

プロテオーム科学の展望

戸田 年総

〈要約〉 プロテオームとは、特定の細胞が特定の状態にあるときに発現している全蛋白質の集合を意味し、プロテオーム科学とは、これらを解析し、生物学的、医学的知見を得る研究手法のことである。近年、高齢者の孤発的神経変性疾患が蛋白質のコンフォメーション病としての側面を持つことが次第に明らかになり、これを解析するには、ゲノム情報だけでは不十分であることもわかってきた。プロテオーム科学は、このような翻訳後修飾の過程が関わる様々な疾患の解析に有効な手法であり、今後、老化の基礎研究や老年病の臨床研究において広く利用されるようになるものと期待される。

Key words: プロテオーム, ポストゲノム, 神経変性疾患, コンフォメーション病, ユビキチン

(日老医誌 2002; 39:8-13)

はじめに

最近、医科学、生命科学研究の分野で『プロテオーム (proteome)』あるいは『プロテオミクス (proteomics) : プロテオーム科学』という言葉が耳にすることが多くなった。財団法人東京都老人総合研究所においてもプロテオーム共同研究センターを立ち上げ、『プロテオーム科学にもとづく老化機構研究』を本格的に展開しようとしているが、プロテオーム科学がいかに老化機構研究や高齢期疾患の発症機序研究に適しているか、一般にはあまり理解されていないようである。そこであらためて、プロテオーム科学とは何か、プロテオーム科学で何がわかるのか、なぜ老化機構研究や老年医学研究に適しているのかといった点について私なりの考えを述べてみたい。

プロテオーム科学とは何か

プロテオーム (proteome) という言葉は、1995年頃 Macquarie 大学の Keith Williams 博士の教室で、当時大学院生であった Marc Wilkins らが、遺伝子 (gene) の集まり (ome) を意味するゲノム (genome) に対応する概念を表すものとして使い始めた比較的新しいことばであり、蛋白質 (protein) の集まり (ome) を意味するものである。従来の古典的生化学における蛋白質研究では、酵素活性やシグナル伝達活性のような『生物学的機能』を手掛かりとして、対象となる蛋白質を個別に分離精製し、一次構造や立体構造、物理化学的な性質な

どを解析するという手法がとられることが多かった。これに対しプロテオーム科学では、特定の組織や細胞で発現する全蛋白質を『集合』として捉え、これを可及的網羅的に解析して、その中から医薬品の開発につながる新規の機能性蛋白質を探し当てたり、分化や癌化、老化などの生物学的プロセスに関わる蛋白質を見つけ出そうという研究戦略であり、そのために必要な原理や装置、分析技術、情報処理技術などの開発を行うことも、プロテオーム科学には含まれる。

プロテオーム科学で何がわかるのか

広義の『プロテオーム科学』は、従来の蛋白質生化学や蛋白質構造科学をすべて包含するが、狭義には、特定の組織細胞において発現される全蛋白質を網羅的に単離し、あるいは完全長 cDNA を用いてリコンビナント蛋白質を作り、立体構造や相互作用などを解析することによって、新規の蛋白質の機能を特定したり、医薬品の開発につながる新しい機能性蛋白質見つけ出そうといういわゆる『機能プロテオミクス』と、発生や分化、癌化、老化など特定の生物学的、病理学的プロセスに伴って変動する蛋白質を洗い出し、それらの機序に関わる蛋白質を特定しようという『発現プロテオミクス』とに大別される。いずれの場合においても、『可及的網羅的』に行われるところが従来の『古典的な蛋白質科学』とは異なる点である。

ヒトゲノムプロジェクトの本当の成果は、遺伝病原因遺伝子の新たな発見という形で、これから現れてくるものと思われるが、当初 10 万程度はあると見られていた遺伝子が実は 3 万ほどに過ぎないことが明らかになった

ことも重要な成果の一つである¹²⁾。実際に個々の細胞で発現し、機能している蛋白質は更にその1割前後に過ぎないと見られるので、実質プロテオーム科学の対象となるのは細胞種当たり数千種の蛋白質である。したがってプロテオーム研究は、これらの蛋白質を可及的網羅的に分離することから始まる。現在最も分解能が高い分離法は『一次元目に固定化 pH 勾配等電点電気泳動を行う二次元電気泳動³⁾』であり、通常はこの二次元電気泳動で蛋白質を分離し、画像処理によってスポットの位置情報(分子量、等電点)と濃度情報(発現量)を数値化し、画像間の比較分析を行い、さらに質量分析法などによる同定を実施する。これによって、(1) その細胞や組織では実際にどのような蛋白質がどれだけ発現されているか、(2) 生理的、病的に細胞の状態が変わる時にどのような蛋白質がどれだけ変化するかと言ったことが明らかになる。(3) さらに二次元電気泳動の分離パターン上で注目された個々の蛋白質について、構造や細胞内局在性、翻訳後修飾、プロセッシング、相互作用などの情報を収集し、『生命情報科学 (bio-informatics)』的な解析を行うことによって、その蛋白質の生理的な意義や、病的な責任を明らかにすることができるものと期待されている。

なぜ老化機構研究や老年医学研究に適しているのか

ヒトゲノムプロジェクトは、『ヒトの全ゲノムを解読すれば多くの生命現象と疾患の原因が明らかになる』という作業仮説の下に進められてきた。これは、確かに『遺伝子の支配を強く受けるプロセス』については正しいが、『蛋白質の翻訳後に発生する非酵素的なプロセスが絡む現象』を理解するには蛋白質そのものを調べる必要があり、ゲノム情報だけでは不十分である。

老化のメカニズムについては、古くから「プログラム説」¹⁾、「エラーカタストロフ説¹⁵⁾」¹⁶⁾、「フリーラジカル説⁶⁾」などの諸説が唱えられてきた。遺伝的に異なる動物種はそれぞれ固有の最長寿命を持つことが「プログラム説」の根拠であったが、ウェルナー症候群の DNA ヘリカーゼホモログ遺伝子に見られるように、ほ乳類以上の高等動物では特定の遺伝子の異常はむしろ老化を促進することから、老化の機構そのものが DNA 上にプログラムされているとは考えにくい。「エラーカタストロフ説」は DNA の複製や RNA への転写、蛋白質への翻訳の段階で「エラー」が発生することにより異常な蛋白質が作られ、これによってさらなる悪循環が発生し、つ

いには破綻を来きたすであろうというものである。この仮説についてはまだ確証は得られていないが否定もされていない。「フリーラジカル説」は、フリーラジカルが、脂質や DNA、蛋白質に酸化的なダメージをもたらす、ダメージを受けた分子種が細胞機能を混乱させるというもので、最近特に注目されている。老化の分子機構としては最も可能性が高い仮説であるが、具体的にどの蛋白質が最も強く酸化を受けるのか、酸化された蛋白質はどのようなのか、そのとき細胞にはどのような老化形質が現われるのか、また老年期疾患の発症の機序にどのように結びついているのかと言った点を明らかにすることが、今後の課題である。

神経変性疾患と蛋白質の関係

最近、種々の神経変性疾患において蛋白質のフォールディング(折畳み)やユビキチン・プロテアソーム分解系の異常が関わっていると見られるものが数多く見つかっている。その典型的な例がウシヤヒツジの海綿状脳症との関連が指摘されているクロイツフェルトヤコブ病などのプリオン病であるが、その他にも、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋委縮性側索硬化症、ハンチントン病など多くの神経変性疾患において、βシート化されたポリユビキチン化された異常な蛋白質の蓄積が観察されている。

特にパーキンソン病では、Lewy 小体にポリユビキチン化蛋白質の蓄積が観察されているが¹⁷⁾、家族性パーキンソン病の原因遺伝子として同定された α-Synucleine, Parkin がいずれも Lewy 小体に蓄積されており、しかも Parkin は N 末端にユビキチンと相同性のある領域を持っているや、α-Synucleine が細胞内でユビキチン化される⁸⁾ことなど考え合わせると、パーキンソン病の発症にはユビキチン化とプロテアソーム分解系の関与が強く疑われる⁹⁾。

一方、アルツハイマー病患者脳の特徴として、細胞外にβアミロイドからなる老人斑が¹⁰⁾、ニューロン内に tau 蛋白質からなる神経原線維の蓄積が観察される¹¹⁾ことは良く知られているが、non-A β component of AD amyloid (NAC) の中に α-Synucleine の 61~95 残基の部分の蓄積も観察されている¹²⁾¹³⁾。また α-Synucleine の蓄積はパーキンソン病ばかりでなく、小脳系や基底核系を冒す神経変性疾患で出現するオリゴデンドログリア内封入体 (glial cytoplasmic inclusion) にも見られることから、多様な神経変性疾患に関与している可能性がある。

さらに、家族性パーキンソン病の原因として見つかったもう一つの遺伝子の産物である UCH-L1 (ubiquitin-

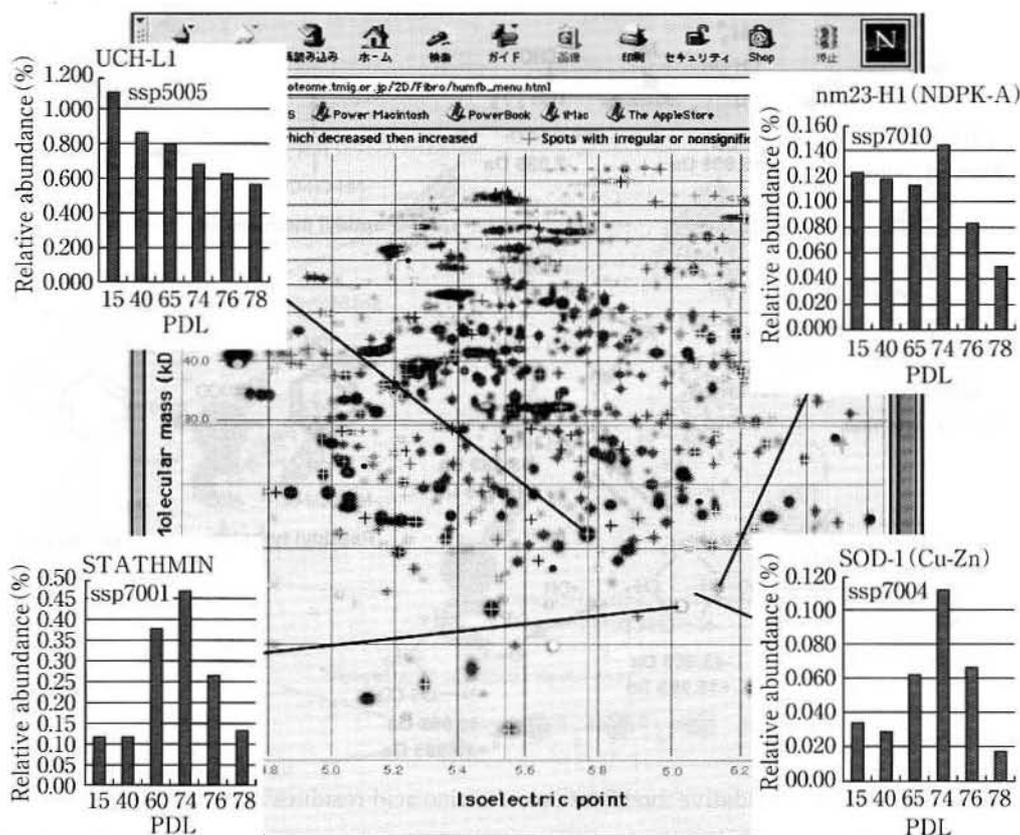


Fig. 3 Proteomic profiling of typical protein alterations in cellular aging of normal human diploid fibroblast TIG-3.

(β シート化)と、これが重合核となって連鎖的に線維形成が起るといふ共通点はあるが、孤発性の場合なぜ最初のミスフォールディングが発生するかという究極の原因は不明である。孤発性の場合、細胞老化に伴う細胞機能の変化が関わっていることは確かであり、その加齢変化の多くは全ての体細胞で同時進行的に起っている生理的細胞加齢現象によるものであることも確かである。したがって、生理的細胞加齢に伴う細胞機能の変化を正確に理解することは、孤発性の神経変性疾患の発症を予防する上で重要な課題となっている。

東京都老人総合研究所では、ヒト正常二倍体線維芽細胞の分裂加齢(細胞老化)に伴う蛋白質の変化について静岡県立大学の加治和彦博士らと共同で²¹⁾、マウスの老化に伴う脳の各部位の蛋白質の変化についてプロテオミクス研究所の次田皓博士らと共同で²²⁾、ヒトドーパミン神経芽細胞の酸化ストレス高負荷条件下における蛋白質の変化について国立長寿医療研究センターの丸山和佳子博士との共同でプロテオーム解析を行っている。

このうち、細胞老化のプロテオーム解析では、MAPキナーゼによるリン酸化を受けながらマイクロチューブルの形成を調節する蛋白質の一つであるスタスミンや、ラジカルの消去に関わる蛋白質であるSOD-1が細胞が

老化の最終段階に入る際に一過性に上昇すること、ユビキチン/プロテアソーム分解システムに関わる蛋白質であるUCH-L1は加齢に伴い直線的に減少することなどが明らかになっている(Fig. 3)。SOD-1の活性は、加齢に伴い直線的に低下することから、活性を失った異常な分子種が蓄積されているものと思われる。質量分析の結果、タンパク量が一過性に上昇する時期のSOD-1スポットから、酸化修飾を受けた可能性があることを示す異常なペプチド断片が検出されており、現在その構造の特定を行っている。

これらの結果は、細胞の生理的な老化に伴いマイクロチューブルの構造を安定化する機構が破綻をする一方で、酸化ストレスの防御システムが弱体化し、さらに変性した蛋白質を分解除去するシステムにも機能低下が起っていることを示しており、これらの生理的な加齢変化が、神経変性疾患の発症リスクを高める要因の一つになっており、遺伝的なリスクの高いヒトが老化すると発症するものと思われる。今後我々は、生理的な老化に伴って細胞特異的に酸化される分子種と、酸化ストレスを強制的に加えた時に特異的に酸化される分子種、および各種神経変性疾患で特異的に酸化を受ける分子種を個別に特定し、生理的老化と病理の関係を詳しく調べたいと考

えている。

結 語

これまでの蛋白質研究では、標的となる蛋白質をあらかじめ設定し、個別にアプローチする戦略がとられること多かったが、老化および老化に伴って発症する疾患には非常に多くの因子が関わっており、先入観をもって事前に絞り込みを行うと、重要な因子を見逃してしまう恐れがある。プロテオーム科学では、可及的網羅的に解析が行うので、先入観や仮定を差し挟まずに幅広く情報を集めることができる。またプロテオーム科学は、酸化や糖化、架橋形成、分解など、翻訳後に起る様々なプロセスが関わっている老化や神経変性疾患、各種生活習慣病の発症機序の研究にも適しており、今後老年医学の研究領域において、大いに力を発揮してくれるものと期待している。

文 献

- 1) Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860—921.
- 2) Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al.: The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304—1351.
- 3) Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al.: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; 21: 1037—1053.
- 4) Medvedev ZA: Ageing at the molecular level and some speculations concerning maintaining the functioning of systems for replication of specific macromolecules. In: *Biological Aspects of Aging*, Shock N (ed), Columbia Univ Press, 1962, p255—266.
- 5) Orgel LE: The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci* 1963; 49: 517—521.
- 6) Harman D: The aging process. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78: 7124—7128.
- 7) Pirim I: Production of anti-polyubiquitin and anti-ubiquitin carboxyl terminal hydrolase antibodies and immunohistochemically assessment of them on brain sections of Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Int J Neurosci* 1998; 95: 33—42.
- 8) Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R: Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 2001; 293: 263—269.
- 9) Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, et al.: Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 2001; 7: 1144—1150.
- 10) Glenner GG, Wong CW: Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885—890.
- 11) Iwatsubo T, Hasegawa M, Ihara Y: Neuronal and glial tau-positive inclusions in diverse neurologic diseases share common phosphorylation characteristics. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 129—136.
- 12) Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, et al.: The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 1995; 14: 467—475.
- 13) Campion D, Martin C, Heilig R, Charbonnier F, Moreau V, Flaman JM, et al.: The NACP/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease. *Genomics* 1995; 26: 254—247.
- 14) DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, et al.: Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997; 277: 1990—1993.
- 15) Volkel H, Scholz M, Link J, Selzle M, Werner P, Tunne- mann R, et al.: Superoxide dismutase mutations of familial amyotrophic lateral sclerosis and the oxidative inactivation of calcineurin. *FEBS Lett* 2001; 503: 201—205.
- 16) Kokubo Y, Kuzuhara S, Narita Y, Kikugawa K, Nakano R, Inuzuka T, et al.: Accumulation of neurofilaments and SOD1-immunoreactive products in a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis with I113T SOD1 mutation. *Arch Neurol* 1999; 56: 1506—1508.
- 17) Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC: CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol* 2001; 102: 293—305.
- 18) Oeda T, Shimohama S, Kitagawa N, Kohno R, Imura T, Shibasaki H, Ishii N: Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2013—2023.
- 19) Sampson JB, Beckman JS: Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu, Zn superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 2001; 392: 8—13.
- 20) Bence NF, Sampat RM, Kopito RR: Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001; 292: 1552—1555.
- 21) Toda T, Kaji K, Kimura T: TMIG-2DPAGE: a new concept of two-dimensional gel protein database for research on aging. *Electrophoresis* 1998 Feb; 19(2): 344—8.
- 22) Tsugita A, Kawakami T, Uchida T, Sakai T, Kamo M, Matsui T, et al.: Proteome analysis of mouse brain: two-dimensional electrophoresis profiles of tissue proteins during the course of aging. *Electrophoresis* 2000; 21: 1853—1871.