

### 細胞老化のプロセスを 定量的ディファレンシャルプロテオミクスから探る

戸田年総\*

## Lecture Key Notes

- ・老化は、時間軸に沿って漸進的かつ不可逆的に細胞機能が低下する現象である。
- ・老化機構の研究には、二次元電気泳動にもとづく定量的なディファレンシャルプロテオミクスが有効である。
- ・細胞の老化では、酸化ストレス耐性関連蛋白質のほか、細胞骨格調節系、細胞分解系、シグナル伝達系の蛋白質などが時系列的に変動する。

### はじめに

1995年にオーストラリアで誕生したプロテオミクス (proteomics) は、蛋白質解析の迅速性、網羅性、高感度化をもたらし、基礎医学生物学関連領域における蛋白質研究のスタイルを一新させた。誕生から10年が経過し、そのあいだに技術的にも大きな広がりをみせたが、とりわけ老化や老年病の研究では、定量的なディファレンシャルプロテオミクスが有効である。

### key words

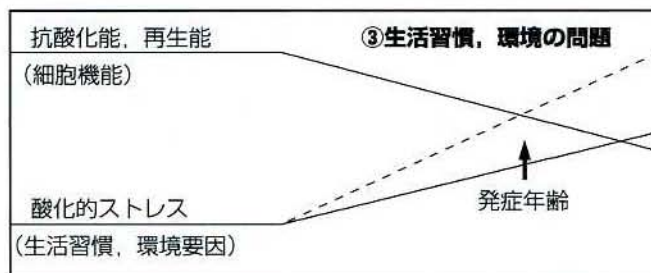
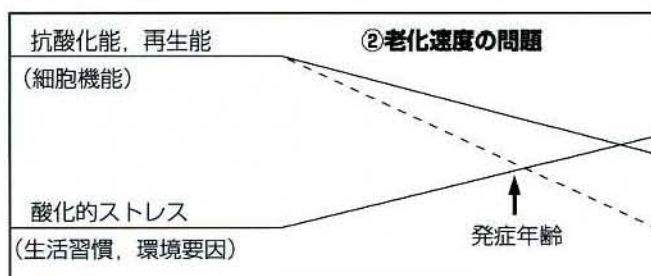
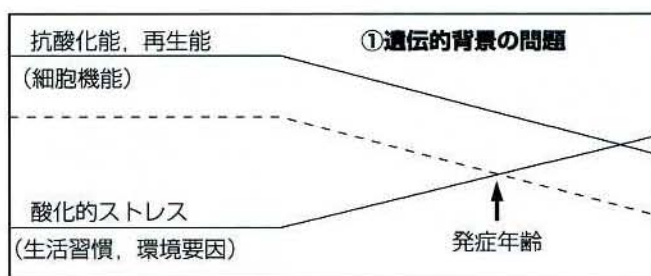
細胞老化  
酸化ストレス  
蛋白質発現変化  
二次元電気泳動画像解析  
ディファレンシャルプロテオミクス

一般に高齢になるほど罹患者が増加する老年期疾患は、遺伝形質 (体質) を背景とし、それにもとづいて加齢による細胞修復機能や組織再生能、免疫能の低下などが進行し、そこに大気汚染などの生活環境、喫煙、食生活などの生活習慣に起因する細胞変性加わることによって、最終的に損傷と修復のバランスが破綻することから発症するものと考えられる (図①)。このような年齢依存的疾患の発症にかかわる要因を蛋白質レベルで解明しようとする場合、定量的なディファレンシャルプロテオミクスによって、老化の過程や発症のプロセスを時系列的に追跡する必要がある。

### 1. 老化と疾患には遺伝的背景と環境要因 がかかっている

老化と遺伝子について、これまでさまざまな仮説が提唱されてきたが、その一つが「老化のプログラム説」である。その根底にある事実、動物種により最長

\* TODA Tosifusa / 東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チーム



胎児期 成長期 思春期 壮年期 老年期  
図① 加齢に伴い発症頻度が上昇する疾患の発症にかかわる因子（概念図）

細胞老化のおもな原因と考えられている酸化ストレスのレベルには、細胞のエネルギー代謝に伴い細胞内で発生するもののほか、生活習慣や生活環境の影響によるものも加わる。遺伝的な背景は細胞の抗酸化能を根源的に支配し、さらに加齢に伴う低下がこれに加わる。（筆者作成）

寿命が異なるということである。確かに寿命の大枠は遺伝子の支配を受けていることは間違いがないが、死に至るプロセスまでもが厳密にプログラムされているという証拠は得られていない。むしろ多くの老化研究者は生活環境や生活習慣の影響をより強く受けていると考えているが、とりわけ環境要因のなかでも重要な因子は、酸化ストレスである。酸化ストレスの大部分は、ミトコンドリア内で発生する活性酸素であるが、放射線や、オキシダントのように体外からくるものもある。そもそも生物は、そのような酸化的攻撃から身を守るための仕組みを備えており、それをコードしているのが遺伝子なのである。しかし時間の経過とともに、酸化ストレスから身を守る仕組み自体がしだいに破綻していく。プロテオーム解析

は、われわれが本来備えている抗酸化能の仕組みを解明するだけでなく、それが時系列的にどのように変化をしていくのかを知るためにも有効なツールなのである。

## 2. 老化に伴う細胞機能の変化をプロテオーム解析する

われわれの体が老化するのは、体を構成する細胞が老化するためであり、その結果として、組織や器官でさまざまな機能の低下が起きてくる。

われわれの体を構成する細胞は、造血系の前駆細胞や表皮の基底細胞のように細胞分裂をくり返す増殖性細胞と、通常は休止状態にあり組織が損傷を受けたときに細胞分裂する増殖性細胞、および心筋や脳の細胞のように基本的には細胞分裂しない非増殖性細胞に分けられる。このうち増殖性細胞の重要な機能の一つは細胞分裂能そのものであるが、高齢になると損傷を受けた組織の修復が遅れぎみになるのは、老化に伴って細胞増殖能が低下するためであると考えられる。

1960 年ごろまでは細胞は無限に生きられるものであると思われていた。しかし、当時ウイルスのワクチンを産生するためにヒトの正常細胞の培養を研究していた Hayflick と Moorhead<sup>1)</sup>が、ヒト胎児の肺組織から正常二倍体線維芽細胞を培養系に移し継代培養をおこなったところ、図②に示すように、細胞は培養環境に適応する段階（第 1 相：適応期）、一定の周期で定常的に増殖を継続する段階（第 2 相：対数増殖期）、分裂周期が延びはじめる段階（第 3 相：増殖低下期）、および細胞周期が無限大となる段階（第 4 相：増殖停止期）を経て細胞死に至ることを見出した。このとき使用された WI-38 細胞は、米国立衛生研究所（NIH）から老化研究者にも配布され利用されたが、本来はワクチンの産生を目的として開発されたものであったため、分裂回数の少ない若い細胞がすぐに枯渇した。Nichols ら<sup>2)</sup>は WI-38 細胞の後継株として、ヒトの 16 週齢の XX 型（女性型）胎児肺の組織片から IMR-90 細胞を樹立したが、やはりワクチン製造が本来の目的であったため、東京都老人総合研究所では、細胞老化研究を目的とする正常二倍体線維芽細胞株〔TIG-1（XX 型）、TIG-3（XY 型）など〕をヒトの胎児肺組織より独自に樹立した<sup>3)</sup>。その後これらの細胞を用

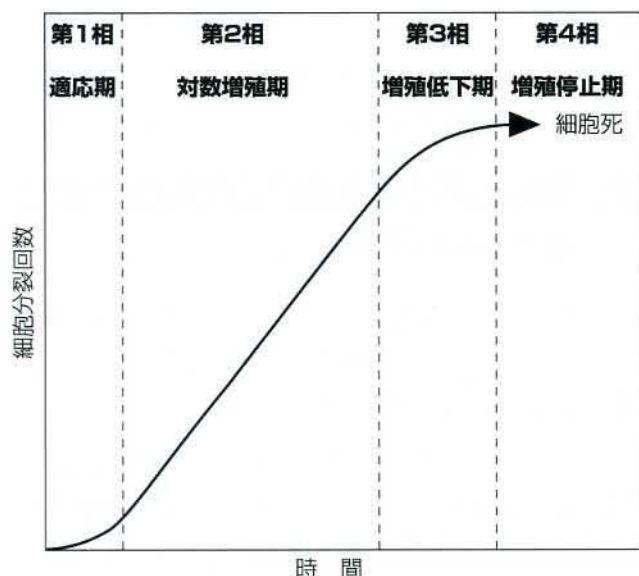


図2 細胞老化の Hayflick モデル

ヒトの肺組織から培養系に移された正常二倍体線維芽細胞は、短い適応期（第1相）を経たのち、一定の周期で細胞分裂をくり返す対数増殖期（第2相）に入るが、50 回程度の細胞分裂をくり返したのちに増殖低下期（第3相）に入り、さらに増殖停止期（第4相）に至り、細胞死を迎える。（筆者作成）

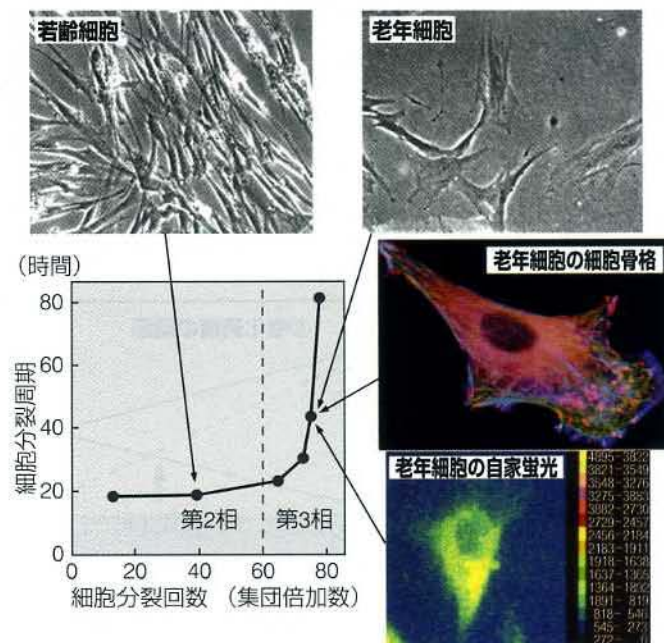


図3 細胞の老化に伴う分裂周期の延長，細胞形態，骨格構造の変化，および自家蛍光物質の細胞内蓄積  
対数増殖期（第2相）には細長い紡錘状の構造をして整然と配列していた細胞が，増殖低下期（第3相）に入ると扁平に広がった不規則な構造に変わり，細胞辺縁の骨格の増加と核周囲の自家蛍光物質の増加がみられるようになる。（筆者作成）

いた研究で、細胞分裂のたびにテロメア（染色体末端のくり返し塩基配列構造部分）が短縮する現象が見つかり、正常二倍体線維芽細胞の分裂寿命はテロメア長によって規定される<sup>4)</sup>と考えられるようになった。しかし、われわれが TIG-1 や TIG-3 を用いておこなった分析において、第2相から第3相に移行するときに細胞骨格構造の変化や自家蛍光性の蛋白質の蓄積（図3）、細胞運動性（遊走性）の低下<sup>5)</sup>など、テロメア長の短縮だけでは説明ができない変化が起きていることがわかり、それらの変化の要因となっている蛋白質の変化を時系列的なプロテオーム解析で探り出すことを試みた。以下に実験方法と解析結果の一部を要約する。

まず、TIG-3 を 10% のウシ胎児血清（FBS）を含むイーグル MEM 培養液を用いて 5% 炭酸ガス培養器中で継代培養して集団倍加数（PDL：平均の分裂回数）が 15, 40, 65, 74, 76 および 78 PDL に達した段階で細胞から蛋白質を抽出し、二次元電気泳動で分離する。つぎに銀染色キットフコー（和光純薬製）で染色してスキャナーで読み込み、画像解析ソフト PDQuest（当時は PDI 製、現在は Bio-Rad 製）を用いて蛋白質スポットの検出と数

値化、正規化、ゲル間のマッチング、および時系列的な比較定量分析をおこなった。その結果、二次元電気泳動で分離検出されたすべての蛋白質スポットを、細胞の老化に伴い増加するもの、減少するもの、いったん増加したのちに減少に転じるもの、いったん減少したのちに増加に転じるもの、ほとんど変化をしないかランダムな変化をするものに分類（クラスタリング）することができた<sup>6)</sup>。われわれは得られた結果をデータベース化し、ウェブサーバー（[http://www.proteome.jp/2D/Fibro/humfb\\_menu.html](http://www.proteome.jp/2D/Fibro/humfb_menu.html)）上で公開しているが、要約するとおおよそつぎのようになる。

図4の二次元電気泳動プロテオームマップ上において赤色で示された蛋白質スポットは、細胞老化に伴い増加するものである。そのなかでも、とくにミトコンドリア内で発生する酸化ストレスによる蛋白質の品質低下を防止するはたらきを考えると考えられている熱ショック蛋白（HSP 60）は、多数の等電点アイソフォームとして発現するが、pI 5.5 と pI 5.4 の2つのアイソフォームは第3相の後期に顕著に増加するのに対し、pI 5.3 の高リン酸化

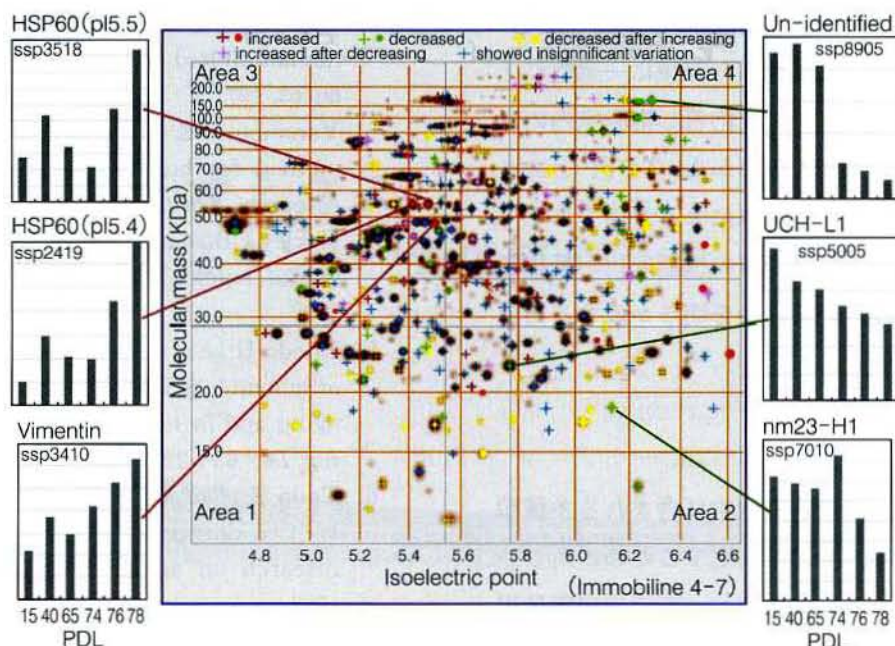


図4 二次元電気泳動によって検出された、細胞の分裂回数の増加に伴い発現レベルが上昇する蛋白質スポット（赤色）と低下する蛋白質スポット（緑色）

熱ショック蛋白 (HSP 60) は等電点の異なる複数のアイソフォームとして発現されるが、塩基性側の2つのスポットが加齢に伴い有意に上昇する。細胞骨格の形成にかかわるビメンチンが増加する一方で、蛋白質分解にかかわる UCH-L1 は低下する。(筆者作成)

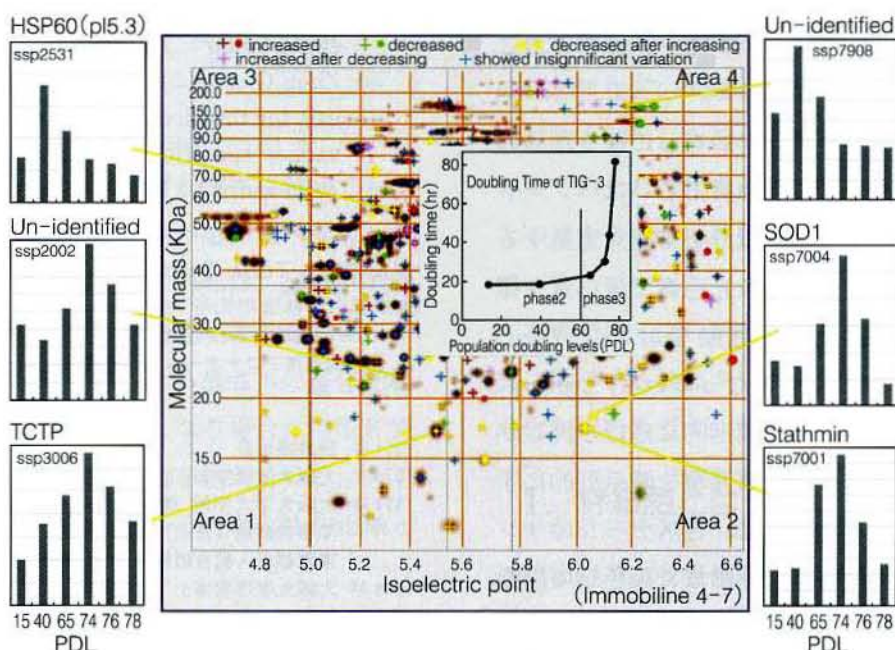


図5 二次元電気泳動によって検出された、細胞の分裂回数の増加に伴い一過性に上昇したのちに下降に転じる蛋白質スポット（黄色）

翻訳制御腫瘍蛋白 p 23 (TCTP)、スーパーオキシド・ディスムターゼ、Cu-Zn (SOD 1) およびスタスミン (腫瘍蛋白 18) などは細胞が第3相 (増殖低下期) に入る 64 PDL (population doubling levels) あたりで一過性に上昇したのち再び下降に転じる。(筆者作成)

アイソフォーム(図5において黄色で示されたスポット) は 40 PDL 付近で一過性に増加したのち減少に転じており、老化に伴って HSP 60 では脱リン酸化などの翻訳後

修飾の変化が起きている可能性のあることがわかった。また翻訳制御腫瘍蛋白 p 23 (TCTP) やスーパーオキシド・ディスムターゼ、Cu-Zn (SOD 1)、スタスミン(腫

瘍蛋白 18) などの黄色で示された蛋白質スポット(図5)は、増殖低下期(第3相)に移行した直後に一過性に上昇するが、SOD 1は酸化ストレスに応答し細胞室内の活性酸素の消去をおこなっていることから、TCTPとスタスミンの一過性上昇も酸化ストレスによるものである可能性があり、今後はこれらの蛋白質の機能変化が細胞老化にどのようにかかわっているのかを明らかにする必要がある。

## おわりに

プロテオーム解析は、組織や細胞中に含まれる多種類の蛋白質を網羅的に分離、検出、同定するための新しい技術をわれわれに提供してくれたが、一方で蛋白質発現を単にプロファイリングするだけでは、老化や疾患のメカニズムの解明につながる有用な情報は得られないということもわかってきた。時系列的に進行する老化や疾患の発症のプロセスにかかわっている蛋白質を見出してメカニズムを解明するためには、定量的なディファレンシャル解析がおこなえる方法でプロテオーム解析をおこなうことが重要である。

ディファレンシャルプロテオミクスをおこなうための方法としては、サンプルごとに蛋白質あるいはペプチドを異なる安定同位体で標識し、質量分析で相対定量するICAT法<sup>7)</sup>やiTRAQ法<sup>8)</sup>、異なる蛍光色素で蛋白質を標識した後に混合して二次元電気泳動をおこなう2-D DIGE法<sup>9)</sup>なども利用されるようになっている。しかし、老化のように長い期間にわたって漸進的に進行し、しかも複雑な増減パターンを示す蛋白質発現を時系列的に丁寧に追いかける必要がある場合には、各ステージのサンプルを二次元電気泳動で分離し、泳動後に染色して画像解析をおこなう定量的ディファレンシャルプロテオミクスをおこなうのが、現時点では最善の方法である。

## 文 献

- 1) Hayflick L *et al* : The serial cultivation of human diploid cell strain. *Exp Cell Res* **25** : 585-621, 1961

- 2) Nichols WW *et al* : Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* **196** : 60-63, 1977
- 3) Yamamoto K *et al* : A practical preservation method for human diploid fibroblasts in aging research. *Exp Gerontol* **16** : 271-285, 1981
- 4) Harley CB *et al* : Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345** : 458-460, 1990
- 5) Kondo H *et al* : Changes in the migratory ability of human lung and skin fibroblasts during *in vitro* aging and *in vivo* cellular senescence. *Mech Ageing Dev* **63** : 223-233, 1992
- 6) Toda T *et al* : TMIG-2 DPAGE : a new concept of two-dimensional gel protein database for research on aging. *Electrophoresis* **19** : 344-348, 1998
- 7) Gygi SP *et al* : Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17** : 994-999, 1999
- 8) DeSouza L *et al* : Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* **4** : 377-386, 2005
- 9) Zhou G *et al* : 2 D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol Cell Proteomics* **1** : 117-124, 2002

## 戸田年総 : TODA Tosifusa

東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チーム 研究副部長  
同 産学公連携プロテオーム共同研究センター センター長



1951年 福井県出身  
1975年 大阪大学理学部 化学科卒業  
1977年 大阪大学大学院 理学研究科 生物化学専攻前期(修士)課程 修了  
東京都老人総合研究所 生化学部 基礎第二研究室 助手  
1988年 大阪大学理学博士 学位取得  
財団法人東京都老人総合研究所 分子生物学部門 研究員  
1988~1989年 カリフォルニア大学サンフランシスコ校 皮膚科学教室 客員研究員  
1993年 財団法人東京都老人総合研究所 分子生物学部門 主任研究員  
2002年 財団法人東京都高齢者研究 福祉振興財団 東京都老人総合研究所 プロテオーム共同研究グループ グループリーダー主任研究員  
2005年より現職  
専門分野: 分子老化学, プロテオミクス,  
研究分野: 老化プロテオミクス, 疾患プロテオミクス