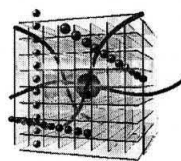


老化のプロテオーム解析

Tosifusa Toda ◎ 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



Summary

高齢者に多い血管性の疾患を予防するには、血管の老化を遅延させることが重要である。それには、血管構成細胞の生理的老化のメカニズムを明らかにする必要がある。細胞の老化には、非常に多くの蛋白質が量的、構造的、機能的に関わっており、それらの蛋白質集団のネットワークシステム全体の歪みが、細胞の機能低下をもたらしていると考えられるが、これを分析するのに最適な手段のひとつがプロテオーム解析である。そもそもプロテオーム解析は、微量のサンプル中に含まれる全蛋白質を手早く分離する手法と、それを高速で同定する手段を組み合わせたものであり、さまざまな方法が提案されているが、老化や病態のプロテオーム解析に最も適しているのは「二次元電気泳動で分離し、画像解析でディファレンシャル分析を行った後に酵素消化し、質量分析で同定する」ものである。

Key words

- ◎プロテオーム
- ◎酸化ストレス
- ◎プロテアソーム
- ◎蛋白質
- ◎ユビキチン化

はじめに

厚生労働省が発表した人口動態統計によると、全年齢での人口10万人当たり原因別死亡率はトップが悪性新生物で、心疾患、脳血管疾患が2位、3位となっているが、年齢階層別にみると、高齢になるにつれて、血管の老化が原因とみられる心疾患と脳血管疾患が急速に増えている(図1)。これは、他の疾患に比べて血管系の疾患には、加齢による血管の変性が大きく影響していることを示している。

血管の老化と、他の体細胞の老化が同じ原因で起こり、同じスピードで進行するものか。血管の老化には、血管独自の特殊事情が関わっているのかといった点については現在のところ不明であるが、血管は直接血液に接しているために、酸化ストレスなどの環境の影響を受けやすく、その一方で老化の制御も行いやすい組織であるので、高齢で増加する血管性の疾患を予防するうえで、血管の老化の機序を明らかにすることは大変重要である。

本特集のテーマは「血管のシステムバイオロジー」ということであるが、そもそもプロテオームという概念が、特定の細胞種(たとえば血管の内皮細胞)が、特

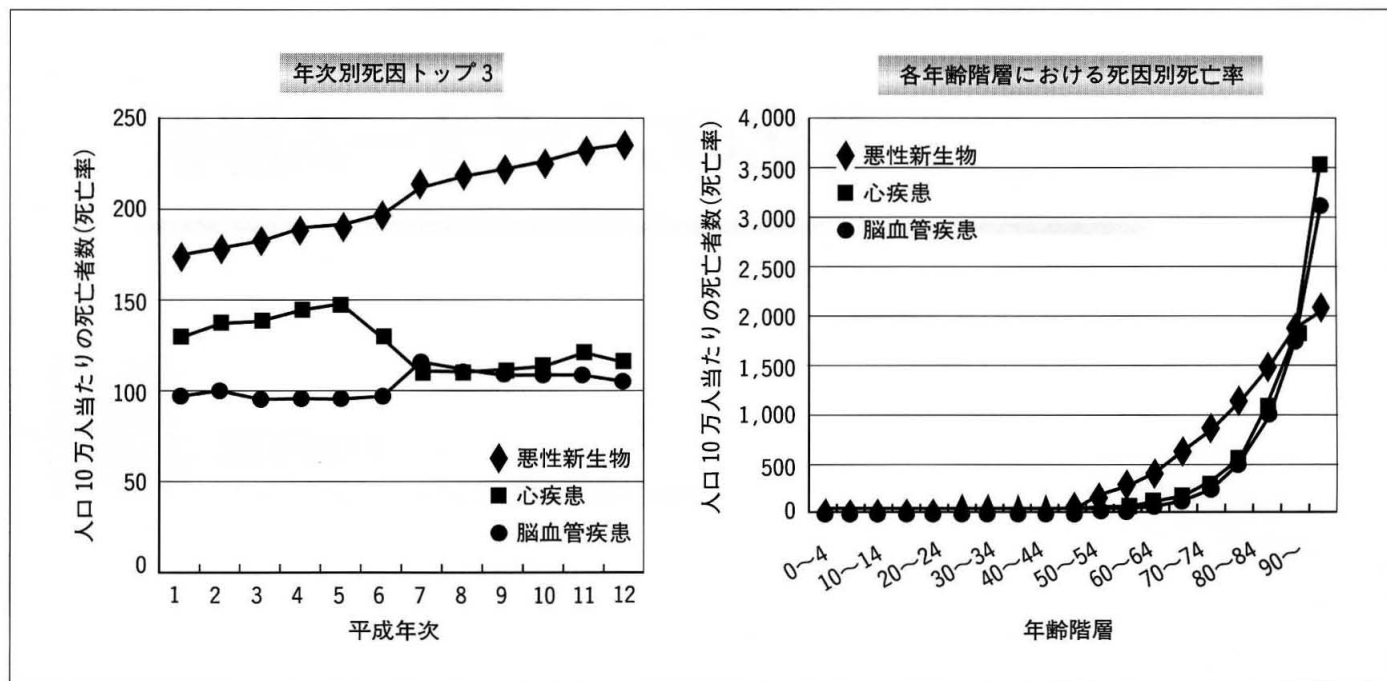


図1. 年次別, 年齢階層別にみた死因の推移

全年齢では悪性新生物による死亡が増えているが, 心疾患や脳血管疾患などの血管系の老化が関わっているとみられる疾患では, 特に高齢において死亡率が急速に増加している。

定の環境条件に置かれた時に発現するすべての蛋白質の集合体を意味しており, これを網羅的に解析しようとするプロテオーム解析は、『蛋白質レベルのシステムバイオロジー』そのものであるといっても過言ではない。

すでにわれわれは, 血管内皮細胞が高酸素濃度条件にさらされた時に多数の細胞内蛋白質が変化することを, 二次元電気泳動と画像解析によって確認しているが, それらの『酸化ストレス応答蛋白質』の同定については現在進行中であるので, 本稿では, 当共同研究グループが行っている老化のプロテオーム解析の基本的な戦略とこれまでに明らかになった結果の一部を紹介し, 今後の「血管のシステムバイオロジー」研究にどのように応用が可能であるかを考察してみたい。

血管と老化

老化に伴う血管の変化はさまざまな形で現れるが, 最も典型的な変化は動脈硬化であろう。高齢者の動脈では, 硬化の初期病変とみられる黄色で扁平な脂肪の沈着による fatty streak が観察されることが多い。これが進行すると内腔側に fibrous plaque を形成し, さらには石灰化などを来して, 表面に血栓の形成をみるようになる。動脈硬化のメカニズムは, まだ不明な点が多いが, 最初に何らかの原因で発生した活性酸素分子種(reactive oxygen species; ROS)の影響によって内膜に傷害が起こり, 露出した内弾性板の上に血小板が凝集し, そこから放出される増殖因子によって, 内膜面での平滑筋細胞の増殖が誘導されると考えられている(図2)。この時, 硬化部位に, コレステロールをはじめとする脂質の取り込みがみられるものが粥状硬化症となるために, あたかも脂質が主因のように考

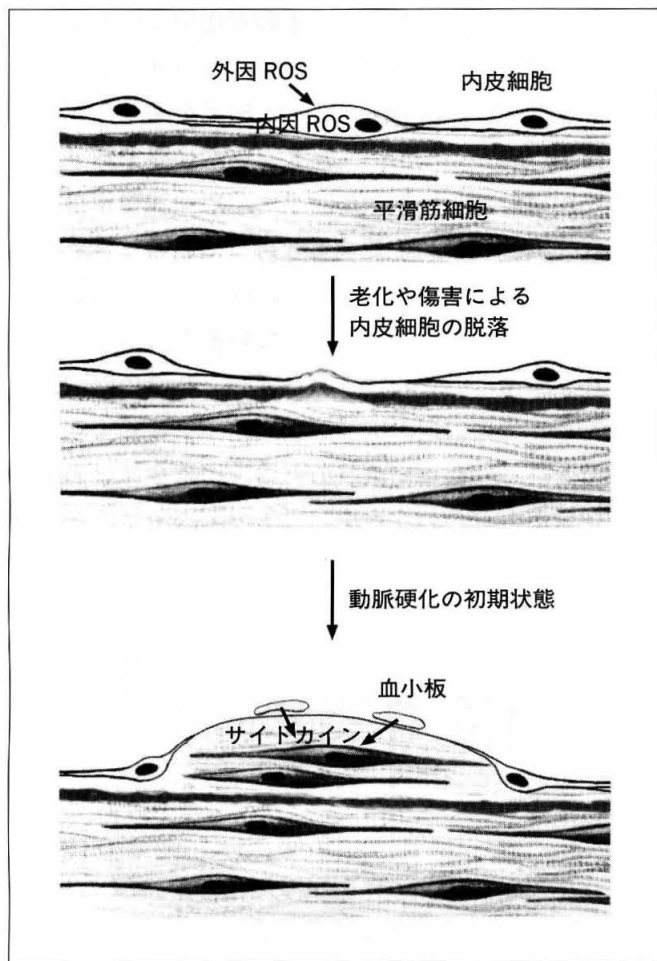


図 2. 動脈硬化の発症初期の様子

酸化ストレスの影響によって血管内皮細胞が老化あるいは傷害を受け、変性脱落することが、動脈硬化の初期病変であると考えられている。

えられがちであるが、実は最も初期の段階で重要な病因は、一連の反応の引き金となる内膜の傷害である。内膜が傷害を受けると、通常は内膜を構成する内皮細胞が分裂を開始し、内膜は速やかに修復されると考えられているが、そもそも正常な内皮細胞の分裂寿命は有限であるために、個体の加齢に伴い分裂能が低下し、やがては内膜の修復が遅れてくるものと考えられる。この修復の遅れが、動脈硬化の引き金になっている可能性は高い。しかも、内皮細胞は大血管から毛細血管までのすべての血管の内壁に存在し、血球の付着を抑える重要な役割を果たしていることから、高齢で多発

するあらゆる血管系の疾患を予防するためには、内皮細胞の生理的な老化を理解し、病理的な老化の進行を食い止めることが重要である。

酸化ストレスと老化

内皮細胞のみならず、ヒトの線維芽細胞や角化細胞など多くの正常二倍体細胞が有限の分裂寿命を持つことはよく知られた事実であるが¹⁾²⁾、そのメカニズムはまだ完全に解明されたとはいえない。造血系細胞や免疫系細胞を含め、このような再生系の細胞は、組織の損傷などで細胞が脱落した時に、「細胞分裂」という形で組織を再生し、機能を維持している。しかしながら、老化に伴い分裂能が低下すると、傷害部位の修復が遅れたり、不完全なものとなる。これが動脈硬化の原因のひとつとなっている可能性があることは、先に述べたとおりである。

このような細胞レベルでの老化の原因として最も重要であると考えられているもののひとつが酸化ストレスである。病理的な血管内皮の傷害では、好中球やマクロファージが発生する炎症性の活性酸素の影響を無視できないが、生理的な細胞老化においては、むしろミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の過程で発生する内因性の ROS が果たす役割が大きい。これに関して、最近興味深い実験結果が報告された。

1999 年に NIH の Lee ら³⁾は、活性 *ras* 遺伝子の導入によって *ras* 蛋白質を高発現させたヒトの線維芽細胞においては、細胞老化のマーカーである β ガラクトシダーゼ活性の誘導と、不可逆的な細胞増殖停止が起こることを報告したが、この時、p 21 や p 53, p 16 の発現が亢進すると同時に、ミトコンドリアにおける活性酸素の上昇が起こることを観察している。さらに興味深いことに、この時、活性酸素を消去するスカベンジャーを投与すると、細胞老化の誘導が抑止されたのである。可逆的な細胞増殖抑制を引き起こす p 53 遺伝子の導入だけではミトコンドリアでの活性酸素の上昇は起こらず、不可逆的な細胞周期停止をも

たらず p 21 遺伝子の導入では、やはりミトコンドリアにおける活性酸素の上昇が起こることから、細胞老化には、シグナル伝達の異常のみならず、活性酸素による細胞へのダメージ⁴⁾⁵⁾が深く関わっていることを強く示唆している。

細胞老化のプロテオーム解析

血管内皮細胞や線維芽細胞などの増殖性細胞と、脳の神経細胞のような非増殖性の細胞では、老化の様子が全く異なるが、もしも酸化ストレスが老化の根本的な要因であるならば、すべての細胞に共通のメカニ

ズムが存在するはずである。近年の老化防止研究は、もっぱら酸化ストレスの消去能を高める方向で進められているが、細胞内で発生する活性酸素を完全に抑えることは不可能であり、活性酸素が細胞に与えるダメージをいかに食い止めるかが、より重要な課題となる。

培養細胞を用いたこれまでの研究で、老化した細胞や組織は若い細胞や組織に比べ、高酸素濃度の影響をより強く受けることが観察されていることから、老化に伴い、酸化ストレスによるダメージを最小限に食い止めるための機構に、機能的な変化が生じてくることが考えられる。そこでわれわれは、これをプロテオームの観点から確かめるべく、まずは老人研で樹立され

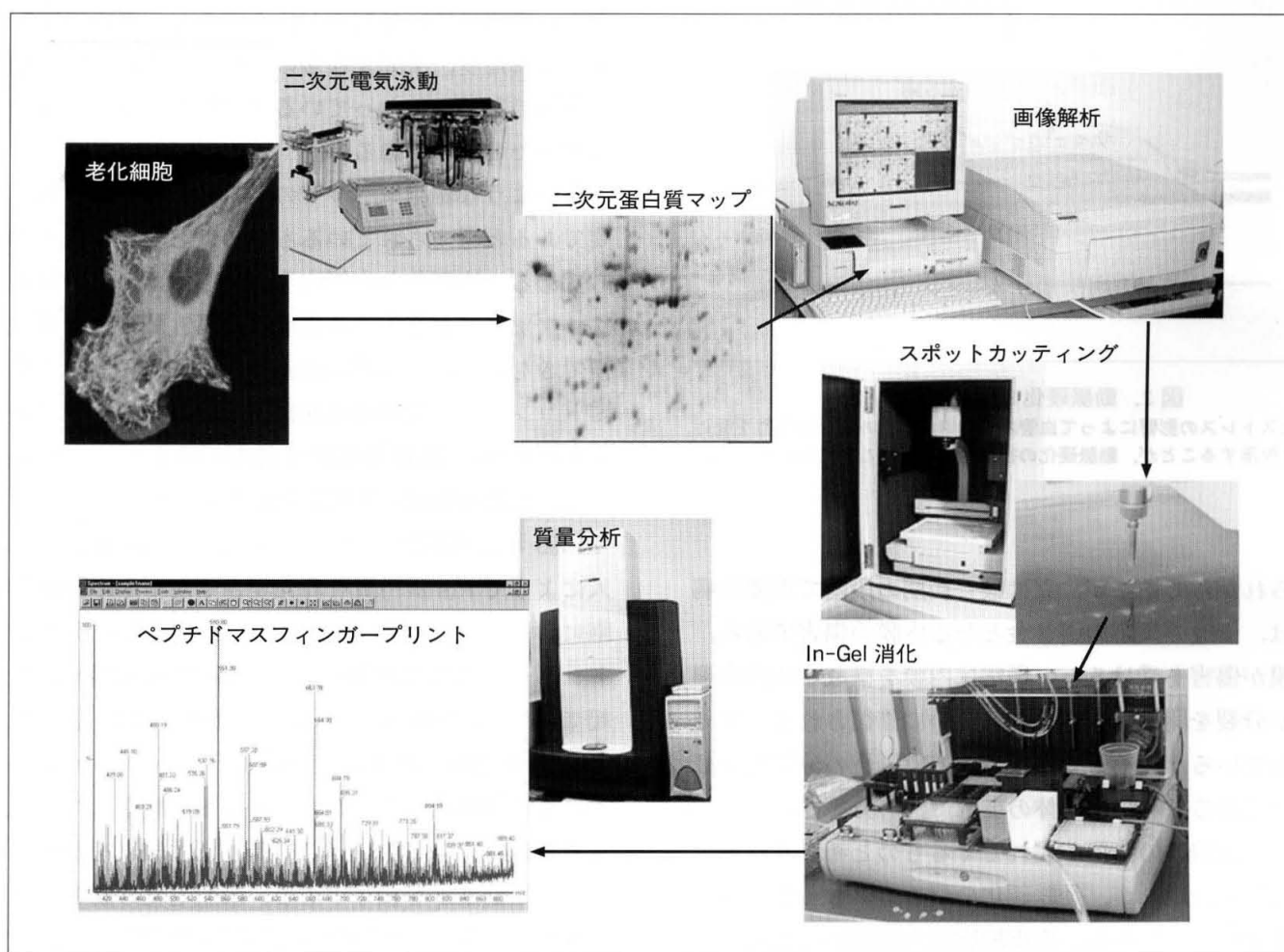


図 3. 現在主流となっている「二次元電気泳動と画像解析、スポットカッティング、In-Gel 消化、および質量分析の組み合わせ」によるプロテオーム解析の流れ

た正常ヒト二倍体線維芽細胞の分裂加齢に伴う蛋白質の変化を解析した。

プロテオーム解析の方法については、これまでに色々な実験書など⁶⁾⁷⁾で紹介しているので、詳しくはそれらをご覧ください。従来、蛋白質科学と大きく異なる点は、大量の蛋白質を長い時間と労力をかけて精製する必要がなくなったということである。興味深い蛋白質を見つけた時には、やはり同定を行いたいものであるが、近年の質量分析技術の進歩により、従来のエドマンシーケンサー法に比べて2桁以上も高感度で同定が行えるようになったため、電気泳動で分離される程度の微量の蛋白質で、十分に同定が行え

るようになったことである。そこであらためて注目されたのが、一度に数千個の蛋白質を分けることのできるO'Farrellの二次元電気泳動⁸⁾であった。同定法も、従来のアミノ酸配列の相同性によるものから、トリプシン消化ペプチドの質量スペクトル(これを「ペプチドマスフィンガープリント」という)を、データベース検索にかけする方法⁹⁾¹⁰⁾に変わり、同定のスピードと効率が飛躍的に向上した。最近では、二次元電気泳動の代わりに「二次元HPLC」を行う方法¹¹⁾も出てきているが、定量性やディファレンシャル解析の容易さの点で、やはり二次元電気泳動の方が勝っている。実際にわれわれが行っているプロテオーム解析の流れを

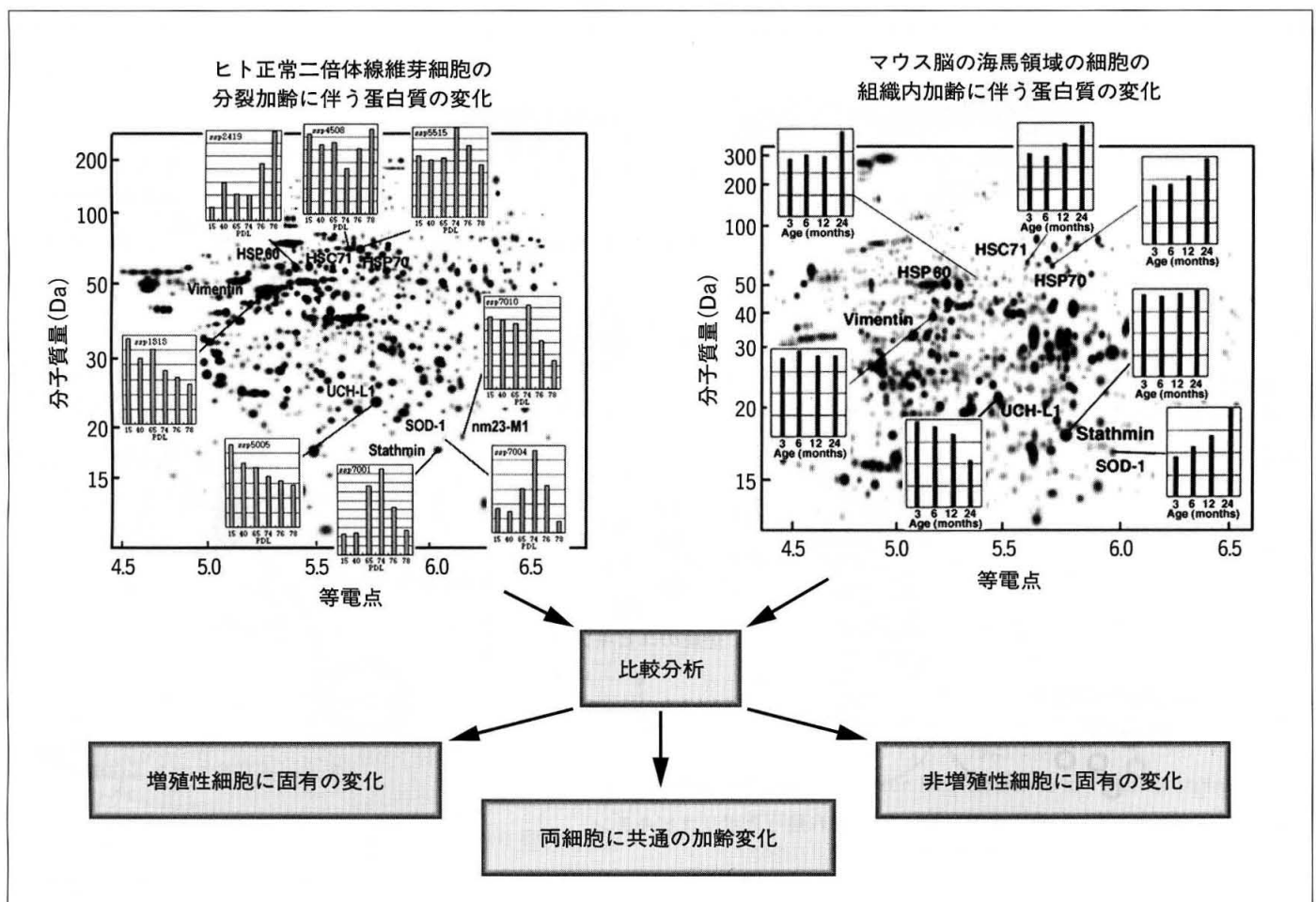


図4. プロテオーム解析における高次のディファレンシャル分析

異なる種類の細胞の老化をプロテオーム解析し、結果を比較分析することによって、普遍的な老化に関わる蛋白質を見つけ出すことができる。

図3に示す。

この流れに従って、老化の各段階の細胞から抽出した蛋白質の二次元電気泳動パターンを画像解析し、加齢に伴う変化を数値化する一方で、主要な蛋白質スポットを切り取ってトリプシン消化し、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とデータベース検索による同定を行った。その結果、細胞の老化に伴う蛋白質の変化は、あるものは増加し、あるものは減少するといった一方向性のものばかりでなく、老化の初期には増加し、後半は減少に転じるなど、非常に複雑多岐にわたるものであることがわかった。得られた結果の多くは、老人研プロテオーム共同研究センタ

ーのウェブサーバー(<http://proteome.tmig.or.jp/2D>)上で公開しているもので、詳しくはそちらをご覧ください。総論としていえることは、老化は特定の蛋白質の変化で起こる単純なものではなく、多くの蛋白質の機能的なネットワークシステム全体の歪みによって生じる形質であるということである。さらに、個々の蛋白質の変化を詳細に観察すると、増加するものと減少するものとの間にも機能的な相関関係を有するものが数多くみられたことから、これらの中から、多くの細胞種に共通するいわば『普遍的な老化』に関わる蛋白質を絞り込むことができるのではないかと考えられた。そこで次に、ヒトの培養線維芽細胞とは全

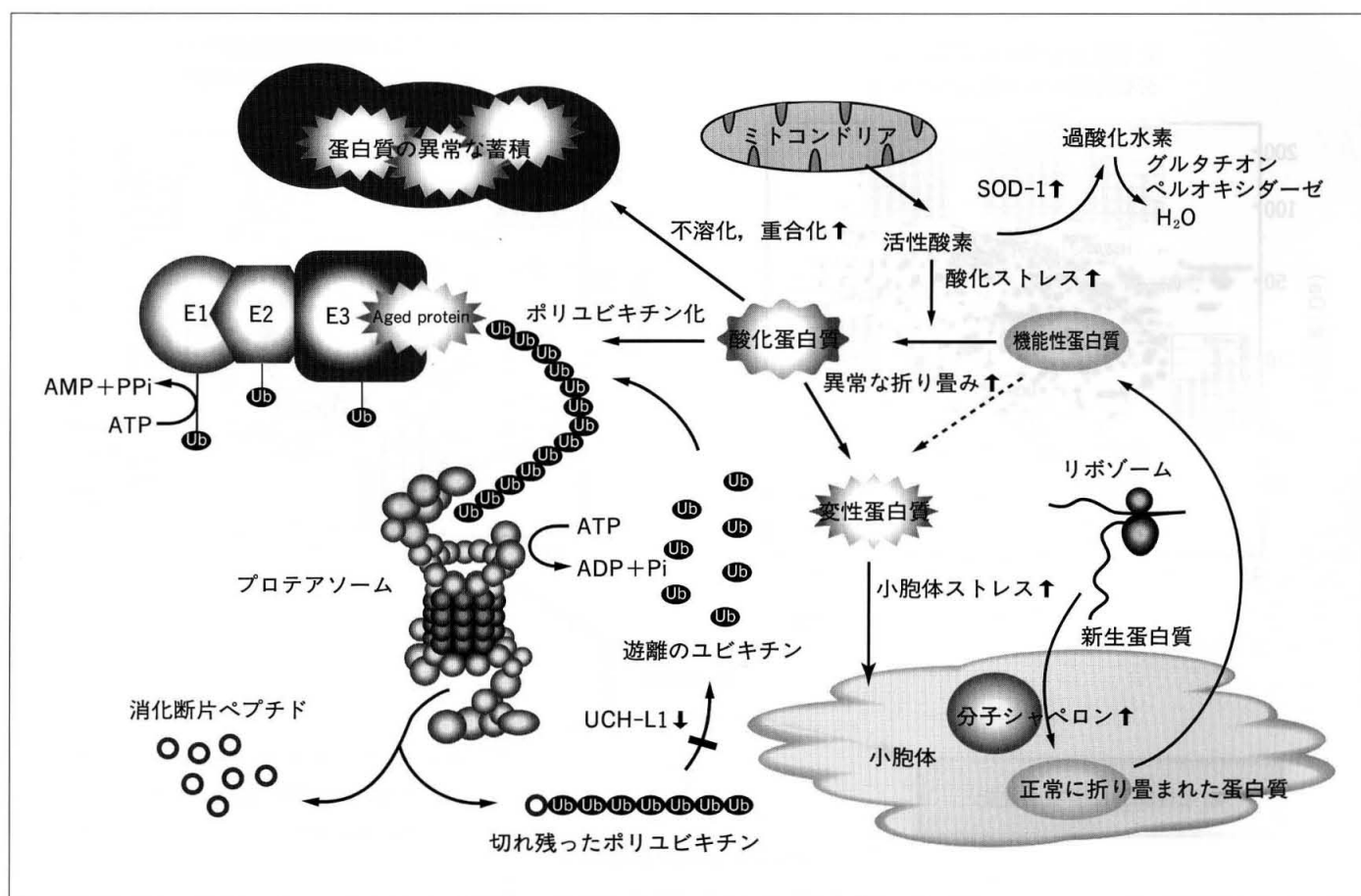


図5. 活性酸素の影響によって変性を受けた蛋白質の選択的排除システム

加齢に伴って変化する蛋白質の多くは、この蛋白質の選択的排除システムに関わっていることから、細胞の老化に伴う機能的な変化には何らかの形で蛋白質分解系の破綻が絡んでいるものと思われる。

く性質の異なるマウスの脳の神経系細胞の個体内老化に伴う蛋白質の変化を解析し、ヒトの線維芽細胞の分裂加齢に伴う変化との突き合わせを行った(図4)。その結果、増殖性の線維芽細胞の分裂加齢と脳の海馬領域の細胞の組織内老化に伴う蛋白質の変化には、大変興味深い共通点があることがわかった。

その変化のひとつはSOD-1の上昇である。この酵素は活性酸素ラジカルを過酸化水素に変える働きをするもので、線維芽細胞では、細胞老化が最終段階に突入した時に一過性に上昇し、その後再び減少に転じている。一方、脳の老化の過程においても、マウスの月齢が進むにつれてゆるやかに上昇を続けることが確認された。また、ヒトの線維芽細胞ではHSP 60、マウスの海馬の組織細胞ではHSP 70と分子種は異なるものの、いずれも熱ショックで誘導される蛋白質が老化に伴い上昇していることもわかった。これらの変化は、「老化細胞で活性酸素の発生が上昇し、これに応答して活性酸素の消去を行う酵素や、活性酸素によって変性した蛋白質の立体構造的修復を行う分子シャペロンの誘導が起こっている」ことを示している。これらを、蛋白質代謝経路の中に書き込むと図5のようになる。これはどうやら「酸化ストレスの発生と消去のバランスの崩れが老化の根本原因で、これによって変性した蛋白質が蓄積し、除去システムが崩壊するに至って細胞機能の破綻が生じる」ということらしい。高齢者の脳で発生する神経変性疾患や種々の組織にみられるアミロイド症は、このような蛋白質代謝の破綻の過程で起こってくる疾患であるものと考えられる。さらに、血管内皮細胞もおそらくは、これと類似したプロセスで老化をして、動脈硬化のリスクファクターとなってくるものと思われる。

活性酸素の影響は、DNA、蛋白質、脂質など、さまざまな分子種に及ぶと考えられるが、特に蛋白質が酸化的修飾を受けた場合には3次元的な折り畳み構造に異常を来し、互いに重合して不溶化やアミロイド様の線維化を起こすおそれがあるため、正常な細胞ではポリユビキチン化/プロテアソーム分解系によって速

やかに分解除去されているものと考えられる。ところが老化した細胞では、プロテアソーム分解の最終産物であるポリユビキチンを分解し、ユビキチンのリサイクリングを行うUCH-L1が減少するために、ポリユビキチン化/プロテアソーム分解系のスループットが低下し、その結果、蛋白質の異常蓄積が起こりやすい状況に追い込まれているものと考えられる。これらの変化は、一つひとつはさほど大きな変化ではないが、システム全体で見ると一定の方向を示しており、「プロテオーム解析による老化のシステムバイオロジー研究」の意義は大きい。

おわりに

われわれが行ってきたこれまでの研究は、血管系の細胞の老化を直接調べたものではないが、血管内皮細胞の老化においても『普遍的な老化』が起きている可能性は高く、内皮細胞の老化によって活性酸素の発生が高まる一方で、酸化された蛋白質の分解活性は低下し、不溶化した蛋白質が増加するにつれて、小胞体ストレスを介したアポトーシスの誘導¹²⁾⁻¹⁴⁾が起こりやすくなってくることが十分に考えられる。現在、老人研プロテオーム共同研究グループでは、培養条件下で高酸素雰囲気さらした内皮細胞のプロテオーム解析を行っており、内皮細胞の老化と酸化ストレスの関係にも新たな知見が加わるものと期待している。

◎文 献

- 1) Hayflick L : The longevity of cultured human cells. *J Am Geriatr Soc* 22 : 1-12, 1974
- 2) Reincke U, Burlington H, Cronkite EP, Laissue J : Hayflick's hypothesis : an approach to *in vivo* testing. *Fed Proc* 34 : 71-75, 1975
- 3) Lee AC, Fenster BE, Ito H, et al : Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274 : 7936-7940, 1999
- 4) Chen Q, Ames BN : Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibro-

- blast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 4130-4134, 1994
- 5) Squier TC : Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol* **36** : 1539-1550, 2001
 - 6) 戸田年総 : 固定化 pH 勾配ゲルストリップを用いた二次元電気泳動. *生物物理化学* **41** : 169-172, 1997
 - 7) 戸田年総 : 発生・老化研究法—細胞老化. 最新電気泳動実験法(日本電気泳動学会 編)医歯薬出版, 1999, pp434-438
 - 8) O'Farrell PH : High resolution two - dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250** : 4007-4021, 1975
 - 9) Ji H, Whitehead RH, Reid GE, et al : Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins expressed by normal and cancerous human crypts : application of mass spectrometry to peptide - mass fingerprinting. *Electrophoresis* **15** : 391-405, 1994
 - 10) Cottrell JS : Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept Res* **7** : 115-124, 1994
 - 11) Opiteck GJ, Ramirez SM, Jorgenson JW, et al : Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping. *Anal Biochem* **258** : 349-361, 1998
 - 12) Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, et al : An ER stress-specific caspase cascade in apoptosis : cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* **277** : 34287-34294, 2002
 - 13) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al : Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403** : 98-103, 2000
 - 14) Mattson MP, LaFerla FM, Chan SL, et al : Calcium signaling in the ER : its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* **23** : 222-229, 2000