
8. Beck, K. A. & Nelson, W. J. The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine. *Am. J. Physiol.* 270, C1263-1270 1996.
9. Hammarlund, M., Davis, W. S. & Jorgensen, E. M. Mutations in beta-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure. *J. Cell Biol.* 149, 931-942 2000.