

&lt;研究課題&gt;

老化関連分子 $\alpha$ -Klotho の減少による糖鎖異常と疾患の分子機構

代表研究者 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター  
 老化機構研究チーム 分子機構  
 研究員 萬谷 啓子

## 【まとめ】

代表研究者は、 $\alpha$ -Klotho 欠損マウスの肺や腎臓において、臓器特異的な糖鎖異常が生じることを明らかにしている。また、自然老化マウスでも $\alpha$ -Klotho の発現量の減少にともなって同様の現象が認められることから老化に深く関連する現象であると考えられる。本研究では、 $\alpha$ -Klotho の減少による臓器特異的な糖鎖変化と腎機能低下の関係を解析した。その結果、過剰な非硫酸化 HNK-1 修飾は CD13 の活性には影響しないことなどを明らかにした。

## 1. 研究の目的

単一遺伝子 ( $\alpha$ -Klotho) の発現を欠損したマウス ( $\alpha$ -Klotho マウス) は、ヒトの老化関連疾患症状 (腎障害、肺気腫、動脈硬化、骨粗鬆症など) に類似した症状を示す。また、野生型マウスにおいて老化にともなって $\alpha$ -Klotho 発現量が低下すること、 $\alpha$ -Klotho の過剰発現によりマウスの寿命が延びることなどから、 $\alpha$ -Klotho は老化を制御する因子であると考えられている。

代表研究者はこれまでに $\alpha$ -Klotho マウスの腎臓で非硫酸化 HNK-1 という糖鎖構造が異常蓄積していること、さらにこの糖鎖がプロテアーゼの一種である CD13/アミノペプチダーゼ N とメプリンを修飾しており、 $\alpha$ -Klotho の減少に伴ってメプリンの発現が減少していることを明らかにした (図1)。これらの現象は自然老化マウスにおいても同様に認められることから、老化に深く関連

する現象であると考えられる。糖鎖はタンパク質の溶解性や極性、タンパク質間の相互作用など、タンパク質の性質を大きく変化させるため、糖鎖の異常は細胞や組織の機能に大きな影響を与える。また、翻訳後修飾分子である糖鎖はゲノムの直接の支配下にないため、老化や栄養などの環境的要因による影響を受けやすい。そこで、腎臓の老化過程における糖鎖の変化とその影響を明らかにすることを目的とした。

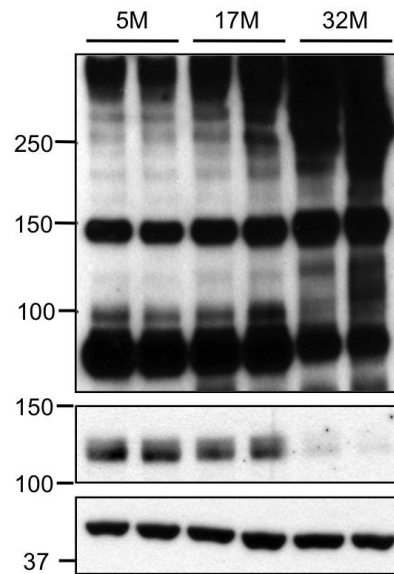


図1 自然老化マウス腎臓における糖鎖の発現変化と $\alpha$ -Klotho の減少  
 上から非硫酸化 HNK-1、 $\alpha$ -Klotho、actin

## 2. 研究方法と経過

## 2-1 CD13 の活性における非硫酸化 HNK-1 修飾の影響

非硫酸化 HNK-1 修飾が CD13 の酵素活性に及ぼす影響を解析するため、シアル酸

トランスポーターに変異を持つ Lec2 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来細胞) に CD13 と HNK-1 合成酵素である GlcAT-P および GlcAT-S を強制発現させ、非硫酸化 HNK-1 糖鎖を多く持つ CD13 を作製した。また、Lec2 細胞の親株であり、シアル酸トランスポーターに変異を持たない CHO 細胞でも同様に CD13、GlcAT-P、GlcAT-S を強制発現させ、通常の糖鎖を持つ CD13 を作製した。

これらの細胞の膜画分を酵素源とし、Alanine が切断されることにより蛍光を発する L-Ala-7-AMC を基質として酵素活性を測定し、比較した。

## 2-2 尿中の非硫酸化 HNK-1 の検出

一般的に腎障害を持たない場合でも老化にともなって腎機能は低下することが知られている。また、抗生剤や抗炎症剤、抗がん剤などでは腎毒性を示すものがあり、使用の際には腎機能の低下に注意する必要がある。しかし、腎臓は予備能力が高い臓器であり、機能低下がかなり進行するまで自覚症状が現れないため、早期発見は難しい。腎臓は一旦壊れてしまうと再生や修復がほとんど起こらない臓器であるため、病状が進行する前の早期診断が非常に重要となり、発見の時期は予後に直接影響する。したがって、機能低下の早期段階や障害の兆候を簡便に検出することができれば、腎障害の悪化の予防に役立つことが期待できる。申請者のこれまでの研究において、腎臓での $\alpha$ -Klotho の発現が老化にともなって減少することや、非硫酸化 HNK-1 の異常蓄積が自然老化マウスでも見られることから、非硫酸化 HNK-1 の発現変化が腎機能の低下のマーカーになる可能性が考えられた。

そこで、自然老化マウスの尿を用いて非硫酸化 HNK-1 や非硫酸化 HNK-1 修飾を受ける CD13、メプリンの発現を調べた。5

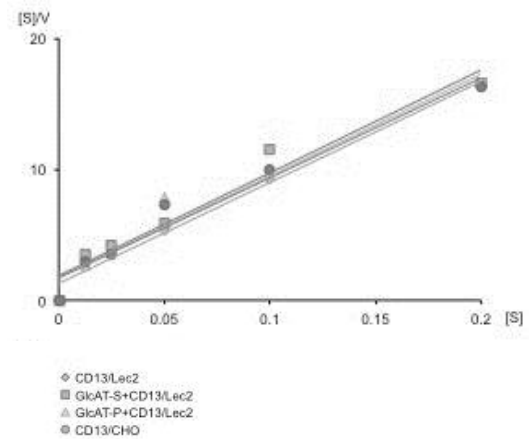


図2 CD13 の活性における非硫酸化 HNK-1 の影響  
ヶ月齢、10ヶ月齢、16ヶ月齢、24ヶ月齢のマウスを代謝ケージで飼育し、24時間ごとに5日間採尿した。その後、腎臓と血液を採取した。これらの試料を用いてウェスタンブロットを行った。

## 3. 研究の成果

### 3-1 CD13 の活性における非硫酸化 HNK-1 修飾の影響

CD13 の発現はどの細胞でもほぼ同等であった。また、GlcAT-P や GlcAT-S と共発現させたものでは、非硫酸化 HNK-1 が過剰に付加されていた。これらの CD13 の酵素活性を合成基質を用いて解析したところ、 $K_m$  がそれぞれ CD13/Lec2 ; 16.6  $\mu\text{M}$ , GlcAT-S+CD13/Lec2 ; 23.8  $\mu\text{M}$ , GlcAT-S+CD13/Lec2 ; 22.0  $\mu\text{M}$ , CD13/CHO ; 22.6  $\mu\text{M}$ 、また  $V_{max}$  がそれぞれ CD13/Lec2 ; 13.0 nmol/h/ $\mu\text{g}$ , GlcAT-S+CD13/Lec2 ; 12.7 nmol/h/ $\mu\text{g}$ , GlcAT-S+CD13/Lec2 ; 12.9 nmol/h/ $\mu\text{g}$ , CD13/CHO ; 13.1 nmol/h/ $\mu\text{g}$  という結果になり、有意な差は見られなかった。つまり、CD13 への非硫酸化 HNK-1 修飾による活性への影響は認められなかった (図2)。

### 3-2 尿中の非硫酸化 HNK-1 の検出

老化にともない、尿量の増加が見られた。また、タンパク質濃度やクレアチニン濃度にも変化が認められた。さらに、CD13 やメプ

リンが尿中に排出することも確認された。

#### 4. 今後の課題

CD13 と同様にメプリンについても GlcAT-P や GlcAT-S との共発現細胞を作成し、過剰な非硫酸化 HNK-1 修飾によるメプリン活性への影響を解析する。特にメプリンはコラーゲン生合成に必要な酵素であることから、 $\alpha$ -Klotho マウスに見られる皮膚萎縮、血管壁脆弱性、骨形成異常などの老化症状にも密接に関係することが考えられる。

また、CD13 やメプリンが尿中に含まれることを確認できたので、今後尿中のこれらの分子の濃度が老化や薬剤による腎機能低下にともなってどのように変化するのか、腎臓由来であるのか、腎機能低下のマーカーになりうるのか検討する。また、これらの分子上の糖鎖についても解析を行う。

#### 5. 研究成果の公表方法

本研究成果は、第 34 回日本糖質学会年会および首都大学東京バイオコンファレンス 2015 において発表した。また、追加実験を行い、英語原著論文にまとめることを目指す。