

【奨励賞受賞者研究トピックス】

老化に伴う糖鎖変化がもたらす細胞機能制御の解明に向けて

板倉 陽子

東京都健康長寿医療センター研究所 老年病態研究チーム

1. はじめに

多くの正常な細胞では、一定数まで分裂するとその増殖を停止し、肥大してくることが知られている。通常、このような状態を「老化した細胞」ととらえているが、一般的な細胞老化指標である β ガラクトシダーゼ [1] の検出においてはストレスを受けた細胞でも染まることや、増殖停止に至るまでの期間や分裂回数が細胞ごとに異なることが知られており、自然科学的な細胞の老化とはどのような状態であるかについてはいまだ不明瞭な点が多い。さらに、細胞の老化が生体機能にどのような影響を及ぼしているかについてはまだまだ議論の余地がある。

糖鎖とは、DNA、タンパク質に続き第3の生命鎖と呼ばれる生命活動に必須の生体内分子である。細胞の表面は多くの糖鎖で覆われており、細胞種の識別、ウイルスへの感染、免疫応答など様々な機能に関与することが知られている。筆者らは細胞表面のタンパク質に結合する糖鎖が細胞の種類や分化段階によって異なることを見出してきた [2-4]。このような細胞固有の性質を反映する糖鎖は、老化のマーカーになり得ると考えられる。

一方、細胞の内部にも糖鎖は存在しているが、その多くは遊離糖鎖などの状態で存在し、糖タンパク質としての種類や機能についての情報は不十分である。そこで、我々は細胞表面および細胞内部における糖タンパク質上の糖鎖プロファイル（細胞が有する糖鎖の組み合わせ）が細胞の老化（細胞老化）ならびに個体の老化（加齢：個体老化）に伴いどのように変化し、その変化にどのような関係性があるのかについて調べることにした。本稿では、細胞における糖鎖の局在、ならびに2つの老化に伴う糖鎖変化に着目し、細胞老化と個体老化との相関について筆者らの研究成果を紹介する。

2. 老化と細胞表面における糖鎖変化

細胞では老化に伴いどのようなことが生じているのだろうか。この疑問を解決するために、継代培養を繰り返

した胎児および高齢者由来ヒト正常皮膚線維芽細胞を用いて、継代初期の若い細胞から増殖停止に至った老化細胞までの継代過程において、細胞表面および内部のタンパク質を修飾している糖鎖に着目した。特定の糖鎖を認識して結合するタンパク質であるレクチンと糖タンパク質上の糖鎖との間で生じる相互作用を解析する“レクチンマイクロアレイ法”という手法を用いて [4]、細胞表面と内部を分画して抽出したタンパク質の糖鎖プロファイル調べた [5]。細胞表面について調べた結果、胎児由来および高齢者由来の糖鎖プロファイルは明確に識別された (図1 A)。さらに、継代を重ねていくと Population doubling level (PDL: 倍加指数) の増加に伴い糖鎖プロファイルは徐々に変化し、細胞が老化すると胎児由来と高齢者由来の糖鎖プロファイルは近いパターンを有する結果となった [5]。

こうした糖鎖プロファイル変化の詳細を解析すると、特に胎児由来の細胞では糖鎖構造の末端に多く見られるシアル酸と呼ばれる糖鎖の割合が高齢者由来の細胞に比べて多いことがわかった。また、継代による細胞老化過程においても由来する個体年齢の違いに見られたように、シアル酸の減少が認められた (図2)。このシアル酸という糖鎖は生体内機能と非常に密に関わる糖鎖である。例えば、シアル酸は硫酸基とともに血管内皮細胞上のタンパク質に発現し、リンパ球の血管内への移入を手助けすること [6] や、血清中では CA19-9 (シアリルルイス a) に代表される膵がんや大腸がんなどで増加する腫瘍マーカー [7] としても知られている。また、老齡ラットの脳におけるシナプス膜ではシアル酸結合分子が減少するという報告がある [8]。このように、様々な変化を示すシアル酸だが、その変化や機能は付随する細胞や組織によって大きく異なる。ここで、線維芽細胞に焦点を当ててみると、細胞表面では細胞老化に伴うシアル酸の減少と同時にシアリダーゼ (NEU1) が増加することが我々の研究で明らかになった [9]。GalNAc- α -O-benzyl を用いてシアリル化を部分的に阻害すると、細胞増殖や細胞老化に影響は生じなかったものの筋線維芽細胞への分化を抑制し、老化の進んだ細胞においてはシアリダーゼの阻害剤で筋線維芽細胞への分化能が回復した [9]。つまり、細胞老化に伴うシアル酸の変化が機能的に細胞分化に関与し、個体レベルにおける皮膚の老化 (弾力性の低下など) に関与することが示唆されたのである。

連絡先：板倉陽子

〒 173-0015 東京都板橋区栄町 35-2

TEL : 03-3964-3241

FAX : 03-3579-4776

E-mail : yitakura@tmig.or.jp

A) 細胞表層の糖鎖プロファイル

B) 細胞内の糖鎖プロファイル

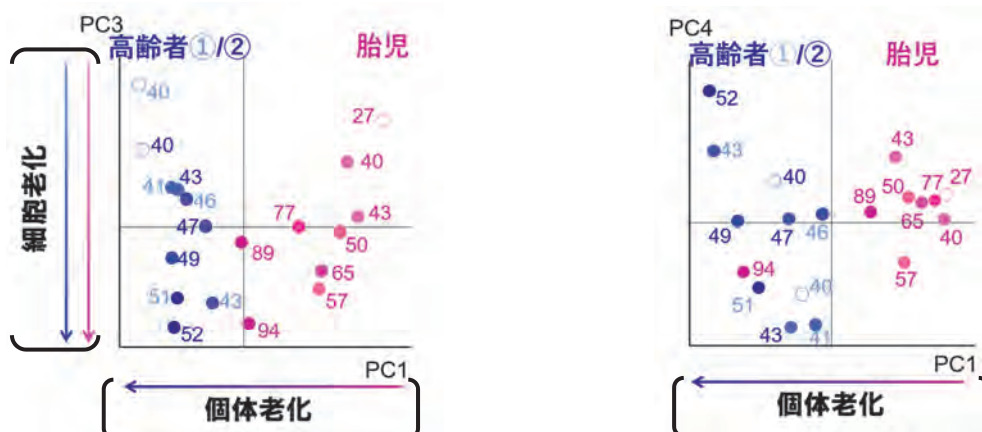


図1 各局在における糖鎖プロファイルと比較した主成分解析の結果

(A) 細胞表層の糖鎖プロファイルデータを比較した。PC1 が個体老化を、PC3 が細胞老化を示している。(B) 細胞内の糖鎖プロファイルデータを比較した。PC1 が個体老化を示している。各軸に対するプロットのばらつきが糖鎖パターンの多様性を示している。数字は倍加指数 (PDL)、高齢者由来細胞 2 種 (水色・青色)、胎児由来細胞 2 種 (水色・青色)、胎児由来細胞 (桃色)、サークルは淡色から濃色へと PDL の増加を表している。

(Itakura Y, et al., *Aging*, 2018, Itakura Y. et al., *Cell Bioscience*, 2016, 一部改変)

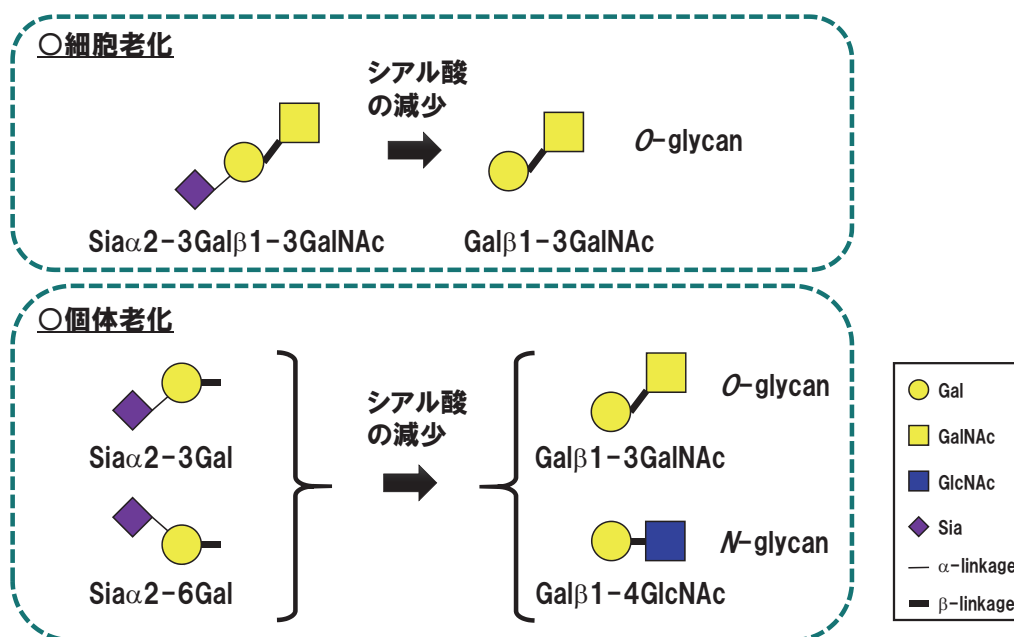


図2 老化に伴う細胞表層糖鎖の特徴 (例)

O 結合型の a2-3 シアル酸含有糖鎖が細胞老化で減少した。N または O 結合型の a2-3/a2-6 シアル酸含有糖鎖が個体老化で減少した。(Sia: シアル酸, Gal: ガラクトース, GalNAc: N- アセチルガラクトサミン, GlcNAc: N- アセチルグルコサミン)

3. 老化と細胞内糖鎖の特性

次に、細胞内部の糖鎖に焦点を当て、分画したタンパク質の糖鎖プロファイルと比較した。その結果、高齢者由来の細胞と胎児由来の細胞では異なる糖鎖プロファイルを有することが示された [10] (図 1B)。しかし、どちらの細胞も細胞表層で見られたような細胞老化に応じて徐々に糖鎖プロファイルが変化する傾向は見られな

かった。細胞内では、胎児由来細胞の糖鎖プロファイルは継代時の分裂回数に関わらずそれぞれのパターンが非常に類似しているのに対し、高齢者由来の細胞では様々な糖鎖プロファイルのパターンが存在していることが示唆された。ここで興味深いことは、継代を繰り返し分裂停止に至った (老化が十分に進んだ) 胎児由来細胞の糖鎖プロファイル (PDL 94) が、それまでとは大きく外

れ、高齢者由来の細胞で現れるパターンを示したことである。これは、細胞分裂を指標とした際、若い細胞の内部では様々な糖鎖を特定の存在比で確保し機能を一定に保とうとする力が働いているが、細胞老化によりその均衡が保てずバランスが変化し可能性を示唆した。したがって、老化に伴う変化では、外部の分子との機能的な相互作用を反映する細胞表面糖鎖と比べ、細胞内部の糖鎖は細胞機能の恒常性を反映するという大きな違いがあることが明らかとなった。

現在、細胞内におけるシアル酸を付加した糖鎖は合成過程や代謝過程の他、オートファジーが欠損した細胞内で蓄積するシアリルオリゴ糖に見られる遊離糖鎖など [11] が知られている。しかし、それ自身が輸送経路や品質管理に関わるタンパク質以外で、本研究のようなシアル酸付加糖タンパク質の存在については不明瞭である。いずれにしても糖鎖末端のシアル酸の変化が細胞機能に影響を与えていると考えられることから、老化に伴う細胞機能の変化にシアル酸がどう関連するかが今後の課題となる。

4. 細胞老化・個体老化に反映される糖鎖局在

ここで細胞全体に占めるシアル酸の局在変化を調べるため、培養期間のほぼ等しい各細胞において同一細胞集団から回収した細胞内外のシアル酸の割合を比較した。その結果、胎児由来の細胞群ではシアル酸を認識する複数のレクチン (*Sambucus nigra* agglutinin ; SNA や *Agrocybe cylindracea* galectin ; ACG) で細胞表面

における割合が減少し、シアル酸付加の標的となるガラクトースを認識するレクチン (*Erythrina cristagalli* agglutinin ; ECA や *Wisteria floribunda* agglutinin ; WFA) において細胞表面における割合が増加していた (図3)。一方、高齢者由来細胞の各段階ではシアル酸の局在における顕著な割合の変化は生じていなかった。このことは、胎児由来の細胞の方が高齢者由来の細胞より顕著にシアル酸の局在が変化し、老化に伴い細胞表面におけるシアル酸の割合が減少していることを示唆している。注目すべきは、胎児由来細胞で見られたシアル酸変化の割合は、胎児由来細胞と高齢者由来細胞の間で見られる割合の差と相関していたことである。我々は本稿に示した以外に、幼児および成人における若い細胞においても、細胞表面および細胞内におけるシアル酸の存在比が本データと相関する結果を得ている (未発表データ)。これは、細胞で見られる分子的变化が個体に反映されていることを示唆している。

そこで、割合の変化だけではなく実際に細胞上での糖鎖発現を確認するため、シアル酸を認識する SNA と細胞膜タンパク質として抗 CD44 抗体、細胞内部の指標としてミトコンドリアのリボソームタンパク質に対する抗体を用いてそれぞれの細胞を染色した。SNA と抗体の共染色を行った細胞表面では、胎児由来の若い細胞においてシアル酸の発現が明らかに多く、細胞内部では、由来する細胞の年齢に関係なくシアル酸が散在していた。また、胎児由来の若い細胞と老化の進んだ細胞ではシアル酸の細胞表面の発現が減少していることを確認した

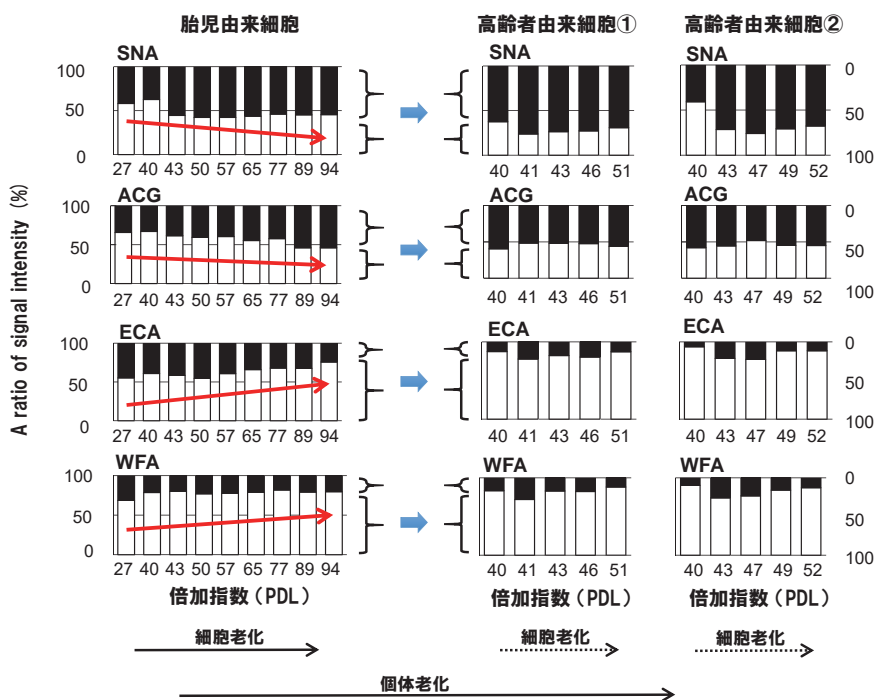


図3 継代に伴う細胞表面と細胞内糖鎖の割合変化
シアル酸認識レクチン (SNA、ACG) とガラクトース認識レクチン (ECA、WFA) の比較において、胎児由来細胞の方が高齢者由来細胞よりも糖鎖の局在変化が顕著であった。胎児由来細胞に見られた糖鎖変化が、世代の異なる細胞間の糖鎖変化と類似していた。
■細胞内糖鎖、□細胞表面糖鎖 (Itakura Y, et al., *Aging*, 2018 一部改変)

[10]。ゆえに、レクチンマイクロアレイ解析による糖鎖プロファイルの割合変化はおおよそそれら糖鎖の発現を反映しているものと考えられた。そして、局在に特異的な糖鎖の発現が確認されたことにより、細胞老化におけるシアル酸の変化が個体老化においても示された。

5. 終わりに

本研究で示された糖鎖の変化は、その細胞の老化状態を反映していると考えられた。これは細胞を培養することなく、シアル酸などの存在比を調べることで老化の度合いを知ることが可能であることを示唆している。また、*in vitro*での細胞老化における糖鎖プロファイル変化が個体老化と相関することが示されたことから、今後、老化研究を目的とした実験系に新たな解析手法を得たという利点も挙げられる。

糖鎖という分子に焦点を当てた際、一般的には機能糖鎖として細胞表層に注目が集まりがちであるが、細胞の品質を維持する機構として現在も未解明な細胞内糖鎖はとても重要な分子といえる。そして、細胞内糖鎖の種類や変化、代謝機構などを解明することは重要な課題である。今後は糖鎖という観点から、老化に伴う様々な変化を解析し、疾患や機能低下に関わる糖鎖の機序について解明していきたい。

6. 参考文献

1. Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 9363-9367, 1995.
2. Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, *et al.* Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells* 16:1-11, 2011.
3. Itakura Y, Kuno A, Toyoda M, *et al.* Podocalyxin-Targeting Comparative Glycan Profiling Reveals

Difference between Human Embryonic Stem Cells and Embryonal Carcinoma Cells. *J Glycom. Lipidom.* S5-004, 2013.

4. Kuno A, Itakura Y, Toyoda M, *et al.* Development of a Data-mining System for Differential Profiling of Cell Glycoproteins Based on Lectin Microarray. *J. Proteomics Bioinform.* 1: 068-072, 2008.
5. Itakura Y, Sasaki N, Kami D, *et al.* N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell Biosci.* 6: 14,2016.
6. Rosen SD. Ligands for L-selectin: Homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 129-156, 2004.
7. Zhang Z, Wuhler M, Holst S. Serum sialylation changes in cancer. *Glycoconj. J.* 35: 139-160, 2018.
8. Sato Y, Akimoto Y, Kawakami H, *et al.* Location of sialoglycoconjugates containing the Sia(alpha)2-3Gal and Sia(alpha)2-6Gal groups in the rat hippocampus and the effect of aging on their expression. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 1311-1319, 2001.
9. Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M. Sialylation regulates myofibroblast differentiation of human skin fibroblasts. *Stem Cell Res. Ther.* 8: 81, 2017.
10. Itakura Y, Sasaki N, Toyoda M. Qualitative and quantitative alterations in intracellular and membrane glycoproteins maintain the balance between cellular senescence and human aging. *Aging (Albany NY)* 10: 2190-2208, 2018.
11. Seino J, Wang L, Harada Y, *et al.* Basal autophagy is required for the efficient catabolism of sialyloligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 288: 26898-26907, 2013.