

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17年度～18年度 総合研究報告書

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17年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 遠藤玉夫

平成19（2007）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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疾患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。本研究では *klotho* 蛋白質の機能解明を目指して以下の研究を行った。(1) *klotho* 蛋白質と糖鎖の関係を明らかにする目的で、*klotho* 遺伝子の変異によって生じる糖鎖変化について解析し、*klotho* 変異マウスの腎臓と肺で異常糖鎖が発現していることを明らかにした。(2) *klotho* 蛋白質の標的分子（受容体あるいは基質）を明らかにする目的で、*klotho* 蛋白質と異常糖鎖との関係を解析し、*klotho* 蛋白質に異常糖鎖を分解する機能があることが示唆された。(3) 老化関連疾患のメカニズムの解明および老化予防を目的として、*klotho* 蛋白質の発現を制御する因子を探索する方法を検討し、培養細胞を用いたスクリーニング法を開発した。これらの成果を基に、*klotho* 蛋白質の発現制御機構、標的分子、シグナル伝達機構をより詳細に調べていくことにより、個体老化の分子機構の一端が解明され、腎臓及び肺疾患などの老化関連疾患の治療や予防への貢献が期待できる。

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。近年、哺乳動物を含む多様なモデル動物から、寿命に影響する遺伝子が数多く見いだされ、老化研究は著しく進展してきた。しかし、老化は環境など複雑な要因に影響を受けるため、老化の分子機構を研究し理解することは難しく、寿命遺伝子の本来の機能や老化との関連には未だ不明な点が多い。*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を明らかにするため、*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た。また、*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。

B. 研究方法

(1) *klotho* 遺伝子の変異による糖鎖変化の網羅的解析：野生型マウス、*klotho* 変異マウスの各臓器から膜面分蛋白質を調製した。各種抗糖鎖抗体およ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および糖蛋白質を検出し、反応性の違

いを比較検討した。

(2) *klotho* 遺伝子変異マウスにおける異常糖鎖の発現と *klotho* 蛋白質との関係：膜貫通領域を除いて C 末端に His-tag を融合した *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、融合 *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 カラムを使用して融合 *klotho* 蛋白質を精製し、

(1) で検出された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 *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。(3) *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方法を検討した。*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、上記 *klotho* ノックダウン細胞株を用いて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。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* 遺伝子の変異による糖鎖変化の網羅的解析：ウェスタンブロットおよびレクチンブロットの結果、*klotho* 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糖鎖があることが分かった。4 週齢の野生型およびホモ変異型の雄と雌を各 5 匹ずつ用いて、この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糖鎖の合成や分解に関与することが考えられ、この糖鎖が、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。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主に修飾されていた。野生型マウスではこの糖鎖修飾ほとんど検出されないことから、*klotho* 蛋白質には腎臓でこの糖鎖の合成阻害、あるいは分解する働きがあり、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が制御されている蛋白質の存在が示されたことから、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。

また、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 *klotho* 蛋白質が膜型か可溶性かを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。

(2) *klotho* 遺伝子変異マウスにおける異常糖鎖の発現と *klotho* 蛋白質との関係：*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

画分を SDS-PAGE で分離して PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜を精製した 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 蛋白質を反応させた場合には、大きな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いる。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、(1) の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。

(3) klotho 蛋白質の発現制御とカルシウム代謝の関連: klotho 蛋白質を内在性に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おり、この細胞により、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

これまで klotho 蛋白質と糖鎖の関係については、糖分解酵素との相同性や *in vitro* での弱い糖分解活性などから、生体内での糖分解作用は推測に留まっていた。本研究により klotho 変異マウスでの糖鎖異常が初めて明らかになり、klotho 蛋白質が糖鎖を介して他の分子と相互作用することが示された。さらに、klotho 蛋白質が発現している臓器と発現していない臓器で異常糖鎖の構造が異なっていたことから、klotho 蛋白質は分泌型と膜結合型で基質特異性を変化させている可能性が示唆された。この結果は、klotho 蛋白質の臓器特異的な作用を明らかにする上で重要な知見である。また、klotho 蛋白質の発現に影響する物質のスクリーニング方法では、klotho 蛋白質を発現し腎尿細管の性質を保持している細胞を用いていることから、生理的に近い条件でのスクリーニングが可能であり、腎機能に与える影響や細胞毒性なども同時に調べることができる。さらにこの細胞から siRNA を利用して樹立した klotho ノックダウン細胞株により、klotho 蛋白質の機能および klotho 蛋白質の関与するシグナル伝達機構を解析することができる。これらの成果を基に、klotho 蛋白質の発現制御機構、標的分子、シグナル伝達機構を解析していくことで、個体老化の分子機構の一端が解明され、腎臓及び肺疾患などの老化関連疾患の治療や予防への貢献が期待できる。

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 (JHUPO) 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