

厚生労働科学研究費補助金

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18年度 総括研究報告書

主任研究者 遠藤 玉夫

平成19（2007）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

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18年度 総括研究報告書

主任研究者 遠藤玉夫

平成19（2007）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

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

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。我々は、平成 17 年度に *klotho* 遺伝子の変異によって生じる糖鎖変化を検討し、*klotho* 変異マウスの腎臓と肺で異常糖鎖が発現することを明らかにした。そこで本年度は、*klotho* 蛋白質欠損による異常糖鎖の発現メカニズムと *klotho* 蛋白質の機能との関連を明らかにするため、異常糖鎖と *klotho* 蛋白質の相互作用について検討した。その結果、*klotho* 蛋白質に異常糖鎖を分解する作用があることが示唆された。また、我々はこれまでに *klotho* 蛋白質を内在性に発現しているヒト腎臓由来細胞株を取得し、培養細胞系を用いた *klotho* 蛋白質の機能解析法を開発している。そこで、この細胞を用いた *klotho* 蛋白質の発現制御物質のスクリーニング方法への応用を検討した。

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異常な分解が腎および肺障害の原因となることを示してきた。calpain はカルシウム存在下で自己消化して活性化する機構が一般的に知られており、*klotho* 遺伝子がカルシウム代謝の中枢である腎遠位尿細管、脳脈絡膜、副甲状腺で主に発現していることから、*klotho* 蛋白質はカルシウムホメオスタシスの制御分子であると考えられている。また、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、*klotho* 蛋白質と糖鎖の関係及び calpain

の活性制御における *klotho* 蛋白質の機能を明らかにすることを目的に、*klotho* 遺伝子の変異による糖鎖変化の網羅的解析及び *klotho* 蛋白質の発現制御とカルシウム代謝の関連について検討した。前年度に *klotho* 変異マウスの腎臓と肺で異常糖鎖が発現することを明らかにしたことから、本年度は異常糖鎖の発現と *klotho* 蛋白質の関連について検討した。また、我々はこれまでに *klotho* 蛋白質を内在性に発現しているヒト腎臓由来細胞株を取得し、培養細胞系を用いた *klotho* 蛋白質の機能解析法を開発している。そこで、この細胞を用いた *klotho* 蛋白質の発現制御物質のスクリーニング方法への応用を検討した。

B. 研究方法

(1) *klotho* 遺伝子変異マウスにおける異常糖鎖の発現と *klotho* 蛋白質との関連：膜貫通領域を除いて C 末端に His-tag を融合した組換え型 *klotho* 蛋白質をコードする cDNA を含む哺乳動物細胞用のプラスミドベクターを作製した。このプラスミドをヒト胎児腎臓由来培養細胞株

HEK293T に導入し、組換え型 klotho 蛋白質を培養上清中に発現する安定発現株を樹立した。培養上清から Ni カラムを使用して組換え型 klotho 蛋白質を精製し、異常糖鎖との相互作用の解析に使用した。相互作用については、klotho 蛋白質と異常糖鎖への結合能や klotho 蛋白質による異常糖鎖の分解活性等を、ウェスタンブロット法を改変したオーバーレイアッセイ法や ELISA 法により解析した。

(2) klotho 蛋白質の発現制御とカルシウム代謝の関連：これまでに取得している klotho 蛋白質を発現しているヒト腎臓由来培養細胞株を用いて、klotho 蛋白質の発現に影響を与える物質のスクリーニングへの応用を検討した。klotho 変異マウスの個体レベルの研究でビタミン D₃ によるカルシウム代謝と klotho 蛋白質の関与が示唆されている。そこで、細胞レベルでビタミン D₃ と klotho 蛋白質の関係を調べた。細胞株をビタミン D₃ で処理した時の、klotho 蛋白質、ビタミン D レセプターなど関連蛋白質の発現をウェスタンブロットで解析した。また、半透膜上で細胞を培養し上層か下層に ⁴⁵Ca を添加し、ビタミン D₃ 処理によるカルシウム輸送能の変化を調べた。さらに、本細胞株を用いて klotho 遺伝子の siRNA 配列をベクターに組み込み、siRNA を恒常的に発現する klotho ノックダウン細胞株を樹立した。

C. 研究結果および考察

(1) klotho 遺伝子変異マウスにおける異常糖鎖の発現と klotho 蛋白質との関連：klotho 変異マウスの肺および腎臓で検出された異常糖鎖が klotho 蛋白質の分解作用の基質となるかどうか検討した。まず、肺および腎臓から調製した膜面分を SDS-PAGE で分離して PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜を組換え型 klotho 蛋白質と反応させ、抗糖鎖抗体およびレクチンで異常糖鎖の反応性の変化を解析した。その結果 klotho 蛋白質の処理により異常糖鎖の検出量が減少することが観察された。一方、熱処理した klotho 蛋白質の場合には、反応性に変化はみられなかった。この結果は、異常糖鎖が klotho 蛋

白質によって分解されることを示唆しており、異常糖鎖が klotho 蛋白質の基質である可能性が考えられる。現在、最適な反応処理条件 (pH、温度、反応時間、バッファー組成、基質および klotho 蛋白質の濃度等) を調べており、異常糖鎖の詳細な構造解析の結果と合わせて、klotho 蛋白質の糖鎖基質を特定することを目指している。

(2) klotho 蛋白質の発現制御とカルシウム代謝の関連：klotho 蛋白質を発現しているヒト腎臓由来細胞株を用いて、klotho 蛋白質の発現制御物質のスクリーニング方法を検討した。マウスにビタミン D₃ を与えると klotho 蛋白質の発現が増加し、ビタミン D₃ 活性化の抑制を誘導することが報告されている。そこで、本細胞株をビタミン D₃ で処理したところ、ビタミン D₃ レセプターの発現増加と klotho 蛋白質の発現増加が確認され、カルシウム輸送量が増加した。この結果は、本細胞株が尿細管細胞の性質を保持し、klotho 蛋白質が生理的に機能していることを示している。この細胞を用いることにより、klotho 蛋白質の発現を変化させる物質をスクリーニングすることが可能であることが示された。また、ビタミン D₃ は klotho 蛋白質発現細胞に直接作用して klotho 蛋白質の発現を増加させることが明らかとなった。さらに、本細胞株に siRNA 発現ベクターを導入し、恒常的に klotho 蛋白質の発現がノックダウンされる細胞株を樹立した。現在、これらの細胞を用いて、klotho 蛋白質の発現を変化させる物質のスクリーニングと、klotho 蛋白質より下流のシグナル伝達について調べている。

D. 結論

klotho 蛋白質が糖分解酵素として機能している可能性が示された。klotho 変異マウスの腎臓と肺では、klotho 蛋白質の欠損によって、分解されなくなった糖鎖が蓄積していることが考えられた。klotho 蛋白質の発現制御物質のスクリーニング方法を確立した。ビタミン D₃ は腎臓の klotho 蛋白質発現細胞に直接作用して、klotho 蛋白質の発現を増加させることが示唆された。