

加齢臓器障害の定性と定量化に関する基礎的研究

分担研究者 石神 昭人 東京都老人総合研究所・加齢臓器障害研究グループ・研究員

研究要旨

高齢者では加齢に伴い臓器の障害や予備能の低下が顕在化してくる。その背景には細胞機能低下や生体分子修飾などの異常が存在している。従来、脂質や蛋白質には様々な加齢に伴う修飾が存在し、老化における意義が解析されてきた。脱イミノ化酵素 PAD はペプチド内の arginine 残基を citrullin 残基に転換する酵素であるが、その酵素により様々な蛋白質が脱イミノ化を受けて傷害された組織に検出される。本研究においてアルツハイマー病患者脳の海馬領域を非アルツハイマー病患者脳と比較すると脱イミノ化蛋白質が顕著に増加していることを明らかにした。この事実は他の臓器障害にも応用が可能であり臓器障害の定性化と定量化法開発に貢献する新しいアプローチであることが明らかとなった。

A. 研究目的

老化において発生する病態はほとんどが退行性病変であるといっても過言ではない。さらにその退行性病変の背景には分子変化が存在している。動脈硬化においては酸化脂質、そして糖尿病においては糖化蛋白質、そして蛋白のカルボニル化が種々の病態の発生に関連している。本課題は異なったアプローチで蛋白分子の変化を解析し、老年病態の定性・定量化の基礎的資料を得るものである。本課題を類例のないものにするために分担研究者は他の研究グループがまだ解析を充分行っていない蛋白質翻訳後修飾に関する酵素を中心に研究を行った。

蛋白質翻訳後修飾は情報伝達、遺伝子発現、細胞分化や老化に深く関与している。特に、蛋白質中のアルギニン残基がシトルリン残基に変わる脱イミノ化反応は蛋白質の本来の電荷や高次構造に著しい変化をもたらす。蛋白質脱イミノ化反応は、蛋白質

脱イミノ化酵素（ペプチジルアルギニンデアミナーゼ；PAD）により触媒される。生体内には4種類の異なるアイソフォーム（I, II, III, IV型）が存在し、活性発現にカルシウムを必要とする。特に、II型PADは脳全体に広く分布しており、他型PADは検出されない。また、II型PADはアストロサイトやミクログリアなどグリア細胞に不活性状態で多量に存在している。最近、神経細胞にもII型PADの存在が確認された。我々は、中枢神経系におけるII型PADの役割を解明するため、一過性脳虚血やカイニン酸投与による遅発性神経細胞死について検討した。その結果、海馬、扁桃体、視床下部、大脳皮質などでグリア繊維酸性蛋白質(GFAP)やミエリン塩基性蛋白質(MBP)が選択的に脱イミノ化され、脱イミノ化蛋白質が神経細胞死に先行して検出されることを明らかにした。本課題では東京都老人医療センターにおいて剖検がなされた症例からアルツハイマー病患

者と非アルツハイマー病患者の脳（海馬領域）における蛋白質の脱イミノ化について検討し、その加齢臓器障害成立における意義を検討した。

本研究では、① アルツハイマー病における脱イミノ化蛋白質生成、PAD 活性化機構を解明し、疾患発症における PAD の関与を明らかにする。特に、アミロイド前駆体蛋白質やタウ蛋白質などのアルツハイマー病原因蛋白質の脱イミノ化の有無をプロテオーム解析により重点的に解析する。また、② PAD のノックアウトマウスを作製して中枢神経系での PAD の機能を明らかにする。期待される表現型としてミエリン鞘形成不全、グリア細胞機能不全、学習障害などがある。本研究は脱イミノ化蛋白質の異常な生成、蓄積をアルツハイマー病に関して行い、その成果を老年病態に一般化することが目的である。

PAD に関する研究は国内では、茨城大学のグループが行っている。国外では、我々との共同研究によりフランス Toulouse 大学のグループがリウマチ様関節炎(rheumatoid arthritis)患者血清中に含まれる自己抗体が脱イミノ化されたフィブリンであることを突きとめた。また、最近、理研と東大のグループが、SNP 解析により IV 型 PAD がリウマチの原因遺伝子であることを同定し、Nature Genetics に報告した。カナダ研究グループは多発性硬化症患者脳での PAD 活性やミエリン塩基性蛋白質 (MBP) の脱イミノ化部位同定を行っている。4 種類のうち、I, II, IV 型 PAD の cDNA クローン化は我々が報告している。最近、PAD や脱イミノ化蛋白質がリウマチ様関節炎や多発性硬化症の原因物質であることが明らかになってきたことから、今後は国際的にも多くの研究者が研究に参入すると思われる。

B. 研究方法

①アルツハイマー病患者及び非アルツハイマー病患者脳は東京都老人医療センター剖検され遺族の承認を受けて海馬領域を中心とした部位を解析した。

②脱イミノ化蛋白質の検出は電気泳動後に蛋白分子中の citrullin を検出する抗体を用いて行った。

③脱イミノ化蛋白の同定はプロテオーム解析に引き続き AXIMA-CFR、MALDI-TOF-MASS 用いて同定した。

④免疫組織学的解析は PAD および GFAP について行った。

C. 結果

アルツハイマー患者脳と非アルツハイマー患者脳における脱イミノ化蛋白の出現と PAD の発現を比較検討した。図 1 B に示すようにアルツハイマー患者脳では非アルツハイマー患者脳に比べて脱イミノ化蛋白質が多く出現していた。また図 1 C に示すように PAD の発現も亢進していた。

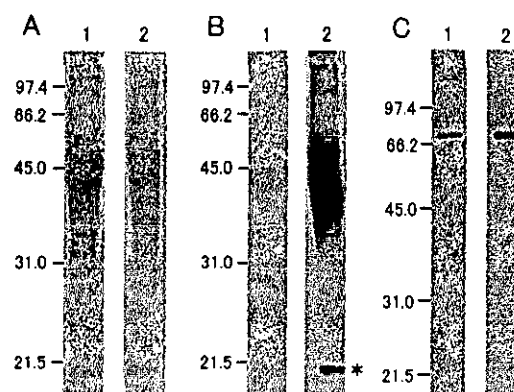


図 1. アルツハイマー患者脳における脱イミノ化蛋白と II 型 PAD の発現. アルツハイマー患者脳 (1)、非アルツハイマー患者脳 (2) を電気泳動後に A) 蛋白染色、B) 脱イミノ化蛋白染色、C) II 型 PAD の免疫染色を行った。

次にアルツハイマー患者脳海馬領域を用いた2次元電気泳動を行った。さらに脱イミノ化の検出のための免疫染色を行った。その結果、図2に示すように複数の蛋白スポットが検出された。質量分析機により表1に記したように6種類の分子を同定したが vimentin と GFAP であった。

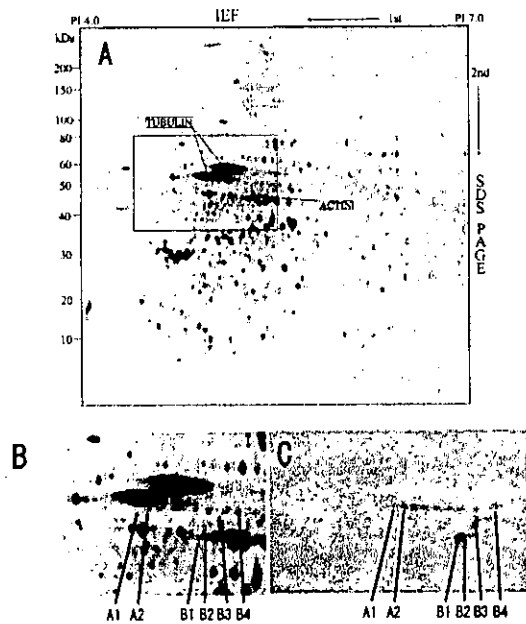


図2. アルツハイマー患者脳海馬領域の2次元電気泳動と脱イミノ化蛋白の検出. A) 全体像、B) 拡大像、C) 脱イミノ化蛋白

Spot No. *	Protein	Probability	Sequence coverage (%)	NCBI Accession Nos.	Theoretical value		Experimental value	
					pI	kDa	pI	kDa
A1	vimentin	3.85E+02	68	CAA39600	5.1	53.7	5.1	49.2
A2	vimentin	4.3E+02	71	CAA39600	5.1	53.7	5.1	49.1
B1	GFAP	3.1E+02	53	NP_002046	5.4	49.9	5.2	43.3
B2	GFAP	3.3E+02	57	NP_002046	5.4	49.9	5.2	44.8
B3	GFAP	3.2E+02	55	NP_002046	5.4	49.9	5.3	47.4
B4	GFAP	3.3E+02	60	NP_002046	5.4	49.9	5.3	49.9

- * The numbering and and lettering corresponding to the two-dimensional gel
- electrophoresis image in Fig. 2A.

表1. 2次元電気泳動法により明らかとなった脱イミノ化蛋白.

次に脱イミノ化蛋白と PAD の海馬領域と細胞の種類について解析した。アルツハイマー患者脳では脱イミノ化蛋白は海馬領域全般にわたり検出された (図3)。特に dentate gyrus と CA1 領域の接合部に強く認められた。一方、脱イミノ化蛋白は対照とした組織には検出できなかった。また II 型 PAD の発現を比較検討したところ両群の海馬領域に認められた。しかし dentate gyrus の顆粒層には検出できなかった。



図3. アルツハイマー患者脳海馬領域における脱イミノ化蛋白. アルツハイマー患者脳 (上) および非アルツハイマー患者脳 (下)

以上の脱イミノ化蛋白質の存在を検討した全ての症例について脱イミノ化蛋白質量を免疫染色強度から半定量的に比較したところ観察された結果を統計学的に支持した(図4)。

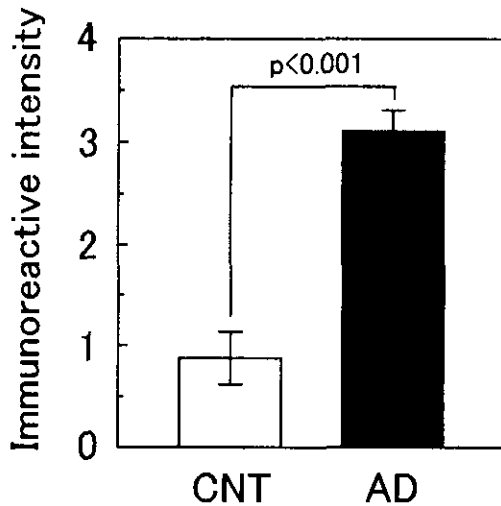


図4. 脱イミノ化蛋白の半定量的比較(免疫染色強度による). AD、アルツハイマー患者脳; CNT) 非アルツハイマー患者脳

D. 考察および今後の課題

アルツハイマー病患者の脳(海馬領域)では病状の進行程度に応じ脱イミノ化蛋白質の異常な蓄積が確認された。また、神経軸索を包み込むミエリン鞘の形成にMBPの脱イミノ化は非常に重要である。ミエリン鞘の形成不全が原因で起こる多発性硬化症では、MBPが高度に脱イミノ化しており、PADの異常な活性化が疾患発症の原因であると考えられている。このような蛋白質の翻訳後修飾は他の障害を受けた臓器でも発生していると考えられる。実際、我々はラットの実験モデルを用いて解析してみた。片側尿管閉塞術後では糸球体ボウマン嚢上皮に脱イミノ化蛋白質が出現することを発見した。またII型PADの発現も亢進することが明らかとなった。この事実は特定の細胞が外的傷害によ

り蛋白質の脱イミノ化を受けることを示している。このような成果を応用し障害臓器の定性化や定量化法が開発できる可能性を示した。この成果を基に現在、石神は本課題で用いられた抗体のモノクローナル化と脱イミノ化分子の高感度検出法の開発を開始している。

E. 結論

二次元電気泳動法、質量分析計を用いた脱イミノ化蛋白質のプロテオーム解析により、アルツハイマー病の患者脳に存在する脱イミノ化蛋白質は、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)、グリア繊維酸性蛋白質(GFAP)、ビメンチンであることを同定した。抗シトルリン抗体を用いたウエスタン法による脱イミノ化蛋白質の解析から、これら以外にも多数の脱イミノ化蛋白質が存在することが明らかである。このような脱イミノ化蛋白質の定量化が可能となれば老年病態や臓器障害の定性化、定量化に応用が可能となる。

F. 研究発表(主任研究者と重複するため略)