

### 3. プロテオームを利用した老化のプロファイリング

戸田年総

老化は、多くの遺伝子産物の機能が複雑に絡み合い、長時間穏やかに進行する多因子のプロセスである。プロテオーム研究は、蛋白質の量的変動や翻訳語修飾、断片化、異常生成物の蓄積などを解析する目的に適した研究手法である。実際のプロテオーム研究では、まず二次元電気泳動で蛋白質を分離展開し、画像処理によってディファレンシャル分析を行って加齢に伴う蛋白質の変化を見つけだすことから始まる。続いて、質量分析によるペプチドマスフィンガープリンティングを行い、データベース検索によって蛋白質を同定し、老化における役割を明らかにする。

#### はじめに

Wilkins<sup>1)</sup>らによって始められたプロテオーム研究は、蛋白質研究の常道であった「クロマトグラフィーによる精製と活性測定による個別的研究」から、「二次元電気泳動による一挙分離と質量分析による網羅的研究」への転換をもたらした。プロテオーム研究がこれほど急速に発展した背景には、20世紀末に起こった4つの独立した出来事があった。第1点は、固定化

pH 勾配等電点電気泳動<sup>2)</sup>を行うための既成のゲルが市販されたことによって二次元電気泳動の解像度と再現性が飛躍的に向上し、遺伝子しか扱ったことのない分子生物学研究者にも、比較的容易に蛋白質の分離が行えるようになったこと。第2点は、二次元電気泳動画像解析<sup>3)</sup>を行うためのコンピュータシステムが低価格化・高機能化し、蛋白質レベルのディファレンシャルディスプレイが容易に行えるようになったこと。第3点は、蛋白質の分析に適した高分解能でハイスループットの質量分析計<sup>4)5)</sup>が続々登場したこと。そしてこれがおそらく最も重要なポイントであると思われる。第4点は、ゲノム情報の解読が進みデータベースが充実したことによって、ペプチドマスフィンガープリンティング<sup>6)7)</sup>による同定のヒット率が格段に向上したことである。

プロテオーム研究の登場によって蛋白質分析の高速化と微量化が一段と進み、最短では数日から1週間、粗抽出液中に存在する1 pmol以下の蛋白質の分析と同定を行うことも夢ではなくなった。今後さまざまな領域で、プロテオーム研究が展開されるものと思

#### [キーワード&略語]

プロテオーム、二次元電気泳動、画像解析、質量分析、ペプチドマスフィンガープリント、バイオインフォマティクス

ESI: electrospray ionization

MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization

TOF: time of flight

ICR: ion cyclotron resonance

FT: fourier transform

ROS: reactive oxygen species

PDL: population doubling level

IPG: immobilized pH gradient

われるが、その成果が最も期待される領域の1つが、細胞老化のプロファイリングである。老化に伴う細胞機能の変化には、多種多様な機能性蛋白質の量的および質的变化が密接にかかわっており、細胞老化のメカニズムの全容を解明するためには、プロテオーム研究のように網羅的な蛋白質研究が重要である。特に細胞の老化形質の発現には、活性酸素分子種 (ROS)<sup>8)</sup>の影響によって引き起こされる蛋白質の翻訳後修飾がかかわっていると考えられているが、プロテオーム研究はこのような「非酵素的な翻訳後修飾」を検出・同定する目的に適した研究手法である。

## 1 老化と蛋白質の関係

### 1) 老化に伴う遺伝子発現の変化

老化に伴い、さまざまな遺伝子の発現プロファイルに変化が生じることは、多くのグループによって実施されたメッセージレベルおよび蛋白レベルの研究<sup>9)~11)</sup>によって明らかである。しかし、実際の老化形質との結びつきについては必ずしも十分に明らかにされていない。その理由の1つは、メッセージの発現レベルと蛋白質のレベルは必ずしも比例せず、機能的な老化を考察する場合やはり蛋白質レベルの変化が重要であるということである。その一方で、従来の蛋白質研究手法では、あらかじめ「変化するであろうと思われる標的蛋白質」を想定したうえで個別の特異的分析法で定量し、「予想通りに変化したもの」を捉えることが行なわれてきたために、「予想もつかない蛋白質の変化」は見逃されてきた。これに対し、プロテオーム研究における「プロテインディファレンシャルディスプレイ」では事前の予想は全く必要がないので、先入観を差し挟まず真摯に変化を受け止めることができる。このため検出感度以上の変化であれば、漏らさずに捉えることができる。

老化に伴って発現が変化する原因としてはいくつかのことが考えられる。第1は、ゲノム本来のプログラムによって継時的に発現が調節される場合であり、老化のプログラム説を支持するものである。第2の可能性はゲノムDNAがダメージを受けることによって遺伝子の発現調節機構が狂った場合である。第3の可能性は、遺伝子の発現調節にかかわる蛋白質が翻訳後修飾によって質的变化を受けた場合である。いずれにせよ、このような発現レベルの変化はすべてプロテオーム

研究の対象となる。

### 2) 老化に伴う蛋白質分解系の変化

老化に伴い蛋白質の分解系に変化が生じることを示すデータも数多く得られている<sup>12)13)</sup>。特にプロテアソーム系の分解速度の低下<sup>14)</sup>が目立っており、これが蛋白質の異化分解を遅らせ、自家蛍光性蛋白質や不溶性蛋白質の蓄積の原因の1つとなっている可能性が高い。プロテオーム研究ではプロテアーゼ活性そのものを検出することは必ずしも容易ではないが、基質蛋白質の分解速度の変化や分解中間体の同定、構造解析には有効な手段である。

### 3) 老化に伴う翻訳後修飾蛋白質の変化

老化に伴う蛋白質の変化の中で最も重要であると考えられているのが、翻訳後修飾である。発生や分化のプロセスにおいては、リン酸化<sup>15)</sup>やアセチル化<sup>16)</sup>、アルギニン残基のシトルリン化<sup>17)</sup>などの酵素的修飾がかかわっているが、老化においてはむしろ酸化<sup>18)</sup>や糖化(グリケーション)<sup>19)</sup>などの非酵素的修飾がより重要であると考えられる。等電点や分子量に変化を生じるような修飾が起こった場合には、二次元電気泳動パターン上で異なる位置にスポットが出現するので、ディファレンシャルディスプレイによって容易に検出できる。さらに、蛋白質を酵素消化し、高分解能の多段質量分析(MS/MS)にかけることによって修飾を受けた部位を特定し、構造を推定することも可能である。各種の翻訳後修飾による分子質量と等電点の変化を表1にまとめた。

## 2 細胞老化のプロテオーム研究

細胞の老化は、次の2つのタイプに分けて考える必要がある。

- [1] 増殖性細胞の分裂加齢 (Replicative cell aging)
- [2] 機能性細胞の非分裂加齢 (Functional cell aging)

[1]は免疫系や造血系、表皮や消化管粘膜組織の再生力の加齢変化にかかわっており、[2]は心臓や脳などの非再生系の組織の機能的老化にかかわっているものと考えられる。

老人研では、これら両タイプの細胞の加齢に伴う機能変化にかかわっている蛋白質を探しだすことを目的としてプロテオーム研究を行っており、そのための基盤となる情報を得るために、[1]については老人研で樹立されたTIG-3細胞(ヒト正常二倍体線維芽細胞)

表1 翻訳後修飾による分子質量の変化

| 生理的（調節的）翻訳後修飾            |             |
|--------------------------|-------------|
| リン酸化                     | 79.98 Da    |
| アセチル化                    | 42.04 Da    |
| ミリスチル化                   | 210.36 Da   |
| 脱イミノ化                    | -0.98 Da    |
| 酵素的な糖鎖結合                 | 付加する糖の構造に依存 |
| （ヘキソースの<br>O-グリコシド結合の場合） | 162.14 Da   |
| 非生理的（非調節的）翻訳後修飾          |             |
| メチオニンの酸化                 | 16.00 Da    |
| チロシンの酸化的架橋               | -2.01 Da    |
| リジンのカルボニル化               | -1.01 Da    |
| ラセミ化                     | 不変          |
| 非酵素的なグリケーション             | 最終生成物の構造に依存 |
| （リジンの CML化の場合）           | 58.04 Da    |

の集団倍加数（PDL）の増加に伴うプロテオームプロファイルの変化を、[2]についてはC57BL/6マウスの月齢の増加に伴う脳の各組織のプロテオームプロファイルの変化<sup>20)</sup>を解析してデータベース化を行っており、一部はインターネット上で公開している<sup>21)</sup>。

実際のプロテオームプロファイリングは図1の流れに沿って行われる。本稿では増殖性細胞の分裂加齢のプロテオームデータベースの作成と、これを利用して筆者ら自身が行った細胞の不死化のプロテオーム研究を例にとって、実際の操作手順と分析結果の一部を紹介する。

## 1) 二次元電気泳動によるプロテオームの可視化

O'Farrell<sup>22)</sup>によって始められた古典的な二次元電気泳動は、一次元目の等電点電気泳動に両性担体を用いるものであったために再現性に難点があり、プロテオーム解析には適していなかった。それに対し、Rigettiら

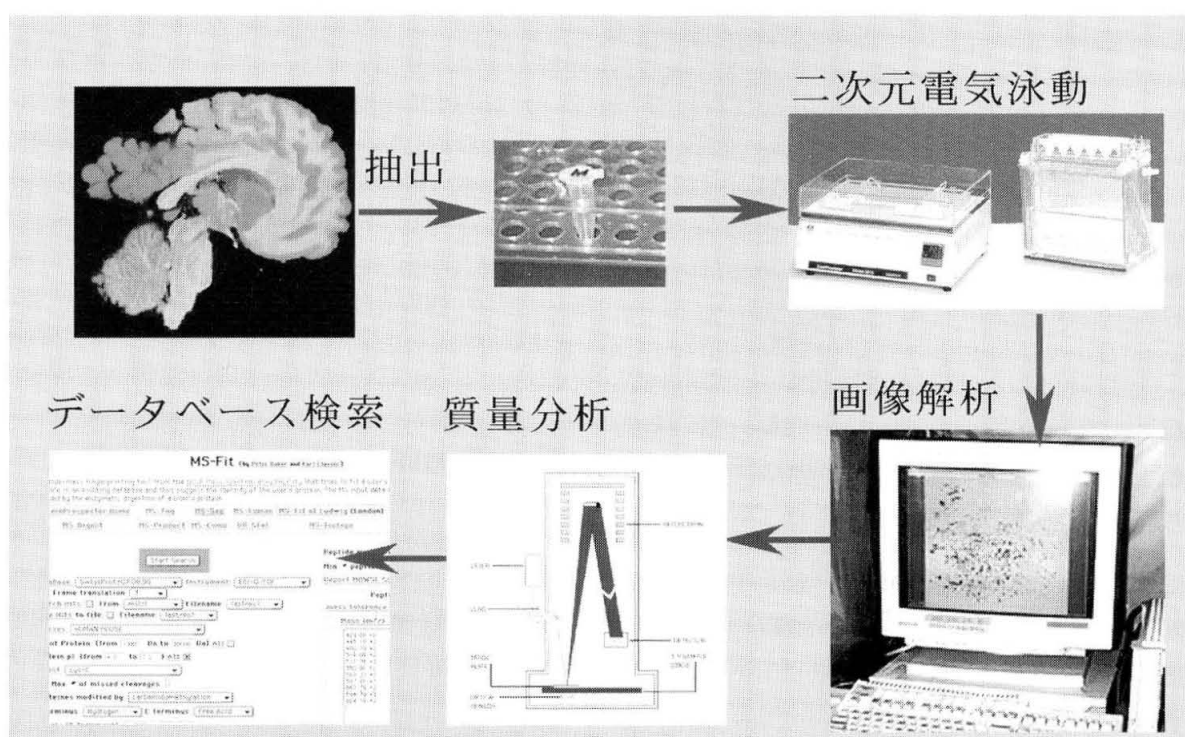


図1 プロテオーム研究の操作手順

組織や細胞から抽出された蛋白質は、二次元電気泳動で分離展開され、染色によって可視化された後、コンピュータ画像処理によってディファレンシャル分析される。この段階で見つめられる特異的なスポットは、ゲル中もしくはPVDF膜上で制限的に消化され、得られたペプチド断片の質量スペクトルが分析される（ペプチドマスフィンガープリンティング）。このデータをもとに、データベースを検索することによって同定と機能の推定が行われる

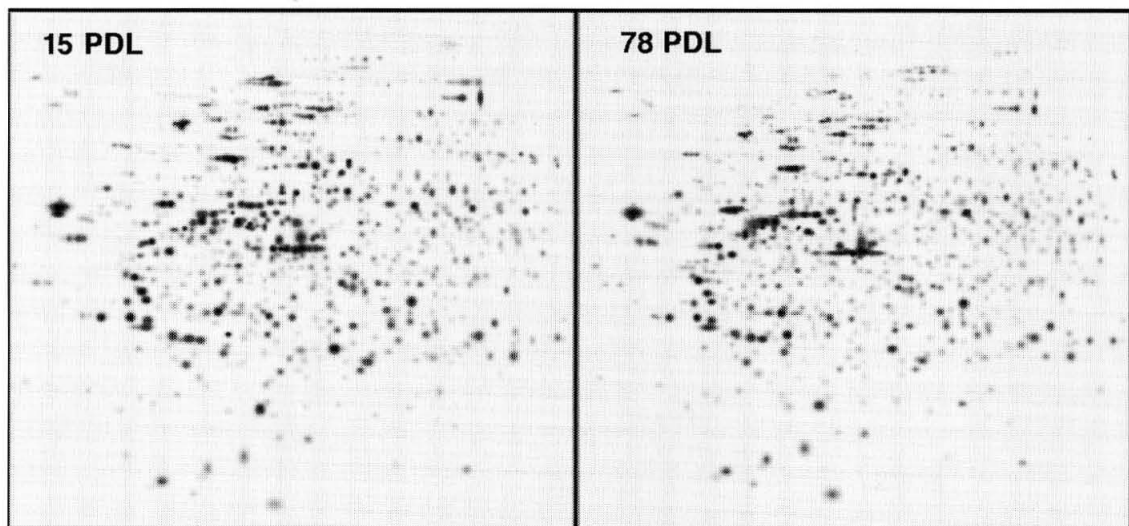


図2 ヒト正常二倍体線維芽細胞の二次元電気泳動パターン

15 PDLと78 PDLの時点における正常ヒト線維芽細胞のプロテオームを二次元電気泳動で可視化したもの。等電点電気泳動には pH 4～7のイモビライン (18 cmのもの) を使用。SDS-PAGEは、7.5%(w/v) のゲル濃度で、Tricine緩衝液を用いて行った

によって開発され、Gorgら<sup>23)</sup>によって確立された新しい二次元電気泳動 (IPG-DALT法) は、一次元目に市販の固定化pH勾配ゲルを用いて等電点電気泳動を実施するものであり、同一の研究グループ内での再現性はもちろん、研究グループ間でも十分な再現性が期待できるものである。

老人研では、有限な分裂寿命を有するヒトの正常二倍体線維芽細胞 (TIG-3) の各集団倍加数 (15 PDL, 40 PDL, 65 PDL, 74 PDL, 76 PDL, 78 PDL) における二次元電気泳動パターンの変化を分析し、その結果をデータベース化している。図2には、そのうちの15 PDLと78 PDLにおける二次元電気泳動パターンを示す。

## 2) 画像解析によるディファレンシャル分析

プロテオーム研究で最初に得られるデータは、図2のような二次元電気泳動パターンである。したがって、それらの画像データから意味のある情報を引き出すためには、コンピュータ画像処理によるディファレンシャルディスプレイ分析を行う必要がある。筆者らはUNIX版の旧型PDQUESTを使用しているが、現在はPC版とMac版のPDQUEST画像処理システムが市販されている。PDQUESTを利用して、上記の二次元電気泳動パターンに対するスポットの検出およびマッチングを行い、各PDLにおける各スポットの経時変化を定量的に分析した結果、図3のような数値データが

得られた。

老人研ではこの結果を、加齢に伴い増加するスポット、減少するスポット、いったん増加後減少するスポットなどに分類し、標準二次元電気泳動画像上に色分けして表示し、ホームページ上で公開している。インターネットを経由してアクセスし、ブラウザ上でスポットをクリックすることにより、詳しいデータを取り出すことができるようになっている。このデータベースは一般に公開しているものであるが、筆者ら自身もこれを利用したいいくつかの研究を行っている。1つは正常二倍体線維芽細胞とWerner症候群患者由来の線維芽細胞のプロテオームプロファイルのディファレンシャルディスプレイ分析によって見出されたスポットの中から、正常な細胞老化でも同じ変化するスポットを探し出す研究<sup>24)</sup>であり、もう1つは細胞の不死化に伴って変化するスポットの中から、正常な細胞老化とは逆の変化をするものを探し出す研究<sup>25)</sup>である。その成果の1つとして、細胞の不死化に伴って著明に減少するスポットの中に、TIG-3細胞の分裂加齢において分裂周期が延び始める時期 (Phase2からPhase3への移行期) に一過性に上昇するスポット (ssp 7001) があることを見出している。このような動きをする蛋白質は、何らかの形で細胞分裂の調節にかかわっている可能性が高いので、同定のために質量分析によるペプチドマ

| Table 1. PDL-dependent protein variation in cultured human fibroblasts.<br>The relative abundance, % total quantity, was obtained by calculation<br>from the integrated optical density data in EXCEL format. |        |        |        |        |        |        |         |      |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|------|-----------|
| -----                                                                                                                                                                                                         |        |        |        |        |        |        |         |      |           |
| Relative abundance (% total quantity)                                                                                                                                                                         |        |        |        |        |        |        |         |      |           |
| Protein                                                                                                                                                                                                       | -----  |        |        |        |        |        | Mr/1000 | pl   | Variation |
| ssp No.                                                                                                                                                                                                       | 15 PDL | 40 PDL | 65 PDL | 74 PDL | 76 PDL | 78 PDL |         |      |           |
| ssp3                                                                                                                                                                                                          | 0.058  | 0.060  | 0.071  | 0.147  | 0.112  | 0.077  | 17.7    | 4.82 | I/D       |
| ssp4                                                                                                                                                                                                          | 0.053  | 0.063  | 0.125  | 0.083  | 0.078  | 0.073  | 16.2    | 4.94 | I/D       |
| ssp7                                                                                                                                                                                                          | 0.125  | 0.120  | 0.126  | 0.142  | 0.103  | 0.063  | 21.0    | 5.02 | 0         |
| ssp8                                                                                                                                                                                                          | 0.053  | 0.065  | 0.102  | 0.068  | 0.042  | 0.016  | 17.1    | 5.03 | I/D       |
| ssp10                                                                                                                                                                                                         | 0.652  | 0.645  | 0.652  | 0.742  | 0.584  | 0.422  | 23.2    | 5.06 | -         |
| ssp11                                                                                                                                                                                                         | 0.048  | 0.063  | 0.081  | 0.098  | 0.056  | 0.013  | 16.7    | 5.08 | I/D       |
| ssp12                                                                                                                                                                                                         | 0.066  | 0.058  | 0.069  | 0.088  | 0.096  | 0.103  | 21.8    | 5.10 | I         |
| ssp13                                                                                                                                                                                                         | 0.438  | 0.453  | 0.557  | 0.337  | 0.273  | 0.207  | 13.1    | 5.11 | 0         |
| ssp16                                                                                                                                                                                                         | 0.829  | 0.515  | 0.987  | 0.497  | 0.574  | 0.654  | 22.5    | 5.05 | -         |
| ssp106                                                                                                                                                                                                        | 0.119  | 0.138  | 0.157  | 0.258  | 0.181  | 0.103  | 23.7    | 4.79 | I/D       |
| ssp107                                                                                                                                                                                                        | 0.063  | 0.077  | 0.089  | 0.214  | 0.193  | 0.171  | 23.5    | 4.82 | I         |
| ssp108                                                                                                                                                                                                        | 0.762  | 0.583  | 0.670  | 0.925  | 0.849  | 0.770  | 23.5    | 4.87 | -         |
| ssp110                                                                                                                                                                                                        | 0.353  | 0.228  | 0.197  | 0.236  | 0.150  | 0.060  | 28.1    | 4.97 | 0         |
| ssp112                                                                                                                                                                                                        | 0.405  | 0.301  | 0.396  | 0.877  | 0.512  | 0.138  | 25.1    | 4.97 | I/D       |
| ssp114                                                                                                                                                                                                        | 0.712  | 0.746  | 0.753  | 0.988  | 0.908  | 0.826  | 23.4    | 4.99 | -         |
| ssp119                                                                                                                                                                                                        | 0.908  | 0.625  | 0.690  | 0.263  | 0.431  | 0.603  | 26.1    | 5.04 | D/I       |
| ssp120                                                                                                                                                                                                        | 0.123  | 0.125  | 0.232  | 0.026  | 0.078  | 0.132  | 27.7    | 5.04 | -         |
| ssp121                                                                                                                                                                                                        | 0.534  | 0.439  | 0.581  | 0.403  | 0.494  | 0.587  | 25.1    | 5.06 | -         |
| ssp122                                                                                                                                                                                                        | 0.113  | 0.068  | 0.094  | 0.219  | 0.166  | 0.110  | 28.7    | 5.06 | I/D       |
| ssp123                                                                                                                                                                                                        | 0.062  | 0.050  | 0.072  | 0.051  | 0.053  | 0.056  | 24.5    | 5.10 | -         |
| ssp125                                                                                                                                                                                                        | 0.064  | 0.073  | 0.065  | 0.017  | 0.032  | 0.048  | 26.5    | 5.14 | D/I       |
| ssp127                                                                                                                                                                                                        | 0.491  | 0.935  | 0.641  | 0.501  | 0.757  | 1.019  | 27.6    | 5.00 | -         |
| ssp128                                                                                                                                                                                                        | 0.114  | 0.115  | 0.125  | 0.072  | 0.095  | 0.119  | 27.4    | 5.08 | -         |
| ssp131                                                                                                                                                                                                        | 0.034  | 0.031  | 0.021  | 0.066  | 0.058  | 0.050  | 28.7    | 5.10 | -         |
| ssp133                                                                                                                                                                                                        | 0.038  | 0.133  | 0.106  | 0.081  | 0.196  | 0.314  | 28.9    | 5.02 | I         |
| ssp137                                                                                                                                                                                                        | 0.088  | 0.064  | 0.055  | 0.076  | 0.075  | 0.074  | 25.8    | 5.13 | -         |
| ssp144                                                                                                                                                                                                        | 0.016  | 0.030  | 0.092  | 0.043  | 0.076  | 0.110  | 23.4    | 4.91 | -         |
| ssp201                                                                                                                                                                                                        | 0.337  | 0.303  | 0.386  | 0.282  | 0.271  | 0.260  | 32.9    | 4.74 | -         |
| ssp202                                                                                                                                                                                                        | 0.331  | 0.239  | 0.270  | 0.227  | 0.268  | 0.311  | 32.8    | 4.77 | -         |
| ssp203                                                                                                                                                                                                        | 0.084  | 0.064  | 0.106  | 0.034  | 0.040  | 0.045  | 30.0    | 4.99 | -         |
| ssp205                                                                                                                                                                                                        | 0.219  | 0.147  | 0.142  | 0.140  | 0.164  | 0.188  | 30.2    | 5.03 | -         |
| ssp209                                                                                                                                                                                                        | 0.219  | 0.323  | 0.312  | 0.141  | 0.104  | 0.066  | 30.6    | 5.09 | 0         |
| ssp216                                                                                                                                                                                                        | 0.065  | 0.073  | 0.105  | 0.106  | 0.091  | 0.075  | 32.9    | 4.71 | I/D       |
| ssp217                                                                                                                                                                                                        | 0.360  | 0.215  | 0.287  | 0.201  | 0.227  | 0.253  | 32.7    | 4.80 | -         |
| ssp219                                                                                                                                                                                                        | 0.568  | 0.922  | 0.579  | 0.315  | 0.379  | 0.446  | 32.1    | 5.08 | -         |
| ssp220                                                                                                                                                                                                        | 0.276  | 0.243  | 0.270  | 0.164  | 0.273  | 0.384  | 31.8    | 5.04 | -         |
| ssp302                                                                                                                                                                                                        | 0.673  | 0.540  | 0.542  | 0.291  | 0.263  | 0.235  | 39.5    | 4.70 | 0         |
| ssp303                                                                                                                                                                                                        | 0.066  | 0.062  | 0.078  | 0.049  | 0.045  | 0.041  | 39.4    | 4.89 | -         |
| ssp304                                                                                                                                                                                                        | 0.199  | 0.180  | 0.229  | 0.305  | 0.242  | 0.176  | 37.2    | 5.05 | I/D       |
| ssp306                                                                                                                                                                                                        | 0.138  | 0.110  | 0.136  | 0.143  | 0.107  | 0.069  | 37.1    | 5.09 | -         |

図3 PDQUEST 画像処理システムによって得られた各スポットの相対定量値  
それぞれの二次元電気泳動パターン上で検出された全スポットの積算  
OD 値の総和を 100 万単位とし、相対的に求められた値 (ppm)。この図  
は、そのデータの一部をブラウザ上に表示させたもの

スフィンガープリンティングを行った。

### 3) 質量分析によるペプチドマスフィンガープリンティング

二次元電気泳動とコンピュータ画像解析によるプロテインディファレンシャルディスプレイで見つかった特異的なスポットの同定は、通常次の手順で行う。  
[1]でうまく同定ができた場合には、[2]や[3]を実施する必要はなくなる。

[1]質量分析によるペプチドマスフィンガープリンティングを実施する。

[2]質量分析による配列分析を実施する。

[3]シーケンサーによる配列分析を実施する。

質量分析計は、イオン化の方式と質量測定の方法によって、いくつかのタイプに分けられる。ペプチドや蛋白質のイオン化については、MALDI 法や ESI 法などがあり、測定原理には、TOF (飛行時間) 方式や ICR-FT (イオンサイクロトロン共鳴-フーリエ変換) 方式などがあるが、プロテオーム研究には MALDI-TOF 型および ESI-Q-TOF 型の質量分析計がよく利用されている。ペプチドマスフィンガープリンティングで得られたデータをもとに MS-FIT などのデータベース検索を実施した場合のヒット率を高めるためには、分解能が 1 万程度以上の質量分析計を用いることが望ましい。

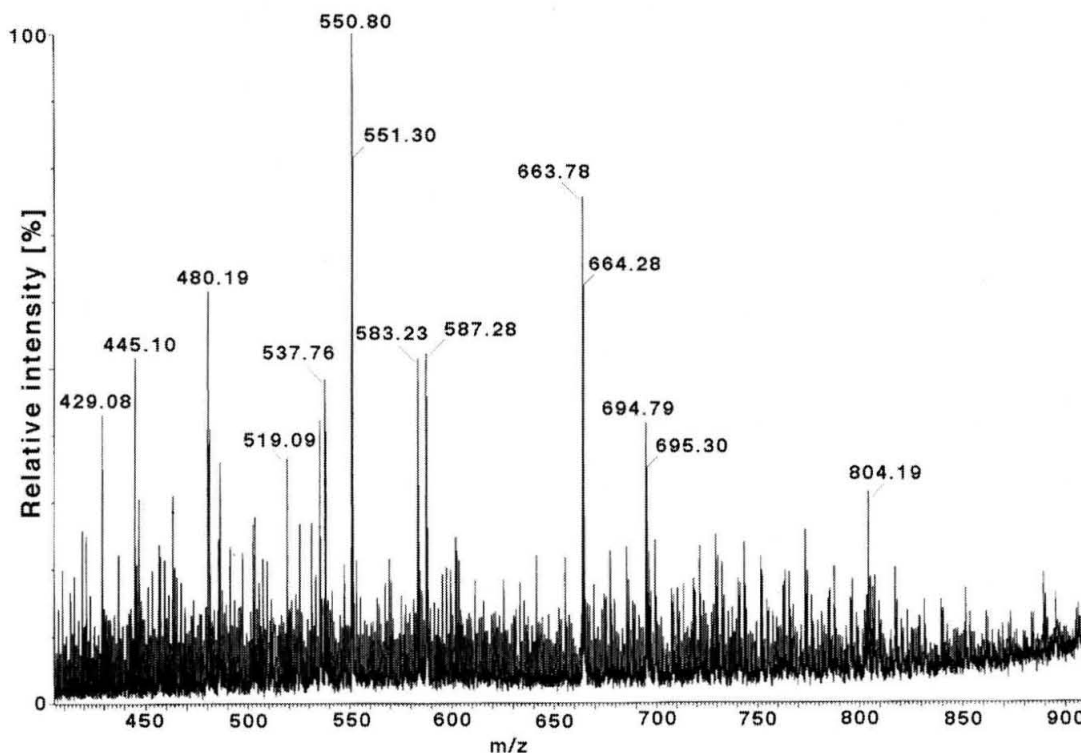


図4 質量分析によって得られたssp 7001 スポット蛋白質のペプチドマスフィンガープリント  
ssp 7001 スポット蛋白質をPVDF膜に転写後にLys-Cで消化. 得られた断片の分子質量をESI-Q-TOF型の質量分析計で分析したもの

上記の細胞の不老化と老化のプロテオーム研究で見つかった特異的スポットssp 7001に対し, PVDF膜上での消化〔リジルエンドペプチダーゼ (Lys-C) によるOn-membrane消化〕を行い, ESI-Q-TOF型の質量分析計を用いて, ペプチドマスフィンガープリンティングを行った. その結果を図4に示す.

#### 4) バイオインフォマティクスによる同定と機能解析

ペプチドマスフィンガープリンティングによる蛋白質の同定は, 質量分析計で得られたデータをもとにデータベースを検索することによって行う. バイオインフォマティクスは, そのためのデータベースと検索システムを提供してくれるものでもある.

ssp 7001の同定は, UCSFのホームページ上で無償提供されているMS-FITという検索ソフトを利用し, SWISS-PROTデータベースを検索することによって行った. その結果この蛋白質は, リン酸化/脱リン酸化を受けることによってチューブリンへの結合親和性に変化し, 細胞周期に伴うマイクロチューブルの解離・再会合を調節する機能を有するスタスミンという

蛋白質であることが判明した. 老化した細胞は形態が明らかに変化しており, 細胞内骨格構造に変化が起きていることが考えられている. スタスミンの加齢変化がマイクロチューブルの解離・再会合のバランスに影響を及ぼし, 結果的に細胞の形態を変えている可能性がある. このssp 7001はリン酸化などの合成後修飾を受けたものではないようであるが, スタスミンのリン酸化/脱リン酸化系にも加齢変化が起きている可能性が考えられるので, 現在この点についても解析を進めている.

#### おわりに

ssp 7001の例では翻訳後修飾を裏づけるデータは得られなかったが, 筆者らが行ったアミロイド $\beta$  (1~40) ペプチドの質量分析において, メチオニンの酸化 (スルホオキシド化) が起きていることを示すデータを得ている (図5).

このようにプロテオーム研究では, 二次元電気泳動後の蛋白質を質量分析にかけることによって, メチオニンの酸化程度の大きさの分子質量変化に伴う翻訳後

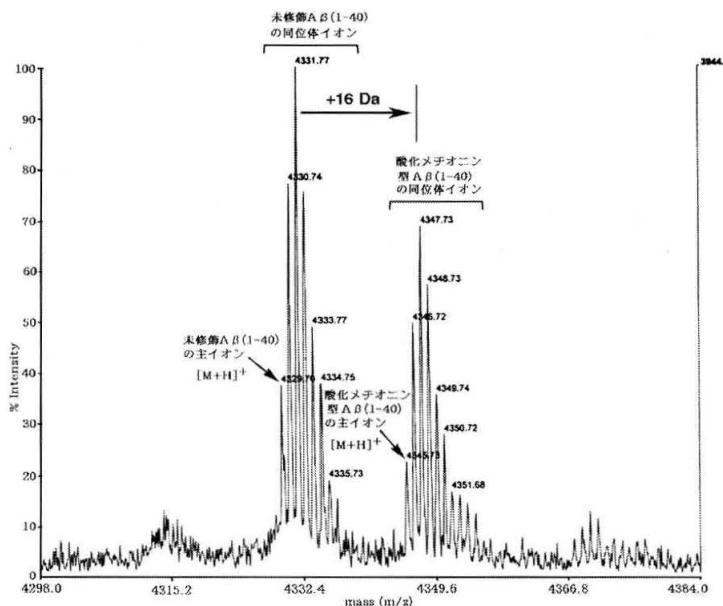


図5 ヒトのアミロイドβ(1~40)ペプチドの質量スペクトル

単離精製されたヒトのアミロイドβ(1~40)ペプチド標品をMALDI-TOF型の質量分析計にかけて得られた質量スペクトルの一例。メチオニンが酸化されたアミロイドβ(1~40)ペプチドは、未修飾のペプチドより約16 Da分子質量が大きくなっている。それぞれのペプチドのシグナルにおいてさらに細かくピークが分かれているのは、安定同位体の数の違いによるものである

修飾であれば、容易に検出同定ができることが確認されたので、今後シグナル蛋白質の翻訳後修飾の加齢変化に焦点を絞ったプロテオーム研究を実施し、細胞老化に伴うシグナル伝達の手度と強度の低下へのかかわりを明らかにしたいと考えている。

## 文献

- 1) Wilkins, M. R. et al. : Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 13 : 19-50, 1996

- 2) Dossi, G. et al. : J. Biochem. Biophys. Methods, 7 : 123-142, 1983
- 3) Garrels, J. I. : J. Biol. Chem., 264 : 5269-5282, 1989
- 4) Fenn, J. B. et al. : Science, 246 : 64-71, 1989
- 5) Beavis, R. C. & Chait, B. T. : Rapid Commun. Mass Spectrom., 3 : 436-439, 1989
- 6) Hong, Ji. et al. : Electrophoresis, 15 : 391-405, 1994
- 7) Cottrell, J. S. : Pept. Res., 7 : 115-124, 1994
- 8) Berlett, B. S. & Stadtman E. R. : J. Biol. Chem., 272 : 20313-20316, 1997
- 9) Salehi, M. et al. : Experientia, 52 : 888-891, 1996
- 10) Matuoka, K. & Takenawa, T. : Biochim. Biophys. Acta, 1401 : 211-215, 1998
- 11) Florio, T. et al. : Brain Res., 557 : 64-8, 1991
- 12) Conconi, M. et al. : Mol. Biol. Rep., 24 : 45-50, 1997
- 13) Mays, P. K. et al. : Mech. Ageing Dev., 59 : 229-241, 1991
- 14) Anselmi, B. et al. : Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci., 53 : B173-179, 1998
- 15) Hardie, D. G. : Symp. Soc. Exp. Biol., 44 : 241-255, 1990
- 16) Turner, B. M. : Cell. Mol. Life Sci., 54 : 21-31, 1998
- 17) Pritzker, L. B. & Moscarello, M. A. : Biochim. Biophys. Acta, 1388 : 154-160, 1998
- 18) Stadtman, E. R. : Science, 257 : 1220-1224, 1992
- 19) Reddy, S. : Biochemistry, 34 : 10872-10878, 1995
- 20) Tsugita, A. et al. : Electrophoresis, 21 : 1853-1871, 2000
- 21) Toda, T. et al. : Electrophoresis, 19 : 344-348, 1998
- 22) O'Farrell, P. H. : J. Biol. Chem., 250 : 4007-4021, 1975
- 23) Gorg, A. et al. : Electrophoresis, 16 : 1079-1086, 1995
- 24) Toda, T. et al. : Mech. Ageing Dev., 100 : 133-143, 1998
- 25) Toda, T. et al. : Electrophoresis, 21 : 1814-1822, 2000

## <著者プロフィール>

戸田年総：大阪大学大学院修了。カリフォルニア大学サンフランシスコ校（UCSF）皮膚科学研究室客員研究員を経て、現職。現在の研究・細胞老化のプロテオーム研究、特に興味ある研究・蛋白質の翻訳後修飾と老化とのかかわり、特に、蛋白質の酸化が細胞機能に及ぼす影響を明らかにしたい。