

klotho マウスを用いた抗老化研究

萬谷 博*, 萬谷(赤阪)啓子, 遠藤玉夫

Antiaging Research Using *Klotho* Mice

Hiroshi MANYA,* Keiko AKASAKA-MANYA, and Tamao ENDO

Molecular Glycobiology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Foundation for Research on Aging and Promotion of Human Welfare, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

(Received August 5, 2009)

The *klotho* mouse shows multiple phenotypes resembling human aging caused by the mutation of a single gene. This mutation is caused by the insertion of ectopic DNA into the regulatory region of the α -*klotho* gene. The α -*klotho* gene encodes a type I membrane protein that is expressed predominantly in the kidney and brain. As a result of a defect in α -*klotho* gene expression, the *klotho* mouse exhibits multiple age-associated disorders, such as arteriosclerosis, osteoporosis, pulmonary emphysema and short life span. However, the mechanism by which the α -*klotho* gene product suppresses the aging phenomena has not been identified. Analysis of the pathophysiology of *klotho* mice is expected to give clues not only to understanding the mechanisms of individual diseases associated with aging but also the molecular mechanisms during human aging. We previously reported that the aberrant activation of μ -calpain is caused by the α -*klotho* mutation, and such change leads to degradation of cytoskeletal elements. Similar phenomena were observed in normal aged mice. Such deterioration may trigger tissue abnormalities in *klotho* mice and aged mice, but *klotho* protein may suppress these processes. We will summarize the function of α -*klotho* protein based on our research on the relationship between proteolysis and age-related disorders and the recent advanced researches.

Key words—aging; α -*klotho*; proteolysis; calpain; calpastatin

1. はじめに

klotho マウスは寿命が短く (約 9 週), 骨粗鬆症や動脈硬化といったヒトの老化症状に類似した多彩な症状を示す.¹⁾ このマウスの多様な病態が α -*klotho* というたった 1 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く, α -*klotho* 遺伝子産物の機能を解明することで, 老化及び老化に伴う疾患の分子機構を理解するための重要な知見が得られることが期待される. 近年, ビタミン D 代謝との関連や, Fibroblast growth factor やカルシウムチャネルとの相互作用を介したリンやカルシウム代謝との関連などが報告されるようになり, α -*klotho* タンパク質の機能が明らかになりつつある.²⁾

われわれはこれまでに, α -*klotho* タンパク質の発現減少により臓器特異的にタンパク質分解酵素 cal-

pain が異常に活性亢進することを示し,³⁾ α -*klotho* タンパク質がタンパク質分解系の制御に係わることを明らかにしており, *klotho* マウスや自然老化マウスにみられる病態とタンパク質分解異常との関連を調べている. 本稿では, α -*klotho* タンパク質による calpain の活性制御機構と病態の関連に関する研究成果や, α -*klotho* を利用した抗老化研究への取り組みを中心に, 最近の *klotho* マウス研究から明らかになってきた知見について紹介したい.

2. *klotho* マウス

1997 年に鍋島らのグループによって, 単一遺伝子欠損により多彩なヒト老化症状を呈する遺伝子変異マウスが報告された.¹⁾ その原因遺伝子が *klotho* と命名されたことから, このマウスは *klotho* マウスと呼ばれている. *klotho* マウスは, 5 番染色体にある α -*klotho* 遺伝子の上流における外来遺伝子の挿入により α -*klotho* タンパク質を欠損したマウスである.¹⁾ *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 (Ta-

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 (〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2)

*e-mail: manya@tmig.or.jp

本総説は, 日本薬学会第 129 年会シンポジウム S10 で発表したものを中心に記述したものである.

Table 1. Phenotypic Characteristics of *Klotho* Mice

short lifespan	arteriosclerosis
infertility	osteoporosis
growth retardation	ectopic calcification
weight loss	cerebellar Purkinje cell decrease
spinal curvature	growth-hormone deficiency
hypokinesia	reduction in serum parathyroid hormone level
gait abnormality	elevation of serum calcium level
skin atrophy	elevation of serum phosphate level
atrophy of genital organs and thymus	elevation of serum 1,25(OH) ₂ D ₃ level
pulmonary emphysema	elevation of serum FGF23 level

ble 1).¹⁾ こうした多様な病態が、*α-klotho* というたった1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。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期待されている。これらの症状は組換え型 *α-klotho* タンパク質を発現させることで回復する。¹⁾ また、*α-klotho* タンパク質の過剰発現マウスでは野生型マウスよりも寿命が約30%延長することが報告されている。⁴⁾ ヒトの *α-klotho* 遺伝子における SNPs (single nucleotide polymorphisms) の研究から、遺伝子型が寿命の長さや冠動脈疾患、脳梗塞、骨粗鬆症の危険率に関与することが多数報告されており、⁵⁻⁷⁾ ヒト老化における *α-klotho* 遺伝子の重要性も明らかにされつつある。

3. *α-klotho* タンパク質に関するこれまでの知見

α-klotho 遺伝子は C 末端側に膜貫通領域と短い細胞質領域を持つ分子量約 130 kDa の I 型膜タンパク質をコードしている。¹⁾ 膜型の *α-klotho* タンパク質は ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 10 や ADAM17 といったプロテアーゼによるプロセシングを受けて、130 kDa と 68 kDa の N 末端側断片が分泌型となることが報告されており、⁸⁾ 分泌型タンパク質はマウスやヒトの血清や脳脊髄液において検出されている。^{9,10)} *α-klotho* 遺伝子の発現は腎尿細管、脳の脈絡膜、副甲状腺、心臓の一部に限局している。¹⁾ 変異型マウスでは *α-klotho* 遺伝子の発現がみられない組織にも異常が現れることから、分泌型と膜型の両方の機能を有するものと考えられる。

Table 1 に示すように *klotho* マウスは血清中のビタミン D (VD)、リン (Pi)、カルシウム (Ca) 濃

度が野生型に比べて高い。¹⁾ 骨の異常や組織の石灰化に密接に関与していると考えられる。最近、これらの代謝における *α-klotho* タンパク質の役割が相次いで報告されている。*α-klotho* タンパク質は糖分解酵素の一種である *β-glucosidase* と相同性を有する2つのドメインから構成される。^{1,11)} これまでに *β-glucosidase* 活性は示されていないが、*β-glucuronidase* という別の糖分解活性が弱いながら示されている。¹²⁾ この糖分解活性がカルシウムチャネル TRPV5 の N 結合型糖鎖の分解に係わりチャネル機能に影響することが示唆されている。¹³⁾ また、*α-klotho* タンパク質が Na⁺, K⁺-ATPase の細胞内輸送に関与することが報告され、Na⁺-Ca²⁺ 交換体を利用した Ca²⁺ 輸送制御への関与が示唆されている。¹⁴⁾ ところで、*klotho* マウスの高 VD 血症では活性型 VD₃ である 1,25(OH)₂D₃ の濃度が高い。通常野生型マウスでは 1,25(OH)₂D₃ 濃度が上昇すると、ネガティブフィードバック機構により 1,25(OH)₂D₃ の合成酵素 1 α -hydroxylase 活性が抑制される。*klotho* マウスではこのフィードバック機構が働いていないようである。¹⁵⁾ さらに、Fibroblast growth factor (FGF) 23 欠損マウスと *klotho* マウスの表現型の類似性から、FGF23 と *α-klotho* タンパク質の関係が研究され、FGF23 の FGF 受容体への結合に *α-klotho* タンパク質が必要であることが報告された。^{16,17)} FGF23 は FGF 受容体を介して腎臓における Pi の再吸収抑制と 1 α -hydroxylase 活性抑制作用を示すため、FGF23 欠損マウスも高 Pi、高 VD 血症となる。*klotho* マウスと FGF23 欠損マウスを VD 制限食で飼育すると表現型が改善する。最近、ヒトにおいて *α-klotho* 遺伝子の変異が家族性腫瘍性石灰沈着症に関与することが報告された。¹⁸⁾

4. *klotho* マウスにおけるタンパク質の変化

α-klotho タンパク質の機能解析の最初のアプローチとして、筆者らは、*α-klotho* 遺伝子の変異によるタンパク質レベルでの変化を網羅的に解析した。解析結果の例として4週齢マウスの各臓器の膜画分タンパク質の SDS-PAGE パターンを Fig. 1 に示した。野生型マウスと *klotho* マウスを比較すると coomassie brilliant blue 染色で検出できる程の違いがいくつかの臓器で認められた。これらのタンパク質をリジルエンドペプチダーゼによりペプチド断片化し、質量分析計及びアミノ酸シーケンサーによ

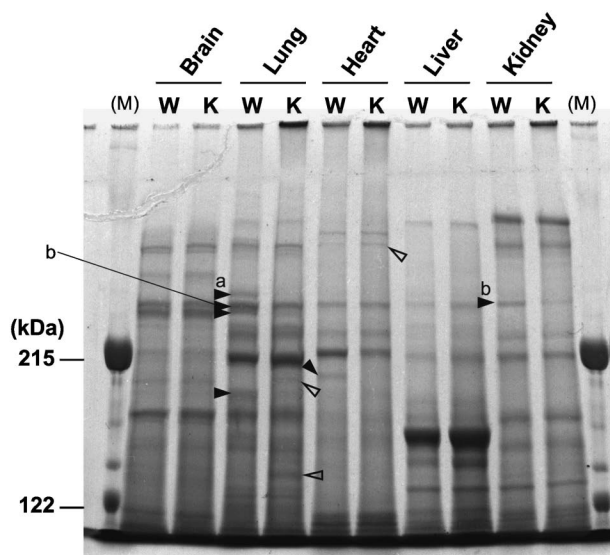


Fig. 1. Different Pattern of Proteins in Several Tissues of Wild and *Klotho* Mice

The microsomal proteins from several tissues of 4-week-old male mice were subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. Lane W, wild mice; lane K, *klotho* mice; lane (M), molecular mass markers. The closed triangles indicate the proteins that decrease with the *klotho* mice. Open triangles indicate the proteins that increase with the *klotho* mice. The proteins of a and b (about 250–300 kDa) were subjected to in-gel lysylendopeptidase digestion and the sequences of the resulting peptides were determined by a combination of Edman degradation and mass spectrometry. A database search of protein sequences revealed that these proteins were β II-spectrin (a) and α II-spectrin (b).

り分析した。その結果、*klotho* マウスで減少していた肺と腎臓の約 280 kDa のタンパク質が α II-spectrin であること、³⁾ *klotho* マウスの肺で減少していた約 300 kDa のタンパク質は β II-spectrin であることが分かった。さらに、抗体を用いたウェスタンブロット解析から、*klotho* マウスの肺と腎臓における α II-spectrin や β II-spectrin といった細胞骨格系タンパク質の減少は分解によることが分かった。4 週齢の *klotho* マウスでは腎臓の組織染色から石灰化や組織の損傷、構造の異常がないことを確認したことから、³⁾ こうした細胞骨格系タンパク質の分解は組織の傷害等に先立って起こり、腎障害の要因となることが考えられる。

5. *klotho* マウスにおけるタンパク質分解の亢進

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、約 140 kDa と約 150 kDa の分解産物を生じることが知られている。¹⁹⁾ そこで、calpain に切断されて生じる末端配列に特異的な抗体を作製し、*klotho* マウスにおける α II-spectrin の分解は calpain によ

ることを確認した。³⁾

calpain は細胞骨格など細胞内の様々なタンパク質の分解反応に関与し、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。^{20–25)} また、生体内における様々な生理現象や病態への関与が示されている。^{26–29)} 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いまだ不明な点が多いが、N 末端の自己消化により活性化型になる機構が知られている。^{26,30–32)}

α II-spectrin の分解がみられた 4 週齢マウスの腎臓における calpain の活性化について調べた結果、*klotho* マウスでは μ -calpain がほぼ完全に活性化型になっていた [Fig. 2(A)].³⁾ 一方、m-calpain の活性化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るが、*klotho* マウスにおける μ -calpain の活性化は極めて異常な状態である。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タンパク質であると考えられている。^{26,33)} 興味深いことに、*klotho* マウスの腎臓では calpastatin が消失していた [Fig. 2(A)]. *klotho* マウスにおける calpastatin mRNA の発現量は変化していないことから、³⁾ calpain の強力な活性化によって calpastatin が完全に分解されて calpain を制御できない状態であると考えられる。

α -*klotho* タンパク質と μ -calpain の活性化の関与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マウスを解析した [Fig. 2(B)]. ホモ変異マウスにおける変異表現型は 4 週齢頃から観察され、3 週齢までは外見上野生型と区別できず、腎臓の石灰化等も観察されない。³⁾ 2–3 週齢のマウスについて調べた結果、ホモ変異マウスでは 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

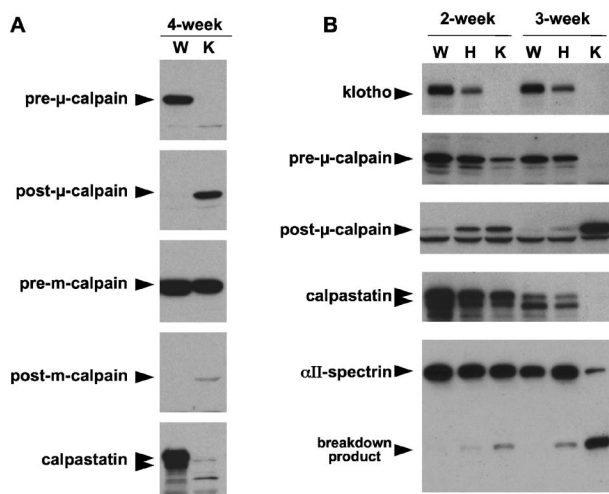


Fig. 2. Changes of μ -Calpain, m-Calpain and Calpastatin in the *Klotho* Mice Kidney (A), Dependency of Calpain, Calpastatin and α II-Spectrin on Klotho Protein (B)

Western blots of kidney cytosolic and microsomal fractions of 2-, 3- and 4-week-old male mice. The pre- μ -calpain and pre-m-calpain are inactive forms. The post- μ -calpain and post-m-calpain are active forms. Arrowheads indicate the positions of the corresponding molecules. Lanes W, wild; lanes H, hetero; lanes K, *klotho* (homo).

で α II-spectrin の分解が進行することが分かった。一方、ヘテロ変異マウスにおける α -klotho タンパク質の発現量は野生型マウスの約 1/2 程度であった。このとき μ -calpain は *klotho* マウスの約 1/2 程度活性化しており、calpastatin は野生型マウスより減少していた。ヘテロ変異マウスはほとんど異常な表現型を呈さないこと、¹⁾ α -klotho タンパク質の減少に伴って活性化型 μ -calpain が増加していたことは、 α -klotho タンパク質の発現量と μ -calpain の活性化の明らかな相関関係を示している。つまり、 α -klotho タンパク質には μ -calpain の活性化を抑制する働きがあることを示唆するものである。

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。^{34,35)} また、アデノウイルスを用いて α -klotho タンパク質を異所性に発現させると NO 産生が増加し *klotho* マウスの血管障害が緩和されるということも報告されている。³⁶⁾ さらに、NO には calpain のタンパク質分解を抑制する効果があることが報告されており、³⁷⁾ α -klotho タンパク質による calpain 活性化の抑制に NO が関与することも考えられる。

6. μ -calpain 活性化の臓器特異性

腎臓以外の器官ではどうなっているのか、4 週齢

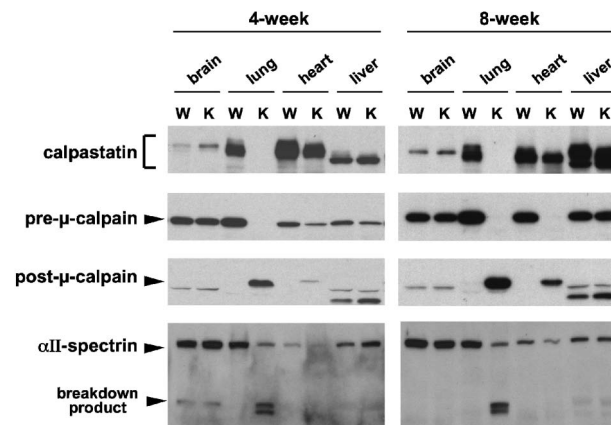


Fig. 3. Organ-specific Differences in Calpastatin, μ -Calpain, and α II-Spectrin between Wild (lane W) and *Klotho* (lane K) Mice

Western blots of organ extracts of 4- and 8-week-old male mice.

から寿命に近い 8 週齢までの各臓器における μ -calpain の活性化について調べた。³⁾ その結果、SDS-PAGE で spectrin の分解を認めた肺で腎臓と同様の現象が観察された (Fig. 3)。*klotho* 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から、³⁸⁾ μ -calpain の活性化が要因となっていることが考えられる。しかし、肺では α -klotho 遺伝子は発現していないことから分泌型の関与が考えられる。一方、脳と肝臓では全く変化は観察されず、 μ -calpain の異常活性化は腎臓と肺に特異的な現象であることが分かった。ヒトの慢性腎疾患では *klotho* マウスにみられる症状が報告されており、^{39,40)} そのような患者では α -klotho 遺伝子の発現低下が認められていること、⁴¹⁾ 高血圧ラットの腎臓では α -klotho 遺伝子の発現低下とともに calpastatin が減少すること、^{42,43)} など興味深い知見がいくつか報告されている。

心臓では 4 週齢において非常に弱い μ -calpain の活性化が検出された。その後加齢に伴って活性化は亢進し 8 週齢でほぼ完全に活性化していた (Fig. 3)。*klotho* マウスには寿命近い週齢になると突然に心不全で死んでしまうケースがみられる。この突然死について心臓における μ -calpain 活性化という観点から考えると、寿命近い 8 週齢で完全に活性化し、calpastatin と α II-spectrin の分解が始まるという経時変化は非常に辻つが合う。心臓での μ -calpain の活性化は、動脈硬化 (石灰化) や高血圧の進行に続いて起こることから、腎臓や肺のケースと

は異なって、組織の Ca^{2+} 濃度上昇などによって惹起される二次的な反応であると考えられる。しかしながら、こうした動脈硬化などの疾患から心不全へ至る過程を理解する上で重要な現象である。また、calpain の活性化を阻害する薬剤などにより心不全の予防に応用できる可能性も考えられる。

7. 自然老化と μ -calpain の活性化

筆者らは *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 α -*klotho* タンパク質の減少を起因とする μ -calpain を介するタンパク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. 4).³⁾ 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 α -*klotho* タンパク質の発現減少と、 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。

8. おわりに

α -*klotho* 遺伝子の発見から10年、カルシウムやリン、VD代謝との関連が明らかにされ、 α -*klotho* タンパク質の研究は着実に進歩してきた。しかし、 α -*klotho* タンパク質の真の機能、老化との関係については、まだ想像の域をでていない。様々な分野から新たな視点で研究されることで、 α -*klotho* 遺伝子の係わる生命現象の全体像が明らかにされていくこ

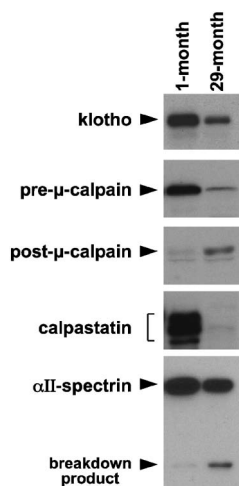


Fig. 4. Changes in the Kidney of Aged Normal Mice
Western blots of 1-month-old and 29-month-old C57BL/6 mice. Arrowheads indicate the positions of the corresponding molecules.

とを期待している。

本総説に記載の動物実験は、「動物実験等の実施に関する基本指針」及び「動物愛護管理法」遵守の下、東京都健康長寿医療センター実験動物委員会の承認を受けて行われた。

REFERENCES

- 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., *Nature*, **390**, 45–51 (1997).
- 2) Nabeshima Y., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **85**, 125–141 (2009).
- 3) Many H., Inomata M., Fujimori T., Dohmae N., Sato Y., Takio K., Nabeshima Y., Endo T., *J. Biol. Chem.*, **277**, 35503–35508 (2002).
- 4) Kurosu H., Yamamoto M., Clark J. D., Pastor J. V., Nandi A., Gurnani P., McGuinness O. P., Chikuda H., Yamaguchi M., Kawaguchi H., Shimomura I., Takayama Y., Herz J., Kahn C. R., Rosenblatt K. P., Kuro-o M., *Science*, **309**, 1829–1833 (2005).
- 5) Arking D. E., Kresova 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. USA*, **99**, 856–861 (2002).
- 6) Ogata N., Matsumura Y., Shiraki M., Kawano K., Koshizuka Y., Hosoi T., Nakamura K., Kuro-o M., Kawaguchi H., *Bone*, **31**, 37–42 (2002).
- 7) Arking D. E., Atzmon G., Arking A., Barzilay N., Dietz H. C., *Circ. Res.*, **96**, 412–418 (2005).
- 8) Chen C. D., Podvin S., Gillespie E., Leeman S. E., Abraham C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19796–19801 (2007).
- 9) Imura A., Iwano A., Tohyama O., Tsuji Y., Nozaki K., Hashimoto N., Fujimori T., Nabeshima Y., *FEBS Lett.*, **565**, 143–147 (2004).
- 10) Li S. A., Watanabe M., Yamada H., Nagai A., Kinuta M., Takei K., *Cell Struct. Funct.*, **29**, 91–99 (2004).
- 11) Grabnitz F., Seiss M., Rucknagel K. P., Staudenbauer W. L., *Eur. J. Biochem.*, **200**, 301–309 (1991).

- 12) Tohyama O., Imura A., Iwano A., Freund J. N., Henrissat B., Fujimori T., Nabeshima Y., *J. Biol. Chem.*, **279**, 9777–9784 (2004).
- 13) Chang Q., Hoefs S., van der Kemp A. W., Topala C. N., Bindels R. J., Hoenderop J. G., *Science*, **310**, 490–493 (2005).
- 14) Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R., Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabeshima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T., Nabeshima Y., *Science*, **316**, 1615–1618 (2007).
- 15) Yoshida T., Fujimori T., Nabeshima Y., *Endocrinology*, **143**, 683–689 (2002).
- 16) Kurosu H., Ogawa Y., Miyoshi M., Yamamoto M., Nandi A., Rosenblatt K. P., Baum M. G., Schiavi S., Hu M. C., Moe O. W., Kuro-o M., *J. Biol. Chem.*, **281**, 6120–6123 (2006).
- 17) Urakawa I., Yamazaki Y., Shimada T., Iijima K., Hasegawa H., Okawa K., Fujita T., Fukumoto S., Yamashita T., *Nature*, **444**, 770–774 (2006).
- 18) Ichikawa S., Imel E. A., Kreiter M. L., Yu X., Mackenzie D. S., Sorenson A. H., Goetz R., Mohammadi M., White K. E., Econs M. J., *J. Clin. Invest.*, **117**, 2684–2691 (2007).
- 19) Harris A. S., Croall D. E., Morrow J. S., *J. Biol. Chem.*, **263**, 15754–15761 (1988).
- 20) Doctor R. B., Bennett V., Mandel L. J., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **264**, C1003–C1013 (1993).
- 21) Saido T. C., Yokota M., Nagao S., Yamaura I., Tani E., Tsuchiya T., Suzuki K., Kawashima S., *J. Biol. Chem.*, **268**, 25239–25243 (1993).
- 22) Bednarski E., Vanderklish P., Gall C., Saido T. C., Bahr B. A., Lynch G., *Brain Res.*, **694**, 147–157 (1995).
- 23) Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J. O., Leverin A. L., Bahr B. A., Mallard C., Hagberg H., *J. Biol. Chem.*, **276**, 10191–10198 (2001).
- 24) Liu X., Rainey J. J., Harriman J. F., Schnellmann R. G., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **281**, F728–F738 (2001).
- 25) 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–H1294 (2001).
- 26) Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K., *Biochem. J.*, **328**, 721–732 (1997).
- 27) Carafoli E., Molinari M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 193–203 (1998).
- 28) Lee M. S., Kwon Y. T., Li M., Peng J., Friedlander R. M., Tsai L. H., *Nature*, **405**, 360–364 (2000).
- 29) Vanderklish P. W., Bahr B. A., *Int. J. Exp. Pathol.*, **81**, 323–339 (2000).
- 30) Imajoh S., Aoki K., Ohno S., Emori Y., Kawasaki H., Sugihara H., Suzuki K., *Biochemistry*, **27**, 8122–8128 (1988).
- 31) Saido T. C., Nagao S., Shiramine M., Tsukaguchi M., Sorimachi H., Murofushi H., Tsuchiya T., Ito H., Suzuki K., *J. Biochem. (Tokyo)*, **111**, 81–86 (1992).
- 32) Brown N., Crawford C., *FEBS Lett.*, **322**, 65–68 (1993).
- 33) Nakamura M., Inomata M., Imajoh S., Suzuki K., Kawashima S., *Biochemistry*, **28**, 449–455 (1989).
- 34) Saito Y., Yamagishi T., Nakamura T., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., Matsumura Y., Masuda H., Kurabayashi M., Kuro-o M., Nabeshima Y., Nagai R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 324–329 (1998).
- 35) Nagai R., Saito Y., Ohyama Y., Aizawa H., Suga T., Nakamura T., Kurabayashi M., Kuro-o M., *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**, 738–746 (2000).
- 36) Saito Y., Nakamura T., Ohyama Y., Suzuki T., Iida A., Shiraki-Iida T., Kuro-o M., Nabeshima Y., Kurabayashi M., Nagai R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 767–772 (2000).
- 37) Koh T. J., Tidball J. G., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **279**, C806–C812 (2000).
- 38) 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).
- 39) London G. M., Drueke T. B., *Kidney Int.*, **51**, 1678–1695 (1997).
- 40) Rostand S. G., Drueke T. B., *Kidney Int.*, **56**,

- 383–392 (1999).
- 41) 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**, 1015–1020 (2001).
- 42) 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**, 865–871 (1998).
- 43) Averna M., De Tullio R., Salamino F., Minafra R., Pontremoli S., Melloni E., *J. Biol. Chem.*, **276**, 38426–38432 (2001).