

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659141

研究課題名(和文) 超百寿者解析による健康長寿マーカー探索とその生物学的意義

研究課題名(英文) Search for biomarkers of successful aging through glycomics and glycoproteomics of semisuper centenarians

研究代表者

遠藤 玉夫 (Endo, Tamao)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・副所長

研究者番号：30168827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト長寿モデルと考えられる105歳以上の超百寿者の血漿タンパク質について、グライコミクス及びグライコプロテオミクスを行い、健康長寿マーカーを策定することを目的とする。超百寿者と対照群について、糖鎖解析、レクチンマイクロアレイ解析、糖ペプチド解析の3種類の網羅的解析法を用いて比較解析した。その結果、超百寿者において、高分岐かつシアル酸を多く含む糖鎖が増加しており、また加齢により減少傾向にある炎症関連タンパク質のシアル酸含有糖鎖が、超百寿者では減少しないことを明らかにした。以上より、超百寿者の健康長寿に糖鎖構造の変化が関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the candidates of the biomarker of successful aging through glycomics and glycoproteomics of semisuper centenarians considered as a model of human longevity. I performed sugar chains analyses, lectin microarray analyses, and glycopeptides analyses, and compared the glycosylation of plasma proteins between semisuper centenarians and controls. As a result, multi-branched complex sugar chains and high sialylated sugar chains were increased in the plasma proteins of semisuper centenarians. Sialylated glycopeptides of inflammatory mediating proteins were decreased with aging, while not in semisuper centenarians. It was suggested that the glycosylation plays an important role in successful aging of semisuper centenarians.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：プロテオミクス 超百寿者 健康長寿マーカー 糖鎖解析 レクチンマイクロアレイ 糖タンパク質 LC-MS

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む様々な種のゲノム情報の解明により、分子遺伝学的解析による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解明は進んでいない。タンパク質はリン酸化や糖鎖など翻訳後修飾を受けており、こうした修飾がタンパク質の機能に大きな影響を与えることは知られている。申請者は、老化の背景には糖鎖に含まれる情報および認識機序の変化があるというアイデアに至った(Endo, T. *Geriatr. Gerontol. Int.*, **10**, S32-S40, 2010)。糖鎖の生合成はタンパク質や DNA、RNA と違って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。そこで、老化に伴う細胞表面の糖鎖や分泌された糖鎖の変化を明らかにすることによって、細胞の内部や組織でどのような加齢変化が生じているか解明できると期待される。これまで老化との関連が深い酸化ストレスにより糖タンパク質の代謝や細胞内局在が影響を受けることを明らかにした(Endo, T. et al. *Mech. Aging Dev.* **127**, 771-778, 2006; *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 22-28, 2010)。一方、早老症や寿命変異体の分子遺伝学的解析により寿命に関連する遺伝子が明らかにされつつある。その中で、糖転移酵素が早老症エーラス・ダンロス症候群の原因遺伝子であることから明らかになった。また、ABO 式血液型物質は糖鎖であるが、B 型が長寿に関連している可能性が示唆された(Hirose, N. et al. *Exp. Gerontol.* **39**, 1563-1565, 2004、研究協力者広瀬の論文)。このように糖鎖と老化あるいは長寿との関連性が示唆されているが、詳細は不明である。これまでの糖タンパク質解析法では、糖鎖の不均一性に由来する分子多様性のため限られた糖鎖情報しか得ることができなかった。申請者はすでに、糖鎖構造、タンパク質への糖鎖結合部位、タンパク質のアミノ酸配列情報をハイスループットに得る技術開発に成功している(Endo, T. et al. *Anal. Chem.* **80**, 3693-3698, 2008)。本技術を貴重なヒトサンプルに応用しその有効性を検証するとともに、長寿と糖鎖の関連を調べる段階に至った。

2. 研究の目的

超百寿者血漿を対象としてグライコプロテオミクス解析を行い、超百寿者に特有の糖タンパク質並びに糖鎖の発現変化を明らかにする。また、その変動の生物学的意義を明らかにするとともに、糖タンパク質の老化マーカー及び健康長寿マーカーとしての提言を行う。

本研究では、本邦における百寿者研究の豊富な経験を有する慶応大学医学部広瀬信義講師の協力のもとに、180 名を超える超百寿者群及び一般群のサンプルについて解析する。本研究は他では得られない超百寿者サンプル数を収集している唯一のものであり、健康長寿マーカーの探索に最適であると考えられる。糖鎖研究と老化研究の領域を超えた新しい研究手法の開発につながり、これまでの基礎老化研究からは得られない老化プロセスの理解を格段に深める。健康長寿マーカーの策定は、老化や身体虚弱化の初期段階での変化を検出することで、疾病の予防・診断・治療に役立ち、健康長寿(サクセスフルエイジング)の実現に向け道を拓く。

3. 研究の方法

(1) 糖鎖解析による超百寿者特異的糖鎖の検出

超百寿者血漿等のサンプルは、慶応大学医学部広瀬信義講師との共同研究により、背景因子データファイルの整ったサンプルについて分与を受ける。超百寿者群及び対照群の血漿タンパク質を還元・アルキル化後、PNGase F を用いて N-結合型糖鎖を切り出す。メタノール沈殿による除タンパク後、LC-MS により糖鎖の構造解析及び対照群との比較解析を行う。多変量解析により、超百寿者に特異的な糖鎖構造を明らかにする。

(2) 超百寿者血漿のレクチンマイクロアレイ解析

45 種類のレクチンが固定されたレクチンマイクロアレイを用いて超百寿者群、老齢対照群、若齢対照群の血漿タンパク質についてマイクロアレイ解析を行い、超百寿者特異的

に結合が変化するレクチンを検出する。超百寿者特異的なレクチンについて、レクチンプロットを行い、レクチンマイクロアレイの結果についてバリデーションを行う。

(3) レクチンに結合する糖タンパク質の濃縮と LC-MS による糖ペプチド解析

超百寿者特異的なレクチンを磁気ビーズに固定化し、血漿タンパク質からレクチンに結合する糖ペプチドを収集する。こうして得た糖ペプチドを LC-MS により分析し、糖鎖構造、タンパク質への糖鎖結合部位、タンパク質のアミノ酸配列情報を得、糖ペプチド由来の糖タンパク質を同定する。さらに多変量解析を行って超百寿者に特徴的な糖ペプチドを明らかにし、健康長寿マーカーとなる糖鎖について明らかにする。

4. 研究成果

平成 24 年度に血漿サンプルを用いた糖鎖解析とレクチンマイクロアレイ解析を行い、超百寿者に特徴的な糖鎖や、特異的に結合が変化するレクチンを明らかにした。平成 25 年度はレクチンマイクロアレイで超百寿者特異的に結合が変化するレクチンを用いて血漿サンプルから糖タンパク質を濃縮し、糖ペプチド解析を行って超百寿者に特異的な糖ペプチドを明らかにした。

(1) 糖鎖解析による超百寿者特異的糖鎖の検出

超百寿者群 (106-107 歳)、老齡対照群 (70-74 歳)、若齡対照群 (20-38 歳) の日本人女性を対象とし、採血後直ちに血漿を分離し凍結保存した。糖鎖解析サンプルは、超百寿者群 6 人と若齡及び老齡対照群、それぞれ 5 人ずつの血漿から調製した。LC-MS を用いて糖鎖の変動解析と糖鎖構造の同定を行い (図 1-a)、主成分分析及び判別分析により超百寿者に特異的な糖鎖構造を調べた。その結果、高分岐の糖鎖及びシアル酸含有糖鎖が超百寿者で増加し (図 1-b)、シアル酸を含まない二本鎖糖鎖が減少していることが明らかになった。

(2) 超百寿者血漿のレクチンマイクロアレイ

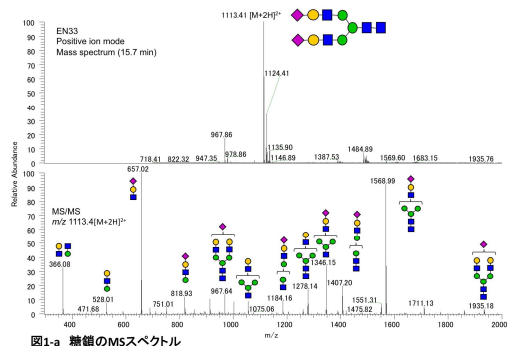


図1-a 糖鎖のMSスペクトル

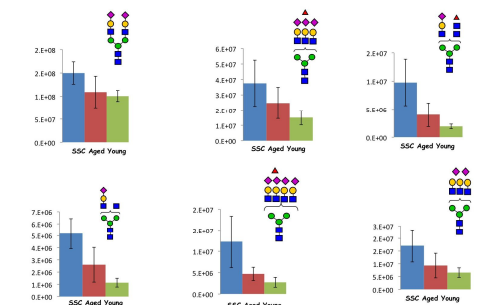


図1-b 超百寿者で増加している糖鎖

イ解析

糖鎖解析と同様、超百寿者群 6 人と若齡及び老齡対照群、それぞれ 5 人ずつの血漿タンパク質を蛍光色素でラベルした。レクチンマイクロアレイにより 45 種のレクチンに対する結合能を調べ、主成分分析及び階層分析を行って加齢によるレクチンの結合変動を解析した。その結果、加齢により結合が増加するのは、MAL-I (*Maackia amrensis lectin I*)、AAL (*Aleuria aurantia lectin*) など 6 種のレクチン、超百寿者特異的に結合が増加するのは AOL (*Aspergillus oryzae lectin*)、ECA (*Erythrina cristagalli agglutinin*) など 6 種のレクチン (図 2)、また老齡対照群で結合が低下し、超百寿者と若齡者で同様の結合能を示すのは WGA (*Wheat germ agglutinin*)、RCA120 (*Ricinus communis agglutinin*) など 6 種のレクチンであることが明らかになった。糖鎖解析により、超百寿者で増加することが示されたシアル酸含有糖鎖や高分岐糖鎖に対しては、MAL-I や ECA などが結合することから、糖鎖解析とも一致する結果が得られた。また、レクチンマイクロアレイの結果を検証するため、レクチンプロットを行った。その結果、RCA120、WGA、AOL、AAL においてレクチンの結合するバンドが検出

され、超百寿者において有意な差が認められた。また、ECA を用いて二次元電気泳動によるレクチンプロットを行い、超百寿者群、老齡対照群、若齡対照群間で、レクチンの結合するスポットが変化することを明らかにした。

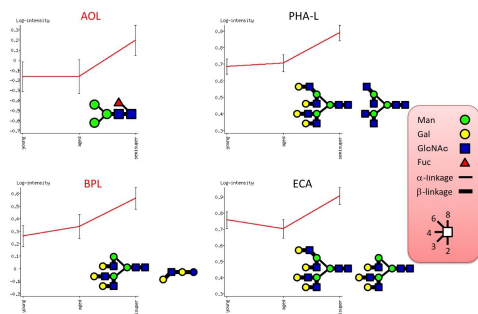


図2 超百寿者で特異的に結合が高いレクチン

(3) レクチンに結合する糖タンパク質の濃縮と LC-MS による糖ペプチド解析

次に、血漿から ECA に結合する糖タンパク質を濃縮し、トリプシン消化を行った後、LC-MSを用いて糖ペプチドの解析を行った。その結果、IgG1、IgG2、IgG4、IgA2、hemopexin、haptoglobin など、タンパク質の変動ではなく糖鎖構造が加齢により変動しているものが検出された。これらの糖ペプチドについてさらに詳細に調べたところ、IgG1、IgA2、haptoglobin の糖ペプチドにおいて、老齡対照群ではシアル酸含有糖鎖が大きく減少する傾向があったが、超百寿者ではその傾向は認められなかった(図 3)。IgG のシアル酸含有糖鎖は抗炎症活性を持ち(*Science*, **313**, 670-673, 2006)、認知機能の低下によって減少することが知られている(*J. Alzheimers Dis*, **38**, 567-579, 2014)。従って、老齡対照群においてこれらの炎症関連タンパク質のシアル酸含有糖鎖が減少することは、加齢による免疫機能の低下や認知機能の低下を反映しているものと考えられる。しかしながら、超百寿者においてシアル酸含有糖鎖の低下が認められないということは、健康長寿が糖鎖を介した免疫機能の維持や認知機能の維持により支えられていることの証なのかもしれない。

以上より、超百寿者の健康長寿に糖鎖構造の変化、すなわち炎症関連タンパク質のシア

ル酸含有糖鎖の変動が関わっている可能性が示唆された。

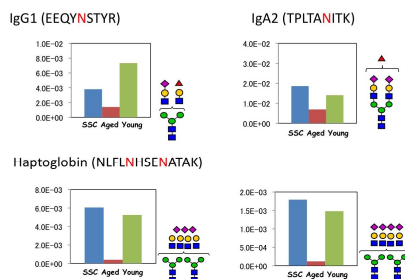


図3 シアル酸含有糖ペプチドの変動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. 三浦ゆり、遠藤玉夫：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-、基礎老化研究、査読有、37、23-27 (2013)

〔学会発表〕(計5件)

1. 三浦ゆり、太田悠葵、高倉大輔、橋井則貴、新井康通、津元裕樹、川崎ナナ、広瀬信義、遠藤玉夫：日本人超百寿者血漿タンパク質のグライコプロテオミクス解析、第37回日本基礎老化学会大会、大府、2014.6.26-27
2. Miura, Y., Arai, Y., Toda, T., Hirose, N., Endo, T.: Proteomics of Plasma Proteins in Japanese Semisuper Centenarians, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR 2014), Kyoto, 2014.3.23-26
3. Miura, Y., Itakura, Y., Arai, Y., Iwamoto, M., Toyoda, M., Kinoshita, H., Unuma, Y., Toda, T., Hirose, N., Endo, T.: Glycoproteomics study of plasma glycoproteins in Japanese semisuper centenarians, 12th Human Proteome Organization (HUPO) World Congress, Yokohama, 2013.9.14-18
4. 三浦ゆり、板倉陽子、豊田雅士、木下英樹、広瀬信義、遠藤玉夫：日本人超百寿者血漿のグライコプロテオミクス解析、第32回日本糖質学会年会、大阪、

2013.8.5-7

5. 三浦ゆり、板倉陽子、新井康通、豊田雅士、木下英樹、丸尾祐二、鶴沼 豊、戸田年総、広瀬信義、遠藤玉夫：レクチンマイクロアレイを用いた日本人超百寿者血漿のグライコプロテオミクス、第 35 回日本基礎老化学会大会、習志野、2012.7.26-27

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 玉夫 (ENDO, Tamao)

所属機関：地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

部局名：東京都健康長寿医療センター研究所

職名：副所長

研究者番号：30168827