

発表番号 45 (0341)

カルシウムホメオスタシスの異常と老化

助成研究者：萬谷 博

(財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所)

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。そこで、*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蛋白質レベルでの変化について解析した。その結果、変異マウスの肺と腎臓では α_{II} -spectrin が著しく分解されていることが明らかになった。 α_{II} -spectrin は calpain によって分解されることが報告されている。そこで、*klotho* マウスにおける calpain の活性化について検討したところ、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 が消失していることが分かった。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。

また、calpain の活性化は主にカルシウム濃度によって制御されていることから、*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、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、*klotho* 遺伝子の変異がカルシウムホメオスタシスに影響することがこれまでに報告されている。*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細管、脳の脈絡膜、副甲状腺である点も非常に興味深く、現在、カルシウム代謝と *klotho* 遺伝子の機能の関連について研究を行っている。

15

助成番号 0341

カルシウムホメオスタシスの異常と老化

萬谷 博 (財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所)

1. 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。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) がいくつか見つかかり、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。そこで、*klotho* 遺伝子の変異による各組織での変化について蛋白質レベルで解析し、老化との関連について検討した。

2. 研究方法

2.1 材料

klotho マウスは京都大学大学院医学研究科の鍋島陽一先生より御供与頂いた。C57BL/6 マウスは東京都老人総合研究所老化動物育成施設より調達した。*klotho* マウスは2週齢から9週齢の野生型 ($kl^{+/+}$)、ヘテロ接合型 ($kl^{+/-}$)、ホモ接合型 ($kl^{-/-}$)を用い、C57BL/6、マウスは4週齢と29月齢を用いた。

2.2 膜画分蛋白質と可溶性画分蛋白質の調製

マウスより各種臓器を摘出し、湿重量の9倍量の SET buffer バッファー (10mM Tris-HCl

(pH7.4), 250mM sucrose, 5mM EDTA) を加え、ポッター式ホモジナイザーでホモジナイズした。遠心 (600 xg, 10min, 4) 後の上清を、超遠心 (100,000 xg, 1h, 4) により上清 (可溶性画分) と沈殿 (膜画分) に分離して以下の実験に用いた。

2.3 klotho 遺伝子の変異による膜画分蛋白質の変化の解析

4 週齢の $kl^{+/+}$ と $kl^{-/-}$ マウス各臓器の膜画分蛋白質を SDS-PAGE で分離し、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) 染色を行った。 $kl^{+/+}$ と $kl^{-/-}$ で発現量が異なるバンドについては、アミノ酸シークエンスおよびマススペクトルにより蛋白質の同定を試みた。CBB 染色後のゲルより目的のバンドを切り出し、ゲルを細かく砕いた後、100mM Tris-HCl (pH9.0), 1mM EDTA, 0.1% SDS に懸濁し、0.1 μ g の lysylendopeptidase を加え 37 で 12 時間反応した。反応後、高速液体クロマトグラフィーによりペプチドを分離した。カラムには DEAE-5PW (1 x 20mm; トーソー) と CAPCELL PACK C18UG120 (1 x 100mm; 資生堂) を使い、溶媒 A を 0.085% (v/v) trifluoroacetic acid 水溶液、溶媒 B を 0.075% (v/v) trifluoroacetic acid, 80% acetonitril 水溶液として、流速 30 μ l/min、溶媒 B の 1-60% 直線勾配の条件で溶出した。

溶出したペプチド断片は、質量分析計 (Reflex MALDI-TOF-MS; ブルカーダルトニクス) とアミノ酸シークエンサー (Procise 494 cLc; Applied Biosystems) により、アミノ酸配列を決定した。

2.4 抗体

抗不活性型 μ -calpain ポリクローナル抗体 (anti-pre- μ -calpain) と抗活性型 μ -calpain ポリクローナル抗体 (anti-post- μ -calpain) 抗 α_{II} -spectrin ポリクローナル抗体 (anti-BDP-148) 抗 calpastatin ポリクローナル抗体 (anti-calpastatin) は以下の方法で作製した。pre- μ -calpain 及び post- μ -calpain はそれぞれの N 末端アミノ酸配列 (SEEIITPVYCTGVSAQVQKQRC) (LGRHEC) をそれぞれ合成し、各ペプチドの C 末端に keyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合し抗原とした。 α_{II} -spectrin はアミノ酸配列中、calpain により切断されて新たに生じる末端部分のペプチド (GAMPRD) を合成し、GAMPRD の C 末側に cysteine と KLH を結合し抗原とした。calpastatin は domain IV と呼ばれる領域 (601-630) のペプチド (AEHRDKLGERDDTIPPEYRHLLDDNGQDKP) を合成し C 末側に cysteine と KLH を結合し抗原とした。各抗原をウサギに免疫し抗血清を得た。各抗原ペプチドを epoxy-activated Sepharose 6B カラム (Amersham bioscience) に固定化し、抗血清からアフィニティー精製により抗体を得た。抗 klotho モノクローナル抗体 (KM2076) は協和醗酵株式会社より御供与頂いた。

2.5 ウェスタンブロット

可溶性画分及び膜画分蛋白質を SDS-PAGE により分離し、polyvinylidene difluoride membrane に転写した。転写後、0.5% skim milk-TPBS (0.005% Tween20, phosphate-buffered saline) で室温、30分ブロッキングを行い、0.5% skim milk-TPBS 中で各種一次抗体を反応した。TPBS で洗浄後、0.5% skim milk-TPBS 中で horseradish peroxydase 標識二次抗体を反応し、ECL kit (Amersham

Bioscience) で検出した。

3. 研究結果および考察

3.1 *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、*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($kl^{+/+}$)とホモ変異型マウス($kl^{-/-}$)を比較したところ、腎臓の約280kDaの蛋白質が $kl^{-/-}$ 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、 $kl^{-/-}$ 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、 $kl^{-/-}$ 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 $kl^{-/-}$ 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、 $kl^{-/-}$ 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^{3, 4)}。spectrin の機能としては一般的に細胞の極性や形体の維持に關与すると考えられているが⁵⁾、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⁶⁻⁹⁾。

3.2 *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¹⁰⁾、 $kl^{-/-}$ マウスにおける α_{II} -spectrin の分解に calpain が關与しているか検討した。 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¹⁰⁾、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、 $kl^{-/-}$ 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關与し、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¹¹⁻¹⁶⁾。また、生体内における様々な生理現象や病態への關与が示されている¹⁷⁻²¹⁾。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

より活性型になる機構が知られている^{19, 22-24)}。

そこで、*kl^{-/-}*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 *kl^{-/-}*マウスの腎臓では μ -calpain がほぼ完全に活性型になっていることが明らかとなった。一方、m-calpain の活性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^{19, 25)}。興味深いことに、*kl^{-/-}*マウス(4週齢)の腎臓では calpastatin の消失も観察された (Fig. 3H)。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。

3.3 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。

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。*kl^{-/-}*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¹⁾、 μ -calpain の活性化が *kl^{-/-}*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。*kl^{-/-}*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。また、*klotho* 遺伝子産物が NO 産生を増加させ *klotho* マウスの血管障害を緩和するということが報告されている。都合の良いことに、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、*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。

3.4 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？*kl^{-/-}*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。*kl^{-/-}*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²⁶⁾、 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、*kl^{-/-}*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²⁷⁻³¹⁾、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³²⁾、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^{33, 34)}、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。

3.5 自然老化と μ -calpain の活性化

本研究では、*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。

3.6 *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³⁵⁾、*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³⁵⁾、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細管、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* 蛋白質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³⁶⁻³⁸⁾。

4. 今後の課題

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。今後の研究によってこれらの課題を明らかにしていく必要がある。

6. 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.: *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.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 856-861 (2002)
- 3) Winkelmann, J. C., Forget, B. G.: *Blood* **81**, 3173-85 (1993)
- 4) Goodman, S. R., Zimmer, W. E., Clark, M. B., Zagon, I. S., Barker, J. E., Bloom, M. L.: *Brain Res. Bull.* **36**, 593-606 (1995)
- 5) De Matteis, M. A., Morrow, J. S.: *J. Cell Sci.* **113** (Pt 13), 2331-43 (2000)
- 6) Beck, K. A., Nelson, W. J.: *Am. J. Physiol.* **270**, C1263-70 (1996)
- 7) Hammarlund, M., Davis, W. S., Jorgensen, E. M.: *J. Cell Biol.* **149**, 931-42 (2000)
- 8) Moorthy, S., Chen, L., Bennett, V.: *J. Cell Biol.* **149**, 915-30 (2000)
- 9) Dubreuil, R. R., Wang, P., Dahl, S., Lee, J., Goldstein, L. S.: *J. Cell Biol.* **149**, 647-56 (2000)
- 10) Harris, A. S., Croall, D. E., Morrow, J. S.: *J. Biol. Chem.* **263**, 15754-61 (1988)
- 11) Blomgren, K., Zhu, C., Wang, X., Karlsson, J. O., Leverin, A. L., Bahr, B. A., Mallard, C., Hagberg, H.: *J. Biol. Chem.* **276**, 10191-8 (2001)

- 12) Doctor, R. B., Bennett, V., Mandel, L. J.: *Am. J. Physiol.* **264**, C1003-13 (1993)
- 13) Saido, T. C., Yokota, M., Nagao, S., Yamaura, I., Tani, E., Tsuchiya, T., Suzuki, K., Kawashima, S.: *J. Biol. Chem.* **268**, 25239-43 (1993)
- 14) Tsuji, T., Ohga, Y., Yoshikawa, Y., Sakata, S., Abe, T., Tabayashi, N., Kobayashi, S., Kohzuki, H., Yoshida, K. I., Suga, H., Kitamura, S., Taniguchi, S., Takaki, M.: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**, H1286-94 (2001)
- 15) Bednarski, E., Vanderklish, P., Gall, C., Saido, T. C., Bahr, B. A., Lynch, G.: *Brain Res.* **694**, 147-57 (1995)
- 16) Liu, X., Rainey, J. J., Harriman, J. F., Schnellmann, R. G.: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281**, F728-38 (2001)
- 17) Vanderklish, P. W., Bahr, B. A.: *Int. J. Exp. Pathol.* **81**, 323-39 (2000)
- 18) Carafoli, E., Molinari, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 193-203 (1998)
- 19) Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K.: *Biochem. J.* **328 (Pt 3)**, 721-32 (1997)
- 20) Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., Tsai, L. H.: *Nature* **405**, 360-4 (2000)
- 21) Wang, K. K., Yuen, P. W.: *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 412-9 (1994)
- 22) Saido, T. C., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Sorimachi, H., Murofushi, H., Tsuchiya, T., Ito, H., Suzuki, K.: *J. Biochem. (Tokyo)* **111**, 81-6 (1992)
- 23) Imajoh, S., Aoki, K., Ohno, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Sugihara, H., Suzuki, K.: *Biochemistry* **27**, 8122-8 (1988)
- 24) Brown, N., Crawford, C.: *FEBS Lett.* **322**, 65-8 (1993)
- 25) Nakamura, M., Inomata, M., Imajoh, S., Suzuki, K., Kawashima, S.: *Biochemistry* **28**, 449-55 (1989)
- 26) Suga, T., Kurabayashi, M., Sando, Y., Ohyama, Y., Maeno, T., Maeno, Y., Aizawa, H., Matsumura, Y., Kuwaki, T., Kuro, O. M., Nabeshima, Y., Nagai, R.: *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**, 26-33 (2000)
- 27) London, G. M., Drueke, T. B.: *Kidney Int.* **51**, 1678-95 (1997)
- 28) Rostand, S. G., Drueke, T. B.: *Kidney Int.* **56**, 383-92 (1999)
- 29) Milliner, D. S., Zinsmeister, A. R., Lieberman, E., Landing, B.: *Kidney Int.* **38**, 931-6 (1990)
- 30) Urena, P., De Vernejoul, M. C.: *Kidney Int.* **55**, 2141-56 (1999)
- 31) Kuizon, B. D., Salusky, I. B.: *J. Bone Miner Res.* **14**, 1680-90 (1999)
- 32) Koh, N., Fujimori, T., Nishiguchi, S., Tamori, A., Shiomi, S., Nakatani, T., Sugimura, K., Kishimoto, T., Kinoshita, S., Kuroki, T., Nabeshima, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1015-20 (2001)
- 33) Aizawa, H., Saito, Y., Nakamura, T., Inoue, M., Imanari, T., Ohyama, Y., Matsumura, Y., Masuda, H., Oba, S., Mise, N., Kimura, K., Hasegawa, A., Kurabayashi, M., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Nagai, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 865-71 (1998)
- 34) Averna, M., De Tullio, R., Salamino, F., Minafra, R., Pontremoli, S., Melloni, E.: *J. Biol. Chem.* **276**, 38426-32 (2001)
- 35) Yoshida, T., Fujimori, T., Nabeshima, Y.: *Endocrinology* **143**, 683-9 (2002)
- 36) Gurnett, C. A., De Waard, M., Campbell, K. P.: *Neuron* **16**, 431-40 (1996)
- 37) Thornhill, W. B., Wu, M. B., Jiang, X., Wu, X., Morgan, P. T., Margiotta, J. F.: *J. Biol. Chem.* **271**, 19093-8 (1996)
- 38) Bennett, E., Urcan, M. S., Tinkle, S. S., Koszowski, A. G., Levinson, S. R.: *J. Gen. Physiol.* **109**, 327-43 (1997)

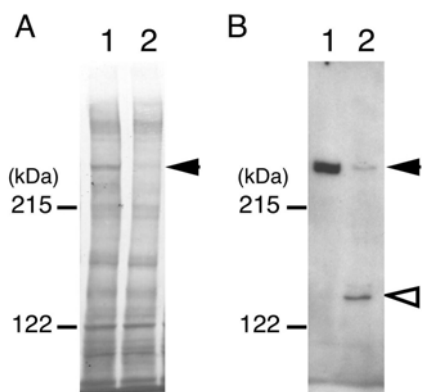


Fig. 1. Decrease of α II-spectrin in the $kl^{-/-}$ kidney. (A) SDS-PAGE of kidney microsomal fractions of 4-week-old male mice, stained with Coomassie Blue. (B) Western blot analysis of gel assessed with anti- α II-spectrin (C-20) antibody. Lane 1, $kl^{+/+}$; lane 2, $kl^{-/-}$. Arrowheads indicate 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.

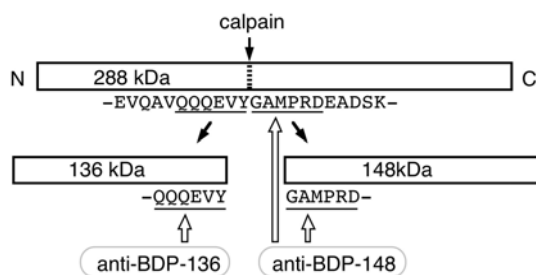


Fig. 2. Design of synthetic peptides for antibodies to the 136 kDa and 148 kDa fragments of α II-spectrin cleaved by calpain. Antigenic peptides were designed to correspond the C-terminal sequence (QQQEVY) of the 136 kDa fragment and the N-terminal sequence (GAMPRD) of the 148 kDa fragment of α II-spectrin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

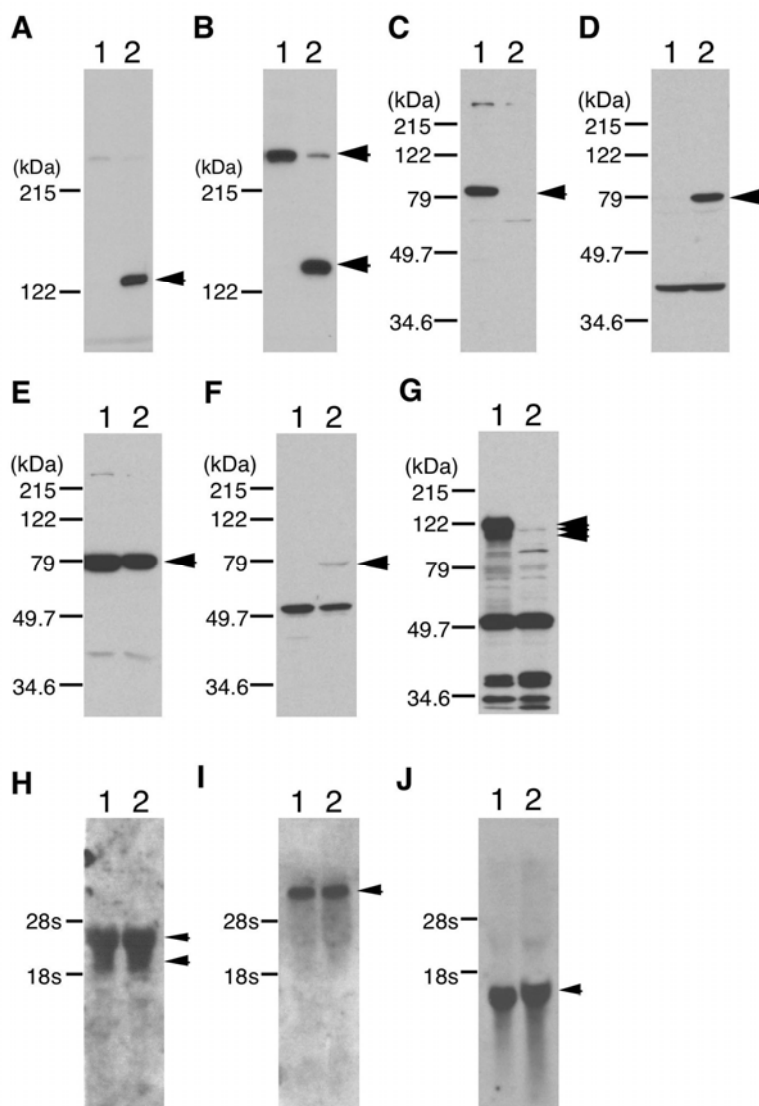


Fig. 3. Changes of α II-spectrin, μ -calpain and calpastatin in the $kl^{-/-}$ kidney. (A and B) Western blots of kidney microsomal fractions of 4-week-old male mice using antibodies. A, Anti-BDP-136 antibody. B, Anti-BDP-148 antibody. (C-G) Western blots of kidney cytosolic fractions of 4-week-old male mice using antibodies. C, Anti- 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, $kl^{+/+}$; lane 2, $kl^{-/-}$. Arrowheads indicate the positions of the corresponding molecules. Molecular mass markers or ribosomal RNA bands are indicated on the left.

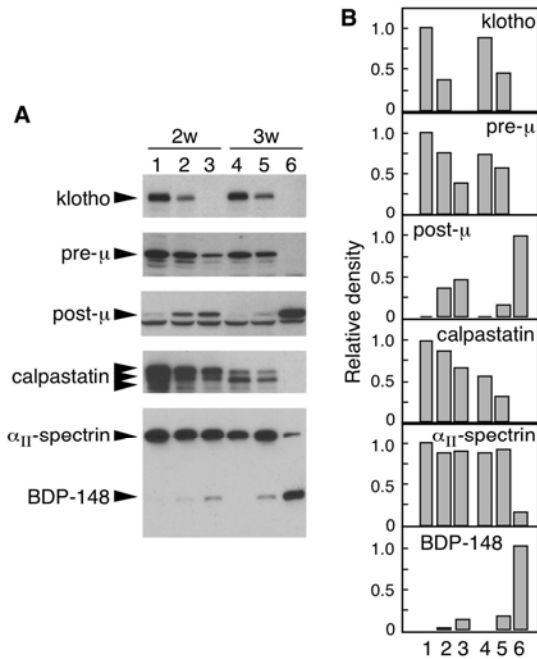


Fig. 4. Dependency of calpain, calpastatin and αII-spectrin on Klotho protein. (A) Western blots of kidney cytosolic and microsomal fractions of 2- and 3-week-old male mice using anti-Klotho antibody and other antibodies described in Fig. 3. Lanes 1 and 4, *kl^{+/+}*; lanes 2 and 5, *kl^{-/-}*; lanes 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.

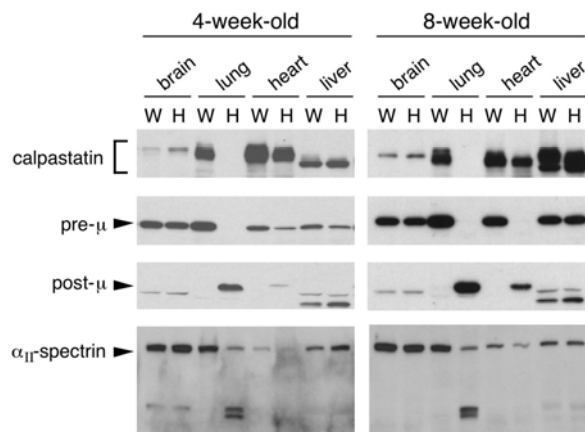


Fig. 5. Organ-specific differences in calpastatin, calpain, and αII-spectrin between *kl^{+/+}* and *kl^{-/-}* mice. Western blots of organ extracts of 4- and 8-week-old male mice with antibodies. Lane W, *kl^{+/+}*; lane H, *kl^{-/-}*.

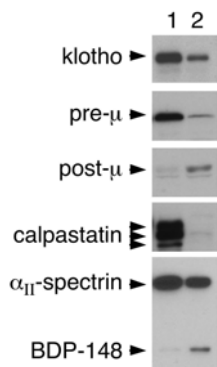


Fig. 6. Changes in the kidney of aged normal mice. Western blots of 4-week-old (lane 1) and 29-month-old (lane 2) C57BL/6 mice. Antibodies are described in Fig. 4. Arrowheads indicate the positions of the corresponding molecules.

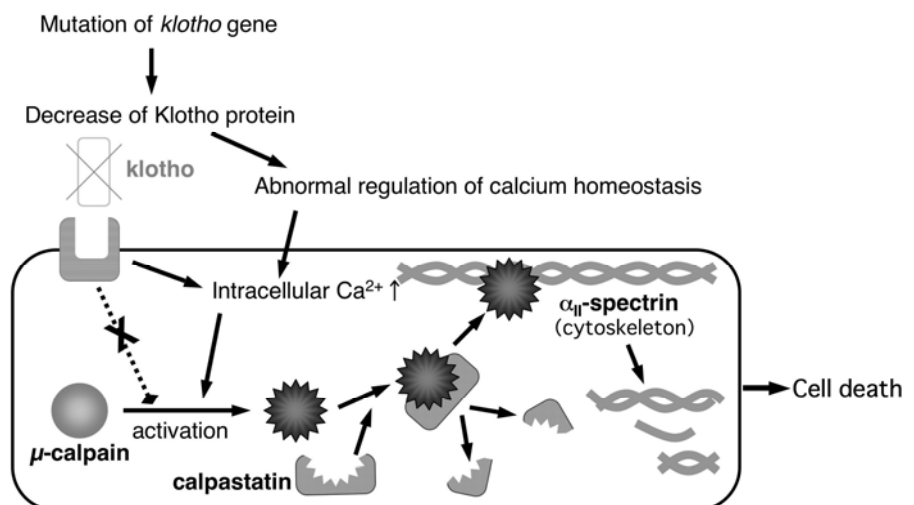


Fig. 7. Klotho protein deficiency leads to overactivation of μ-calpain. The aberrant activation of μ-calpain and the decrease of calpastatin in the kidney are caused by the *klotho* mutation, and such changes lead to the cleavage of αII-spectrin.

Aberration of calcium homeostasis and aging

Hiroshi Manyá

Glycobiology Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Foundation for Research on Aging and Promotion of Human Welfare,

Summary

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.