

9 老化とプロテオーム解析

とだ としふさ
■戸田 年総

東京都老人総合研究所
プロテオーム共同研究グループ



戸田 年総
1975年大阪大学理学部化学科卒業。77年同大学院理学研究科生物化学専攻修士課程修了、同年東京老人総合研究所生化学部助手。88年大阪大学理学博士学位取得。88年～89年UCSF客員研究員を経て89年から同研究所遺伝子情報部門主任研究員。2002年よりプロテオーム共同研究グループリーダー。研究テーマはプロテオーム解析による老化のメカニズムの解明。趣味はスキー。

Key words : proteomics, aging, brain, oxidative stress, posttranslational modification

Abstract

生命のしくみの根源がDNAにあることは明らかである。しかし、細胞内で実際に働くのはタンパク質である。特に老化や疾患では、活性酸素などの酸化ストレスが、タンパク質の構造や機能に与える影響が問題となる。プロテオーム解析法は、翻訳後修飾の定量的・定性的に解析に最適なタンパク質分析法である。修飾によってタンパク質の等電点や分子量が変化した場合には二次元電気泳動上のスポット位置のずれとして、発現レベルの変化はスポット濃度の変化として現れる。タンパク質の同定や、修飾構造の確認は質量分析計によって行われる。

はじめに

すべての生物個体は、DNAの塩基配列の中に記録された遺伝子情報に基づいてタンパク質を合成し、タンパク質の機能によって細胞を作り出し、エネルギーを産生し、物質代謝を営むことによって生命を維持している。しかしながら、経時的な細胞内環境の変化の中には不可逆的なプロセスが含まれているために、やがては生命の維持が困難な状態に陥るものと考えられる。この不可逆的なプロセスこそが老化であり。生命維持が可能な最長期間が個体の寿命である。生物が種を保存する

ためには、個体が寿命に到達する前に次世代を再生産し、生命維持に最も適したDNAを伝える必要があるが、我々人類を含め地球上に現存する全ての生物は、このような再生産を繰り返してきた。

老化そのものは避けることのできない生物現象であるが、老化に伴って進行する身体機能の低下によって疾病を患い、自立した生活を営むことができなくなるようなことだけは、できれば避けたいものである。それには、先に述べた「細胞内で進行する不可逆的なプロセス」とはどのようなものか、なぜそのようなことが起きるのか、それによってなぜ疾患が発生しやすくなるのかといったことを解明しなければならない。

1. 線虫の寿命遺伝子研究でわかったこと

ヒトの最長寿命は120歳前後、ネズミは3年程度、線虫は1カ月程度といったように、生物種によって最長寿命が異なるが、これはDNAに記録された情報が異なるためである。このことを根拠に、老化のメカニズムは遺伝子の中に「プログラム」されているとする仮

説が、かつて提唱されたことがある。これは一見真理のようにも思えるが、現存する全ての生物種は、上述のように次世代を再生産しDNAを伝えることが必然であり、個体を消滅させることは必然ではないので、そのような情報が進化の過程で維持されたと考えることには無理がある。それでは、寿命の差は遺伝子のどのような部分の違いによるものであろうか。これを解明するために、同じ動物種の中の寿命の異なるミュータントの遺伝子を調べることが行われてきた。

線虫は、体長1ミリのミミズのような体を持つ動物で、平均寿命が21日と短い。体を構成する細胞も1,000個足らずと少なく、全遺伝子が既に判明しており、寿命の長短を左右する遺伝子も相次いで見つかっている。例えば東海大学助教授石井直明博士らは、寿命の短い線虫の系統の一部では、*mev-1*という遺伝子に異常があることを発見している。この遺伝子は、ミトコンドリアの電子伝達系のcomplex IIを構成する Succinate dehydrogenase cytochrome b560という酵素をコードしており、この遺伝子に異常があるとクエン酸からユビキノンへの電子伝達が正常に行われなくなる。その結果、ミトコンドリアでの活性酸素の発生が上昇し、これが寿命の短縮を引き起こすらしい。この発見は、活性酸素が老化を引き起こしている可能性があることを示しており、大変興味深い。

一方、*daf-2*や*age-1*という遺伝子に異常が起きると、逆に線虫の寿命が通常の2~3倍に延びることがわかった。これらの遺伝子は、インスリンシグナルの受容と伝達に関与するタンパク質をコードしていることがわかっており、これらの遺伝子の異常によってエネルギー代謝が低下し、結果的に活性酸素の発生が抑制される

ことによって寿命が延長されているものと見られる。これらの寿命遺伝子の発見も、寿命と活性酸素との関係を強く示唆している。

2. 老化に伴うタンパク質の変化

ワトソンとクリックがDNAの二重螺旋構造を発表してからちょうど50年目に当たる2003年に、ヒトの全ゲノムDNAの解読が完了し、我々ヒトの体はおおよそ32,000の遺伝子によって作られていることが明らかとなった。これによって、今後さまざまな遺伝性疾患の原因遺伝子が見つかるものと期待されるが、実際DNA上に記録されているのはタンパク質の一次構造（アミノ酸配列）と、その発現調節に関わる『情報』に過ぎず、細胞内で実際に生理活性を有し、物質代謝やエネルギー代謝、シグナル伝達などを行っているのはタンパク質である。したがって、加齢に伴う細胞機能の低下の直接的な原因は『タンパク質の加齢変化』である。では、タンパク質の加齢変化とは、いったいどのようなものであろうか。線虫の寿命遺伝子に関する研究によって得られた結果を踏まえ、活性酸素などによる酸化ストレスが老化の根本原因であると考えた場合、図1のような「老化の構図」が浮かび上がってくる。実際に、高齢者の脳や血管、腎臓などの組織においては、老人斑などの異常なタンパク質やペプチドの蓄積が観察されており、酸化ストレスがタンパク質の変性の原因になっている可能性が高い。

異常なタンパク質の蓄積が、病気を引き起こす原因となりえることを明らかにしてくれたのは、BSEにおけるプリオンの発見であった。その後、様々な神経変性疾患で見られる類似のタンパク質の不溶化が、プリオンタンパク質の不溶化と極めてよく似ており、いずれも

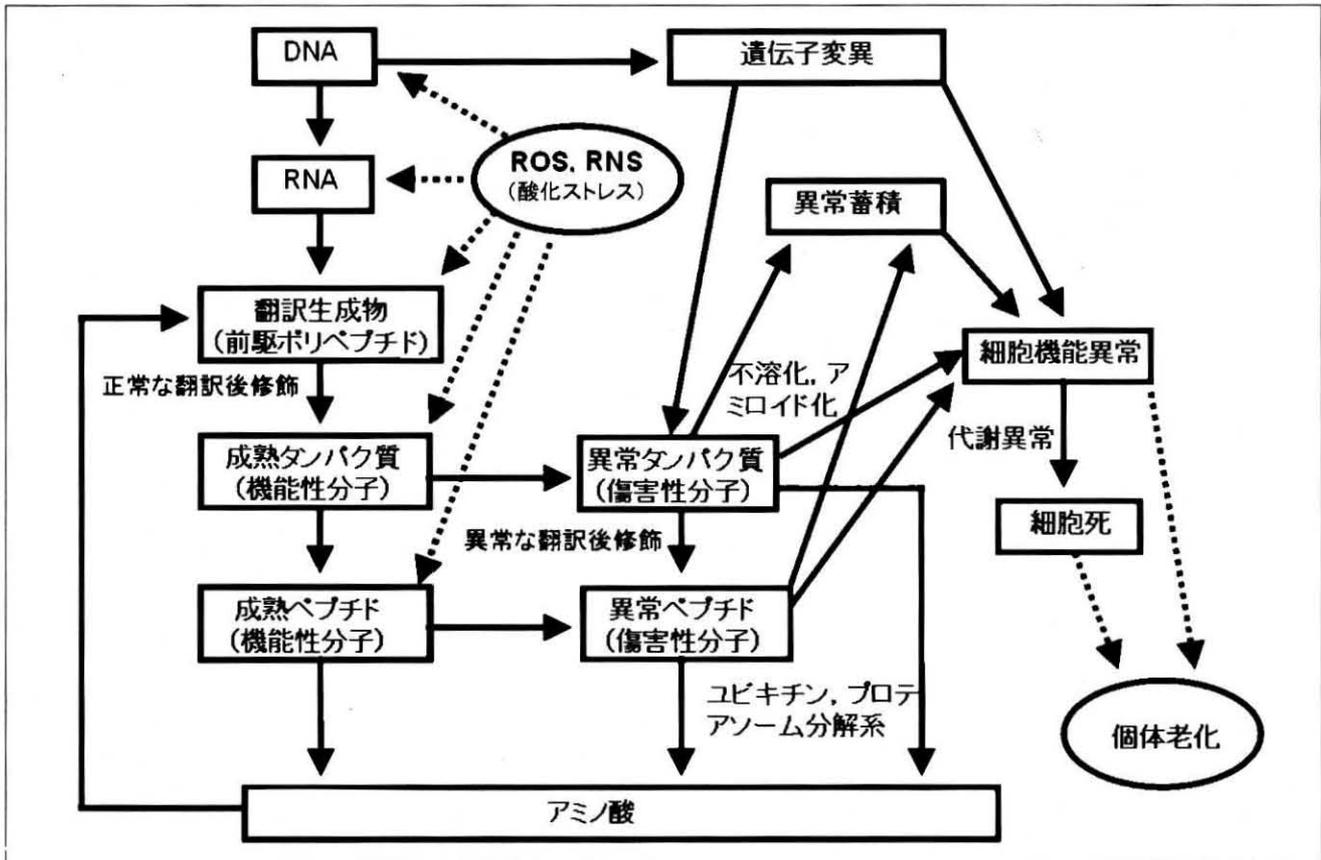


図1 老化機構の作業仮説：主にミトコンドリアで発生したROS (Reactive Oxygen Species) やRNS (Reactive Nitrogen Species) などの酸化ストレス分子種は、DNAやRNA、タンパク質、脂質などを酸化的に修飾すると考えられ、その結果生じる異常なタンパク質やペプチドが細胞傷害を引き起こすことが個体老化の直接的な原因になっていると考えられる。

『βシート構造』というタンパク質のコンフォメーションに関わる病気であることがわかった。これらのうち若齢で発症した症例においては家族性が見られ、遺伝子の異常見つかっているが、高齢で発症する弧発性の症例では遺伝子の異常が見つからないことが多い。遺伝子に異常が無くても結果としてタンパク質に異常蓄積が起きるのは、タンパク質が作られた後で、タンパク質構造に異常が発生する何か酸化ストレスの影響によって起きていることを示唆している。

3. 老化に関するタンパク質のプロテオーム解析

現在行われているプロテオーム解析は、主に二次元電気泳動に基づくものと、二次元LC

に基づくものに二分される。老化に関するタンパク質を見つけ出すためには、量的な変化と質的な変化の両面で解析を行うことが重要であるが、それには図2に示すような流れに沿ったプロテオーム解析が最適である。酸化ストレスによって構造上に異常を起こしたタンパク質の多くは、ユビキチン化を受け、プロテアソームなどで分解除去されると考えられているが、二次元電気泳動のパターン上には、タンパク質の合成、修飾、分解のすべての過程が写し出される。

我々が実施した「脳のタンパク質の加齢変化のプロテオーム解析」の1例を図3に示す。生後6カ月、12カ月、および24カ月のマウスの脳の海馬領域のタンパク質を抽出し、二次元電気泳動で分離後、高感度のSYPRO Ruby

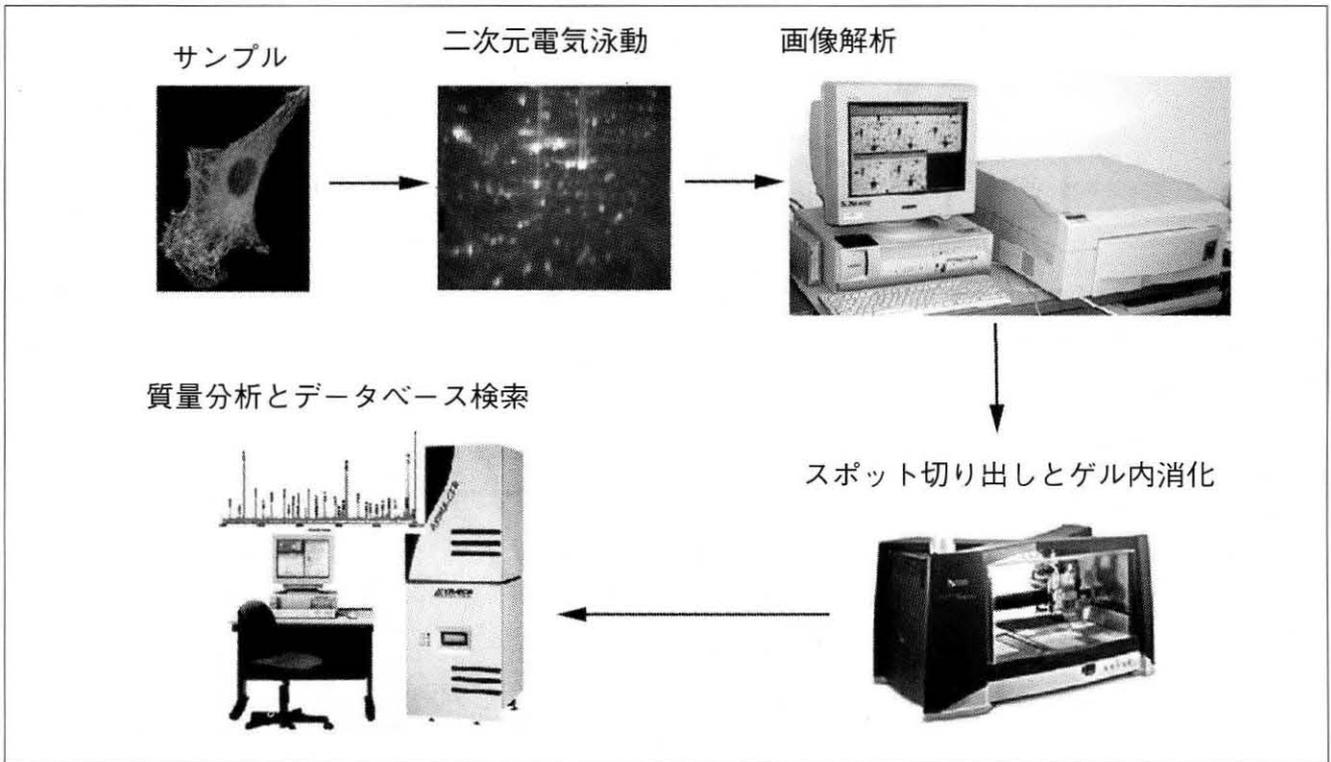


図2 二次元電気泳動に基づいたプロテオーム解析の流れ：組織や細胞から抽出されたタンパク質は、「固定化pH勾配等電点電気泳動」で分離した後に蛍光色素で染色し、コンピュータで画像解析する。加齢に伴って変化したタンパク質スポットを切り出し、ゲル内で消化した後に質量分析を行い、データベースを検索して同定する。

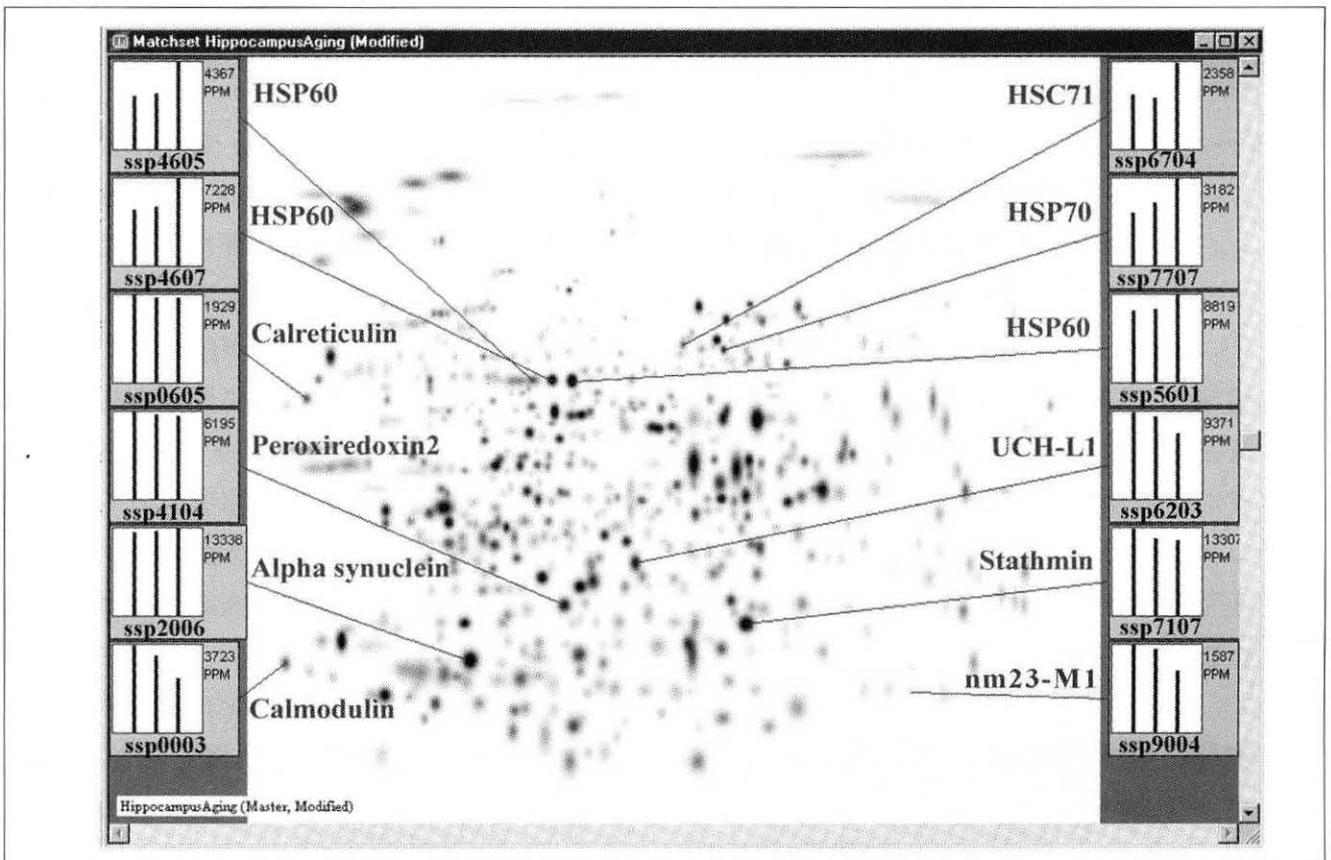


図3 マウスの脳のタンパク質の加齢変化：6カ月齢、12カ月齢、24カ月齢のマウスの海馬領域よりタンパク質を抽出。二次元電気泳動で分離した後に、経時変化を定量的に画像解析した。

蛍光色素にて染色し、レーザー励起型の蛍光スキャナーで画像を読み取り、各タンパク質の加齢に伴う変化を画像解析した。その結果、12カ月齢から24カ月齢の間に、HSP60、HSP70、HSC71といった、タンパク質の立体構造（フォールディング）の維持管理において重要な役割を果たしている分子シャペロンが上昇する一方で、ユビキチン化-プロテアソーム分解系の最終段階に関わる UCH-L1 (Ubiquitin c-terminal hydrolase L-1) や、カルシウム濃度依存的にタンパク質の機能を調節

するカルモデュリンなどが減少する傾向を示した。分子シャペロンやラジカルスカベンジャーの上昇は、老齢マウスの脳内でラジカルの発生が高まっていることへの応答であると思われた。そこで我々は、これらのタンパク質は老化に伴いより強く酸化を受けているのではないかと考え、これを確かめるために、老齢マウスの海馬からカルモデュリンを単離し、質量分析で酸化修飾の有無を調べてみた。その結果、老化したマウスの海馬のカルモデュリンでは特にC末端に近い位置のメチオニ

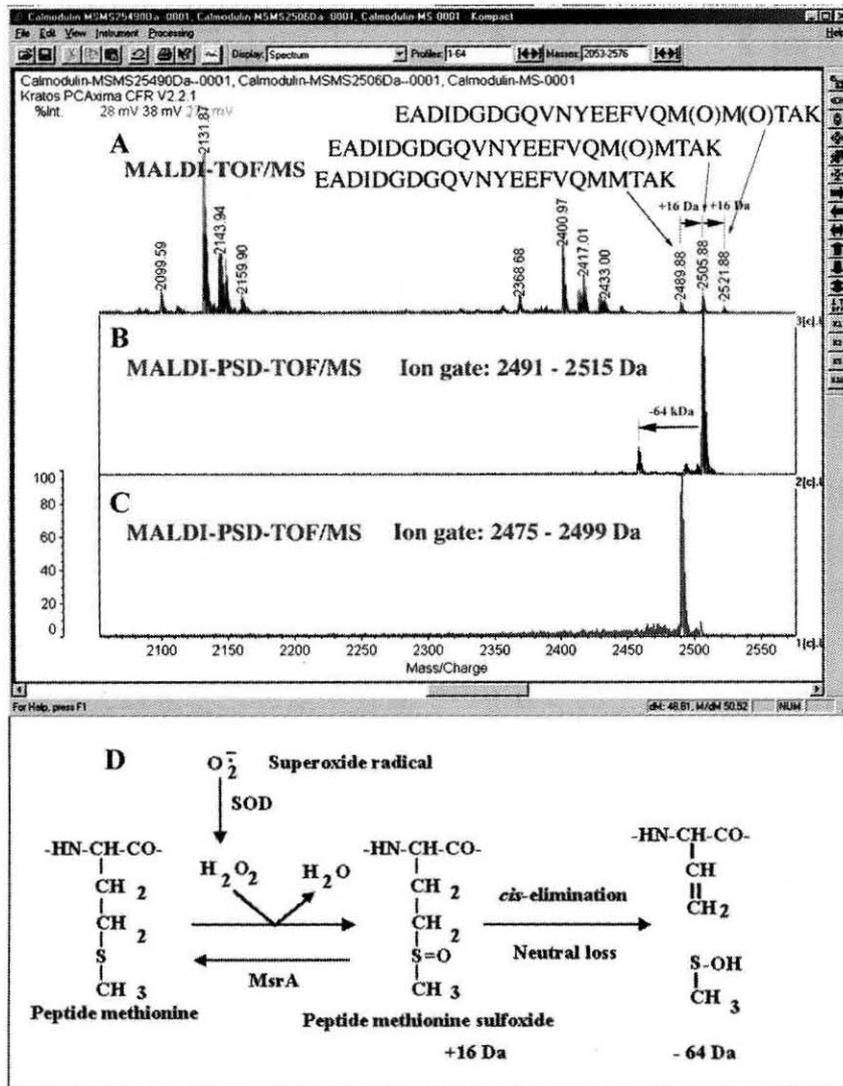


図4 質量分析計を用いた酸化メチオニン (Methionine sulfoxide) の分析：メチオニンの酸化が伺われたカルモデュリンの2506 DaのペプチドについてはPSD (Post-source decay) モードでMALDI-TOF/MSを行った結果、メチオニンの酸化による64 Daの質量減少 (ニュートラルロス) が観察された。

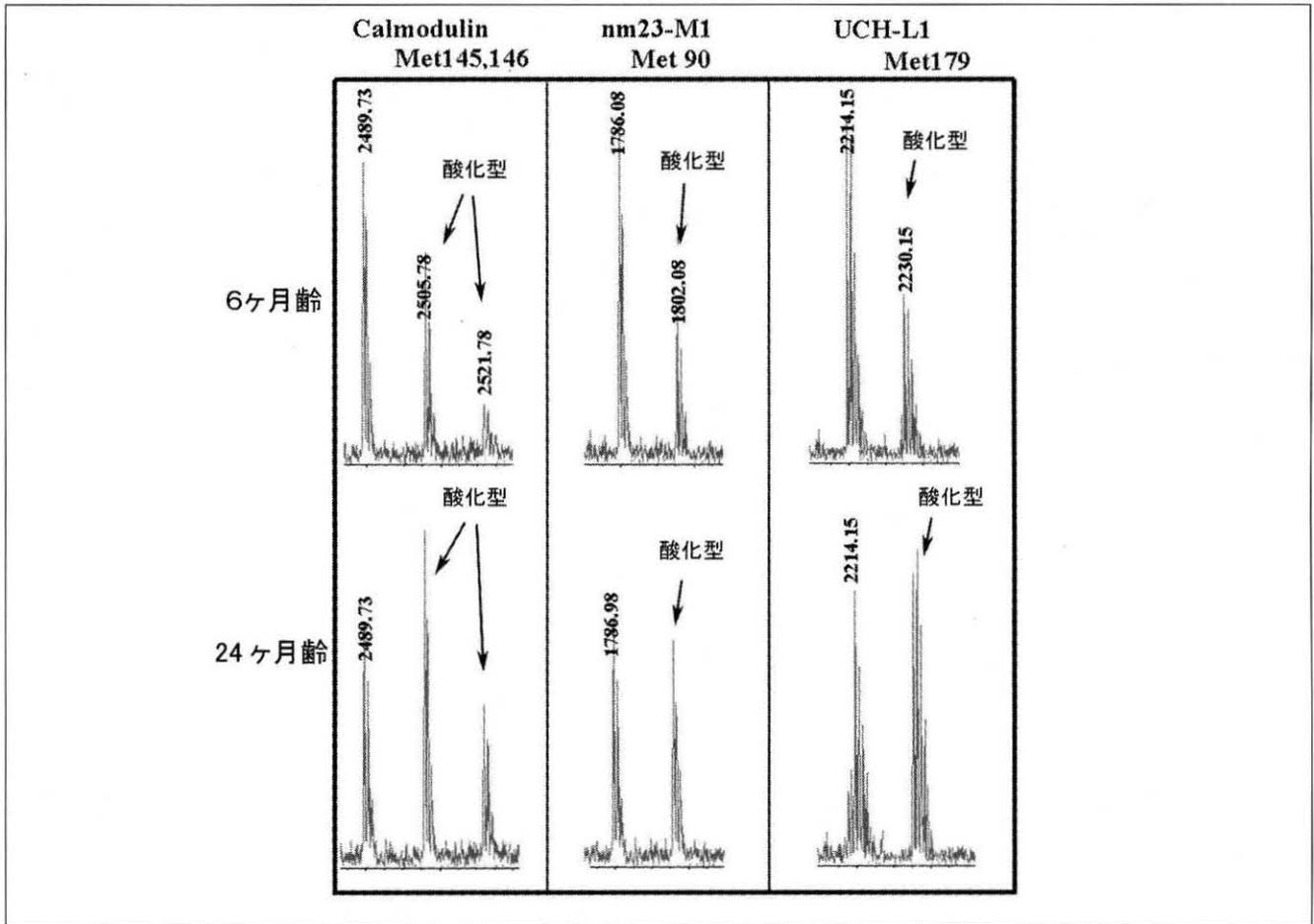


図5 6ヶ月齢と24ヶ月例のマウスの海馬から抽出されたカルモデュリン, nm23-M1, UCH-L1について, 質量分析を行い, 酸化型と還元型のタンパク質の比率を調べた結果。老齢ラットの海馬では, それぞれのタンパク質で酸化型が増加していることがわかった。

ンが強く酸化されていることがわかった (図4)。メチオニンの酸化は, 試験管内でタンパク質を取り扱っている過程においても比較的起きやすいので, 抽出から二次元電気泳動, 染色, トリプシン消化に至るすべてのプロセスにおいて常に還元剤を加えた条件でタンパク質を取り扱い, メチオニンの酸化状態の比較を行った。その結果, 12カ月例のマウスに比べ24カ月のマウスの海馬では, これらのタンパク質のメチオニン酸化が上昇していることがわかった。これは, 老化に伴いカルモデュリンの量が減少する原因の一つが, 酸化修飾による変性であることを示唆している。

しかし, 酸化されたタンパク質は, 常に速やかに分解されるというわけではなく,

リジンやアルギニンが酸化されてカルボニル化されたものについては, 一部は酸化された状態のまま細胞内に貯留されると考えられる。現在私たちは, カルモデュリンが酸化を受けたときに, どのようなコンフォメーション変化を起こすのか, それによってカルモデュリンの生理活性にどのような変化が生じるかといった点についても解析を進めている。これまでに予備的に行った分析では, カルモデュリンのカルシウムに対する親和性が酸化によって低下することを示唆するデータを得ており, 酸化は単に分解を促進するだけでなく, 酸化タンパク質による機能攪乱も引き起こしている可能性がある。