

【総 説】

## タンパク質の酸化修飾と老化

戸田 年総

東京都健康長寿医療センター研究所 老化機構研究チーム

### 要約

酵母や線虫で見つかった寿命遺伝子の多くはミトコンドリア機能やエネルギー代謝の制御、酸化傷害の防御修復などに関わっており、酸化ストレスが老化の速度を規定する要因の一つであることはまちがいない。ミトコンドリアなどで発生したスーパーオキシドはSODなどによって過酸化水素に変わり、さらにカタラーゼやペルオキシダーの働きで無害化されるが、一部はヒドロキシラジカルを経て生体分子を酸化する。タンパク質の酸化についてはリシンやアルギニンのカルボニル化がよく知られているが、実際タンパク質の中ではメチオニン残基が最も酸化を受けやすく、細胞内の酸化ストレスに素早く反応してスルホキシド型となる。多くの細胞はこれを還元修復する酵素を発現し対応していると考えられているが、老化動物の組織中で特定のタンパク質においてメチオニンスルホキシドの上昇が観察されており、老化に伴う細胞機能の低下に関わっている可能性が高い。

**キーワード:** Protein, oxidative modification, methionine sulfoxide

### 1. はじめに

老化のメカニズムとしてこれまで多くの仮説が提唱され、それぞれの仮説に基づいて研究が行われてきた。その中でも有力な二大仮説はプログラム説[1-4]とフリーラジカル説[5-8]である。前者は、「老化は遺伝子の中にプログラムされている」とするもので、この仮説に基づいて寿命の長短を規定する遺伝子（寿命遺伝子・長寿遺伝子）を探索する研究が行われてきた[9-12]。一方、フリーラジカル説は、「生体内で発生するフリーラジカルによってDNAやタンパク質が酸化修飾を受け、これが蓄積することによって最終的に細胞機能が破綻する」という考え方であり、この仮説に基づき、生体内におけるフリーラジカルの発生およびその制御に関する研究[13-16]や、DNAの酸化およびその修復系酵素に関する研究[17,18]、タンパク質の酸化およびその分解/修復系酵素に関する研究[19-24]が行われてきた。また、培養細胞や線虫などの培養条件で酸素濃度が寿命に及ぼす影響を調べる研究[25-27]も、フリーラジカル説がベースになっており、さらに最初に酵母で研究され、その後線虫、ショウジョウバエ、ネズミ、さらにはサルでその効果が確かめられたカロリー制限による寿命延長効果[28-31]も、基本的にはエネルギー代謝のレベルを下げ、フリーラジカルの発生を抑えることで寿命が延びることを期待

して行われたものである。

### 2. フリーラジカルと活性酸素種

フリーラジカルは不対電子を有する原子や分子の総称で、ミトコンドリアなどの酸化還元酵素複合体において反応の副生成物として出てくるスーパーオキシド( $O_2^{\cdot-}$ )や、過酸化水素水に鉄イオンなどが働いたときにできるヒドロキシラジカル( $\cdot OH$ )、一酸化窒素合成酵素によって生理的に作られる一酸化窒素(NO)などがこれにあたる。これに対し活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)は、通常の酸素分子( $O_2$ )よりも活性化された状態の酸素分子誘導体を指し、上記のフリーラジカルの他に過酸化水素( $H_2O_2$ )やペルオキシナイトライト( $ONOO^-$ )、過酸化脂質なども含まれる。

スーパーオキシドは日常生活の中で常に発生しているものであるが、酸化力は弱く、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)によって速やかに過酸化水素に変換されており、後述のメチオニンのスルホキシド化を除き、直接タンパク質などを酸化することは少ないとされている[32]。過酸化水素(hydrogen peroxide)も酸化力は弱いですが、寿命が長く、生体膜を容易に通過する。生体内の過酸化水素はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ、チオレドキシンペルオキシダーゼなどによって水と酸素に分解されると考えられるが、生体内の鉄イオン( $Fe^{2+}$ )や銅イオン( $Cu^+$ )などと接触するとフェントン反応によって、ヒドロキシラジカルに変化する。ヒドロキシラジカルの寿命は100万分の1秒間と非常に短いですが、酸化力が強く、生体内でのタンパク質や脂質、核酸(DNA、RNA)の酸化は主にヒドロキシラジカ

〒173-0015

東京都板橋区栄町35-2

TEL: 03-3964-3241 (ex. 3182)

FAX: 03-3579-4776

E-mail: ttoda@proteome.jp

ルによるものと考えられている[32]。

### 3. タンパク質の酸化

そもそもタンパク質は、酸化を受けやすいアミノ酸残基を多数含んでおり、生体内でヒドロキシルラジカルやペルオキシナイトライト、NOなどの濃度が高まると様々な酸化修飾を受ける(図1)。

#### 3-1. カルボニル化

カルボニル化は、酸化ストレスや加齢に伴い細胞内で増加する酸化タンパク質の指標として最もよく調べられており、リシン残基の酸化によるアリシン(Allylsine, 2-aminoadipic semialdehyde)、アルギニン残基の酸化によるγ-グルタミル-セミアルデヒド(γ-glutamyl semialdehyde)、プロリンのピロリジン環の酸化によるγ-グルタミル-セミアルデヒド(γ-glutamyl semialdehyde)などが知られている[33,34](図1-A)。ただし、このうちアリシンは、ヒドロキシルラジカルによる非酵素的酸化の他、リシロキシダーゼによって酵素的に作られることもあるので、タンパク質の酸化指標として利用するには注意が必要である。

#### 3-2. チロシン残基のニトロ化

生体内でスーパーオキシドラジカルと一酸化窒素が共存すると、両者が反応してより酸化力が強く細胞毒性が高いペルオキシナイトライト(peroxynitrite: ONOO<sup>-</sup>)が産生される。ペルオキシナイトライトは特にチロシン残基のフェノール環に結合してニトロチロシンを生成する(図1-B)。チロシンのニトロ化は、アルツハイマー病患者の脳で増加することが知られており、神経変性に伴う脳内の酸化ストレスの上昇を示すものとして注目されている[35]。ニトロチロシンは質量分析で45 Daの質量増加として検出されるほか、特異性の高い抗体が市販されているので、Western Blottingによる検出も可能である。

#### 3-3. システイン残基の酸化

システインのチオール基では、ジスルフィドという形での酸化と、酸素の直接付加による酸化が競合的に起きる(図1-C)。このうちジスルフィドはタンパク質分子内あるいはタンパク質分子間で形成される架橋の他、システインやグルタチオンなどの低分子チオール化合物との結合(s-チオール化、s-thiolation)など多彩な形態をとり、それぞれで異なるコンフォメーションをとるため、

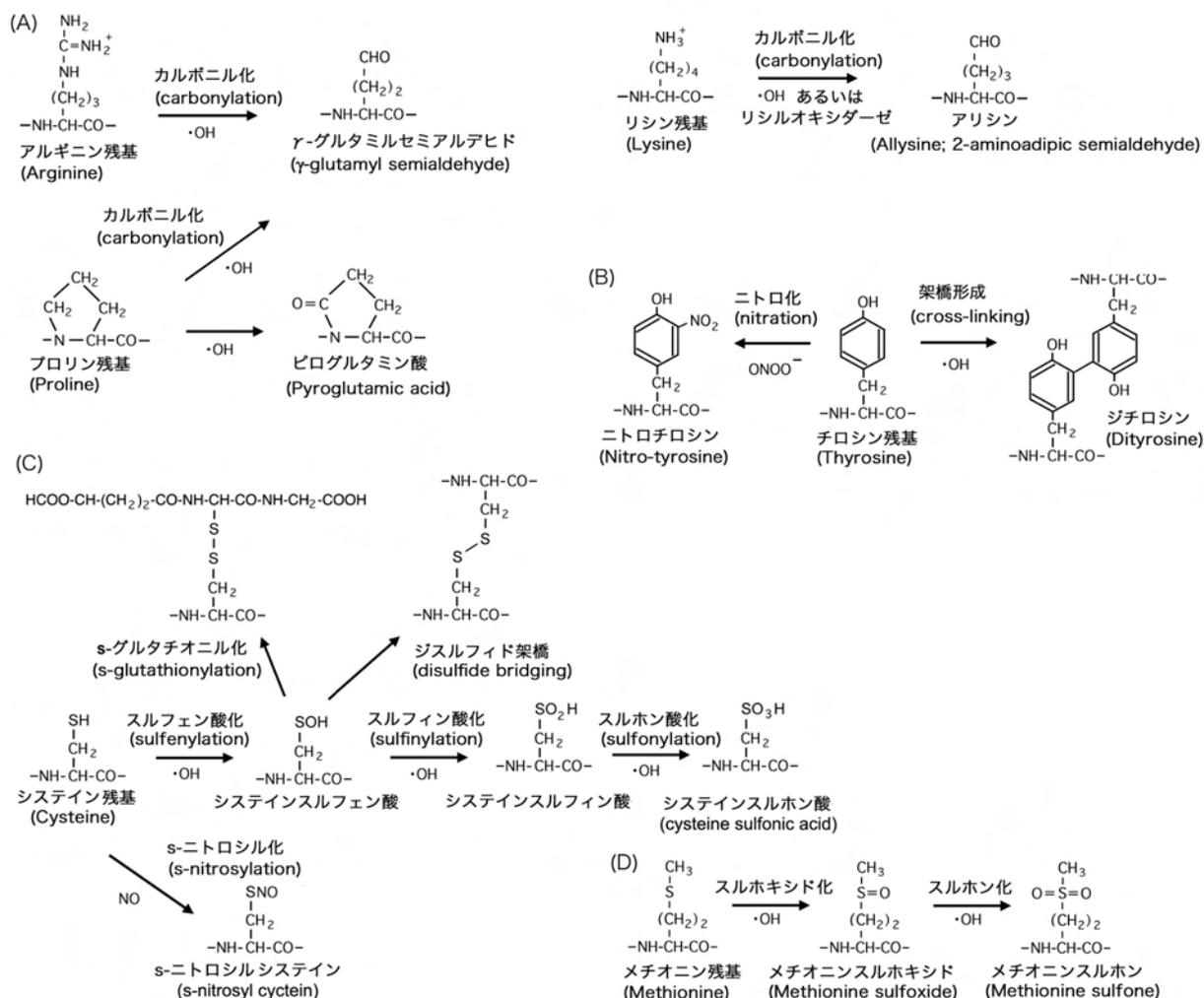


図1. タンパク質の酸化修飾

機能への影響も多様である。

s-チオール化は可逆的な酸化であるため、老化との関係ではあまり調べられていないが、虚血再灌流による酸化傷害においては重要な意義を持つ。s-チオール化に関する最初の論文は、心筋細胞の虚血モデルとしてチオール特異的な酸化剤であるダイアミドを投与する実験におけるもので、クレアチンキナーゼおよびプロテインキナーゼC- $\alpha$ はs-チオール化によって失活するのに対し、低分子量Gタンパク質 Rasは逆に活性化されることから、s-チオール化は虚血再灌流の際の心筋細胞の傷害組織再生シグナルに重要な役割を果たしていると考えられている[36]。

### 3-4. メチオニン残基の酸化

メチオニンのメチルチオエーテル基は、タンパク質を構成するアミノ酸残基の中でも特に酸化を受けやすく、細胞内において酸化ストレスレベルが上昇すると容易にスルホキシド型の構造に変換される。さらに強い酸化ストレスが加わると、最終的にメチルスルホン型の構造に変わると考えられているが、細胞内で観察されるのは大部分がスルホキシド型である(図1-D)。

メチオニンのスルホキシド化による等電点および分子量の変化はごく僅かであるため、二次元電気泳動では同一のスポットとして観察される。メチオニンスルホキシドに対するポリクローナル抗体も市販されてはいるが、感度、特異性、定量性共に不十分であり、Western Blottingでメチオニンの酸化レベルを定量的に分析することは難しい。これに対し、質量分析計による定量分析は比較的容易であり、同時に同定も行える利点がある。

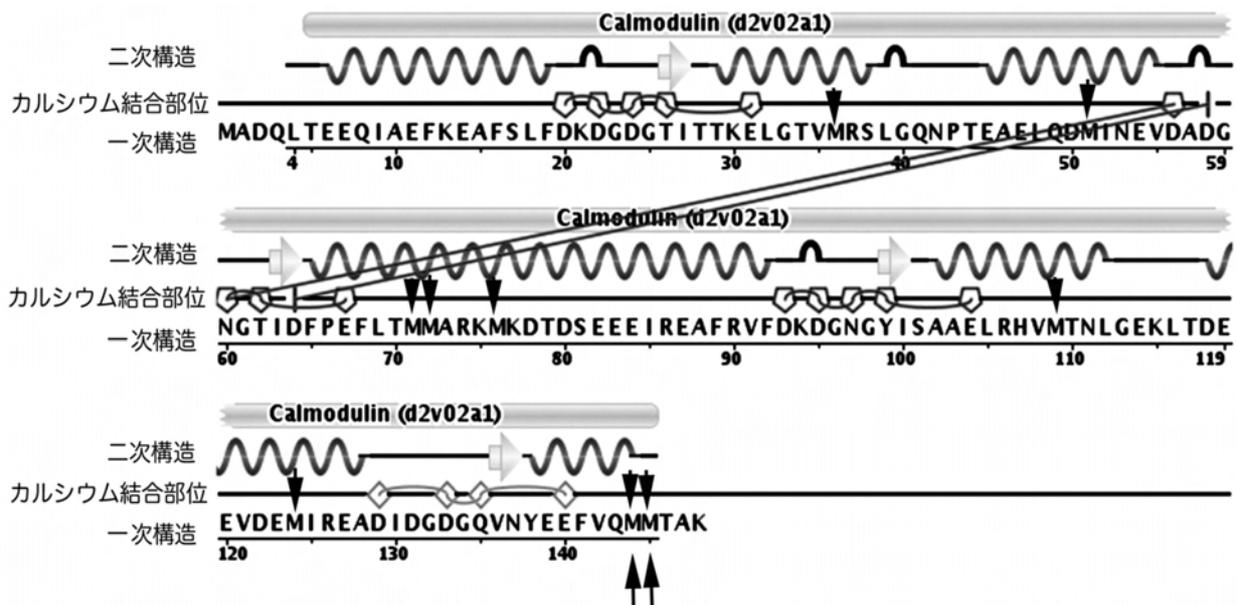
メチオニンスルホキシドに対しては、特異的な還元酵素(methionine sulfoxide reductase, MsrA, MsrB)が存在し[37-40]、還元型(チオール型)のチオレドキシンの協働によって元のメチオニンに戻す機能を有して

いることがわかっていることから、他のアミノ酸残基のより重大な酸化を防ぐためにラジカスカベンジャーとして機能しているという考え方も提唱されている。しかし我々が調べた限り、メチオニンのスルホキシド化レベルはタンパク質の種類により、また同一分子内でも部位によって異なることから、コンフォメーション的にMsrA/Bのアクセスが悪いなどの理由で十分に還元修復が行えない部位もあるものと思われる。そのため網羅的なプロテオーム解析によって、タンパク質スポットごとにメチオニン酸化の加齢変化を調べ、機能との関係を明らかにする必要があるのではないかと考えている。

一例として、老齢マウスの海馬におけるカルモデュリンの酸化修飾について解析を行った結果を示す。カルモデュリンの一次構造はXenopusからヒトまで完全に保存されて、1分子内に4カ所のカルシウム結合ドメインを持ち、それぞれのドメインの近傍に合計9個のメチオニンを含んでいる(図2)。

我々が実施した二次元電気泳動スポットの質量分析によって、メチオニンの酸化レベルは分子内の位置によって異なること、および老齢マウスの海馬ではC末端に近い位置にある連続した2つのメチオニン(Me144, Met145)が特に強く酸化を受けていることがわかった[41]。さらに、この位置はカルシウム結合サイトに近く、酸化カルモデュリンではカルシウムへの結合親和性およびカルシウム結合によるコンフォメーションの変化が共に低下していることが、DPI法(Dual Polarization Interferometry)による相互作用解析によって確認されている(図3)。

カルモデュリンはCa<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)などの活性調節を介して、脳機能の維持に重要な役割を果たしていることから、メチオニンの酸化は、加齢に伴う脳機能低下の要因の一つであると考えている。



マウスの海馬において加齢に伴う酸化修飾レベルの上昇が認められたメチオニンの位置

図2. カルモデュリンの構造(一次構造、二次構造、カルシウム結合部位およびメチオニンの位置)

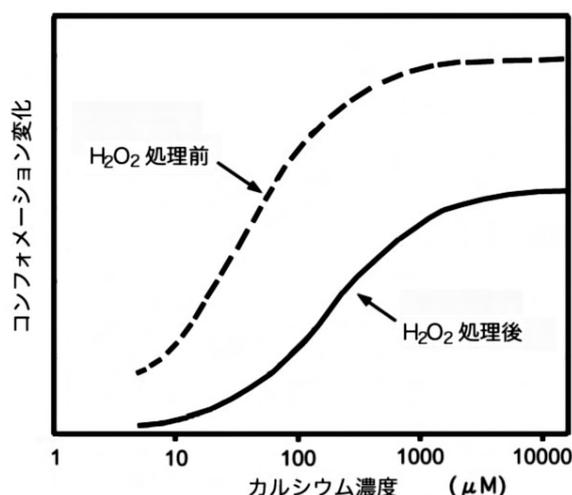


図3. 酸化修飾によるカルモデュリンの機能変化  
(概念図: DPI測定による生データは原著論文として発表準備中)

#### 4. まとめ

タンパク質は、酸化を受けやすいアミノ酸残基を多数含んでおり、とりわけメチオニンのメチルチオエーテル基は、タンパク質を構成するアミノ酸残基の中でも最も酸化を受けやすく、細胞内で酸化ストレスレベルの上昇に敏感に反応してスルホキシド型の構造に変わる。メチオニンの酸化は、これまであまり注目されて来なかったが、我々が行った二次元電気泳動と質量分析による網羅的なレドックスプロテオーム解析により、タンパク質の種類や部位によって酸化レベルが異なることが明らかとなった。

カルモデュリンに対して行った分析の結果から、老齢マウスの海馬ではC末端に近い位置にある連続した2つのメチオニン (Me144, Met145) が特に強く酸化を受けていることがわかり、さらに機能の解析によって、酸化を受けたカルモデュリンではカルシウム親和性が低下していることもわかった。

発現している全タンパク質に対し網羅的なプロテオーム解析を行なってメチオニンの酸化レベルを計測し、さらに個々のタンパク質について機能への影響を解析することによって、フリーラジカル説に基づいた老化のメカニズムにおけるメチオニンのスルホキシド化の意義を明らかにできるものと考えられる。

#### References

1. Hrubant HE. Specific genetic control of life span. *J Gerontol.* 19:451-452, 1964.
2. Clark AM, Gould AB., Genetic control of adult life span in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol.* 5:157-162, 1970 .
3. Wright WE, Hayflick L. Nuclear control of cellular aging demonstrated by hybridization of anucleate and whole cultured normal human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 96:113-121, 1975.
4. Goodrick CL. Life-span and the inheritance of

- longevity of inbred mice. *J Gerontol.* 30:257-263, 1975.
5. Harman D. Aging theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 2:298-300, 1956.
6. Harman D. Prolongation of life: role of free radical reaction in aging. *J Am Geriatr Soc.* 17:721-735, 1969.
7. Harman D. Free radical theory of aging: dietary implications. *Am J Clin Nutr.* 25:839-843, 1972.
8. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:7124-7128, 1981.
9. Lakowski B, Hekimi S. Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science.* 272:1010-1013, 1996.
10. Vanfleteren JR, De Vreese A. The gerontogenes age-1 and daf-2 determine metabolic rate potential in aging *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 9:1355-1361, 1995.
11. Yanase S, Yasuda K, Ishii N. Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (age-1, mev-1 and daf-16) that affect life span. *Mech Ageing Dev.* 123:1579-1587, 2002.
12. Kayser EB, Morgan PG, Hoppel CL, Seden-sky MM. Mitochondrial expression and function of GAS-1 in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 276:20551-20558, 2001.
13. Puga A, Oates EL. Isolation and nucleotide sequence of rat Cu/Zn superoxide dismutase cDNA clones. *Free Radic Res Commun.* 3:337-346, 1987.
14. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6:2675-2683, 1992.
15. Greenstock CL. Radiation and aging: free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med Hypotheses.* 41:473-482, . 1993
16. Mattson MP. Calcium and Free Radicals: Mediators of neurotrophic factor and excitatory transmitter-regulated developmental plasticity and cell death. *Perspect Dev Neurobiol.* 3:79-91, 1996.
17. Floyd RA, West MS, Eneff KL, Hogsett WE, Tingey DT. Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys.* 262:266-272, 1988.
18. Chen D, Cao G, Hastings T, Feng Y, Pei W, O'Horo C, Chen J. Age-dependent decline of DNA repair activity for oxidative lesions in rat brain mitochondria. *J Neurochem.* 81:1273-1284, 2002.

19. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem.* 262:5488-5491, 1987.
20. Dulic V, Gafni A. Mechanism of aging of rat muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase studied by selective enzyme-oxidation. *Mech Ageing Dev.* 40:289-306, 1987.
21. Gracy KN, Tang CY, Yüksel KU, Gracy RW. The accumulation of oxidized isoforms of chicken triosephosphate isomerase during aging and development. *Mech Ageing Dev.* 56:179-186, 1990.
22. Petropoulos I, Conconi M, Wang X, Hoemel B, Brégégère F, Milner Y, Friguet B.: Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 55:B220-227, 2000.
23. Sitte N, Merker K, von Zglinicki T, Grune T: Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 28:701-708, 2000.
24. Goto S, Takahashi R, Kumiyama AA, Radák Z, Hayashi T, Takenouchi M, Abe R.: Implications of protein degradation in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 928:54-64, 2001.
25. Honda S, Ishii N, Suzuki K, Matsuo M. Oxygen-dependent perturbation of life span and aging rate in the nematode. *J Gerontol.* 48:B57-61, 1993.
26. Matsuo M. Oxygen dependency of life-span in the nematode. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 105:653-658, 1993.
27. Ishii N. Oxidative stress and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Res.* 33:857-864, 2000.
28. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 289:2126-2128, 2000.
29. Lakowski B, Hekimi S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:13091-13096, 1998.
30. Weindruch R, Walford RL. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science.* 215:1415-1418, 1982.
31. Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science.* 305:390-392, 2004.
32. Hebbel RP. Auto-oxidation and a membrane-associated 'Fenton reagent': a possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes. *Clin Haematol.* 14:129-140, 1985.
33. Sell DR, Strauch CM, Shen W, Monnier VM. 2-amino adipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochem J.* 404:269-277, 2007.
34. Climent I, Levine RL. Oxidation of the active site of glutamine synthetase: conversion of arginine-344 to gamma-glutamyl semialdehyde. *Arch Biochem Biophys.* 289:371-375, 1991.
35. Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C. Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 269:52-54, 1999.
36. Eaton P, Byers HL, Leeds N, Ward MA, Shattock MJ. Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem.* 277:9806-9811, 2002.
37. Singh VK, Moskovitz J. Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiology.* 149:2739-2747, 2003.
38. Boschi-Muller S, Gand A, Branlant G. The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities. *Arch Biochem Biophys.* 474:266-273, 2008.
39. Novoselov SV, Kim HY, Hua D, Lee BC, Astle CM, Harrison DE, Friguet B, Moustafa ME, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN. Regulation of selenoproteins and methionine sulfoxide reductases A and B1 by age, calorie restriction, and dietary selenium in mice. *Antioxid Redox Signal.* 12:829-838, 2010.
40. Moskovitz J, Oien DB. Protein carbonyl and the methionine sulfoxide reductase system. *Antioxid Redox Signal.* 12:405-415, 2010.
41. Toda T, Nakamura M, Morisawa H, Hirota M, Nishigaki R, Yoshimi Y. Proteomic approaches to oxidative protein modifications implicated in the mechanism of aging. *Geriatr Gerontol Int.* 10:S25-31, 2010.

# Oxidative protein modification and aging

Tosifusa Toda

Research Team for Mechanism of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

Oxidative stress has been implicated in the process of aging, since the genes responsible for longevity of yeast and *C. elegans* were assigned to be related to mitochondrial function and regulation of energy metabolism. Superoxide radicals generated as byproducts of the electron transport system in mitochondria are converted to hydrogen peroxide by SOD, and eventually detoxified by the function of catalase or peroxidases. However, hydroxyl radicals may be also derived from hydrogen peroxide by Fenton reaction, and oxidatively modify DNAs and proteins. Carbonylation of protein has been extensively studied as an aging-related protein oxidation, though the biological meaning of the carbonylated protein has not been understood yet. Methionine residue is the most susceptible to oxidative stress, and the increase in the level of methionine sulfoxide with aging has been observed in our proteomic investigations. Although most cells express methionine sulfoxide reductase (MsrA/MsrB), the Msr activity is suspected to be insufficient for repairing all sites of methionine sulfoxide completely because of its steric problem. The methionine oxidation may be involved in the aging-related deterioration in cell functions.