

【総 説】

健康長寿への挑戦  
—長寿者プロテオミクスが明らかにするものとは—

三浦 ゆり、遠藤 玉夫

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・プロテオーム

要約

筆者らは、超百寿者血漿タンパク質のプロテオミクス解析を行い、Paraoxonase/arylesterase 1などの抗酸化活性をもつタンパク質が減少し、逆に、Haptoglobin、 $\alpha_1$ -Microglobulin、Clusterinなどの酸化ストレスによって増加することが知られているタンパク質が増加することを報告した。これらは超百寿者で生体内の酸化ストレスが亢進していることを示すと考えられる。そこで、本稿では「健康長寿と酸化ストレス」「健康長寿と糖鎖修飾」に焦点を当て、加齢によるタンパク質変化や糖鎖修飾の変化を解析した研究を紹介する。

キーワード：超百寿者、酸化ストレス、プロテオミクス、グライコミクス、糖鎖修飾

1. はじめに

高齢化社会を迎え、健康で自立度の高い長寿を達成することは、現代を生きる我々の究極の願いである。このため、老化に伴うさまざまな機能変化の機構を明らかにし、疾病の予防、診断、治療に役立つ老化マーカーを探索することは、高齢化社会における老化研究の重要な柱と考えられる。しかし、「ヒトの老化」は、遺伝子や環境影響、さらに生活習慣など、様々な要因の相互作用によって生じる。このため、きわめて一般的な現象であるにもかかわらず個人差が非常に大きく、老化マーカーの探索や老化制御、抗老化に関する研究など、健康長寿に向けた多くの努力にもかかわらず、決定打はなかなか出ていない。

近年、ヒトゲノム研究の成果により、遺伝子多型がヒトの長寿に影響を及ぼしていることが明らかになってきた。Sebastianiらは、百寿者や114歳以上の超百寿者と対照群のSNPsを調べ、長寿に関連したバリエーションを探索している [1, 2]。また、105歳以上の超百寿者のミトコンドリアDNAの解析から、BilalらはハプログループD4aが長寿のマーカーとなることを報告している [3]。このようにゲノム関連の研究は、ヒトの長寿研究においてもめざましい進化を遂げている。

しかし一方で、生命活動の機能分子はタンパク質であ

る。タンパク質は、生体における様々な反応や物質の細胞内外への出入り、情報伝達や分子認識、そして転写制御といった重要な役割を担っており、そのときどきの生体の状態変化を反映して臨機応変に変動する。このため、環境要因や生活習慣などを含めた複雑でゆらぎのある「ヒトの老化」を総合的に研究するには、タンパク質とその機能に着目した研究が必要と考えられる。

本稿のテーマである「健康長寿」つまり健康寿命の維持には、疾患の予防だけでなく、運動機能や認知機能の維持、さらには心理的安定など「ヒトの老化」同様、様々な要素が必要である。このため「すでに健康長寿を達成している先輩たちから学ぶ」というアプローチが、健康長寿研究の最も手取り早い方法のひとつではないかと思う。そこで本稿では、超百寿者などの健康長寿達成者を「タンパク質とその翻訳後修飾の変化」という視点から研究した報告について筆者らの研究成果を含めて紹介し、プロテオミクス研究から健康長寿に向けてどのような提言ができるのかについて考えたい。

2. 健康長寿と酸化ストレス

筆者らは、慶応大学医学部老年内科の広瀬信義博士、新井康通博士との共同研究で超百寿者血漿の二次元電気泳動によるプロテオミクス解析を行った [4]。サンプルは106歳から109歳の治療中の疾患のない超百寿者（平均107.3 ± 1.0歳）と20歳から39歳の健康なボランティア（平均27.5 ± 7.5歳）の血漿を用い、アセトン沈殿により脱塩した後、タンパク質を二次元電気泳動法により分離した（図1）。タンパク質スポットの発現をPDQuest (BioRad) を用いて解析し、超百寿者において変動したスポットについて、トリプシンを用い

連絡先：〒173-0015

東京都板橋区栄町 35-2

TEL：03-3964-3241（内線 4409）

FAX：03-3579-4776

E-mail：miura@center.tmig.or.jp

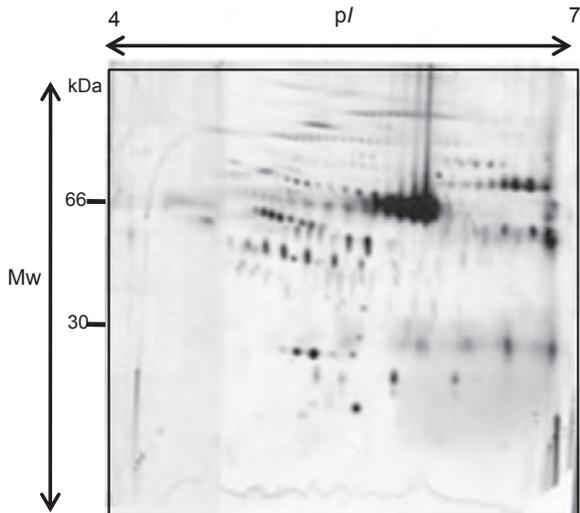


図1 超百寿者血漿タンパク質の二次元電気泳動像

たゲル内消化を行い、MALDI-TOF 質量分析装置によるペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) によりタンパク質を同定した。その結果、Paraoxonase/arylesterase 1 などの抗酸化活性をもつタンパク質が減少し、逆に、酸化ストレスによって増加することが知られている Haptoglobin、 $\alpha_1$ -Microglobulin、Clusterin が増加することが明らかになった (表1)。これは、超百寿者で生体内の酸化ストレスが亢進していることを示している。酸化ストレスが老化のプロセスに関与することは知られていたが、ヒト超百寿者の血漿タンパク質解析から酸化ストレスの関与が示唆されたのは興味深い。今後、各年代における変動や長期縦断的な変動についても調べ、酸化ストレスが健康長寿にとってプラスなのかマ

イナスなのかについて考察していきたい。

酸化ストレスに関連して、血漿タンパク質のグリケーションと老化について紹介する [5]。タンパク質のグリケーションはタンパク質に糖が結合することであるが、糖鎖修飾 (グリコシレーション) とは異なり、図2に示すように還元糖とタンパク質の非酵素的な反応 (メイラード反応) によって生成する。糖尿病マーカーであるグルコアルブミンや HbA1C は、グルコースがアルブミンやヘモグロビンに結合したものであり、これらは高血糖により増加する。タンパク質に結合した糖は自動酸化や分解によって最終的に Advanced Glycation End Products (AGEs) となるが、この過程で活性酸素が生成する。つまり、タンパク質のグリケーションそのものが酸化ストレスであり、糖尿病は全身性の酸化ストレス疾患なのである。生成した AGEs はさらにタンパク質に結合して AGEs 修飾タンパク質となる。近年、ガレクチン3や Receptor for AGEs (RAGE) などのような AGEs に対する受容体が発見され、これらの受容体に AGEs 修飾タンパク質が結合することが糖尿病合併症の発症や重症化、さらに神経変性疾患やがん、老化の促進に関与することが明らかになってきた (図3)。老化に関しては、グリケーションに由来するタンパク質のクロスリンクが蓄積することで、細胞外マトリクスの障害を引き起こすことが知られている。コラーゲンのグリケーションとクロスリンクによって、細胞と細胞間マトリクスとの相互作用が低下することが、血管障害につながる重要な要因となる。最近では、MALDI-TOF 質量分析装置を用いてグリケーション部位やクロスリンクサイトを同定する研究も行われている [6]。

こうしてみると、酸化ストレスは健康長寿にとっては

表1 超百寿者で変動したタンパク質の機能

タンパク質	機能	レドックスへの関与	超百寿者での変化
PON1 (paraoxonase/arylesterase)	HDLに結合 過酸化脂質を分解することにより、 LDLの酸化を防ぐ	・抗酸化活性	↓
Apo E	リポタンパク質の構成成分		↓
Haptoglobin	ヘモグロビンに結合 鉄イオンによる酸化的傷害を防ぐ	・炎症によって発現増加 ・抗酸化活性	↑
$\alpha_1$ -Microglobulin	鉄イオンやROS <sup>*1</sup> による酸化的傷害 を防ぐ	・ROS <sup>*1</sup> やヘモグロビン によって発現増加 ・抗酸化活性	↑
Clusterin	apolipoprotein J HDLの構成成分 LDLの酸化を防ぐ	・酸化ストレスによって 発現増加 ・抗酸化活性	↑

\*1 ROS: Reactive Oxygen Species (活性酸素種)



図2 タンパク質のグリケーション

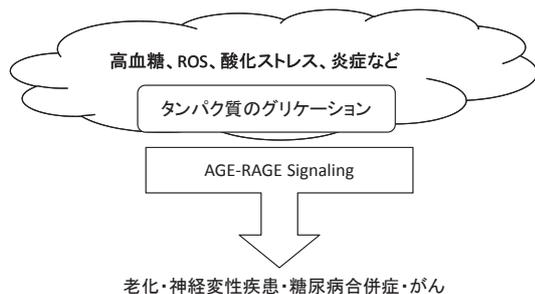


図3 タンパク質のグリケーションと疾患

マイナスにちがいないと思われるが、糖尿病を避けることができた超百寿者たちも酸化ストレスからは逃れられなかった。逃れること、ではなく、うまくつきあうことの方に超百寿を達成する秘密があるのかもしれない。

健康長寿にとって運動機能の維持は重要な課題のひとつであるが、次に加齢により筋肉において変動するタンパク質を解析した例を紹介する [7]。Staunton らは、47-62 歳と 76-82 歳の外側広筋のタンパク質を 2D-DIGE 法を用いて二次元電気泳動により解析し、加齢で発現変動するタンパク質を調べた。同定されたタンパク質のほとんどは、筋肉の興奮—収縮—弛緩サイクル、代謝、イオン濃度のホメオスタシス、ストレス応答に関与するものであった。また彼らは、筋肉の老化により炭酸脱水素酵素 III (CA3) の発現が顕著に増加することを明らかにした。CA3 アイソフォームは筋肉に特異的に発現するタンパク質であるため、新しいサルコペニアのバイオマーカーになるのではないかと示唆している。

筋肉の加齢によるプロテオーム変化を全体的に見ると、ミトコンドリア酵素の変化や、収縮に関与するタンパク質アイソフォームの変化などから、加齢によって筋肉の収縮応答は速から遅へ、代謝は解糖 (嫌氣的酸化過程) から酸化 (好氣的酸化過程) へと変化することが示唆された。ここでも、生体のレドックス (酸化還元状態) は加齢によって「酸化」の方に傾くのである。原因なのか結果なのかはわからないが、プロテオミクスの示す長寿あるいは老化のキーワードのひとつは「酸化ストレス」ではないかと思われる。

### 3. 健康長寿と糖鎖修飾

タンパク質には様々な翻訳後修飾があり、これらの翻訳後修飾はタンパク質の機能に大きな影響を与えることが知られている。翻訳後修飾の中でも糖鎖修飾は、動物細胞のタンパク質の約 50% にみられる非常に頻度の高い修飾で、タンパク質の局在性や分子認識など様々な機能を担っている。糖鎖の生合成はタンパク質や DNA、RNA と異なり鋳型なしに進められるので、細胞の生理的条件により左右されやすい。つまり、細胞の内部や組織での微妙な加齢変化を、より反映しやすいのではないかと考えられる。

実際、これまでに糖鎖や糖タンパク質が老化や老化関連疾患に関与しているという報告は、数多くある [8-10]。

早老症であるエーラス・ダンロス症候群の原因遺伝子は、糖転移酵素である Galactosyltransferase I であることが報告されており、糖鎖の異常が早老症を引き起こすことが明らかになっている [8]。また、Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) の培養線維芽細胞ではアグリカンの発現や分泌が増加することが報告されており、早老症である HGPS の病態にも糖鎖及び糖タンパク質異常が関与する可能性が示唆されている [9]。さらに、Shimizu らは日本人百寿者 269 人の ABO 式血液型を調べ、日本人の一般的な血液型分布に比べ、百寿者には B 型が多いことを報告している [10]。ABO 式血液型物質は赤血球膜の糖鎖であり、これはまさに糖鎖と長寿が関連することを示唆するものである。このように糖鎖と老化あるいは長寿との関連性を示唆する報告は多い。

さて、糖鎖を網羅的に調べる「グライコミクス」には、大きく分けて二つの方法がある。一つは糖鎖に特異的に結合するレクチンを利用する方法、もう一つは LC による分離と質量分析装置を組み合わせる糖鎖の質量分析から構造を決める方法である。レクチンを利用する方法には、多くのタンパク質の中から目的の糖タンパク質を濃縮するためにレクチンを用いる方法のほか、レクチンマイクロアレイによってレクチンに対する結合能を網羅的に調べる方法がある。

そこでまず、レクチンを用いて糖タンパク質を濃縮し、虚弱における糖タンパク質の変化を調べた研究を紹介する。2012 年 Shamsi らは、被験者を (i) 握力 (ii) 歩く速さ (iii) 体重減少 (iv) 疲労感 (v) 身体活動低下の 5 項目により、健常群、虚弱予備群、虚弱群に分け、それぞれの血漿タンパク質を解析した。サンプルから、5 種類のレクチン (concanavalin A (Con A)、*Aleuria aurantia lectins* (AAL)、*Sambucus nigra lectin* (SNA)、*Jacalin* (Jac)、*wheat germ agglutinin* (WGA)) を用いたレクチンカラムにより糖タンパク質を濃縮し、二次元電気泳動によるプロテオミクス解析を行って、虚弱予備軍において変動する糖タンパク質を探索した。その結果、Haptoglobin、Transferrin、Fibrinogen、Hemopexin、Kininogen-1、Leucin-rich  $\alpha$ -2-glycoprotein 1、Apolipoprotein A1 の 7 つの糖タンパク質が変動することが明らかになった。彼らはこれらの結果から、炎症や血液の変化が虚弱に関連すると考えている [11]。

また Qin らは、ヒトの唾液に含まれる糖タンパク質糖鎖の加齢及び性別によるパターン変化について、レクチンマイクロアレイを用いて調べた。その結果、男女を問わず 7 つのレクチンの結合性が加齢によって変化すること、また年代を問わず 7 つのレクチンの結合性が性別により異なることが明らかになった [12]。このように、血液だけでなく唾液に含まれる糖タンパク質の糖鎖パターンからも、老化関連疾患や老化による生理的变化を理解する新しい指標が明らかになる可能性が示唆されている。

レクチンを用いず、HPLC や LC-MS を用いて直接糖鎖の構造を明らかにする方法では、血液中の糖タンパク質糖鎖について解析した例がある。2010 年 Knezevic ら

は、クロアチア人 1914 人の血漿糖タンパク質の *N*-型糖鎖を解析し、フコースの位置やガラクトシル化、シアル化、さらに分岐の程度などの糖鎖構造が、年齢、喫煙、肥満などに依存して変化することを明らかにした [13]。さらに彼らは GWAS (Genome-wide association study) による解析も行い、血漿中 *N*-型糖鎖の変動と糖転移酵素 (MGAT5、B3GAT1) やゴルジ装置のプロトンポンプ (SLC9A9) の多型に関連性があることを報告している [14]。また加齢に伴う変化として Bakovic らは、抗体の Fc フラグメントの *N*-型糖鎖について質量分析装置を用いて解析し、加齢に伴って変化する糖鎖パターンを調べている [15, 16]。57 歳以上と以下の年齢について調べたところ、57 歳以上ではガラクトシル化とシアル化が低下していることが明らかになった。この低下は男性では加齢に伴って徐々に見られるが、女性では閉経期の 45 ~ 60 歳くらいで顕著に観察された。

グライコミクス、グライコプロテオミクスによる超高齢者サンプルの解析に関する研究はまだあまり報告されていない。今後、健康長寿のキーワードとなる糖鎖構造は見いだされるのであろうか。見いだされたとしてもタンパク質の場合とは異なり、糖鎖変化そのものに生物学的意義があるのか、糖鎖変化したタンパク質の機能に生物学的意義があるのか、あるいはその糖鎖を合成する糖転移酵素に生物学的意義があるのか、研究のテーマは尽きない。

#### おわりに

今世紀に入り、質量分析装置のめざましい発展に後押しされて、プロテオミクスによる網羅的なタンパク質研究は様々な分野に応用されてきた。基礎老化の分野では、まず老化関連疾患である。病態や病因の解明、バイオマーカーの探索、そしてテイルメイド医療に向けた取り組みなど、様々な目的でプロテオミクス研究が行われてきている。しかし、疾患よりもはるかに漠然としていて捉えどころのない「健康長寿」については、取り組みは遅れている。遺伝だけでなく生活習慣や生活状況など様々な社会的な影響因子がある中で、被験者をどのようにして確保するか、多くのサンプル測定をいかにハイスループットに行うか、そして得られた結果をどのように解釈するかなど、困難な点が多いためである。

しかしながら今後は、疾患を予防するだけではなく総合的な「健康長寿」への取り組みが必要になっていくと考えられる。タンパク質とその翻訳後修飾に着目したプロテオミクス解析は、そのための頼もしいツールとなると信じている。

#### 謝辞：

本稿の執筆にあたり、血漿サンプルの提供と有益な助言をいただきました慶応大学医学部・広瀬信義博士、新井康通博士に感謝いたします。

#### 参考文献

[1] P. Sebastiani, T.T. Perls, The genetics of extreme

longevity: lessons from the new England centenarian study, *Front Genet* 3 (2012) 277.

- [2] P. Sebastiani, N. Solovieff, A.T. Dewan, K.M. Walsh, A. Puca, S.W. Hartley, E. Melista, S. Andersen, D.A. Dworkis, J.B. Wilk, R.H. Myers, M.H. Steinberg, M. Montano, C.T. Baldwin, J. Hoh, T.T. Perls. Genetic signatures of exceptional longevity in humans. *PLoS One*. 7 (2012) e29848.
- [3] E. Bilal, R. Rabadan, G. Alexe, N. Fuku, H. Ueno, Y. Nishigaki, Y. Fujita, M. Ito, Y. Arai, N. Hirose, A. Ruckenstein, G. Bhanot, M. Tanaka, Mitochondrial DNA haplogroup D4a is a marker for extreme longevity in Japan, *PLoS One* 3 (2008) e2421.
- [4] Y. Miura, Y. Sato, Y. Arai, Y. Abe, M. Takayama, T. Toda, N. Hirose, T. Endo, Proteomic analysis of plasma proteins in Japanese semisuper centenarians, *Exp Gerontol* 46 (2011) 81-85.
- [5] M.J. Kulkarni, A.M. Korwar, S. Mary, H.S. Bhonsle, A.P. Giri, Glycated proteome: from reaction to intervention, *Proteomics Clin Appl* 7 (2013) 155-170.
- [6] Z. Dai, B. Wang, G. Sun, X. Fan, V.E. Anderson, V.M. Monnier, Identification of glucose-derived cross-linking sites in ribonuclease A, *J Proteome Res* 7 (2008) 2756-2768.
- [7] L. Staunton, M. Zweyer, D. Swandulla, K. Ohlendieck, Mass spectrometry-based proteomic analysis of middle-aged vs. aged vastus lateralis reveals increased levels of carbonic anhydrase isoform 3 in senescent human skeletal muscle, *Int J Mol Med* 30 (2012) 723-733.
- [8] K. Furukawa, T. Okajima, Galactosyltransferase I is a gene responsible for progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome: molecular cloning and identification of mutations, *Biochim Biophys Acta* 1573 (2002) 377-381.
- [9] J.M. Lemire, C. Patis, L.B. Gordon, J.D. Sandy, B.P. Toole, A.S. Weiss, Aggrecan expression is substantially and abnormally upregulated in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome dermal fibroblasts, *Mech Ageing Dev* 127 (2006) 660-669.
- [10] K. Shimizu, N. Hirose, Y. Ebihara, Y. Arai, M. Hamamatsu, S. Nakazawa, Y. Masui, H. Inagaki, Y. Gondo, J. Fujimori, Y. Kanno, K. Konishi, K. Kitagawa, Blood type B might imply longevity, *Exp Gerontol* 39 (2004) 1563-1565.
- [11] K.S. Shamsi, A. Pierce, A.S. Ashton, D.G. Halade, A. Richardson, S.E. Espinoza, Proteomic screening of glycoproteins in human plasma for frailty biomarkers, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67 (2012) 853-864.
- [12] Y. Qin, Y. Zhong, M. Zhu, L. Dang, H. Yu, Z. Chen, W. Chen, X. Wang, H. Zhang, Z. Li, Age- and Sex-

- Associated Differences in the Glycopatterns of Human Salivary Glycoproteins and Their Roles against Influenza A Virus, *J Proteome Res* 12 (2013) 2742-2754.
- [13] A. Knezevic, O. Gornik, O. Polasek, M. Pucic, I. Redzic, M. Novokmet, P.M. Rudd, A.F. Wright, H. Campbell, I. Rudan, G. Lauc, Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans, *Glycobiology* 20 (2010) 959-969.
- [14] J.E. Huffman, A. Knezevic, V. Vitart, J. Kattla, B. Adamczyk, M. Novokmet, W. Igl, M. Pucic, L. Zgaga, A. Johannson, I. Redzic, O. Gornik, T. Zemunik, O. Polasek, I. Kolcic, M. Pehlic, C.A. Koeleman, S. Campbell, S.H. Wild, N.D. Hastie, H. Campbell, U. Gyllensten, M. Wuhrer, J.F. Wilson, C. Hayward, I. Rudan, P.M. Rudd, A.F. Wright, G. Lauc, Polymorphisms in B3GAT1, SLC9A9 and MGAT5 are associated with variation within the human plasma N-glycome of 3533 European adults, *Hum Mol Genet* 20 (2011) 5000-5011.
- [15] M. Pucic, A. Knezevic, J. Vidic, B. Adamczyk, M. Novokmet, O. Polasek, O. Gornik, S. Supraha-Goreta, M.R. Wormald, I. Redzic, H. Campbell, A. Wright, N.D. Hastie, J.F. Wilson, I. Rudan, M. Wuhrer, P.M. Rudd, D. Josic, G. Lauc, High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations, *Mol Cell Proteomics* 10 (2011) M111 010090.
- [16] M.P. Bakovic, M.H. Selman, M. Hoffmann, I. Rudan, H. Campbell, A.M. Deelder, G. Lauc, M. Wuhrer, High-throughput IgG Fc N-glycosylation profiling by mass spectrometry of glycopeptides, *J Proteome Res* 12 (2013) 821-831.

## Challenge to Successful Aging

### -Proteomics on centenarians as a powerful tool for gerontology-

Yuri MIURA and Tamao ENDO

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

We performed proteomic analysis of plasma proteins in Japanese semisuper centenarians (SSCs) , and found that antioxidant enzyme such as paraoxonase/arylesterase 1 was decreased, while biosensors of oxidative stress such as haptoglobin,  $\alpha_1$ -microglobulin, and clusterin were increased in SSCs. These results suggest that oxidative stress might be important for the longevity of SSCs. In the present review, we will focus on “successful aging and oxidative stress” and “successful aging and glycosylation” , and will introduce the reports of proteomics or glycomics analyses for aging.

Key words : semisuper centenarians, oxidative stress, proteomics, glycomics, glycosylation