

老化の仕組みとプロテオミクス

—タンパク質の切り口からみた老化—

戸田年総

○ヒトは年をとると、皮膚にはしわやしみがめだちはじめ、毛髪は薄くなって白髪が増え、目や耳が衰え、物忘れがひどくなる。また、呼吸器や循環器の機能が衰え、免疫能も低下し、けがや病気からの回復も遅くなる。そもそも個体発生から性成熟までの期間は100%遺伝子にプログラムされたメカニズムに従って分化を行ってきた細胞も、その陰では活性酸素などの攻撃に曝されつづけ、遺伝子とタンパク質にダメージや修飾を受けながら、しだいに機能を低下させている。このとき、タンパク質が直接酸化修飾を受けた場合はもちろんのこと、遺伝子がダメージを受けた場合も転写や翻訳を経てタンパク質の変化という形になって現れ、その結果として細胞機能の低下や破綻を招くので、老化の仕組みを解明するためにはタンパク質を分析することが不可欠である。“網羅的なタンパク質研究法”として1995年に鳴り物入りでスタートしたプロテオミクスは、生命科学全般に応用が可能な技法ではあるが、実は“老化研究のために生まれてきたようなものである”といっても過言ではない。

本稿では、なぜ老化研究にプロテオミクスが最適であるかを議論してみたい。



Key word : 老化, プロテオミクス, タンパク質, 活性酸素, 翻訳後修飾

ヒト全ゲノムDNAの解読がほぼ終了し、当初予想されていた数を大幅に下まわるおよそ30,000の遺伝子によって、われわれの体がつくられていることが明らかとなった^{1,2)}。同じ遺伝子をもつ動物種内ではすべての個体がほぼ同じ寿命を示し、異なる遺伝子をもつ動物種間では平均寿命が異なることを根拠に、“寿命は遺伝子によって規定されている”とする考え方が、いわば公理のように信じられているが、こと老化の仕組みに関してはかならずしもそうであるとはいいい切れない。

発生から性成熟までの期間の発達は100%遺伝子の支配下で行われ、しかも個体の生存期間と性成熟までに要する期間との間には一定の関係があるために、個体の死までがすべて遺伝子にプログラムされているかのようにみえるが、実は遺伝子は個体の生命維持のために働いており、それが破綻するときに死が訪れると考えたほうが、すくな

くとも高等動物においては現実をよく反映しているように思われる。このことは発生から性成熟までの発達期間は個体差が比較的少ないのに対し、次世代の再生産という生物学的使命を終えた後(女性の場合は閉経後)の余命期における諸臓器の機能低下においては、年を重ねるごとに個体差が大きくなり、発症する疾患や死亡原因もさまざまであることから確かである。

それならば、本来遺伝子の利己的な保存を目的とする遺伝子の支配を破綻に追い込み、個体を死に追いやる要因とはいったい何であろうか。現在もっとも可能性が高いと考えられているものが、おもにミトコンドリアで発生する O_2^- ラジカルやOHラジカルなどの活性酸素³⁾である。活性酸素の攻撃によってダメージを受けたDNAや、変性したタンパク質が細胞内に蓄積し、本来の機能を障害する程度が限度を越えたとき、細胞の生命維持機能が破綻するものと考えられている。タンパク質が直接ダメージを受けた場合はもちろんのこと、DNAがダメージを受けた場合でもタンパク質

Mechanism of aging and proteomics

Tosifusa TODA :

東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究グループ

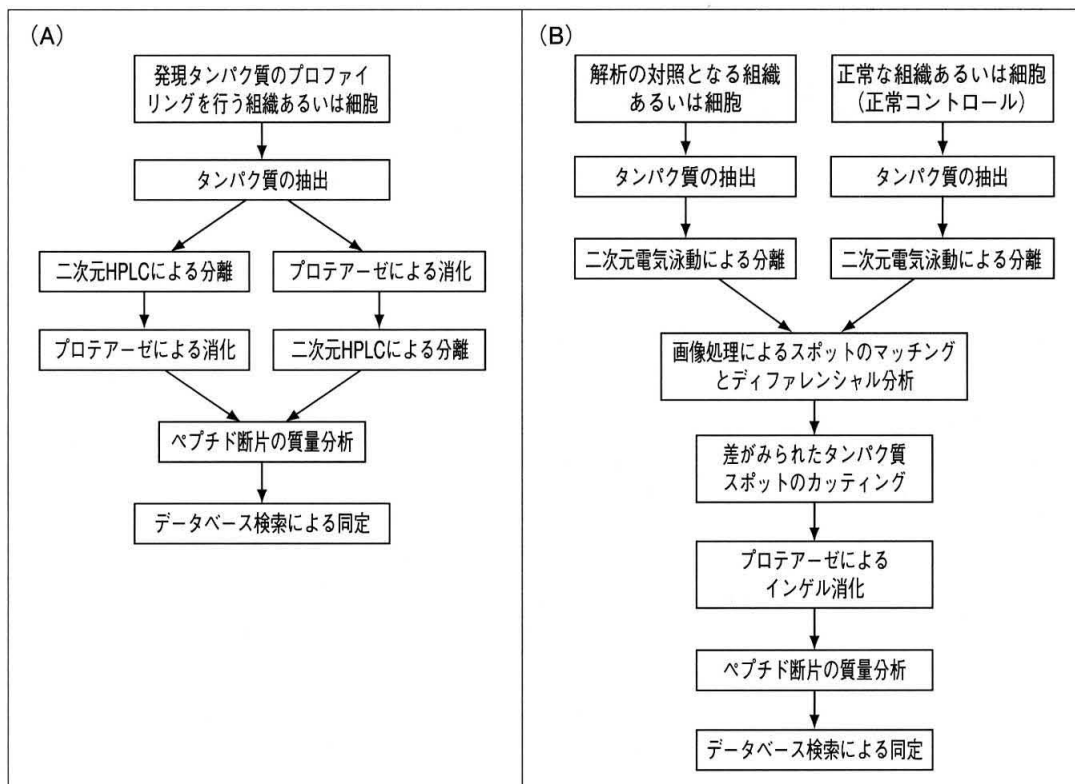


図 1 プロテオミクスにおける二通りの方法論
 A：発現プロテオミクスに最適な方法論。
 B：病態プロテオミクスに最適な方法論。

の発現の変化という形を経て細胞機能を障害するので、加齢に伴うタンパク質の変化を“プロテオミクス”によって網羅的に解析することが、細胞に老化形質をもたらしている“真犯人”を探しだすための一番の近道である。

生理的老化と老年期疾患のはざまに潜むタンパク質の変化

家族性 Alzheimer 病や Parkinson 病、筋萎縮性側索硬化症などの遺伝的神経変性疾患では、タンパク質のβシートコンフォメーション化と、それに伴うタンパク質の不溶化、および分解系の異常が起こっていることがしだいに明らかとなり、これが神経機能の異常や神経細胞死を誘発する要因のひとつと考えられるようになってきている^{4,5)}。家族性の神経変性疾患の患者では、蓄積されるタンパク質そのものやタンパク質を分解する酵素、アミロイドタンパク質の重合化反応にかかわるタンパク質などをコードする遺伝子に異常が認められており、これらの変異が直接的にタンパク質の異常な蓄積を誘発しているものと考えられている。

一方、高齢者に多く発症する孤発性の Alzheimer 型老年期痴呆や Parkinson 病の場合、家族性神経変性疾患ほど顕著ではないものの、変性した組織ではやはり不溶化したアミロイド様タンパク質の蓄積や色素顆粒へのタンパク質の蓄積が認められることが多く、また高齢者の腎や血管、脳組織や老年期疾患の病理組織においても、アミロイド様タンパク質の蓄積や色素顆粒の蓄積が認められている^{6,7)}。

このようにタンパク質が異常蓄積する原因として考えられることは、老化した細胞では長年にわたり活性酸素の攻撃に曝されつづけたことによりβシートコンフォメーション化を起し、不溶化したタンパク質をもはや分解除去しきれなくなるような状況に陥っているのではないかということである。そして、このような状況をタンパク質サイドから解明する手段としては、プロテオミクスがもっとも有効であると考えている。

老化研究に最適なプロテオミクス

プロテオミクスが従来のタンパク質科学と

とも大きく異なる点は“分析の網羅性”にあるが、これを実現するための方法論として現在、大きく2つの流れができつつある。ひとつはおもに二次元 HPLC を分離手段とする“発現プロテオミクス”⁸⁾であり、もうひとつは二次元電気泳動を分離手段とする“病態プロテオミクス”⁹⁾である(図1)。

二次元 HPLC に基づく“発現プロテオミクス”は、ゲノム解析におけるショットガン方式に対応するものであり、個々のタンパク質の意義はさておき、特定の組織や細胞で発現するタンパク質をとりあえず片っ端から捕まえてしまおうというものである。これに対し“病態プロテオミクス”は、発現タンパク質をまず網羅的に分離分析しようという考え方は同じであるが、最終的に特定の疾患や、分化、不死化、老化といった病理学的・生理学的プロセスにおける責任タンパク質を捕まえようという具体的な目的をもったものである点が、二次元 HPLC に基づく“発現プロテオミクス”とは異なる。また、二次元電気泳動に基づく“病態プロテオミクス”はタンパク質の翻訳後修飾を分析する手段としても優れており、この点でも老化研究にふさわしい方法論であるといえる(「サイドメモ」参照)。

すべての細胞が同じメカニズムで老化しているのか

老化はすべての臓器や組織・細胞に発生する普遍的な現象であるが、老化に伴う障害がはじまる時期や障害される機能、および進行するスピードは細胞によって異なる。このことは、細胞の老化のプロセスにはすべての細胞種に共通する普遍的な部分と、細胞の分化状態に依存する特異的な部分があることを意味している。そのため、老化研究は細胞種ごとに実施し、老化に伴うタンパク質の変化を個別に解析したうえで、それらの結果を突き合わせ相互に比較検討し、普遍的な老化の部分と細胞特異的な老化の部分を分別する必要がある。ちなみに増殖性細胞と非増殖性細胞では老化のメカニズムがまったく異なっているかのように見えるが、両者の間に共通のメカニズムはかならず存在するはずである。増殖性細胞と非増殖性細胞で共通の老化とはいったいどのようなものか、

たいへん興味深いところである。

線維芽細胞や内皮細胞、角化細胞などの増殖性細胞が有限の分裂寿命をもつことはよく知られた事実であり、これにはテロメア長の短縮がかかわっているとされている¹⁰⁾が、その意味はまだ完全に解明されたわけではない。もしも老化の本質がテロメア長の短縮にあるとすると、非増殖性細胞の老化をいったいどう説明したらよいのだろうか。

そこで、著者らはまず、ヒト由来の正常二倍体線維芽細胞 TIG-3 細胞を用いて“増殖性細胞の老化のプロテオーム解析”¹¹⁾を行った。その結果、加齢に伴うタンパク質の変化は実に複雑で、図2に示すように、①細胞の分裂加齢に伴い単調に減少するもの、②逆に単調に増加するもの、③有意な変化を示さないもの、④いったん増加した後に減少に転じるもの、および、⑤減少後に増加に転じるもの、などさまざまなパターンを示すことがわかった。

さらに、細胞の老化に伴って変動するタンパク質のなかには、細胞骨格の形成にかかわる調節タンパク質のほかに、活性酸素の消去にかかわるラジカルスカベンジャー酵素や、変性したタンパク質の再折り畳みに関与する分子シャペロン、および不要となったタンパク質の除去にかかわる分解系の酵素が数多く含まれていることも明らかとなった。このうちビメンチンはアクチンとの相互

サイド メモ

病態プロテオミクス

もともとプロテオミクスは二次元電気泳動と質量分析の組合せからスタートしたものであるが、その後キャピラリー電気泳動法や二次元 HPLC 法、微小流路表面親和クロマト法など、さまざまな方法を組み合わせたプロテオミクスが登場してきた。今後は研究目的ごとに異なる方向に進んでいくものと思われるが、二次元電気泳動と質量分析にさらにコンピュータ画像解析による“タンパク質ディファレンシャルディスプレイ法”を組み合わせた“ディファレンシャルプロテオミクス”が病態解析にもっとも適したプロテオミクスであることから、最近この手法をとくに“病態プロテオミクス”とよぶようになってきている。

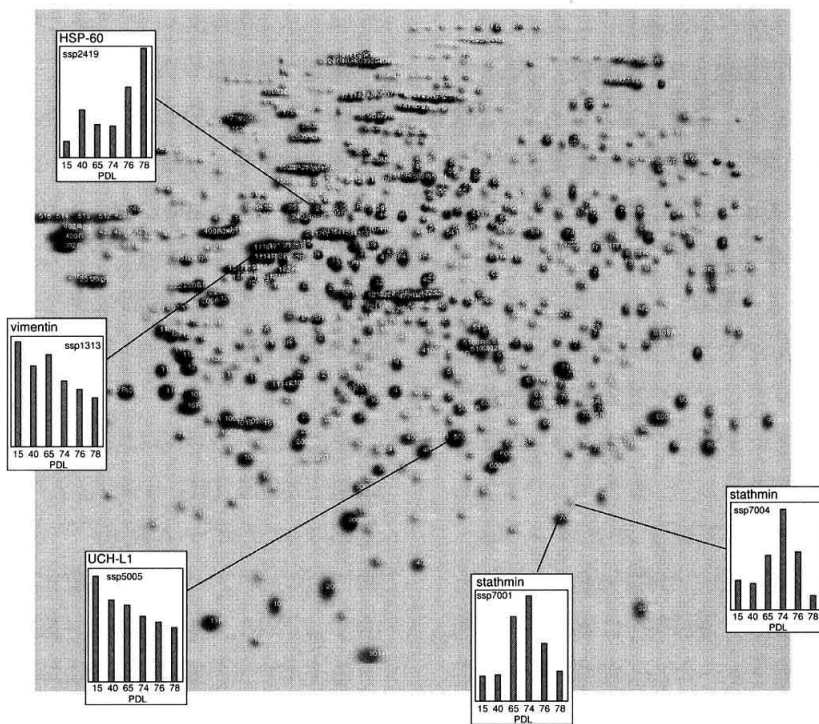


図 2 ヒト正常二倍体線維芽細胞の細胞老化(分裂加齢)に伴うタンパク質の変化

作用をもち、中間径フィラメントの形成を調節するタンパク質であり、スタスミンはチューブリンとの相互作用をもち、微小管の形成を調節するタンパク質である。この両者の変化は、老化細胞の形態変化や遊走性の変化、および多核細胞の出現などとも関係している可能性が高い、SOD1とHSP60はいずれも酸化ストレスによって誘導を受けるタンパク質であり、SOD1は活性酸素の除去に、HSP60は活性酸素によって変性を受けたタンパク質の処理にかかわるタンパク質である。このことは細胞老化の末期においては細胞内の活性酸素の発生が上昇しており、これに対する反応が起こっているものと思われるが、これらの上昇で本当に活性酸素の影響が完全に排除できているのであろうか。そのSOD1も終末期には、ふたたび減少に転じることから、老化の最終段階では活性酸素除去システムそのものが破綻をきたすものと考えられる。

その一方で、酸化されポリユビキチン化された変性タンパク質がプロテアソームで分解を受けた後に、切れ残ったペプチド断片からユビキチンをふたたび遊離させる働きをするUCH-L1(ユビキチンC末端水解酵素)が加齢とともに漸減してい

るといことは、細胞内にポリユビキチン化されたタンパク質やペプチドが蓄積されやすい状況に徐々に陥っている可能性があることを示唆している。

多方、非増殖性細胞の老化の解析は培養細胞を用いて行うことはできないので、これについては各月齢のマウスの脳の組織の比較検討を行った¹²⁾。とくに海馬の領域について実施した分析結果の一部を図3に示す。増殖性細胞の分裂加齢でみられたビメンチンの低下や、スタスミンの一過性の上昇は認められず、細胞の骨格構造には大きな変化はないものと思われたが、SOD1およびHSP60、HSP70、HSP71の上昇が認められた。このことは、老化に伴って海馬の領域では活性酸素の発生が上昇しており、これに対するストレス応答が起こっていることを示している。その一方で、活性酸素によって修飾や変性を受けたタンパク質に分解除去に重要な役割を果たしているUCH-L1の低下がやはり老齢マウスの海馬でも認められたことから、これが老化に伴うタンパク質の代謝回転の低下をもたらし、 β コンフォメーション化したタンパク質やペプチドを除去できなくなる要因のひとつになっている可能性がある。

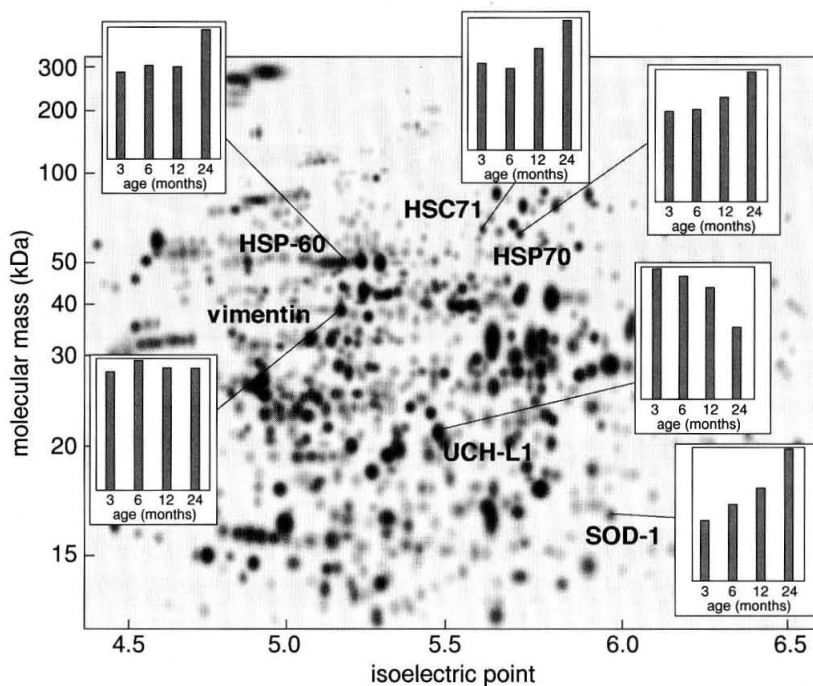


図 3 マウスの個体老化に伴う脳(海馬領域)のタンパク質の変化

● おわりに

このように“病態プロテオミクス”は、タンパク質という切り口から老化の本質に迫るための有効なアプローチである。今後、多くの老化研究者がさまざまな動物種や組織、細胞系を用いた老化研究において“病態プロテオミクス”を活用することによって、あらたな知見が数多く生まれることが期待される。

文献

- 1) Lander, E. S. et al. : *Nature*, **409** : 860-921, 2001.
- 2) Venter, J. C. et al. : *Science*, **291** : 1304-1351, 2001.
- 3) 谷口直之 : *細胞工学*, **15** : 1370-1379, 1996.

- 4) 森島真帆, 井原康夫 : *生化学*, **73** : 1297-1307, 2001.
- 5) 辻 省次 : *実験医学*, **18** : 2655-2661, 2000.
- 6) 橋詰良夫 : *現代病理学体系, 成長と加齢*. 中山書店, 1995, pp. 183-188.
- 7) 水谷俊雄 : *現代化学増刊, 老化の科学*(積田 亨・他編). 東京化学同人, 1994, pp. 181-186.
- 8) 儀辺俊明・他 : *実験医学別冊, ポストゲノム時代の実験講座, プロテオーム解析法*(儀辺俊明, 高橋信弘編). 羊土社, 2000, pp. 105-110.
- 9) 戸田年総 : *実験医学増刊, ゲノム医学と基礎からのバイオインフォマティクス*(高木利久編). 羊土社, 2001, pp. 1443-1448.
- 10) Greider, C. W. : *Annual. Rev. Biochem.*, **65** : 337-365, 1996.
- 11) Toda, T. et al. : *Electrophoresis*, **19** : 344-348, 1998.
- 12) Toda, T. et al. : *J. Neurochem. Sci.* (in press)

* * *