

老化のゲノミクスとプロテオミクス

戸田年総*

はじめに

老化は全身の各臓器、各器官の機能が漸進的に低下するプロセスであり、生命維持機能が許容される限度を下回った時に死を迎える。生命の維持が可能な期間(寿命)は動物種によって異なり、また同じ動物種の中でも個体によって異なる。そもそも寿命は個体の遺伝形質の一つであり、最上流でゲノムの支配を受けているが、果たして老化のプロセスにゲノムはどのような関わり方をしているのであろうか。また、遺伝子の最終産物である蛋白質は、老化に伴う細胞機能の低下にどのような責任を負っているのであろうか。本稿では、分子レベルの新しい視点であるゲノミクスとプロテオミクスによる老化研究の状況を紹介したい。

I. 老化のゲノミクスとプロテオミクスの背景

一般に短寿命の個体では老化の速度が速く、長寿命の個体では老化の速度が遅いと考えられており、寿命の長短を左右する遺伝子は老化の速度をも規定していると解釈されているが、本当にそうであろうか。実際には、寿命遺伝子がコードする蛋白質の機能が特定され、老化のいかなるプロセスに関わっているのか明らかにされない限り、直ちに「寿命遺伝子=老化制御遺伝子」と考えることはできない。個々の臓器、器官において加齢に伴い進行する細胞機能の低下に直接関わっているのは、蛋白質の量的、質的および機能的な変化である。老化のプロテオミクスが標的とするのは、まさしくこの「加齢に伴う蛋白質の変化」である。

ゲノミクス genomics (ゲノム研究) が盛んに行われるようになるのは、雑誌 Genomics が創刊された 1980 年代の終わり頃からであるが、ゲノム研究の出発点は

Watson と Crick¹⁾ による DNA 二重らせん構造の発見 (1953 年) に遡る。その後 Maxam-Gilbert 法 (化学分解法) と Sanger 法²⁾ (ダイデオキシターミネーター法) に代表される DNA 塩基配列決定法が開発されたことにより、ゲノムの解読が盛んに行われるようになり、さらに PCR (polymerase chain reaction) 法が加わって、2003 年にはヒトの全ゲノム DNA 塩基配列の完全解読が宣言されるに至った。

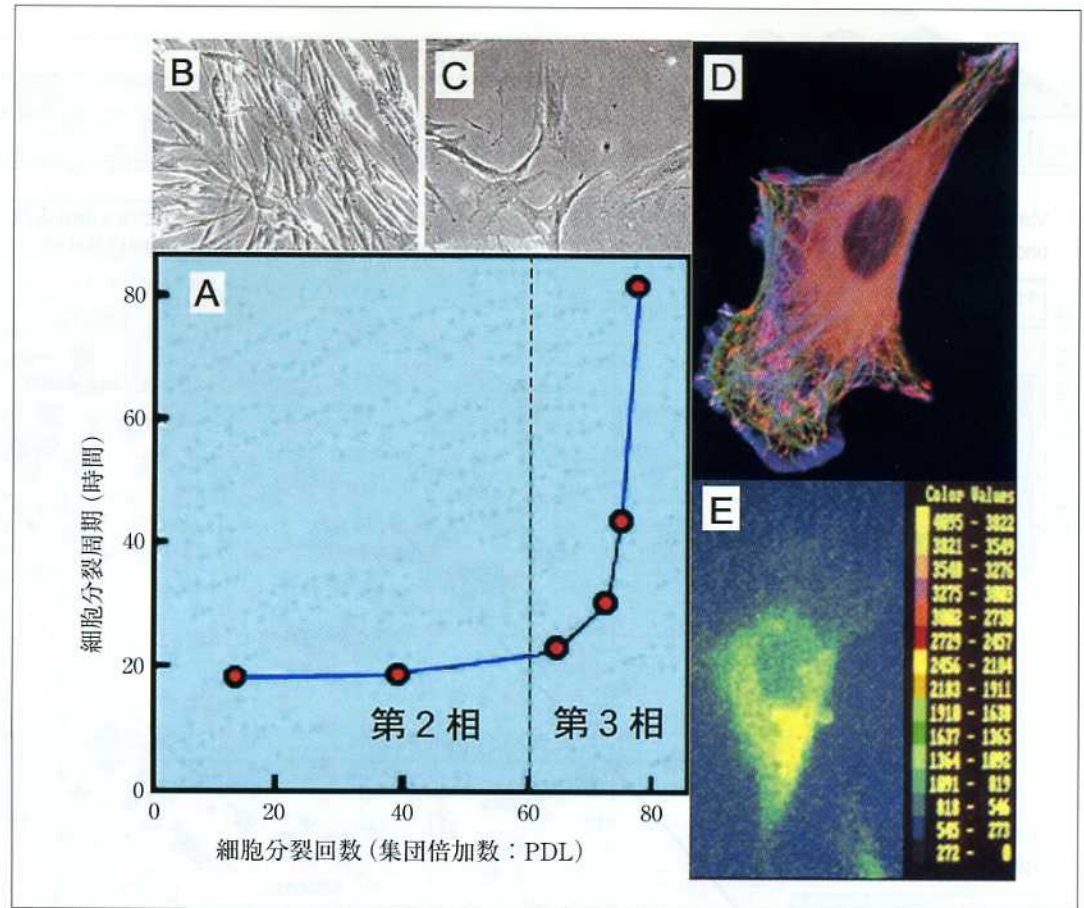
ヒトゲノムプロジェクトが大きな山を越えた 1995 年に、ゲノムの機能を解明するための新たなアプローチとしてプロテオミクス proteomics (プロテオーム研究) がスタートした³⁾。プロテオミクスは基本的には「蛋白質研究」そのものであるが、従来の蛋白質科学においては蛋白質を個々に取り上げ、構造などの物理化学的特性や生物学的機能を追求するという手法がとられたのに対し、プロテオミクスでは発現される全蛋白質を可及的網羅的に分離分析し、その中から細胞の分化や癌化、老化などに関係するものを探し出すという手法がとられる。なお、プロテオミクスが生まれたもう一つの技術的背景として、質量分析計による蛋白質の同定法の開発がある。これによって、わずか 1 枚のゲルから回収された微量の蛋白質を同定すると同時に翻訳後修飾の分析まで行うことが可能となった。

II. ゲノムと老化の関係

ゲノムには、少なくとも次の 3 つの機能があると考えられている。①蛋白質の一次構造情報を保有し、蛋白質の機能を規定する。②転写調節に関わる塩基配列を保有し、蛋白質の発現を規定する。③ゲノムの保守と複製に関わる塩基配列を保有し、自己の保存と再生産を規定する。そしてこれらは、自己と同一もしくは類似のゲノムをもつ次世代の個体を再生産し、種を保存するために働いている。老化はそのような利己的遺伝子のもとに起きている生物現象である。現在地球上

*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

図1 ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 TIG1-3の細胞老化 細胞分裂周期の変化(A), 第2相(指数増殖期)にある細胞の形態(B), 第3相(分裂停止期)の細胞の形態(C), 第3層の細胞にみられるストレス線維(D), 第3層の細胞にみられる自家蛍光物質の蓄積(E).



に種が保存されている生物種では、少なくとも次世代を再生産し終えるまではゲノムが安定に維持され、各細胞が正常に機能し、必要な代謝が行われ、個体が保全されていなければならない。逆に言えば、次世代の再生産を終えた個体では、ゲノムの生物学的な役割はほぼ終了しており、老化はこの時期に進行する。

Ⅲ. 線虫の寿命遺伝子研究で浮かび上がったこと

線虫は体長わずか1 mmの小さな動物で、平均寿命は21日と短い。体を構成する細胞も1,000個足らずと大変少なく、ゲノムが完全に解読されている。東海大学の石井直明博士らは、寿命の短い線虫の一系統で、*mev-1* 遺伝子の異常を見出した⁴⁾。*mev-1* 遺伝子は、ミトコンドリアの電子伝達系 complex II を構成する酵素 (succinate dehydrogenase cytochrome b560) をコードしており、この遺伝子に異常があるとミトコンドリアにおける活性酸素の発生が上昇することがわかっており、その結果、寿命が短縮されるものと考えられている。

一方、*daf-2* 遺伝子や *age-1* 遺伝子に異常があると、

mev-1 遺伝子の場合とは逆に線虫の寿命が野生型の2~3倍に延びる。これらの遺伝子は、インスリンシグナルの受容と伝達に関与する蛋白質をコードしていることがわかっており、これらの遺伝子の異常によって結果的に活性酸素の発生が低下し寿命が延長されるものと考えられている。このほかにも、線虫の運動をコントロールする *clk-1* 遺伝子に異常がある線虫では寿命が約1.5倍に延びていることがわかっているが、この遺伝子はミトコンドリアの蛋白質をコードしており、この遺伝子の変異によってミトコンドリアにおける活性酸素の発生が抑えられた結果、寿命が延長されていることが明らかとなっている⁵⁾。

このように、細胞内の酸化ストレスのレベルを高めるような遺伝子変異は寿命を短縮し、酸化ストレスの発生を抑制する方向への変異は寿命を延長する。今後の分子老化学研究および分子老年病研究においては、酸化ストレスがどのようなメカニズムで細胞機能を低下させ、疾患の発症を促しているのかという問題に焦点が絞られる。

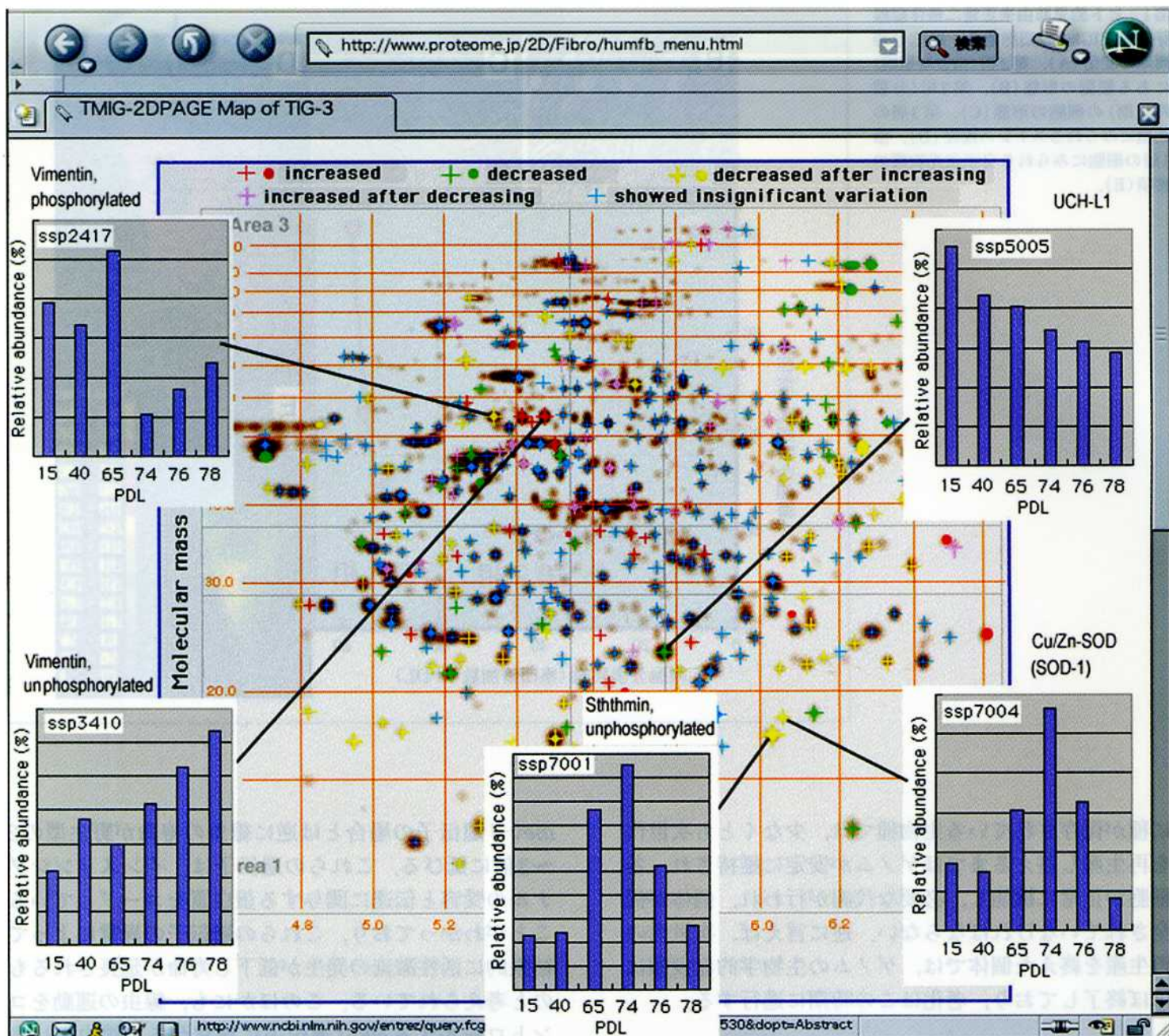


図2 インターネット上で公開されている細胞老化のプロテオーム解析データの一部 スポットをクリックすると、各蛋白質の加齢変化に関するデータ等が表示される。

IV. ヒト正常二倍体線維芽細胞の老化とヒトBリンパ芽球細胞の不死化の比較プロテオミクスで見えてくるもの

図1に、東京都老人総合研究所で作成されたヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 TIG-3 (TIG: Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology) の細胞老化の様子を示す。ヒト正常二倍体細胞の分裂回数が有限である(細胞に寿命がある)ということは Hayflick ら⁶⁾に

よって発見され、その後このような細胞寿命はテロメアの短縮によるものであるとする説⁷⁾が一般に受け入れられるようになった。しかし、老化に伴う細胞形態の変化や遊走能の低下、自家蛍光物質の蓄積など、テロメアの短縮だけでは説明ができない現象も数多くみられる。

実際の個体内には、線維芽細胞のような増殖性の細胞のほかに、神経系の細胞や筋細胞のように、分裂を停止した状態で老化していく細胞もあることから、異なる両者のタイプの老化モデルを個別に研究する必

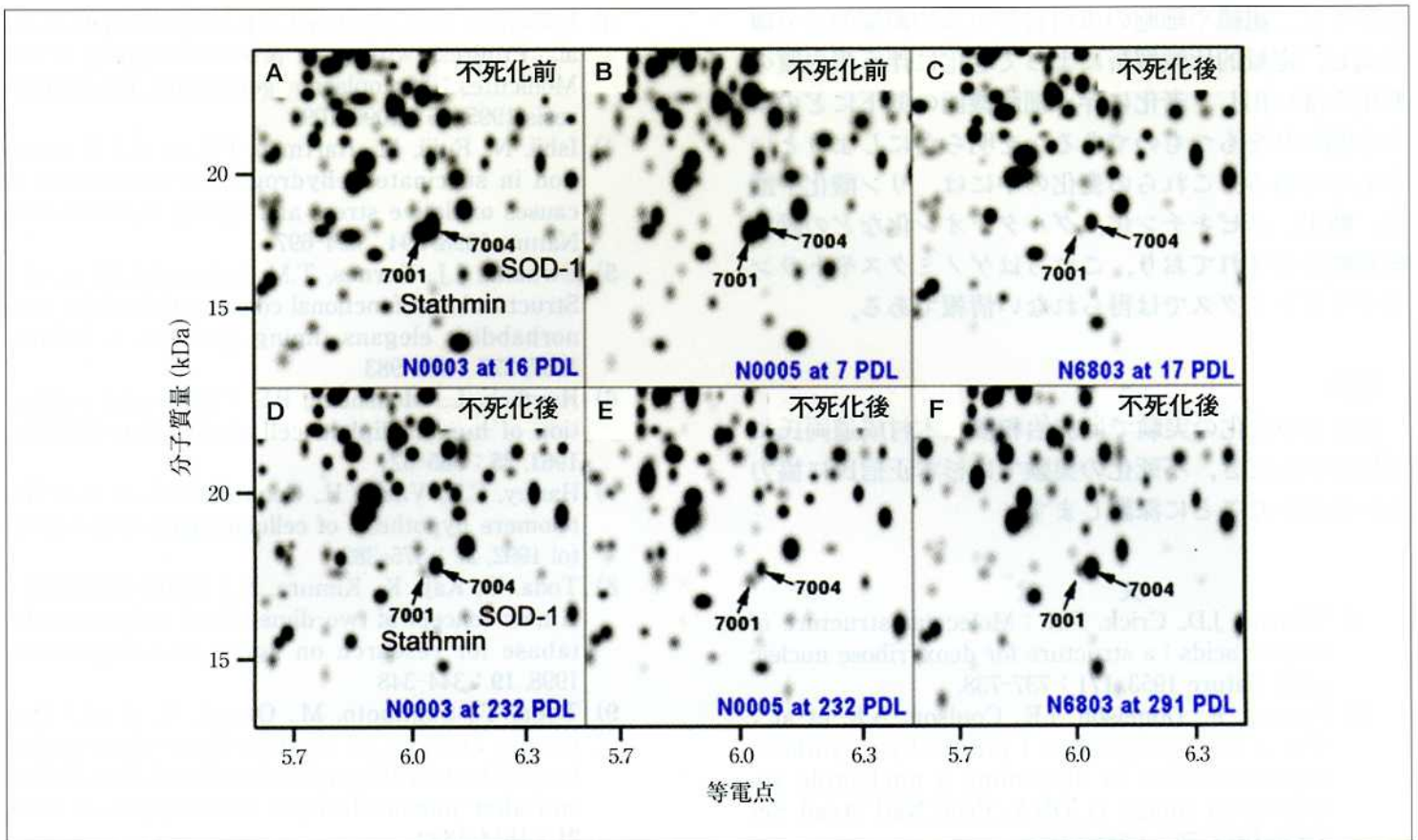


図3 それぞれ不死化の前後の細胞から抽出された蛋白質の二次元電気泳動によるプロファイリングの結果 注目される部分の拡大(文献9より改変).

要があるが、少なくとも造血系の細胞や消化管粘膜細胞、骨芽系の細胞など増殖能が細胞機能に必須な細胞においては、このHayflickモデルが有効な研究対象となっている。

我々は、老化の各段階にある細胞(PDL (population doubling level) の異なる細胞)から蛋白質を抽出して二次元電気泳動で分離、定量的な画像解析による比較を行い、老化に伴う蛋白質の変化を求めてデータベース化した⁸⁾。現在このデータの一部は、インターネット上で公開されている(図2)。多くの蛋白質スポットにおいて加齢変化がみられているが、我々が特に注目したのは、活性酸素の消去において重要なSOD-1 (superoxide dismutase 1)と、チューブリンの解離会合平衡を調節するスタスミンが、第2相(指数増殖期)から第3相(分裂停止期)に移る65 PDL付近で一過性の上昇を示しているということである。これに連動するように、中間径フィラメントを構成するビメンチンでは、リン酸化型の減少と脱リン酸化型の上昇がみられる。

これらのほかにも多くの蛋白質で加齢に伴う変化が

みられたので、細胞増殖の調節に関わっているものを特定するために、EBV (Epstein-Barr virus)によるヒトBリンパ芽球細胞の不死化の過程で変動する蛋白質のプロテオーム解析を行い、両者を比較分析した⁹⁾。その結果、TIG-3の老化では一過性の上昇がみられた脱リン酸化型スタスミンが、Bリンパ芽球の不死化では逆に減少していた(図3)。このことから、スタスミンの変化は老化細胞の形態変化や細胞遊走能の低下だけでなく、細胞増殖能の低下にも関わっているものと考えられる。

まとめ

ここで紹介した蛋白質は、TIG-3細胞の老化に伴い大きな変化を示したもののごく一部であり、上記のデータベースにみられるように、細胞老化には非常に多くの蛋白質の変化が伴う。老化のゲノミクスは主に老化の背景となる遺伝形質の特定に役立つのに対し、老化のプロテオミクスは老化のプロセスの解明に役立つ。実際これまでに実施された老化のプロテオミクス

の多くは、組織や細胞の蛋白質を可及的網羅的に分離分画し、定量的比較解析によって老化に伴う蛋白質の変化を洗い出し、老化に伴う細胞機能の低下にどのような関わりをもつものであるかを明らかにしようというものである。これらの変化の中には、リン酸化や酸化、糖化、ユビキチン化、グルタチオン化などの翻訳後修飾も含まれており、これらはゲノミクスやトランスクリプトミクスでは得られない情報である。

謝辞

TIG-3の老化の実験では加治和彦、木村成道両氏に支援をいただき、不死化の実験では杉本正信氏に協力をいただいたことに深謝します。

文 献

- 1) Watson, J.D., Crick, F.H. : Molecular structure of nucleic acids ; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953, **171** : 737-738.
- 2) Sanger, F., Donelson, J.E., Coulson, A.R. et al. : Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage f1 DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, **70** : 1209-1213

- 3) Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A. et al. : Progress with gene-product mapping of the Mollicutes : *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995, **16** : 1090-1094
- 4) Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P.S. et al. : A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 1998, **394** : 694-697
- 5) Ewbank, J.J., Barnes, T.M., Lakowski, B. et al. : Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* 1997, **275** : 980-983
- 6) Hayflick, L., Moorhead, P.S. : The serial cultivation of human diploid cell strain. *Exp Cell Res* 1961, **25** : 585-621
- 7) Harley, C.B., Vaziri, H., Counter, C.M. et al. : The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992, **27** : 375-382
- 8) Toda, T., Kaji, K., Kimura, N. : TMIG-2DPAGE : A new concept of two-dimensional gel protein database for research on aging. *Electrophoresis* 1998, **19** : 344-348
- 9) Toda, T., Sugimoto, M., Omori, A. et al. : Proteomic analysis of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines before and after immortalization. *Electrophoresis* 2000, **21** : 1814-1822