日本アフェレシス学会雑誌 23(2)：135-142，2004

総　説

タンパク質の加齢変化

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

Age-Related Proteome Alteration

Tosifusa Toda

Proteomics Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

Summary The increase in oxidized forms of proteins including carbonyls, methionine sulfoxide and cross-links has been reported by many groups in addition to the accumulation of heat-labile and less-active enzymes in aged animal tissues. Since oxidized forms of proteins are thermodynamically unstable, the partially unfolded proteins are assumed to be more susceptible to irregular proteolysis in aged animal tissues. Here we report a decrease in the relative abundance of calmodulin, UCH-L1 and nm23-M1 in aged mouse hippocampus detected by two-dimensional gel electrophoresis and quantitative image analysis. To investigate the involvement of oxidation in the down-regulation of these proteins, the level of methionine sulfoxide was analyzed by high-throughput MALDI-TOF mass spectrometry with post-source decay fragmentation. As a result of proteomic analysis, increased methionine oxidation was detected in those proteins in aged mouse hippocampus. Our observation suggests that the oxidation of calmodulin, UCH-L1 and nm23-M1 might be involved in the down-regulation of these proteins in aged mouse hippocampus.

Key words: proteome, aging, oxidative stress, post-translational modification

1. はじめに

我々は，おおよそ思春期を過ぎた頃から少しずつ身体機能に衰えを感じ始め，さらに年齢が進むと，皮膚にはしわやしみが目立ち始め，髪は薄くなって白髪も増え，視力や聴力が衰え，そのうちに物忘れがだんだんひどくなってくる．我々の身体にこのような加齢変化が現れること自体は生物学的に不可避であり，すべての人が甘んじて受け入れなければならないことである．しかしながら，身体機能の低下によって家族や周囲の人たちから介護の世話を受けなければならなくなったり，寝たきりになって自立した生活が営めなくなったりすることだけは，できれば避けたいものである．それを実現させるためには『どうして老化は起きるのか』，『老化が進むとなぜ身体機能が低下するのか』といった『老化の分子メカニズム』を解明しなければならない．

2. 線虫の寿命遺伝子から見えてくる老化の根本原因

老化の原因として，これまでにさまざまな仮説が提唱され，仮説を証明すべく多くの研究者が独自に研究を重ねてきた[1~4]．その結果，最近になって少しずつ老化の本質が解き明かされ始めてきている．

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丁度50年目の節目に当たる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，当初の予想を大幅に下回る約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[5,6]．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け出されるものと期待されている[7~9]．しかし，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，その発現調節にかかわる『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．また，その変化を引き起こす老化の根本原因とはいったいどのようなものか．その答えを導き出すためのヒントが，線虫の寿命遺伝子に関する研究によって得られている．

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[10]．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 b 560 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しているらしい．この発見は，老化と活性酸素の関係を示唆しており，大変興味深いものである．

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．これらの遺伝子は，インスリンシグナル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，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低減されることによって寿命が延長されるものと考えられている．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するものである．線虫の寿命にかかわる遺伝子は他にもある．生命活動を緩慢にする *clk-1* という遺伝子がカナダの研究者によって 1996 年に発見されたが，この遺伝子に異常がある線虫も寿命が約 1.5 倍に延びていた．その後，この遺伝子はミトコンドリアのタンパク質をコードし，運動のリズムを制御していることがわかり，やはり遺伝子の異常によって活性酸素の発生が抑えられていたのである[11]．

これらのことから，少なくとも線虫では，活性酸素の発生が増加する遺伝子変異は寿命を短縮し，逆に活性酸素の発生を抑制する遺伝子変異は寿命を延長することが明白となった．

3. 哺乳動物の老化を制御する因子

線虫では，*daf-2* や *age-1* 遺伝子の変異によって寿命が延びたが，マウスなどの哺乳動物でも，これらの遺伝子変異によって同じように寿命が延長するのであろうか．これを調べるための実験が，東京都老人総合研究所の白澤卓司博士らによって行われている．その結果，ある意味では予想されたとおりであるが，線虫の *daf-2* に対応するマウスのインスリン受容体遺伝子に P 1195 L 変異を導入したホモ接合体遺伝子改変マウスでは，糖尿病が発症し，強いケトアシドーシスを起こして生後 48 時間以内に死亡してしまった．このことは，もともと血糖調節という機能を持たない線虫の場合，インスリン受容体遺伝子の変異は単純にエネルギー代謝を低下させ，活性酸素の発生を抑制する効果としてだけ働き，寿命延長に結びついたが，高等な哺乳動物の場合，これが血糖の調節という別の重要な機能を持ってしまっているために，この遺伝子の異常が血糖調節の異常をもたらし，結果的に寿命を短縮させることになってしまったと言える．さらに *clk-1* 欠損マウスは胎生期に致死となり，寿命の延長どころではなかった．このあたりが寿命遺伝子を研究する上で最も大きな問題点であり，種を超えて同じように働く寿命遺伝子を見つけることの難しさを示している．

その一方で，京都大学の鍋島陽一博士らは，短寿命の klotho マウスの解析から *klotho* 遺伝子と老化の結びつきを見出している[12,13]．

この *klotho* 遺伝子変異マウスは劣性遺伝であり，ホモ接合マウスは椎乳期の生後 3 週目までは野生型と同様に発育するが，3 週目を超えると発育が止まり，平均寿命は 60 日と，きわめて短命である．6 週齢頃からパーキンソン病様の歩行障害が現れるが，それと同時に，中膜の石灰化と内膜の肥厚を特徴とする動脈硬化や骨密度の低下，小脳のプルキンエ細胞の脱落，卵巣・子宮・精巣の顕著な萎縮，胸腺の顕著な萎縮，胃壁，皮膚，気管，心臓の弁など軟部組織の石灰化，皮膚の萎縮，毛根の減少，皮下脂肪の消失，脳下垂体の機能異常など，ヒト早老症の診断基準に合致するさまざまな症状が現れてくる．

klotho 遺伝子は，C 末端に膜貫通ドメイン構造を持つ 1,014 個のアミノ酸からなる膜タンパク質をコードしており，細胞外の配列は β グルコシダーゼに相同性を持つ 2 つのドメインより構成されていることがわかっている．この遺伝子の変異によって，なぜ早期老化が起きるのか，これまでのところまだ明確な説明ができるだけの情報は得られてはいないが，*klotho* 遺伝子変異マウスでは，生後 5 週齢あたりからマロンアルデヒドなどの過酸化脂質や 8-OH-デオキシグアノシンなどの酸化 DNA のレベルが正常マウスに比べて有意に上昇していることが報告されており[14]，やはり *klotho* 遺伝子変異マウスに見られる早老性の背景にも，活性酸素の関与があることを強くうかがわせる．

これとは別に韓国の Park 博士ら[15]は，*klotho* マウスとは別の系統の短寿命系マウス（SAM）において，ミトコンドリア内で発生する活性酸素の処理を行う酵素 SOD（Superoxide dismutase）が，対照の長

寿命系のマウスに比べ，早期に低下することを見出しており，佐藤ら[16]もやはりSAMマウスで，大脳皮質における酸化的ストレスの発生が増加していることを示すデータを報告している．

また，遺伝的な背景が全く同じラットやマウス，サルを2群に分けて行った比較実験では，カロリー摂取を制限された飼育群の個体は，自由節食で飼育された群の個体に比し長寿命であることが報告されており，やはりカロリー制限がミトコンドリアにおける活性酸素の発生を抑制し，これによって寿命が延びたことを裏付ける解析結果が得られている[17~19]．

4. 活性酸素が引き起こす老化の分子メカニズム

それではいったい，活性酸素はどのような分子メカニズムによって老化を引き起こしているのであろうか．我々はこれに対し，図1に示す作業仮説を立て，それを実証すべくプロテオーム解析を行っている．

活性酸素は，さまざまな生体分子に対して強い酸化作用を持っており，特にDNA，RNAおよびタンパク質に対する作用が，細胞を老化させる直接的な要因になっているのではないかと考えられている．DNAの損傷に対しては，修復機構が用意されており，元通りに修復が行われれば，ダメージは残らない．修復機構が働かずに損傷がそのまま残った場合には，DNAの複製や転写が正常に行われないために，細胞死（アポトーシス）に陥るものと考えられるが，その過程では，アポトーシスの誘導に向けて細胞内シグナル伝達とストレスタンパク質の動員が波動的に発生する．DNA修復が行われる際に塩基置換が起こり，遺伝子が変異するとき，変異がエクソン部分に起こればタンパク質の構造に変化が現れ，イントロン部分に起これば発現に変化が現れる可能性がある．いずれにせよ，DNAが損傷を受けた場合にも，結局は何らかの形でタンパク質の発現プロファイル（プロテオーム）に反映され，「タンパク質の加齢変化」として捉えることができる．

同様に，活性酸素はmRNAやtRNA，rRNAにも変異を引き起こす可能性があるが，これらも，タン

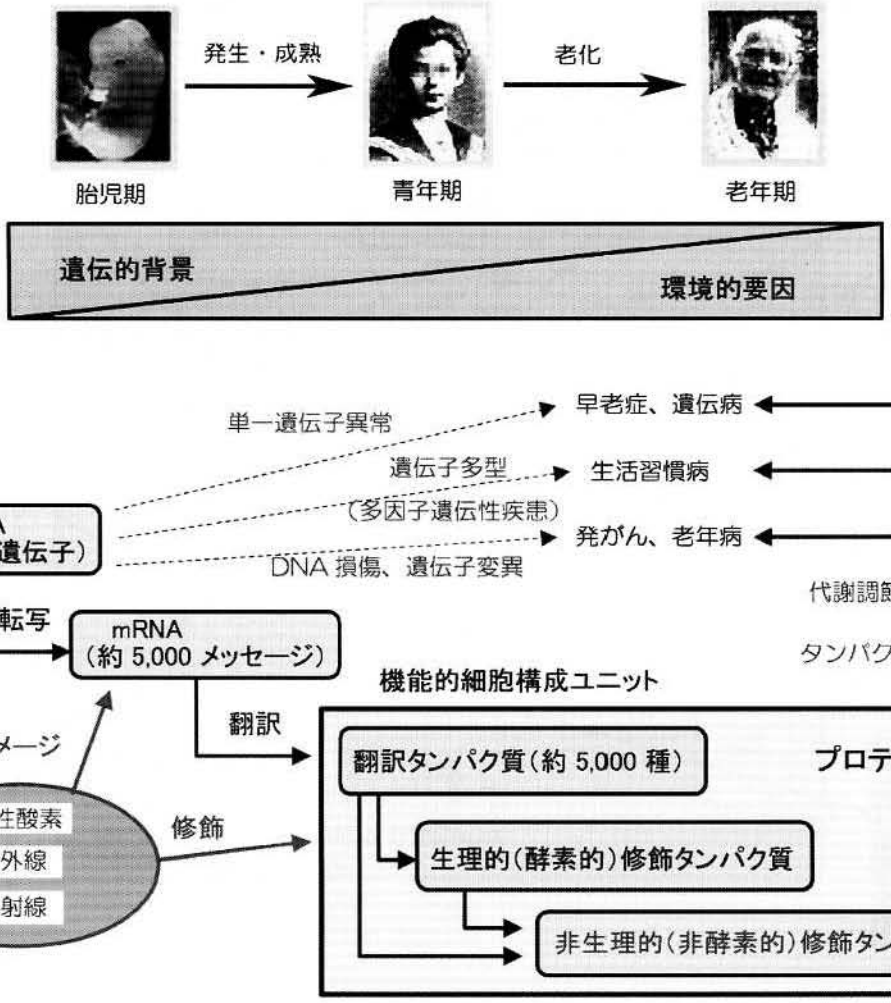

図1　老化機構の作業仮説

パク質の量的・質的変化となって現れ，それによって細胞の機能異常を引き起こす可能性が考えられる．

このような核酸に対する活性酸素の影響は，特に上皮系や免疫系造血系の組織における増殖性の細胞のように，活発にDNA複製を行っている細胞において重大な問題であるが，脳や心筋組織などの非増殖性の細胞においては，タンパク質の酸化的変性の方が，細胞機能に対してより大きな影響を及ぼしている可能性がある．事実，高齢者に発症が多いアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では，脳の組織内に異常なタンパク質の蓄積が見られることが多く，これが，神経細胞の機能に大きな影響を与えていることから，タンパク質の異常蓄積につながるような酸化的変性修飾は細胞にとって大きなダメージとなっているものと考えられる．

酸化を受けたタンパク質は局所的に疎水性を増し，立体構造（3次元的なタンパク質の折りたたみ構造）に異常をきたし，複合体の形成や生理活性の調節に重大な影響を及ぼす．その結果，酸化されたタンパク質では活性や機能の調節に不具合が発生したり，複合体を形成して異常な蓄積を引き起こしたりといった事態を招くことになる．

このように，活性酸素はさまざまな形でタンパク質の加齢変化を引き起こしているものと考えられることから，我々は実際に細胞内で起こっている「タンパク質の加齢変化」を明らかにすることを目的として，さまざまなプロテオーム解析を行ってきた[20~22]．

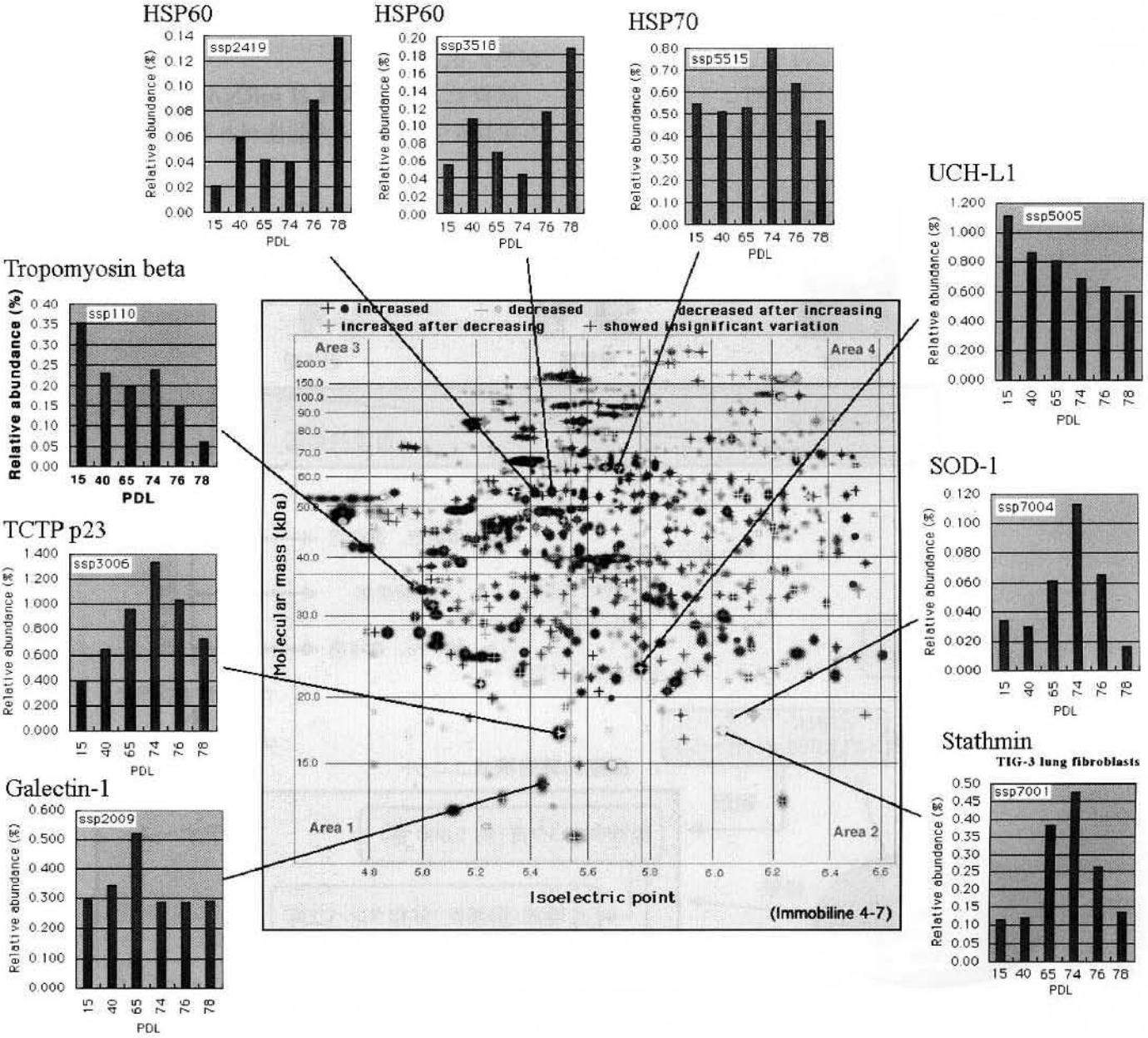

図2　培養条件下での細胞老化に伴うタンパク質の加齢変化

5. プロテオーム解析によって見えてきたタンパク質の加齢変化

老化によって起きる臓器や器官の機能低下は，それを構成する細胞の老化によるものである．成人の体を構成する細胞には，免疫幹細胞や上皮系の幹細胞のように生涯を通じて細胞分裂を繰り返す増殖性の細胞と，中枢神経系の細胞のように，個体発生後は細胞分裂を停止し，そのままの状態で老化していく非増殖性の細胞とがあるが，老化に伴う機能の低下はいずれのタイプの細胞にも起こることから，老化を引き起こす根本的な原因は，活性酸素のようにすべての細胞に普遍的に発生するものであると考えられる．

一方，老化した細胞において現実に観察される機能の低下が細胞の種類によって異なるのは，活性酸素の攻撃を受けるタンパク質が，その細胞内で発現しているタンパク質のプロファイル（すなわちプロテオーム）に依存するためであると考えられる．我々は，この作業仮説を検証し老化の分子メカニズムを明らかにするために，活性酸素の直接的な攻撃対象となっている『活性酸素高感受性タンパク質』を探し当て，さらにその下流でそのタンパク質の機能変化の影響を受けて変動し，最終的に細胞機能の低下をもたらす『老化形質責任タンパク質』を特定することが必要であると考えているが，プロテオミクスは，このような老化に伴うタンパク質の微細な変化を網羅的に解析する目的に最適な手法である．

東京都老人総合研究所では，増殖性細胞の分裂加齢（いわゆる細胞老化）のメカニズムを研究するためのモデル細胞として，ヒト胎児肺由来の正常二倍体線維芽細胞株を樹立し維持しているが，そのうちのTIG-3株はトリプシン処理をして細胞をはがし，希釈して撒きなおすという形で継代培養を繰り返していると，おおよそ65〜70代目（PDL）あたりで最大分裂寿命（Maximum life span）を迎え，増殖が停止し，やがて細胞集団全体が死滅する．これが，いわゆるヘイフリックモデルと呼ばれる増殖性細胞の細胞老化である．我々はこのモデル細胞を用いて，増殖性細胞の老化に伴うタンパク質の変化の解析を行った[22]．

培養条件下での細胞老化に伴うタンパク質の加齢変化を解析した結果，細胞老化に伴い細胞内の酸化ストレスの上昇を示唆するタンパク質の変化（HSP 60や

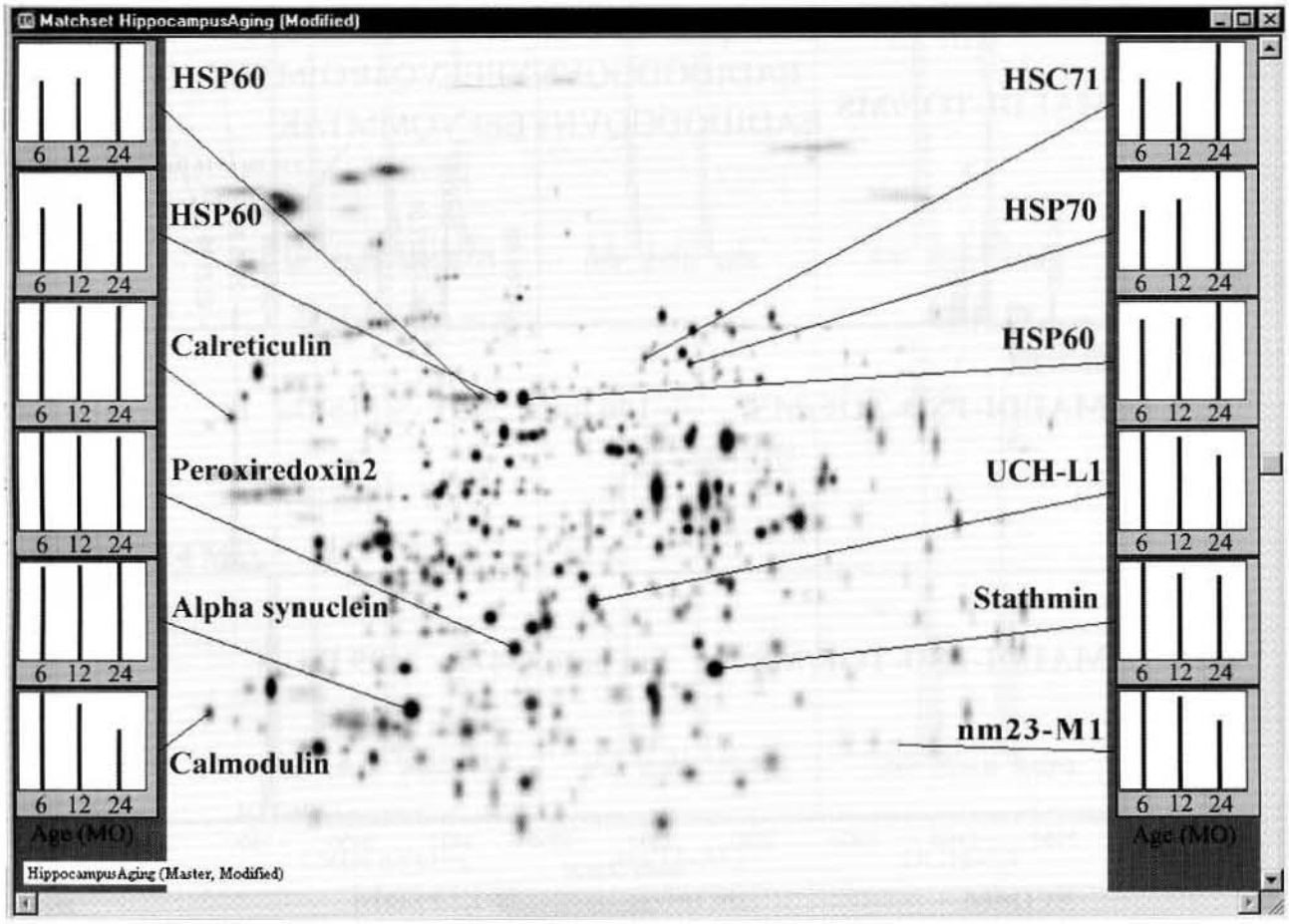

図3　マウスの脳の海馬組織のタンパク質の加齢変化

HSP 70，SOD-1 などの上昇）を見出すとともに，老化細胞における増殖抑制に関与すると見られるタンパク質を見出している（図 2）．このタンパク質は，ペプチドマスフィンガープリント法でスタスミンと同定されたが，これについては，別の細胞を用いた『EB ウイルス転換後の不死化に伴うプロテオームの変化の解析』で，不死化に伴い老化の際とは逆の挙動をすることを見出しており，現在さらに，この変化がもたらす生理的な意味についての詳細な解析を行っている．

一方，非増殖性細胞の老化研究では培養細胞を使用することができないので，生後 6 ヶ月，12 ヶ月，および 24 ヶ月のマウスの脳の海馬組織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 蛍光色素にてタンパク質スポットを染色し，レーザー励起蛍光スキャナーで画像を取り込んで画像解析を行ない，各タンパク質の加齢変化を解析した[23]．その結果，12 ヶ月齢から 24 ヶ月齢までの間に，HSP 60 や HSP 70，HSC 71 などの，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反面で，ユビキチン-プロテアソーム分解系の最終段階の掃除役である UCH-L 1（Ubiquitin C-terminal hydrolase L-1）や，カルシウム濃度を介したタンパク質の機能調節に重要な役割を果たしているカルモデュリンなどが減少する傾向を示した（図 3）．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を示唆しており，このことと UCH-L 1 やカルモデュリンなどの減少の間には何らかの因果関係があるものと考えられる．そこで我々は，活性酸素によってこれらのタンパク質が酸化を受け易いのではないかと考え，老齢マウスの海馬からカルモデュリンを単離し，質量分析に掛けて酸化修飾の有無を解析した．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

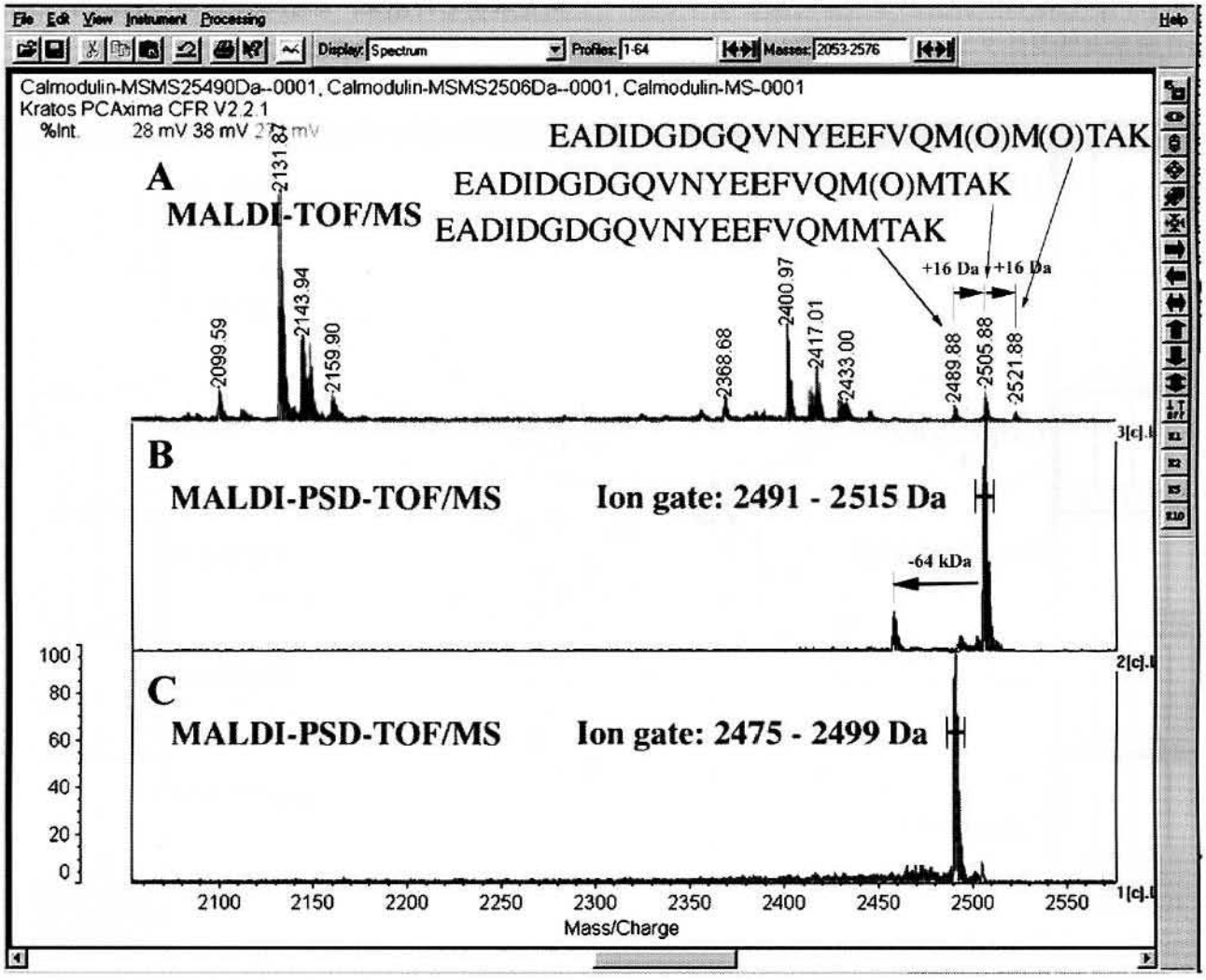

図 4　質量分析によって検出された老齢マウス海馬のカルモデュリンにおけるメチオニンの酸化

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ものであり，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共存させてタンパク質を単離し，同じようにメチオニンの酸化状態の比較を行った．その結果，12ヶ月齢のマウスに比べ24ヶ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有意に上昇していた（図5）．この結果は，老齢マウスの海馬組織では酸化ストレスが高まり，これによってカルモデュリンなどの酸化ストレスに感受性が高いタンパク質が選択的に酸化を受けて，分解を受けやすくなっていることを強く示唆する[23]．

しかし，酸化を受けたタンパク質は，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ことも考えられる．現在我々は，カルモデュリンが酸化を受けたときに，コンフォメーションに一体どのような変化を生じるのか，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がわかっており，単に分解が促進されるだけでなく，酸化フォームによる機能撹乱も起こっている可能性がある．このことから，これまでに報告されている老化組織や老化細胞での熱不安定な酵素の出現や，酵素比活性の低下なども，『タンパク質の酸化変性』によって引き起こされたものであると考えられる．今後は，これまでに変化が報告されている酵素やタンパク質について，老化に伴う酸化的修飾の有無と量的変化を詳しく洗い直してみる必要があると考えている．

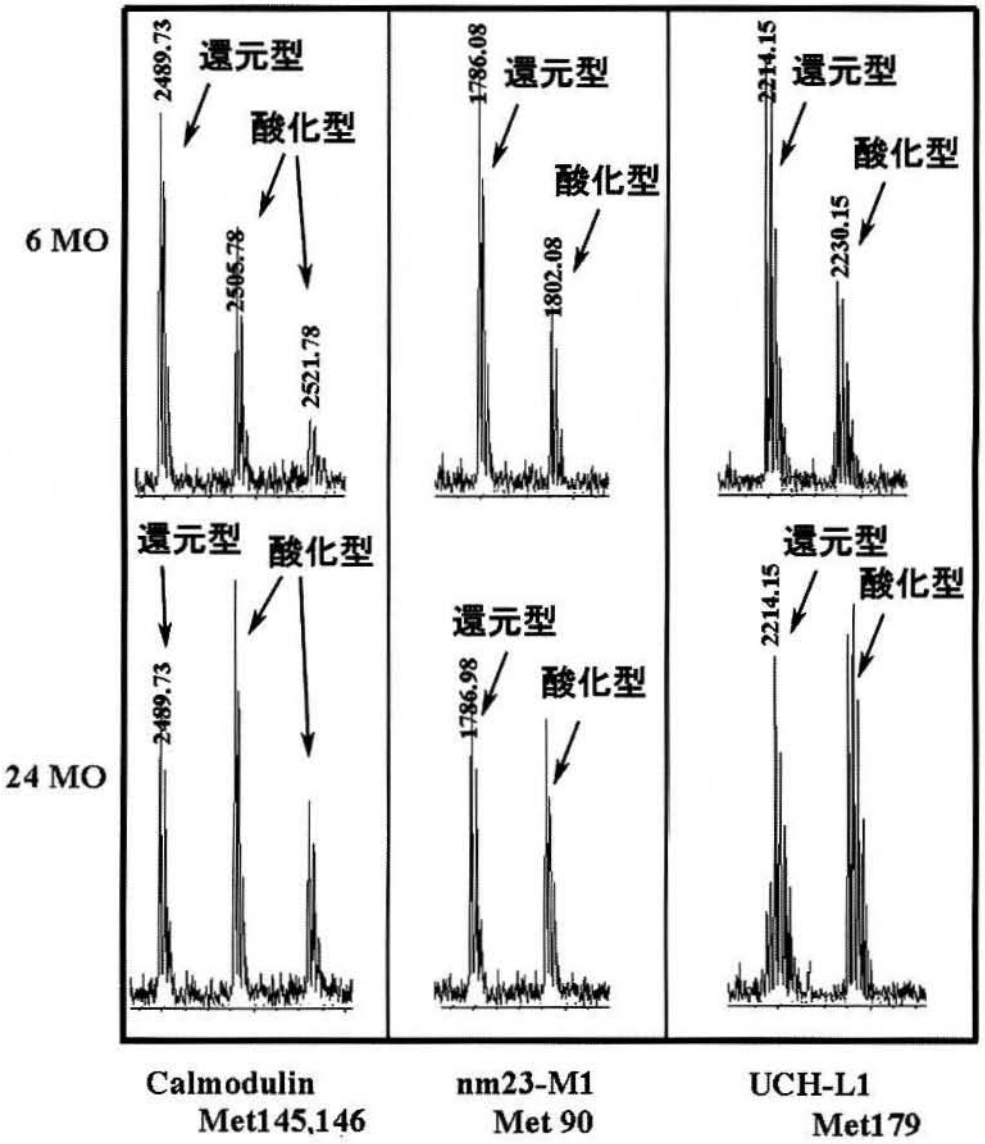

図5　マウスの海馬の加齢に伴うメチオニン酸化レベルの上昇

文　献

1) Melov S, Ravenscroft J, Malik S, et al: Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. Science **289**(5484): 1567-1569, 2000
2) Melov S: Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. Ann NY Acad Sci **908**: 219-225, 2000
3) Fossel M: Cell senescence in human aging: a review of the theory. In Vivo, **14**(1): 29-34, 2000
4) Kowald A, Kirkwood TB: Accumulation of defective mitochondria through delayed degradation of damaged organelles and its possible role in the ageing of post-mitotic and dividing cells. J Theor Biol **202**(2): 145-160, 2000
5) Pennisi E: Human genome. Reaching their goal early, sequencing labs celebrate. Science **300**(5618): 409, 2003
6) Little J, Khoury MJ, Bradley L, et al: The human genome project is complete. How do we develop a handle for the pump? Am J Epidemiol **157**(8): 667-673, 2003
7) Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, et al: A vision for the future of genomics research. Nature **422**(6934): 835-847, 2003
8) Collins FS, Morgan M, Patrinos A: The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. Science **300**(5617): 286-290, 2003
9) Sakaki Y: Studies of DNA, genome, and the Human Genome Project. Tanpakushitsu Kakusan Koso **48**(6): 684-685, 2003 (in Japanese)
10) Ishii N, Fujii M, Hartman PS, et al: A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. Nature **394**(6694): 694-697, 1998
11) Ewbank JJ, Barnes TM, Lakowski B, et al: Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene clk-1. Science **275**: 980-983, 1997
12) Nabeshima Y: Klotho: a fundamental regulator of aging. Ageing Res Rev **1**(4): 627-638, 2002
13) Yamashita T, Nifuji A, Furuya K, et al: Elongation of the epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a klotho gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. J Endocrinol **159**(1): 1-8, 1998
14) Nagai T, Yamada K, Kim HC, et al: Cognition impairment in the klotho gene mutant mice and oxidative stress. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi **23**(5): 211-217, 2003 (in Japanese)
15) Park JW, Choi CH, Kim MS, Chung MH: Oxidative status in senescence-accelerated mice. J Gerontol A Biol Sci Med Sci **51**(5): B 337-345, 1966
16) Sato E, Oda N, Ozaki N, et al: Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. Mech Ageing Dev **86**(2): 105-114, 1996
17) Kim HJ, Jung KJ, Yu BP, et al: Modulation of redox-sensitive transcription factors by calorie restriction during aging. Mech Ageing Dev **123** (12): 1589-1595, 2002
18) Cho CG, Kim HJ, Chung SW, et al: Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. Exp Gerontol **38**(5): 539-548, 2003
19) Mattison JA, Lane MA, Roth GS, Ingram DK: Calorie restriction in rhesus monkeys. Exp Gerontol **38**(1-2): 35-46, 2003
20) Toda T: Proteome and proteomics for the research on protein alterations in aging. Ann NY Acad Sci **928**: 71-78, 2001
21) Toda T: Current status and perspectives of proteomics in aging research. Exp Gerontol **35**(6-7): 803-810, 2000
22) Toda T, Kaji K, Kimura N: TMIG-2 DPAGE: a new concept of two-dimensional gel protein database for research on aging. Electrophoresis **19**(2): 344-348, 1998
23) Toda T, Morimasa T, Kobayashi S, et al: Proteomic approach to determination of the significance of protein oxidation in the ageing of mouse hippocampus. Appl Genomics Proteomics **2**(1): 43-50, 2003