

加齢臓器障害発症因子の分子解析と創薬の基礎的研究

分担研究者 後藤佐多良 東邦大学薬学部・生化学・教授

【研究要旨】

①ラット（F344）の加齢に伴う腎臓障害を酸化タンパク質の二次元電気泳動法（2D-PAGE）および免疫組織化学的方法で解析した。2D-PAGEによる解析では個々のタンパク質の酸化修飾度が大きく異なること、したがってタンパク質全体の酸化度のみから得られる情報は限られていることが判明した。特に顕著なカルボニル化タンパク質としてアルブミンをアミノ酸配列解析から同定した。腎臓切片の免疫組織化学解析によって酸化修飾タンパク質は老齢個体の一部の尿細管に特に多いことが明らかになった。

② 加齢で低下する加齢指標タンパク質 SMP30 の機能を明らかにするために開発された SMP30 遺伝子のノックアウトマウスの肝臓と腎臓のミトコンドリア分画タンパク質について酸化の程度をタンパク質カルボニル化量で評価した。その結果、12ヶ月齢の肝臓および6ヶ月齢の腎臓ミトコンドリア分画では野生型対照の方が酸化傷害は有意に多かった。

【研究目的】

老化および種々の加齢関連疾患において、活性酸素による傷害の関与が示唆されている。本研究では、加齢に伴って発症する多臓器障害の原因を分子レベルで解析し、その予防に役立つ方法を考案する。まず、標的分子としてタンパク質に、また傷害指標として酸化修飾に注目して指標の検出方法の確立およびその応用に関する基礎的研究を行う。

生理的老化および種々の加齢関連疾患において、活性酸素による傷害の関与が示唆されている。たとえば、アルツハイマー病・パーキンソン病・脳梗塞などの神経変性疾患、動脈硬化、白内障、糖尿病合併症などいずれも活性酸素が関わっているとの報告がある。活性酸素の標的分子として膜脂質・核酸・タンパク質などがある。中でもタンパク質は、すべての生体機能に関わり、その異常は直接的に機能に影響する可能性があることから重要だと考えられる。

本年度は、① 老若ラットの腎臓組織のカルボ

ニル化タンパク質について生化学的および免疫組織化学的に解析する。また、② SMP30 ノックアウト動物における臓器障害について同様の指標に注目して肝臓および腎臓のタンパク質酸化傷害を検討する。

【研究方法】

動物：東邦大学薬学部 SPF 動物飼育施設で維持されてきた老若（若齢：6-10ヶ月、老齢：25-30ヶ月齢）の雄ラット F344 および東京都老人総合研究所（老人研と略称）分子病理部門にて開発された SMP30 遺伝子破壊マウスおよびその野生型対照マウス（雄）を用いた。

組織ミトコンドリアの単離：12ヶ月齢マウスの肝臓および6ヶ月齢マウスの腎臓からミトコンドリアを分画遠心法で単離し、その遠心上清（ポストミトコンドリア分画）とともにタンパク質の酸化修飾の解析に用いた。

タンパク質酸化修飾の解析：ラット腎臓抽出液あるいはマウス肝臓および腎臓 n 各分画のタン

パク質を 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 塩酸溶液で処理したあと、未反応の DNPH を洗浄で除いた。タンパク質一定量を 2D-PAGE あるいは SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分離し、抗 DNP 抗体を用いて Western blot で酸化修飾 (カルボニル化) タンパク質を検出した。SDS-PAGE における抗体との反応強度の定量化は、ゲルの各レーンに相当するイムノプロットを縦に走査して行った。

【研究結果と考察】

① 老若ラット腎臓組織のカルボニル化タンパク質の生化学的・免疫組織化学的解析

前年度に引き続いてラット (F344) の加齢に伴う酸化タンパク質の変化を解析した。今年度は、個々のタンパク質の酸化傷害度を調べるために、二次元電気泳動法 (2D-PAGE) を用いた。その結果、個々のタンパク質の酸化修飾度が大きく異なること (図1)、したがってタンパク質全体の酸化度のみから得られる情報は限られていることが判明した。この方法は、タンパク質の酸化修飾と老化あるいは病態との関連を探る上で有用な方法である。なお、特に顕著なカルボニル化タンパク質としてアルブミンをアミノ酸配列解析から同定した。

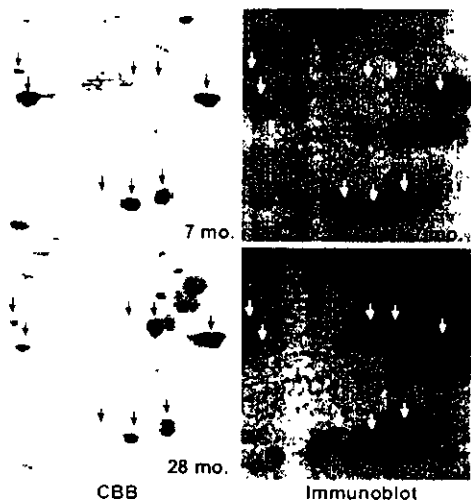


図1 カルボニル蛋白 28ヶ月齢では増強している。

腎臓切片の免疫組織化学的解析によってカルボニル化タンパク質は、高齢ラットでは組織全体に若齢よりも多だけでなく、高齢個体の一部の尿細管に特に多いことが判明した (図2)。このことは前年度報告した高齢個体の尿タンパク質量増大と関連があると考えられる。すなわち、尿細管に見られるカルボニル化タンパク質の多くはアルブミンで、何らかの仕組みで再吸収が阻害されていることの反映であると思われる。

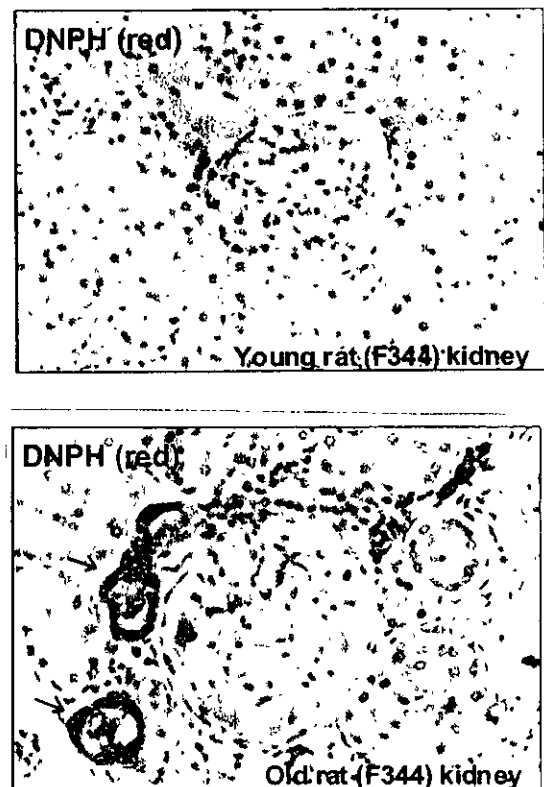


図2 尿細管上皮のカルボニル蛋白 高齢個体で増強している (→)。

② SMP30 ノックアウトマウス・ミトコンドリアタンパク質の酸化傷害

加齢で低下する加齢指標タンパク質 SMP30 の機能を明らかにするために開発された SMP30 遺伝子のノックアウトマウスの肝臓と腎臓のミトコンドリア分画タンパク質について酸化の程度をタンパク質カルボニル化量で評価した。すなわち、ミトコンドリア分画およびポストミトコンド

リア分画の一定量のタンパク質を SDS-PAGE で分離後、イムノプロットによって抗体との反応シグナルを検出・定量化した。その結果、12ヶ月齢の肝臓および6ヶ月齢の腎臓ミトコンドリア分画では野生型の方が酸化傷害は有意に多かった(図3)。

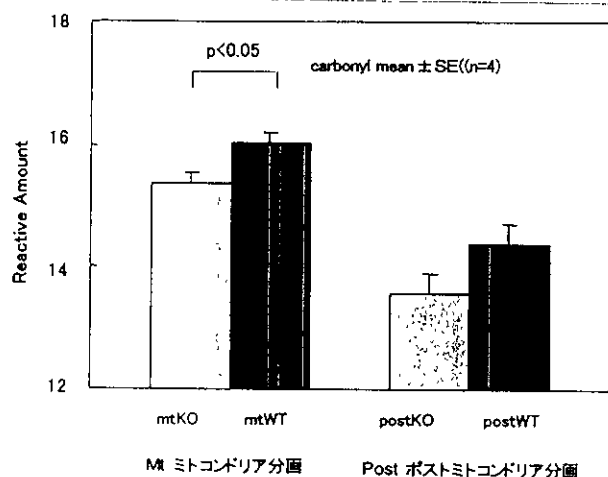


図3 肝臓カルボニル蛋白量(12ヶ月齢) 野生型のミトコンドリア分画で有意に多くなっている。

石神らは、SMP30 ノックアウトマウスの肝臓では、野生型に比べて過酸化脂質が減少し、還元型グルタチオンが低下してと報告している(第25回日本基礎老化学会要旨集、p.27, 2002)。過酸化脂質の減少は酸化ストレスの軽減を、還元型グルタチオンの低下は酸化ストレスの亢進を示唆している。一方で SMP30 ノックアウトマウスでは、形態学的にミトコンドリアの膜異常が見られている。この膜異常が酸化ストレスの亢進の原因になるか軽減の原因になるか定かではないが、肝臓においてミトコンドリアタンパク質の酸化傷害がノックアウトマウスの方で低いことは、ノックアウトの方が活性酸素の産生が低いことを示唆する。形態学的膜異常が呼吸鎖成分および関連分子にどのような変化をもたらしているのか興味深いと同時に SMP30 の老化指標としての意義に重要な関わりを持つと考えられる。

【研究発表】(原著論文・総説・著書)

1. Takahashi R, Toyoda E, Aoki Y, Suzuki KT, Goto S.: Paradoxical increase of heat-shock response with age in a substrain of F344 rats: Comparison between F344/DuCrj and F344/Jcl. *Mech. Ageing Dev.* 123: 1605-1615, 2002
2. Radák Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, Goto S.: Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress in aged rat skeletal muscle. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 445: 273-278, 2002
3. Radák Z, Takahashi R, Kumiyama A, Nakamoto H, Ohno H, Ookawara T, Goto S.: Effect of Aging and Late Onset Dietary Restriction on Antioxidant Enzymes and Proteasome Activities, and Protein Carbonylation of Rat Skeletal Muscle and Tendon. *Exp. Gerontol.* 37: 1423-1430, 2002
4. Radák Z, Gaal D, Taylor AW, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Goto S.: Attenuation of the development of murine solid leukemia tumor by physical exercise. *Antioxidants & Redox Signaling* 4: 213-219, 2002
5. Takahashi R, Goto S.: Effect of dietary restriction beyond middle age: Accumulation of altered proteins and protein degradation. *Microscopy Research and Technique*, 59: 278-282, 2002
6. Ishii N., Goto S., Hartman P.: Protein oxidation as it relates to aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Rad. Biol. Med.*, 33: 1021-1025, 2002

7. Goto S, Takahashi R, Araki S, Nakamoto H.:  
Dietary restriction initiated in late adulthood  
can reverse age-related alterations of protein  
and protein metabolism. In: *Increasing the  
Healthy Life Span: Conventional Measures and  
Slowing the Innate Aging Process*. 959 (ed.  
Harman D, Ann. New York Acad. Sci., 2002) pp.  
50-56

8. 後藤佐多良: 基礎老化学入門—老化の基本概  
念と論点 特集 老化・寿命決定のメカニズム、  
細胞工学 21: 704-708, 2002

9. 後藤佐多良、高橋良哉、荒木幸子、中本英子: 後  
半生における食餌制限の抗老化作用、加齢の克服  
—21世紀の課題、生体の科学 53: 502-508,  
2002