

厚生労働科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化関連遺伝子*klotho*によるカルパイン活性制御機構の解明
および関連疾患の予防と治療に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 遠藤玉夫

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

老化関連遺伝子*klotho*によるカルパイン活性制御機構の解明

および関連疾患の予防と治療に関する研究

遠藤玉夫

----- 1

老化関連遺伝子 *klotho* によるカルパイン活性制御機構の解明および関連疾患の予防と治療に関する研究

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、研究部長

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 μ -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、 μ -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てきた。最近、*klotho* 蛋白質に β -グルクロニダーゼ活性があることが報告され、*klotho* 蛋白質が糖分解酵素として機能している可能性が示唆された。しかし、*klotho* 蛋白質の生体内における糖分解酵素としての具体的な作用点や基質に関してはほとんど分かっていない。そこで本年度は、*klotho* 遺伝子の変異によって生じる糖鎖変化について検討した。各種抗糖鎖抗体及びレクチンを用いて *klotho* 変異マウスと野生型マウスの糖蛋白質糖鎖を比較した結果、*klotho* 変異マウスの肺と腎臓で特異的に増加している糖鎖があることが明らかになった。これらの糖鎖は *klotho* 蛋白質の欠損により増加していたことから、*klotho* 蛋白質の標的（基質）である可能性が考えられる。また、これらの糖鎖の増加は μ -calpain の異常活性化が顕著な肺と腎臓で観察されることから、 μ -calpain の活性制御やカルシウムホメオスタシスの制御に関与している可能性が考えられる。

A. 研究目的

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 μ -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、 μ -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てきた。最近、*klotho* 蛋白質に β -グルクロニダーゼ活性があることが報告され、*klotho* 蛋白質が糖分解酵素として機能している可能性が示唆された。また、*klotho* 蛋白質の β -グルクロニダーゼ活性がカルシウムチャネルの機能に影響している可能性が報告された。しかし、*klotho* 蛋白質が生体内において実際に分解酵素として機能しているのか、あるいはその天然基質は何であるのか、ということに関してはほとんど分かっていない。

そこで本年度は、*klotho* 遺伝子の変異によって生じる糖鎖変化を網羅的に解析し、*klotho* 蛋白質と糖鎖の関係について検討した。

B. 研究方法

野生型マウス、ヘテロ変異マウス、ホモ変異マウスの各臓器から膜画分蛋白質を調製した。各種抗糖鎖抗体及びレクチンを用いて、ウェスタンブ

ロット、レクチンブロット、ELISA 等の方法により糖鎖及び糖蛋白質を検出し、各マウス間での反応性の違いを比較検討した。

C. 研究結果および考察

ウェスタンブロット及びレクチンブロットの結果、ホモ変異マウスの肺で野生型に比較して顕著に増加しているプロテオグリカン糖鎖があることが分かった。4 週齢の野生型及びホモ変異型の雄と雌を各 5 匹ずつ用いて、このプロテオグリカン糖鎖の肺における発現量をウェスタンブロットにより比較定量した結果、野生型の発現量（平均値）を 1 とした場合、雄のホモ変異型は約 1.5 倍、雌のホモ変異型は約 3 倍に増加していた。さらにサンドイッチ ELISA によりこのプロテオグリカン糖鎖の発現量を雄の野生型とホモ変異型で比較した結果、ホモ変異型は野生型の約 1.7 倍となりウェスタンブロットの結果と一致した。これらの結果から *klotho* 蛋白質の発現量の減少に相関して、このプロテオグリカン糖鎖が増加していることが明らかとなった。このことから、*klotho* 蛋白質は肺においてこのプロテオグリカン糖鎖の合成や分解に関与することが考えられ、このプロテオグリカン糖鎖が、肺における *klotho* 蛋白質の標的（基質あるいは結合糖鎖）であることが示唆された。

一方、腎臓でも野生型に比較してホモ変異型で顕著に増加している糖鎖が検出された。この糖鎖は肺で増加していた糖鎖とは異なっていた。今回の解析では、ホモ変異マウスの腎臓で増加する糖鎖は、SDS-PAGE で分子量約 180kDa と 200kDa に検出される糖蛋白質に修飾されていることを明らかにし、野生型マウスではこの修飾がほとんど起こっていないことを突き止めた。このことから、klotho 蛋白質には腎臓でこの糖鎖修飾を阻害、あるいは糖鎖を切断する働きがあり、この糖鎖が klotho 蛋白質の腎臓における標的（基質あるいは結合糖鎖）であることが考えられる。また、klotho 蛋白質により糖鎖修飾の調節を受けている蛋白質の存在も明らかになり、これらの蛋白質の同定と機能解析が今後の重要な課題である。

以上の結果から、klotho 蛋白質は肺と腎臓で異なる糖鎖を認識していることが示唆された。肺では klotho 蛋白質は発現していないことから、肺以外の組織由来の可溶性 klotho 蛋白質が作用していることが考えられる。一方、腎臓では klotho 蛋白質を発現しており、膜型の klotho 蛋白質も存在している。このことから、可溶性と膜型で基質特異性が異なる可能性も考えられ、今後、腎臓の糖鎖変化に関与しているのが膜型か

可溶性か明らかにする必要がある。また、今回糖鎖異常が検出されたのは肺と腎臓であり、これらの臓器では μ -calpain の異常活性化により著しく組織が障害されることが我々の解析から示されている。このことから、今回検出された糖鎖異常と μ -calpain の活性化が関連する可能性がある。

D. 結論

本年度の研究から、klotho 蛋白質は肺と腎臓において糖鎖修飾（肺ではプロテオグリカン糖鎖の伸長）を阻害する、あるいは、糖鎖を切断する働きがあることが示され、肺と腎臓で klotho 蛋白質の標的となる糖鎖が明らかになった。

E. 学会発表

1. 遠藤玉夫、戸田年総、萬谷博、鈴木明身、佐藤雄治: 新規老化マーカー糖タンパク質の探索. 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUPPO) 第3回大会, 横浜, 2005.8.1-2
2. Endo, T.: Klotho protein deficiency leads overactivation of μ -calpain. The 7th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Aging Research, Muju, Korea, 2005.11.3-5