

第 35 回日本基礎老化学会シンポジウム

老化とタンパク質分解の接点 – 分解系を亢進すれば老化制御も可能か? –

【日時】平成 25 年 12 月 14 日 (土)

【会場】東京都健康長寿医療センター研究所 3 階 第 3 会議室

13:00 ~ 13:10

はじめに

石神 昭人 (東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム)

座長：伊藤 雅史 (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)

13:10 ~ 13:50 (発表 30 分、質疑 10 分)

後藤 佐多良 (順天堂大学大学院 スポーツ健康医科学研究所)

「老化とタンパク質代謝回転：オーバービュー」

13:50 ~ 14:30 (発表 30 分、質疑 10 分)

小松 雅明 (東京都医学総合研究所 蛋白質リサイクル PT プロジェクト)

「オートファジーと Keap1-Nrf2 システムの接点：その異常とがん増殖」

14:30 ~ 15:10 (発表 30 分、質疑 10 分)

萬谷 博 (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)

「老化関連分子 klotho とタンパク質分解」

15:10 ~ 15:30 休憩

座長：近藤 嘉高 (東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム)

15:30 ~ 16:10 (発表 30 分、質疑 10 分)

石堂 一巳 (徳島文理大学 健康科学研究所)

「老化繊維芽細胞による自己アポトーシス誘導因子の産生」

16:10 ~ 16:50 (発表 30 分、質疑 10 分)

樋上 賀一 (東京理科大学 薬学部生命創薬科学科 分子病理・代謝学研究室)

「代謝関連細胞におけるオートファジー」

16:50 ~ 17:00

終わりに

石井 直明 (東海大学医学部教授 日本基礎老化学会理事長)

参加費：無料

参加登録：御参加頂くには事前登録をお願い致します。必要事項を明記のうえ、シンポジウム事務局 (jsbg_35th_sym@yahoo.co.jp) までご連絡下さい。

必要事項 (氏名・所属機関名・電話番号・メールアドレス・日本基礎老化学会員の方は会員種別)。

世話人：〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2

地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム

分子老化制御 石神 昭人 (事務担当：天野 晶子)

電話：03-3964-3241 (内線 4304) E-mail：jsbg_35th_sym@yahoo.co.jp

老化とタンパク質代謝回転：オーバービュー

後藤 佐多良

順天堂大学大学院 スポーツ健康医科学研究所



私がこの問題に関心を持ったのは、大学院時代に恩師水野傳一先生からシェーンハイマー (Rudolf Schönheimer) の著書 “The dynamic state of body constituents” について聞いた時に遡る⁽¹⁾。1930年代、シェーンハイマーは発見されて間もない安定同位元素 (重窒素) で標識されたアミノ酸を投与された動物の血清タンパク質 (γグロブリン) の運命を追跡し、常時一定量存在するタンパク質が数日の半減期で交替していることを見出した。生体成分の動的平衡の発見である。彼はこれを metabolic turnover と呼んだ。その後、細胞内タンパク質についても同様であること、さらに脂質や RNA も代謝回転していることが明らかにされた。代謝回転とは生体内の合成と分解を介した物質の交替のことで、生物と無生物を分ける基本的な性質の一つである。

タンパク質代謝回転が老化との関連で注目されたのは、エラー・カタストロフ説が唱えられたことに端を発している⁽²⁾。遺伝情報伝達・発現 (特に翻訳) エラーの増幅によって異常タンパク質が増加することが老化のメカニズムとして重要であるとする説である。翻訳装置もタンパク質からなるためにエラー頻度は次第に増加するだろうと考える。ところが、翻訳にエラーは生じるがカタストロフに至る増幅は起こらない⁽³⁾。しかし、加齢で異常分子は増加する。それはなぜか。

マウス肝実質細胞 (初代培養系) では個体の加齢によってタンパク質分解半減期が延長し、抗老化作用のある食餌制限によって短縮する⁽⁴⁾。異常タンパク質分解に関わるプロテアソーム活性は加齢で低下するが⁽⁵⁾、食餌制限で上昇する。細胞内タンパク質の分解、特に傷害オルガネラや凝集タンパク質の分解にはオートファジーを介したリソソームのタンパク質分解酵素も関わっている⁽⁶⁾。この活性も加齢で低下するが、食餌制限によって低下が抑制されるという報告がある一方、そうでないとする報告もある。

代謝回転のもう一方の側面、合成についても加齢による低下、食餌制限による活性化が報告されている。老化・抗老化のメカニズムにはタンパク質の代謝回転が深く関わっているのである。

文献

(1) 水野伝一：生体制御 (共立出版、1985) p. 4, (2) Orgel L: Proc Natl Acad Sci USA 49 (1963) 517; do. 67 (1970) 1476, (3) Mori N et al. Biochemistry 24 (1985) 1231, (4) Ishigami A, Goto S: Arch Biochem Biophys 277 (1990) 189; do. 283 (1990) 362, (5) Hayashi T, Goto S: Mech Ageing Dev 102 (1998) 55, (6) Mizushima N: Cold Spring Harb Symp Quant Biol 76 (2011) 397

オートファジーと Keap1-Nrf2 システムの接点： その異常とがん増殖

小松 雅明

東京都医学総合研究所 蛋白質リサイクルプロジェクト



酸化ストレスや細菌感染などの非常事態に対して、細胞はその環境変化に対応するために巧妙なストレス応答システムを発動する。オートファジー、Nrf2-Keap1 システムはストレス応答機構の代表例であり、共に抗酸化ストレス応答や自然免疫に組み込まれ、その調整不全は腫瘍形成をはじめとしたヒト疾患と関連する。

オートファジーは小胞体ないしはその近傍の構造体から出現した構造体が伸長して細胞質成分を取り囲んだオートファゴソームが形成される過程と、生じたオートファゴソームがエンドソームないしはリソソームと融合し内容物を消化する2つの過程から構成されている。オートファジーは膜電位を消失したミトコンドリア等の異常細胞内小器官や細胞内侵入細菌を排除し、細胞の恒常性維持を担う。一方、細胞がストレスに曝されると、Keap1 がセンサーとして働き、転写因子 Nrf2 の分解を停止して、抗酸化タンパク質や抗炎症性酵素の遺伝子発現を活性化し細胞を保護する。

p62/Sqstm1 (以降は p62 と省略) は、ユビキチン化基質 (ユビキチン化タンパク質凝集体、ユビキチン化異常ミトコンドリアやユビキチン化バクテリア) 上に集積し、それらをオートファゴソームに輸送するレセプターであると提唱されている¹。我々は、p62 が Nrf2 の分解因子 (ユビキチンリガーゼ) である Keap1 の Nrf2 認識部位に結合し、Nrf2 の分解を拮抗阻害しうることを報告した²。しかし、Keap1-Nrf2 (Keap1 と Nrf2 の ETGE 残基) との結合は Keap1-p62 (Keap1 と p62 の STGE 残基) のそれよりも著しく強く、他のファクターの関与が予想された。ごく最近、我々はオートファジー選択的基質上で p62 の STGE モチーフのセリン残基がリン酸化されると p62 と Keap1 の結合が著しく増強され、Nrf2 は分解を免れ、活性化することを見出した。つまり、選択的オートファジーと Keap1-Nrf2 経路が p62 のリン酸化を介して連動していることを発見した³。重要なことに、通常 p62 のリン酸化は選択的オートファジー発動時に起こるが、肝細胞がん細胞株や肝細胞がん患者組織においては恒常的に p62 が蓄積そしてリン酸化され、Nrf2 が活性化されていた。この Nrf2 の恒常的活性化は、肝細胞がんの微小環境下での生存を可能にする⁴。この事実は、p62 のリン酸化や p62-Keap1 結合を標的とした化合物が肝細胞がんの新しい創薬候補になり得ることを意味する。

1. Mizushima & Komatsu, Cell, 2011
2. Komatsu et al., Nature Cell Biology, 2010
3. Ichimura et al., Mol. Cell, 2013
4. Inami et al., J. Cell Biol., 2011

老化関連分子 klotho とタンパク質分解

萬谷 博

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 分子機構



klotho マウスは寿命が短く（約9週）、骨粗鬆症や動脈硬化、肺気腫、腎障害といったヒトの老化症状に類似した多彩な症状を示す。このマウスは α -*klotho* 遺伝子に異常があり α -*klotho* タンパク質を発現できなくなっており、 α -*klotho* タンパク質の消失が多様な疾患の原因となっている。こうした多様な病態が α -*klotho* というたった一つの遺伝子の下流で制御されていることは非常に興味深く、 α -*klotho* タンパク質の機能を解明することで、老化や老化に伴う疾患の分子機構の理解に繋がることが期待される。

α -*klotho* タンパク質はグルコシダーゼとの相同性から糖分解酵素としての機能が予想されていた。実際にグルクロン酸分解活性が報告されているが、非常に弱い活性しか検出できないことから本来の機能かどうかは不明である。近年、線維芽細胞増殖因子 FGF23 (Fibroblast growth factor 23) や Na^+, K^+ -ATPase と結合することでリンやカルシウム代謝の制御に関与することが報告され、*klotho* マウスではカルシウム代謝異常により血中リン酸濃度と血中カルシウム濃度が高いことが明らかとなっている。また、 α -*klotho* タンパク質の相互作用に糖の関与が示唆されており、糖分解酵素ではなく糖結合タンパク質である可能性が指摘されている。

我々は以前にカルシウム依存性のタンパク質分解酵素 calpain が *klotho* マウスの腎臓と肺で異常に活性化されていることを明らかにし、 α -*klotho* タンパク質とタンパク質分解系の関連について研究してきた。*klotho* マウスでは臓器特異的に calpain の活性化が異常に亢進し、spectrin などの細胞骨格タンパク質を分解する。また、自然老化マウスにおいても α -*klotho* タンパク質の発現が減少し calpain が活性化する。これまでの研究から加齢による α -*klotho* タンパク質の減少から始まりカルシウム代謝異常、calpain 活性亢進という一連の流れが老化疾患の病態に深く関わるということが明らかになりつつある。しかしながら、こうした現象は老化や *klotho* マウスにおける異常の一端であり、 α -*klotho* タンパク質の機能のすべてが解明されたわけではない。 α -*klotho* タンパク質は膜タンパク質であり、ADAM10 などのプロテアーゼによってプロセシングされ分泌型として血中や脳脊髄液中に存在する。分泌型 α -*klotho* の機能は全く分かっていないが、膜型と分泌型の量はプロテアーゼにより制御されていると考えられる。本シンポジウムでは、タンパク質分解系との関わりからみた α -*klotho* タンパク質の機能を中心に、最近の *klotho* マウス研究から明らかになってきた知見について紹介したい。

老化繊維芽細胞による自己アポトーシス誘導因子の産生

石堂 一巳

徳島文理大学 健康科学研究所



新規 NAD 産生系の Key Enzyme である Quinolinate Phosphoribosyl Transferase (QPRT) は、すべての細胞で発現しており、肝臓および腎臓ではトリプトファンからの NAD⁺合成に関与している。これまでに QPRT をノックダウン (QPRT-KD) することにより、活性型カスパーゼ 3 が過剰に産生された結果、アポトーシスが誘導されることを明らかにした。この QPRT-KD によるアポトーシスは M 期特異的に起こり、細胞周期に依存している。

MRC5 細胞は継代に従って Senescence-associated- β -Galactosidase (SA-Gal) 活性が上昇するなど、老化を検出することができる培養細胞である。継代数の少ない若い MRC5 細胞では QPRT-KD によるアポトーシスを観察することができるが、SA-Gal 染色陽性の老化 MRC5 細胞では観察することはできない。しかしながら、老化 MRC5 細胞は、特にアポトーシスを誘導しなくても、常に一定の割合の細胞が死んでいく様子を観察することができる。この細胞死は Ac-IETD-CHO により抑制できることから、外因性アポトーシス誘導経路により実行されている。すなわち、すべての MRC5 細胞では細胞死を誘導する因子が常に産生されているが、若い MRC5 細胞では受容体が発現しておらず、老化に伴って受容体が発現するために老化 MRC5 細胞でのみ細胞死が起こるのか、すべての MRC5 細胞において常に受容体は発現しているが、老化に伴って細胞死を誘導する因子が産生され細胞死が観察できるようになるのかのいずれかである。実際には若い MRC5 細胞の培地が老化した MRC5 細胞にアポトーシスを誘導することはなく、逆に、老化した MRC5 細胞の培地を添加することにより、若い MRC5 細胞においてアポトーシスを誘導することができることから、老化 MRC5 細胞が何らかのアポトーシス誘導因子を産生していると推定された。そこで、老化 MRC5 細胞と若い MRC5 細胞の培地に存在する分子を MS/MS で同定・比較したところ、老化 MRC5 細胞の培地中には B 細胞の分化・成熟因子である soluble B-cell activating factor belonging to TNF family (sBAFF) が検出された。Gene Chip による mRNA 発現解析の結果、BAFF は若い MRC5 細胞と老化 MRC5 細胞のいずれにおいても発現しており、その発現レベルには変化が認められない。BAFF は 32kDa の膜タンパク質であり、細胞膜上で三量体を形成しているおり、マクロファージでは Furin により切断されて 17kDa の sBAFF (N 末端が 134 番目の Ala、以下 sBAFF-134) が産生されることが報告されている。しかしながら、老化 MRC5 細胞の培地中の sBAFF は Mw=27kDa で、N-末端は 69 番目の Val であり (以下 sBAFF-69)、報告されている sBAFF-134 とは異なっていた。さらに老化細胞の培地による MRC5 細胞のアポトーシスは抗 BAFF-134 抗体により不完全ながら抑制することができる。また、MRC5 細胞で発現している BAFF の受容体である BAFF-R や TACI に対する中和抗体では抑制されないことから、既知の BAFF に対する受容体経路ではなく、別の受容体を介してアポトーシスを誘導していると考えられる。

以上のことから、老化 MRC5 細胞では、Furin とは異なった Shedding プロテアーゼが誘導されることにより、27kDa の sBAFF-69 を遊離し、MRC5 細胞にアポトーシスを誘導していると考えられる。

代謝関連細胞におけるオートファジー

樋上 賀一

東京理科大学薬学部生命創薬科学科 分子病理・代謝学研究室



オートファジーは不要なタンパク質や細胞内小器官を分解することで細胞の恒常性を維持する機構で、その破綻が神経変性疾患や癌をはじめとする疾患の発症にかかわることが知られている。一方、線虫ではカロリー制限の寿命延伸効果がオートファジーの欠損により消失する。我々は肥満症マウスの脂肪組織では、オートファゴソームが蓄積すること、一方、カロリー制限によりオートファジーが亢進することを見出した。そこで、本講演では、現在、我々が行なっている、1) 3T3-L1 脂肪細胞株の分化・肥大に伴うオートファジー、2) 肝細胞株における脂肪酸により誘導されるオートファジー、以上、2つのオートファジーに関する研究を簡単に紹介する。

1) 3T3-L1 細胞の分化・肥大化にともないオートファゴソームが蓄積し、オートファジーフラックスが低下したことから、分化・肥大化によりオートファゴソームの分解効率が低下している可能性を考えられた。オートファゴソームの分解にはリソソーム機能が重要であることから、リソソームの機能を解析した。その結果、分化・肥大化にともないリソソーム量自体は増加しているようであるが、リソソームの機能低下が観察された。次に、このオートファジーの機能低下が脂肪細胞の形質に及ぼす影響を検討した。オートファジー抑制剤処理により、ミトコンドリアおよび ROS (reactive oxygen species) 産生が増加し、アディポカインプロファイルは増悪した。一方、オートファジー促進剤処理により、ミトコンドリアは減少し、ROS 産生は抑制され、アディポカインプロファイルは改善した。以上から、肥大化した脂肪細胞ではリソソームの機能障害によりオートファゴソームが蓄積すること、オートファジーによりミトコンドリアを分解することで ROS 産生を抑制し、脂肪細胞の形質を良好に保つ可能性が考えられた。

2) HepG2 および Hepal-6 細胞を用いて、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸をそれぞれ添加し、オートファジーやトリグリセリド (TG) および活性酸素種 (ROS) に及ぼす影響を解析した。その結果、飽和脂肪酸を処理した肝臓細胞では、オートファゴソームは蓄積し、ROS 産生が増加した。一方で、不飽和脂肪酸処理により TG の蓄積量は有意に増加したが、オートファゴソームや ROS 蓄積の顕著な増加は観察されなかった。さらに、オートファゴソーム蓄積によりインシュリンシグナルが抑制されるが、オートファジーの促進により改善された。以上より、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が肝細胞に与える影響は異なること、また、オートファジーが ROS 産生やインシュリンシグナルに影響を与えることが明らかとなった。

以上、2つの研究により、オートファジーの障害が代謝関連細胞においても細胞機能に重要な影響を及ぼすことが示唆される。