

<研究課題>

プロテオミクス解析を用いた縦断調査による健康長寿バイオマーカーの探索とその生物学的意義の解明

研究代表者

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）

研究副部長 三浦ゆり

【まとめ】

本課題は、超高齢期の血漿タンパク質の発現変化とその機構を解析し、健康長寿バイオマーカーを策定することを目的とする。本研究期間内には、血漿タンパク質プロテオームの問題点であった低濃度タンパク質の濃縮方法を確立し、酸化ストレス関連タンパク質の ELISA 解析を行った。その結果、超高齢期においては酸化ストレスマーカーが増加するものの抗酸化酵素も増加し、レドックスバランスを保っていることが示唆された。

1. 研究の目的

社会の高齢化に伴い、健康で自立度の高い長寿を達成することは、個人の希望であるばかりでなく社会的要請も高いと考えられる。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なる。近年、ヒトを含む様々な種のゲノム情報が明らかになり、遺伝情報に基づいた分子生物学的老化研究の進展には著しいものがある。し

かし、実際の機能分子であるタンパク質レベルでの老化過程の詳細は、まだ明らかになっていないのが現状である。このため、老化機構の研究には遺伝情報レベルの研究だけではなく、タンパク質の研究こそが必要である。

我々は今までに、若齢群と超百寿者群の血漿プロテオミクス解析を行い、酸化ストレス関連タンパク質が変動することから、ヒトの老化において酸化ストレスが具体的に関与することを報告した。本研究は、この手法をさらに発展させて健康長寿バイオマーカーの策定につなげるため、長期縦断的コホート研究を行っている SONIC (Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians) 研究チーム（代表・石崎達郎東京都健康長寿医療センター研究所研究部長）との共同研究により、QOL データ、臨床データ、心理学データ等の背景因子データファイルの整った血漿サンプルの提供を受ける。プロテオミクス解析により得られるバイオマーカー候補タンパク質について、生物学的意義を解明するとともに、

臨床データのみならず QOL レベルや心理学的背景因子との相関性を調べ、社会生活や心理学的背景を含めた健康長寿バイオマーカーの策定を図る。

2. 研究の方法と経過

2-1 ヒト血漿サンプル

ヒト血漿サンプルは、SONIC 研究の関東調査により得られたサンプルのうち、70 歳 40 例、80 歳 40 例、90 歳 40 例、超百寿(105 歳以上) 40 例を無作為に選んだ。

2-2 全自動二次元電気泳動装置 (Auto2D) を用いた血漿タンパク質の前処理方法の検討

血漿タンパク質の濃度は、ダイナミックレンジが非常に大きい。このため二次元電気泳動による解析においては、高濃度タンパク質のスポットのために低濃度タンパク質のスポットが検出されない、などの問題がある。その点を改善するため、高濃度タンパク質を除去する方法について、全自動二次元電気泳動装置 (Auto2D; Sharp Co.) を用いて検討した。Auto2D の泳動条件 (参考文献 1)

等電点電気泳動用膨潤液 : 6 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 20 mM DTT, and 0.5% Pharmalyte (pH 3-10)

等電点電気泳動条件 :

200 V, 5 min, constant; to 1000 V, 5 min, linear increment; 1000 V, 5 min, constant; to 6000 V, 10 min, linear increment; 6000 V, 5 min, constant.

還元化溶液 : 500 mM Tris-HCl (pH 6.6), 50 mM DTT, 4% SDS, and 12.5% glycerol

SDS-PAGE 泳動条件 :

7.5% acrylamide and 0.1% SDS (gel size; 6 cm x 4.8 cm) 20 mA, 35 min

2-3 二次元電気泳動により分離したタンパク質スポットの同定 (参考文献 1)

最も効率的かつ簡便に、サンプルのクリーニングを行う方法を決定し、その方法を用いてラージゲル二次元電気泳動を行った。自動スポットピッキング装置 (Ettan Spot Picker; GE Healthcare) を用いて、スポットを切り出し、トリプシンによるゲル内消化を行った後、質量分析装置 (MALDI-TOF/TOF 5800; ABCIEX) による質量分析と ProteinPilot (ABCIEX) によるデータベース検索によりタンパク質を同定した。

2-4 酸化ストレス関連マーカーの ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay) 測定

酸化ストレス関連マーカータンパク質として、Extracellular SOD (EC-SOD) (Cloud-Clone Corp.), PON1 (Aviscera Bioscience)、酸化 LDL (Immunodiagnostik AG) について、ELISA により測定した。ELISA の方法は、それぞれのプロトコールに従って行った。測定及び定量解析はマイクロプレートリーダー (iMark; BioRad) を用いて行った。

3. 研究の成果

3-1 全自動二次元電気泳動装置 (Auto2D) を用いた血漿タンパク質の前処理方法の検討
血漿タンパク質に高濃度含まれる血清ア

ルブミンやイムノグロブリンなどを除去し、低濃度タンパク質のスポットを感度良く検出するため、Method 1、2、3の3つの方法を比較した。その結果、Method 3が最も高濃度タンパク質の除去を効率よく行い、低濃度タンパク質を濃縮できることが明らかになった(図)。

また、等電点電気泳動のpHレンジについても検討を行い、高濃度タンパク質除去後の血漿サンプルの等電点電気泳動はpH 4-7で行うこととした。

3-2 二次元電気泳動により分離したタンパク質スポットの同定

Method 3を用いて血漿サンプルを処理した後、タンパク質を蛍光標識し、ラージゲルによる二次元電気泳動を行った。主なスポットについてスポットピッキングを行い、タンパク質を同定した。高濃度タンパク質を除去することで低濃度タンパク質が濃縮され、よりマイナーなスポットも同定されることが明らかになった。

3-3 酸化ストレス関連マーカーのELISA測定

今までに我々は、超百寿者と若齢者の血漿タンパク質プロテオーム解析により、ヒトの老化において酸化ストレスが具体的に関与することを報告した(参考文献2)。そこで、酸化ストレス関連マーカーについて70歳、80歳、90歳、超百寿40例ずつについてELISA測定を行った。

その結果、低密度リポタンパク質(LDL)の酸化を抑制することが知られているPON1は、70歳以降、加齢に伴って低下する傾向があり、酸化LDLは増加する傾向があることが示唆された。また、抗酸化酵素であるEC-SODは70歳以降、加齢に伴って増加することが示唆された。これらの結果より、超高齢期においては、加齢に伴って酸化LDLなどの酸化ストレスが増加傾向にあるものの、抗酸化酵素も増加し、レドックスバランスが崩れないよう保たれていることが示唆された。

4. 今後の課題

本研究期間内に、血漿サンプル中に含まれる低濃度タンパク質の二次元電気泳動による解析方法を確立した。今後、この方法を用いてヒト血漿タンパク質のプロテオーム解析を行い、健康長寿マーカータンパク質の探索を行う。また、酸化ストレス関連マーカーについては、高齢期において酸化LDLの増加とEC-SODの増加が認められた。今後、同じ人の追跡調査(3、6、9年後)のサンプルを調べることで、これらのタンパク質マーカーが、同じ人でも長寿になるに従って増加していくのか、あるいは、抗酸化酵素レベルの高い人が長寿を達成するのか、明らかにできるものと思われる。

5. 研究成果の公表方法

本研究結果は、学会発表を含めまだ公表していないが、得られた成果は論文にまとめ、英文誌に投稿する予定である。

6. 参考文献

1. Iwamoto, M., Miura, Y., Tsumoto, H., Tanaka, Y., Morisawa, H., Endo, T., Toda, T.: Antioxidant effects of carnitine supplementation on 14-3-3 protein isoforms in the aged rat hippocampus detected using fully automated two-dimensional chip gel electrophoresis, *Free Radic. Res.* 48, 1409-16, (2014)
2. Miura, Y., Sato, Y., Arai, Y., Abe, Y., Takayama, M., Toda, T., Hirose, N., and Endo, T.: Proteomic analysis of plasma proteins in Japanese semisuper centenarians. *Exp. Gerontol.* 46, 81-85, (2011)

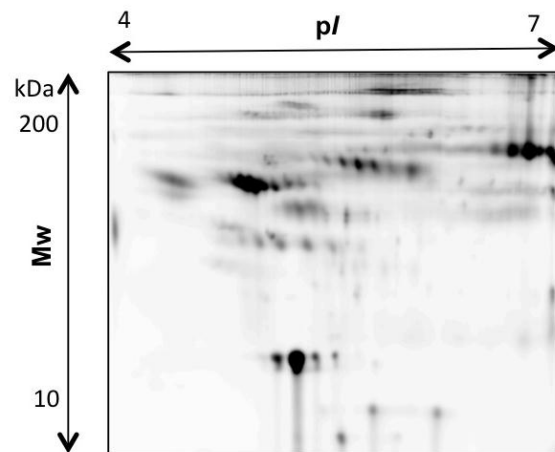


図 Method 3による低濃度タンパク質濃縮後の電気泳動像 (Auto2D)