

【トピックス】

老化のプロテオミクス

—プロテオーム解析の切り口から見えてくるもの—

戸田年総

東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チーム

はじめに

近年さまざまな生命科学研究において、genomics や transcriptomics, proteomics, glycomics, metabolomics などのいわゆる『-omics』研究が盛んに行われているが、『-omics』研究は基礎老化研究においても有効なアプローチになり得るのであるのか。特に老化のプロテオーム解析について、その切り口から見えてくるものを考えてみたい。

1. ヒトゲノムプロジェクトの終了と『-omics』時代の到来

ヒトゲノム計画の成果により、ヒトの生命は2万~2万5千の遺伝子によってコードされていることが明らかとなった[1]。この中から、分化細胞においては約10%ほどの遺伝子がタンパク質に転写翻訳され、細胞の形態形成や生命維持、および分化機能の発現に寄与していると推定されている。プロテオーム[2]は、このように実際に発現しているタンパク質の集合体として「ひとまとめ」にしたものであり、プロテオームこそが細胞の形態や機能を直接支配している物質的実体である。プロテオミクスは、このようなプロテオームを網羅的に研究することによって生命の仕組みを明らかにしようというアプローチであるが、その後この動きはRNAや糖鎖、代謝物にまで及び、様々な-omics研究が行われるようになった。

2. 基礎老化研究におけるプロテオミクス

プロテオーム研究がスタートしたのは1995年であるが、老化研究で利用されるようになるのは2000年頃からである。2000年に発表された老化のプロテオーム解析に関する論文はわずか8件であったが、その年、我々は老化研究におけるプロテオーム解析の重要性を主張し[3]、マウスの脳の老化に伴うタンパク質の発現変化をプロテオーム解析して、Electrophoresisに発表した[4]。その後、老化のプロテオーム解析に関する論文数は年々増え続け、本年9月末の時点で老化と関連が深い酸化ストレスに関する論文を含めると597件が報告されている。

老化の原因について様々な作業仮説が提唱されてきたが、細胞が好氣的エネルギー代謝を行っている以上必ず発生する酸化ストレスが老化を促進し、老化に伴う様々な細胞傷害の根本的な原因の一つとなっていることは、もはや否定のできない事実である。しかし、酸化ストレスがもたらす機能攪乱の分子メカニズムについては、あまりよくわかっていない。直接の影響としては脂質の過

酸化やDNAのダメージ、タンパク質の酸化的修飾の3つが考えられるが、近年のプロテオミクスの技術的進歩によって、タンパク質の酸化的修飾の関与が次第に明らかになってきている。

3. 老化のプロテオミクスで見えてくるもの

二次元電気泳動法に基づいたディファレンシャルプロテオミクスには、タンパク質の発現変化のみならず、翻訳後修飾などの構造変化も捉えることもできるという利点がある[5]。実際我々が行ったマウス海馬の加齢変化に関するプロテオーム解析[6]でも、Calmidulin (CaM)、Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1)、およびnm23-M1 (NDPK β)の発現レベルが老齢マウスで低下する傾向が認められたが、さらに質量分析による詳細な構造解析を行った結果、C末端側のCa²⁺結合ドメインに位置する2箇所のメチオニンが選択的に酸化されること、および高齢マウスでは酸化型が増加していることがわかった。その後Anbanandam博士らの研究によって[7,8]、酸化型のCaMは細胞膜上のCa(2+)-AT-Pase (PMCA)や種々の標的タンパク質に結合し、細胞の代謝を抑制することが報告され、CaM酸化の生理的意義が次第に明らかになってきている。さらに我々は、CaM本来の機能であるカルシウムシグナリングにも酸化の影響が及ぶのではないかと考え、タンパク質相互作用解析装置AnaLight Bio200を用いて解析を行った結果、酸化CaMはCa²⁺親和性が低いことが明らかとなった(投稿準備中)。この結果は、酸化ストレスはCaMの酸化を介してCaM kinase IIの下流の細胞内シグナル伝達にも影響を及ぼすことを示しており、大変興味深い。

プロテオミクスが酸化ストレス応答のメカニズムの解明に大きな貢献を果たした、もう一つの重要な研究は、抗酸化酵素 Peroxiredoxin (Prx)に関するものである。今後の老化制御研究において重要な標的タンパク質の一つになるものと思われるので少し詳しく紹介する。

Prxは、哺乳動物では少なくとも6種類のアイソフォームとして発現されていることがわかっているが(図1)、そのうちPrx I, II, III および IV (2-Cys型Prx)は活性に直接関わる2つのCysを持っている。Prx V (atypical 2-Cys型Prx)も活性に関与する2つのCysを有しているが、上記4種との配列相同性が低い。これに対しPrx VI (1-Cys型Prx)はN末端側のCysのみが活性に関わっており反応のメカニズムが若干異なると考えられている。

- sional electrophoresis profiles of tissue proteins during the course of aging. *Electrophoresis*. 21:1853-1871, 2000.
5. Godovac-Zimmermann J, Soskic V, Poznanovic S, et al. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis*. 20:952-961, 1999.
 6. Toda T, Morimasa T, Kobayashi S, et al., Proteomic approach to determination of the significance of protein oxidation in the ageing of mouse hippocampus. *Applied Genomics and Proteomics* 2: 43-50, 2003.
 7. Bartlett RK, Bieber Urbauer RJ, et al. Oxidation of Met144 and Met145 in calmodulin blocks calmodulin dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* 42:3231-3238, 2003.
 8. Anbanandam A, Bieber Urbauer RJ, et al. Mediating molecular recognition by methionine oxidation: conformational switching by oxidation of methionine in the carboxyl-terminal domain of calmodulin. *Biochemistry* 44:9486-9496, 2005.
 9. Kim K, Rhee SG, Stadtman ER. Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron. *J Biol Chem*. 260:15394-15397, 1985.
 10. Kim K, Kim IH, Lee KY, et al. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem*. 263:4704-11, 1988.
 11. Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, et al. Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J Biol Chem*. 277:19396-19401, 2002.
 12. Yang KS, Kang SW, Woo HA, et al. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem*. 277:38029-38036, 2002.
 13. Biteau B, Labarre J and Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*. 425:980-984, 2003.
 14. Chang TS, Jeong W, Woo HA, et al. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J Biol Chem*. 279:50994-51001, 2004.