

200400244 A

厚生労働科学研究研究費補助金

痴呆・骨折臨床研究事業

アルツハイマー病の早期診断、治療戦略の開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石神 昭人

平成17(2005)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

アルツハイマー病の早期診断、治療戦略の開発に関する研究	-----	1
石神 昭人		

II. 分担研究報告

1. アルツハイマー病の早期診断、治療戦略の開発に関する研究	-----	4
石神 昭人		

2. シトルリン化蛋白質の分子病理学的解析に関する研究	-----	9
半田 節子		

3. シトルリン化蛋白質のプロテオーム解析に関する研究	-----	12
久保 幸穂		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16
-----------------	-------	----

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）
総括研究報告書

アルツハイマー病の早期診断、治療戦略の開発に関する研究

主任研究者 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

アルツハイマー病の原因は未だほとんど解明されていない。アルツハイマー病での特徴的な病理所見としてアミロイドベータ蛋白質 (A β) が蓄積した老人斑や、リン酸化タウ蛋白質が蓄積した神経原繊維変化は有名である。これら蛋白質は、本来、正常な機能を果たしていたものがやがて様々な修飾を受け異常化し、神経細胞の内側や外側に蓄積したためと考えられる。異常蛋白質の蓄積は、アルツハイマー病をはじめ多くの神経変性疾患（神経難病）で観察される。我々は、アルツハイマー病患者の脳で蛋白質中のアルギニンという塩基性アミノ酸がシトルリンという中性アミノ酸に変換された異常な蛋白質が多く出現することを見出した。また、アルギニンをシトルリンに変換する酵素も同定した。この酵素は、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) と呼ばれ、脳内の至る所に存在する。しかし、この酵素の反応産物であるシトルリン化蛋白質は正常な脳内にほとんど存在しない。本研究では、アルツハイマー病の発症にシトルリン化蛋白質が関与することを明らかにすると共に、シトルリン化蛋白質を指標としたアルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査薬を開発する。研究初年度、以下のような興味深い結果を得ることができた。

- ① アルツハイマー病患者脳の海馬領域では、シトルリン化蛋白質が多く出現し、病状の進行程度に応じてその量が増加することを明らかにした。細胞の形態や蛍光2重染色により反応性アストロサイトが陽性であることがわかった。
- ② シトルリン化蛋白質分子の同定のために二次元電気泳動法、質量分析計を用いたプロテオーム解析を行った。その結果、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP)、グリア繊維酸性蛋白質 (GFAP)、ピメンチンがアルツハイマー病患者の脳でシトルリン化されていることを同定した。
- ③ シトルリン化蛋白質を特異的に認識する抗体を作製した。アルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査薬の開発への足掛かりを築いた。

今年度、アルツハイマー病患者脳でのシトルリン化蛋白質の動態やシトルリン化分子の同定を行い、期待通りの結果を得ることができた。アルツハイマー病発症におけるシトルリン化蛋白質の関与は、明白である。

【研究組織】

分担研究者

石神 昭人 東京都老人総合研究所・
研究員

半田 節子 東京都老人総合研究所・
研究助手

久保 幸穂 東京都老人総合研究所・
研究助手

A. 研究目的

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シトルリン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。蛋白質シトルリン化反応は、ペプチジルアルギニンデヒミナーゼ(PAD)により触媒される(図1)。生体内には5種類の異なるアイソフォーム(PAD1, PAD2, PAD3, PAD4/5, PAD6)が存在し、活性発現にカルシウムイオンを必要とする。今までの解析からPAD2は脳全体に広く分布し、その多くはグリア細胞に不活性状態で存在する。PAD活性の発現には、一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇が必須である。異常なPAD活性化は、蛋白質本来の機能を破壊し、異常蛋白質蓄積の原因となる。

本研究では、シトルリン化蛋白質の生成がアルツハイマー病発症の引き金になることを証明する。また、シトルリン化蛋白質を指標としたアルツハイマー病早期診断を行う臨床検査試薬を開発する。

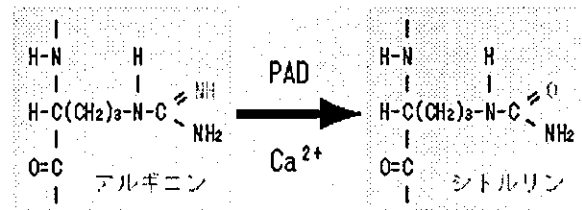


図1 ペプチジルアルギニンデヒミナーゼ(PAD)によるアルギニン(塩基性)からシトルリン(中性)への変換

B. 研究方法

シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病発症の引き金となることを証明する。即ち、① アルツハイマー病患者脳におけるシトルリン化蛋白質の生成を免疫学的、生化学的手法を用いて詳細に解析する。② 二次元電気泳動法、質量分析計を用いたプロテオーム解析によりアルツハイマー病患者の脳におけるシトルリン化蛋白質分子を同定する。③ シトルリン化蛋白質やPADの高感度ELISAシステムを構築し、アルツハイマー病早期診断を行う臨床検査試薬を開発する。

(倫理面への配慮)

アルツハイマー病の患者脳は東京都老人医療センター、東京都老人総合研究所共同の国内唯一のブレインバンクより供与される。本研究は、東京都老人総合研究所倫理委員会、東京都老人医療センター倫理委員会の承認を得ている。

本研究では、死後剖検脳を用いる。個人の情報は公表しない。遺族の同意を得る。病院の承諾書を得る。剖検同意書の範囲内で実施する。研究により生じた対象者への不利益及び危険性はない。など倫理面において最大の配慮を行っており、倫理面の問題がないと判断した。

C. 研究結果

本年度の研究により、アルツハイマー病患者の脳では、シトルリン化蛋白質が多く出現し、病状の進行程度に応じてその量が増加することを明らかにした。また、アミロイドペータ蛋白質 (A β) 陽性の老人斑やリン酸化タウ陽性の神経原繊維変化とシトルリン化蛋白質陽性の染色部位が良く一致した。一方、正常脳では、シトルリン化蛋白質は、ほとんど検出されなかった。シトルリン化蛋白質のプロテオーム解析により、アルツハイマー病患者の脳では、グリア線維性酸性蛋白質 (GFAP)、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP)、ピメンチンがシトルリン化されていることを同定した。これらの結果は、アルツハイマー病患者の脳では、PADの異常な活性化が起こっており、その結果としてシトルリン化蛋白質が生成、蓄積していることを強く示唆している。

D. 考察および今後の課題

今年度、アルツハイマー病患者脳では、シトルリン化蛋白質が多く出現し、病状の進行程度に応じてその量が増加することを明らかにした。シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病発症の引き金となることを証明するため、PAD2遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製している。このマウスは、アルツ

ハイマー病の所見を示さないスーパーマウスとなる。更に、PAD2ノックアウトマウスが出来次第、既存のアルツハイマー病モデルマウス (A β 高発現マウス) との交配を行う。このマウスで老人斑や神経原繊維変化の消失が観察できれば、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病発症の原因であることを証明できる。また、シトルリン化蛋白質やPADを指標としたアルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査試薬を開発する (図2)。ポリクローナル抗体は既に作製した。現在、モノクローナル抗体を作製中である。シトルリン化蛋白質の高感度ELISA検出法が開発できれば、アルツハイマー病の早期診断が可能となる。

E. 健康危険情報

特に該当する項目はなかった。

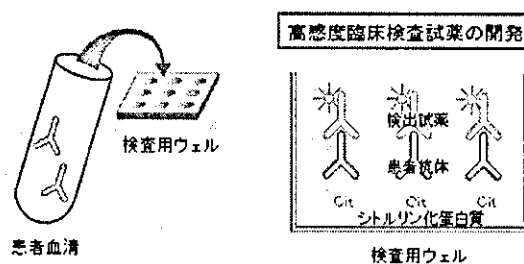


図2 臨床検査試薬の開発

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）
分担研究報告書

アルツハイマー病の早期診断、治療戦略の開発に関する研究

主任研究者 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

アルツハイマー病患者の脳では、シトルリン化蛋白質が多く出現し、病状の進行程度に応じてその量が増加する。従って、アルツハイマー病患者の血清や脳脊髄液中にシトルリン化蛋白質が多く存在する可能性がある。本研究では、アルツハイマー病の早期診断を行うシトルリン化蛋白質の高感度検出システムを開発する。今年度、シトルリン化蛋白質を特異的に認識するポリクローナル抗体を作製した。アルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査薬の開発への足掛かりを築いた。

また、中枢神経系でのPADの機能を明らかにするため、PAD2 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製する。今年度、PAD2の第1エクソンを欠失させた遺伝子組換え体を作製し、ES細胞に導入した。

A. 研究目的

ペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) は、蛋白質中の塩基性アミノ酸であるアルギニンを中性アミノ酸であるシトルリンに変換する酵素である。蛋白質シトルリン化反応は、正電荷を失うことから、蛋白質の高次構造に著しい変化をもたらす。生体内には5種類のアイソフォーム (PAD1, 2, 3, 4/5, 6) が存在し、活性化にカルシウムイオンを必要とする。特に、PAD2は脳全体に広く分布し、他型PADは検出されない。

今までにアルツハイマー病患者の脳では、シトルリン化蛋白質が多く存在し、病状の進行程度に応じてその量が増加することを明らかにしてきた。従って、アルツハイマー病患者の血清や脳脊髄液中には、シトルリン化蛋白質が多く存在する可能性がある。もし、アルツハイマー病患者の血清や脳脊髄液中

にシトルリン化蛋白質が存在するならば、早期診断を行う臨床検査薬が開発できる。本研究では、1) シトルリン化蛋白質を指標とした高感度ELISAシステムを構築するため、シトルリン化蛋白質に対する特異抗体を作製する。更に、2) 中枢神経系でのPADの機能を明らかにするため、PAD2 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製する。このマウスを用いることにより、アルツハイマー病発症におけるシトルリン化蛋白質の関与を証明できる。

B. 研究方法

1. シトルリン化蛋白質抗体の作製

シトルリン化蛋白質を特異的に認識する抗体を作製するため、牛血清アルブミン (BSA) やヒストンにヒトPAD2組換え蛋白質を作用させシトルリン化した。ヒトPAD2組換え蛋白質は大腸菌で発現、精製した。抗原性を

高めるため、更に化学修飾を行った。これらシトルリン化蛋白質をウサギに免役し抗血清を得た。特異抗体を精製するため、化学修飾シトルリンアフィニティーカラムを作製し、抗血清から抗体を精製した。

2. PAD2ノックアウトマウスの作製

PADには5種類の異なるアイソフォーム(PAD1, PAD2, PAD3, PAD4/5, PAD6)が存在する。マウスPAD1, PAD2, PAD3, PAD4/5, PAD6遺伝子は、全て第4染色体上でそれぞれ独立に位置している。また、全てのPAD遺伝子は、16個のエクソンを持ち、アミノ酸配列の相同性は、それぞれの型で約50-60%である。中枢神経系でのPADの機能を明らかにするため、PAD2 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製する。そのため、PAD2の第1エクソンを欠失させた遺伝子組換え体を作製する。更に、ES細胞に導入して、陽性クローンのスクリーニングを行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、研究所内、動物実験倫理委員会の承認を得ており、動物に苦痛を与えない最大の配慮をしている。

C. 研究結果

化学修飾シトルリン化蛋白質を特異的に認識するポリクローナル抗体を作製した。また、化学修飾シトルリンアフィニティーカラムを作製し、抗血清から化学修飾シトルリン抗体を精製した。抗体の特異性を調べた結果、シトルリン化蛋白質を特異的に認識することが確認できた(図1)。

抗体の確認(ウェスタンブロッティング法) ＜化学修飾シトルリン化BSAポリクローナル抗体＞

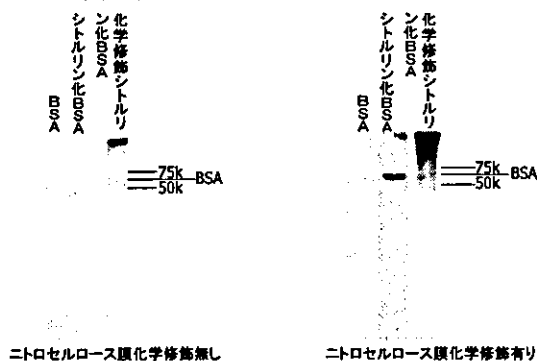


図1 化学修飾シトルリン化抗体

PAD2の第1エクソンを欠失させた遺伝子組換え体を作製した(図2)。

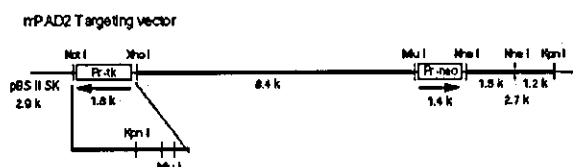


図2 PAD2ターゲッティングベクター

D. 考察

アルツハイマー病患者の血清や脳脊髄液中にシトルリン化蛋白質が多く存在する可能性がある。それを検証するため、シトルリン化蛋白質を特異的に認識する抗体を作製した。今年度、シトルリン化蛋白質を特異的に認識するポリクローナル抗体を取り終えた。今後、モノクローナル抗体をする。シトルリン化蛋白質の高感度ELISA検出法が開発できれば、アルツハイマー病の早期診断が可能となる。

中枢神経系でのPADの機能を明らかにするため、PAD2 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製する。今年度、PAD2の第1エクソンを欠失させた遺伝子組換え体を作製した。また、現在、ES細胞に導入して、陽性クローンのスクリーニングを行っている。シト

ルリン化蛋白質の生成、蓄積がアルツハイマー病の発症原因とするならば、PAD2ノックアウトマウスはアルツハイマー病を発症しないスーパーマウスとなる。更に、PAD2ノックアウトマウスが出来次第、既存のアルツハイマー病モデルマウス(Aβ高発現マウス)との交配を行う。このマウスで老人斑や神経原繊維変化の消失が観察できれば、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病発症の原因であることを証明できる。

E. 結論

アルツハイマー病患者脳では、シトルリン化蛋白質が多く出現し、病状の進行程度に応じてその量が増加する。アルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査薬を開発するため、シトルリン化蛋白質を特異的に認識するポリクローナル抗体を作製した。アルツハイマー病の早期診断を行う臨床検査薬の開発への足掛かりを築いた。

また、中枢神経系でのPADの機能を明らかにするため、PAD2 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製する。今年度、PAD2の第1エクソンを欠失させた遺伝子組換え体を作製し、ES細胞に導入した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishigami, A., Kondo, Y., Nanba, R., Ohsawa, T., Handa, S., Kubo, S., Akita, M. and Maruyama, N. : SMP30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315** 575-580 (2004)

Mori, T., Ishigami, A., Seyama, K., Onai, R., Kubo, S., Shimizu, K., Maruyama, N. and Fukuchi, Y. : Senescence marker protein-30 knockout mouse as a novel murine model of

senile lung. *Pathol. Int.* **54** 167-173 (2004)

Kondo, Y., Ishigami, A., Kubo, S., Handa, S., Gomi, K., Hirokawa, K., Kajiyama, N., Chiba, T., Shimokado, K. and Maruyama, N. : Senescence marker protein-30 is a unique enzyme that hydrolyzes diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) in the liver. *FEBS Lett.* **570** 57-62 (2004)

Maruyama, N., Ishigami, A., Kuramoto, M., Handa, S., Kubo, S., Imasawa, T., Seyama, K., Shimosawa, T., Kasahara, Y. : Senescence Marker Protein-30 Knockout Mouse as an Aging Model. *Ann. NY Acad. Sci.* **1019** 383-387 (2004)

Feng, D., Kondo, Y., Ishigami, A., Kuramoto, M., Machida, T., Maruyama, N. : Senescence Marker Protein-30 as a Novel Antiaging Molecule. *Ann. NY Acad. Sci.* **1019** 360-364 (2004)

Matsuyama, S., Kitamura, T., Enomoto, N., Fujita, T., Ishigami, A., Handa, S., Maruyama, N., Zheng, D., Ikejima, K., Takei, Y. and Sato, N. : Senescence marker protein-30 (SMP30) regulates Akt activity and contributes to cell survival in Hep G2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321** 386-390 (2004)

Jung, K.J., Ishigami, A., Maruyama, N., Takahashi, R., Goto, S., Yu B.P. and Chung, H.Y. : Modulation of gene expression of SMP-30 by LPS and calorie restriction during aging process. *Exp. Gerontol.* **39** 1169-1177 (2004)

Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., Murayama,

S., Asaga, H., Toda, T., Kimura, N. and Maruyama, N. : Abnormal accumulation of deiminated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **80** 120-128 (2005)

Ishigami, A., Fujita, T., Inoue, H., Handa, S., Kubo, S., Kondo, Y. and Maruyama, N. : Senescence Marker Protein-30 (SMP30) induces formation of microvilli and bile canaliculi in Hep G2 cells. *Cell & Tissue Res.* (in press) (2005)

Ishii, K., Tsubaki, T., Fujita, K., Ishigami, A., Maruyama, N., Akita, M. : Immunohistochemical localization of senescence marker protein-30 (SMP30) in the submandibular gland and ultrastructural changes of the granular duct cells in SMP30 knockout mice. *Histol. Histopathol.* (in press) (2005)

2. 学会発表

石神昭人、半田節子、丸山直記 : 加齢指標蛋白質 SMP30 が持つ酸化ストレス抑制作用. 第 124 回日本薬学会, 大阪, 2004.3.29-31

丸山直記、石神昭人 : 老化抑制遺伝子 SMP30 欠損動物に出現する老化病態. 第 93 回 日本病理学会, 札幌, 2004.6.9-11

丸山直記、石神昭人 : アルツハイマー病の患者脳における脱イミノ化蛋白質. 第 93 回 日本病理学会, 札幌, 2004.6.9-11

今澤俊之、馮冬芸、石神昭人、永野忠相、高柳佳織、小澤孝宏、戸田年総、長田道夫、御手洗哲也、丸山直記 : 腎において糸球体ポーマン嚢特異的に認められる脱イミノ化反

応の解析. 第 93 回 日本病理学会, 札幌, 2004.6.9-11

今澤俊之、馮冬芸、石神昭人、大澤多加子、永野忠相、戸田年総、丸山直記、御手洗哲也 : 糸球体ポーマン嚢特異的に認められる脱イミノ化蛋白質の同定. 第 47 回 日本腎臓学会, 宇都宮, 2004.6.27-29

石神昭人、田口ひろみ、小林沙織、大澤多加子、齊藤祐子、村山繁雄、丸山直記 : アルツハイマー病の発症における脱イミノ化蛋白質の関与. 第 27 回日本基礎老化学会, 東京, 2004.6.17-18

近藤嘉高、石神昭人、下門顕太郎、丸山直記 : SMP30 は肝臓で唯一の DFPase である. 第 27 回日本基礎老化学会, 東京, 2004.6.17-18

Taguchi, H., Ishigami, A., Kobayashi, S., Machida, T., Maruyama, N. : Abnormal accumulation of deiminated proteins in Alzheimer's disease. 第 77 回日本生化学会, 横浜, 2004.10.13-16

近藤嘉高、石神昭人、下門顕太郎、丸山直記 : 加齢指標蛋白質 SMP30 における gluconolactonase 活性の同定. 第 77 回日本生化学会, 横浜, 2004.10.13-16

久保幸穂、重本和宏、石神昭人、半田節子、丸山直記 : 筋細胞におけるアセチルコリン受容体凝集の解析と応用. 第 11 回東京都老年学会, 東京, 2004.11.5

Ishigami, A., Taguchi, H., Kobayashi, S., Kondo, Y., Saito, Y. and Maruyama, N. : Abnormal accumulation of deiminated proteins in the hippocampus from Alzheimer's disease. The

Society for Neuroscience 34rd Annual Meeting,
San Diego, 2004.10.23-27

石神昭人、田口ひろみ、小林沙織、山本尚吾、
浦野四郎、丸山直記: シトルリン化蛋白質と
アルツハイマー病. 第 27 回日本分子生物学
会, 横浜, 2004.12.8-11

石神昭人、丸山直記: アルツハイマー病での

シトルリン化蛋白質の異常な蓄積. 第 11 回
日本未病システム学会, さいたま 2005.1.8-9

石神昭人、丸山直記 : アルツハイマー病と
シトルリン化蛋白質. 第 125 回日本薬学会,
東京, 2005.3.29-31

シトルリン化蛋白質の分子病理学的解析に関する研究

分担研究者 半田 節子 東京都老人総合研究所・加齢臓器障害研究グループ・研究助手

研究要旨

アルツハイマー病（AD）患者脳の海馬領域では、シトルリン化蛋白質が多く出現し、病状の進行程度に応じてその量が増加することを明らかにした。細胞の形態や蛍光二重染色により反応性アストロサイトが陽性であることがわかった。

A. 研究目的

ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)は、タンパク質中のアルギニン残基をシトルリン残基にシトルリン化する酵素である。蛋白質シトルリン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。生体内には、組織分布や基質特異性の異なる5種類のアイソフォーム（PAD1, PAD2, PAD3, PAD4/5, PAD6）が存在し、そのいずれもが活性発現にカルシウムイオンを必要とする。しかし、EF-ハンド構造のような典型的なカルシウム結合部位を持たない。5種類の中で、特にPAD2は海馬、扁桃体、視床下部、大脳皮質など脳全体に広く分布しており、他型PADは検出されない。また、その多くはアストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞に不活性状態で存在している。我々は、中枢神経系におけるPAD2の役割を解析するため、短時間の一過性脳虚血やグルタミン酸のアナログであるカイニン酸投与により誘導され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)が優先的にシ

トルリン化されること、シトルリン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。更に、神経軸索を包み込むミエリン鞘の形成にMBPのシトルリン化反応は非常に重要であり、ミエリンが破壊される原因不明の多発性硬化症(multiple sclerosis)では、MBPが高度にシトルリン化している。これはPADの異常な活性化が原因であろうと考えられている。

本研究では、アルツハイマー病の患者脳におけるシトルリン化蛋白質の生成、蓄積を免疫組織染色により詳細に解析する。

B. 研究方法

アルツハイマー病患者の脳でシトルリン化蛋白質が生成しているかを免疫組織染色法により解析する。シトルリン化蛋白質の検出は、我々が開発した抗シトルリン抗体、化学的検出方法を用いることにより高感度に検出できる。

（倫理面への配慮）

アルツハイマー病の患者脳は東京都老人医療センター、東京都老人総合研究所共同の

国内唯一のブレインバンクより供与された。本研究は、東京都老人総合研究所倫理委員会、東京都老人医療センター倫理委員会の承認を得ている。

本研究では、死後剖検脳を用いる。個人の情報は公表しない。遺族の同意を得る。病院の承諾書を得る。剖検同意書の範囲内で実施する。研究により生じた対象者への不利益及び危険性はない。など倫理面において最大の配慮を行っており、倫理面の問題がないと判断した。

C. 研究結果

アルツハイマー病患者の脳におけるシトルリン化蛋白質の生成、蓄積を免疫組織染色により調べた。その結果、アルツハイマー病患者の脳（海馬とその周辺）では、病状の進行程度に応じシトルリン化蛋白質の異常な蓄積が確認された（図1）。強染された細胞は、主にグリア細胞の1つであるアストロサイトであった（図2）。また、神経細胞の一部も染色された。同時に、アミロイドベータ蛋白質（A β ）やリン酸化タウに対する抗体を用いた連続切片による免疫組織染色を行った。その結果、A β 陽性の老人斑やリン酸化タウ陽性の神経原繊維変化とシトルリン

化蛋白質陽性の染色部位が一致した。A β やリン酸化タウがシトルリン化されているかは明らかではない。一方、正常脳では、シトルリン化蛋白質は、ほとんど検出されなかった（図1）。

D. 考察

アルツハイマー病患者の脳では、病状の進行程度に応じてシトルリン化蛋白質が多く蓄積した。これは、アルツハイマー病患者の脳では、PADの異常な活性化が起きていることを強く示唆している。今後、さらに患者検体数を増やし、結果の信頼性を高めて行く必要がある。

E. 結論

アルツハイマー病患者の脳内には、シトルリン化蛋白質が多く出現し、病状の進行程度に応じてその量が増加することがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishigami, A., Kondo, Y., Nanba, R., Ohsawa, T., Handa, S., Kubo, S., Akita, M. and Maruyama, N. : SMP30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids

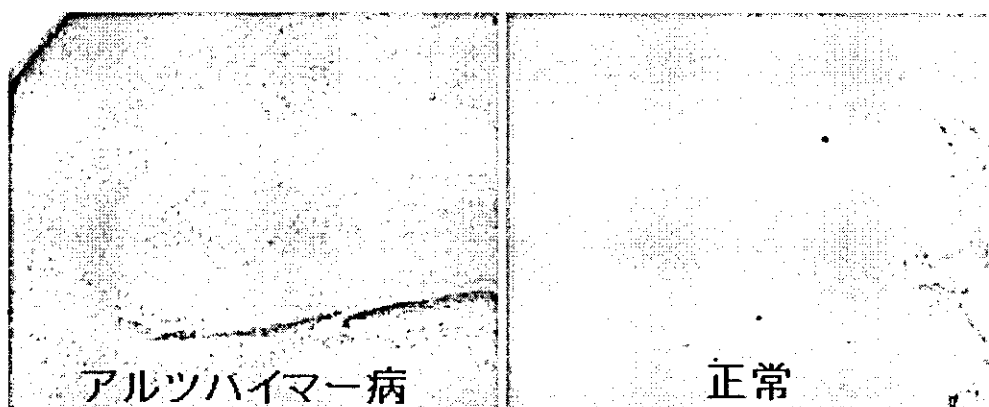


図1 アルツハイマー病患者脳（海馬領域）でのシトルリン化蛋白質の免疫染色



図2 シトルリン化蛋白質陽性細胞

in the liver and shortens the life span. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 575-580 (2004)

Maruyama, N., Yoshida, Y., Inamatsu, T., Fujita, K., Handa, S. and Shinkai, S. : HLA-DR allotype is associated with responsiveness to influenza vaccine in elderly Japanese. *Geriatrics and Gerontology Int.* 4 234-237 (2004)

Kondo, Y., Ishigami, A., Kubo, S., Handa, S., Gomi, K., Hirokawa, K., Kajiyama, N., Chiba, T., Shimokado, K. and Maruyama, N. : Senescence marker protein-30 is a unique enzyme that hydrolyzes diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) in the liver. *FEBS Lett.* 570 57-62 (2004)

Maruyama, N., Ishigami, A., Kuramoto, M.,

Handa, S., Kubo, S., Imasawa, T., Seyama, K., Shimosawa, T., Kasahara, Y. : Senescence Marker Protein-30 Knockout Mouse as an Aging Model. *Ann. NY Acad. Sci.* 1019 383-387 (2004)

Matsuyama, S., Kitamura, T., Enomoto, N., Fujita, T., Ishigami, A., Handa, S., Maruyama, N., Zheng, D., Ikejima, K., Takei, Y. and Sato, N. : Senescence marker protein-30 (SMP30) regulates Akt activity and contributes to cell survival in Hep G2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321 386-390 (2004)

Ishigami, A., Fujita, T., Inoue, H., Handa, S., Kubo, S., Kondo, Y. and Maruyama, N. : Senescence Marker Protein-30 (SMP30) induces formation of microvilli and bile canaliculi in Hep G2 cells. *Cell & Tissue Res.* (in press) (2005)

2. 学会発表

石神昭人、半田節子、丸山直記 : 加齢指標蛋白質 SMP30 が持つ酸化ストレス抑制作用. 第124回日本薬学会, 大阪, 2004.3.29-31

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）
分担研究報告書

シトルリン化蛋白質のプロテオーム解析に関する研究

分担研究者 久保 幸穂 東京都老人総合研究所・加齢臓器障害研究グループ・研究助手

研究要旨

アルツハイマー病患者脳に存在するシトルリン化蛋白質分子を同定するため二次元電気泳動法、質量分析計を用いたプロテオーム解析を行った。その結果、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP)、グリア繊維酸性蛋白質 (GFAP)、ピメンチンがシトルリン化されていることを明らかにした。

A. 研究目的

アルツハイマー病患者の脳では、シトルリン化蛋白質が多く存在する。また、病状の進行程度に応じてその量が増加する。どのような蛋白質がシトルリン化を受けるのか明らかにするため、本研究では二次元電気泳動法、質量分析計を用いたプロテオーム解析によりシトルリン化蛋白質の同定を行った。

B. 研究方法

アルツハイマー病患者の脳におけるシトルリン化蛋白質分子を同定するため、海馬領域抽出物を二次元電気泳動により展開した。ウエスタンブロット解析により、シトルリン化蛋白質陽性スポットを同定、切り出し、更にトリプシン消化した。シトルリン化蛋白質は島津質量分析計、Mascot Search プログラムを用いて同定した。必要な機器は、東京都老人総合研究所プロテオーム共同研究センターのものを使用させて頂いた。

(倫理面への配慮)

アルツハイマー病の患者脳は東京都老人医療センター、東京都老人総合研究所共同の

国内唯一のブレインバンクより供与された。本研究は、東京都老人総合研究所倫理委員会、東京都老人医療センター倫理委員会の承認を得ている。

本研究では、死後剖検脳を用いる。個人の情報は公表しない。遺族の同意を得る。病院の承諾書を得る。剖検同意書の範囲内で実施する。研究により生じた対象者への不利益及び危険性はない。など倫理面において最大の配慮を行っており、倫理面の問題がないと判断した。

C. 研究結果

二次元電気泳動法、質量分析計を用いたシトルリン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シトルリン化蛋白質は、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP)、グリア繊維酸性蛋白質 (GFAP)、ピメンチンであることを同定した (図1)。

D. 考察

抗シトルリン抗体を用いたウエスタン法によるシトルリン化蛋白質の解析から、ミエリン塩基性蛋白質、グリア繊維酸性蛋白質、

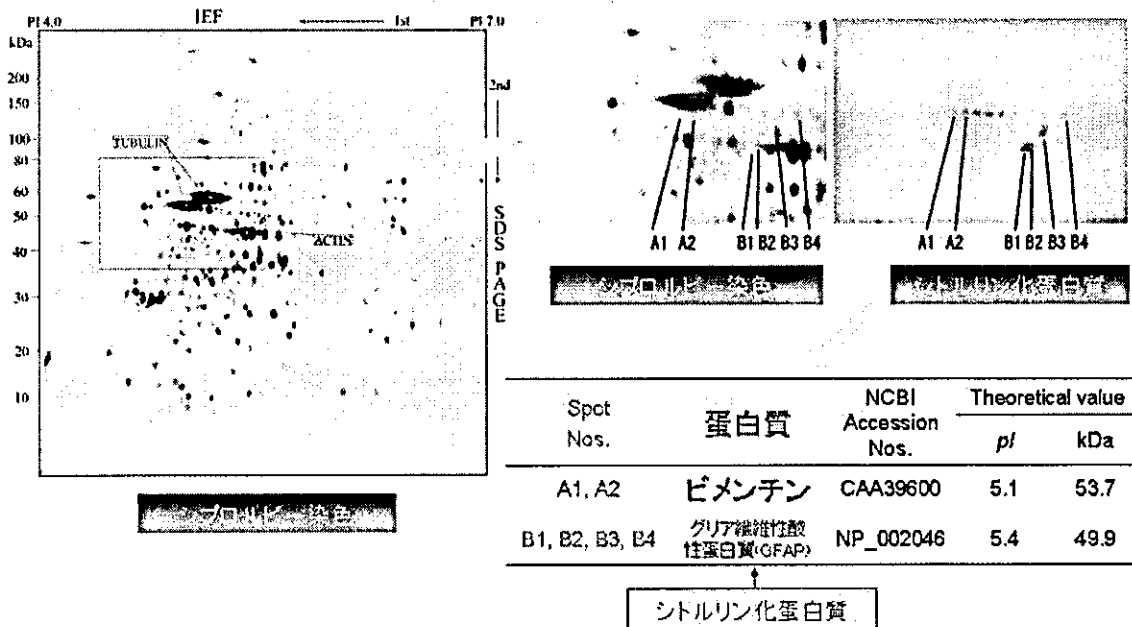


図1 プロテオーム解析によるシトルリン化蛋白質の同定

ビメンチン以外にも多数のシトルリン化蛋白質が存在することがわかった。今後、これらシトルリン化蛋白質の同定が必要である。更に、アルツハイマー病発症の原因と考えられているアミロイドベータ蛋白質 (Aβ) やリン酸化タウがシトルリン化を受けているか明らかにするため、今後もプロテオーム解析を積極的に進める必要がある。

E. 結論

シトルリン化蛋白質分子の同定のために二次元電気泳動法、質量分析計を用いたプロテオーム解析を行った。その結果、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP)、グリア繊維酸性蛋白質 (GFAP)、ビメンチンがアルツハイマー病脳でシトルリン化されていることを同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishigami, A., Kondo, Y., Nanba, R., Ohsawa, T., Handa, S., Kubo, S., Akita, M. and Maruyama, N. : SMP30 deficiency in mice causes an

accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315** 575-580 (2004)

Mori, T., Ishigami, A., Seyama, K., Onai, R., Kubo, S., Shimizu, K., Maruyama, N. and Fukuchi, Y. : Senescence marker protein-30 knockout mouse as a novel murine model of senile lung. *Pathol. Int.* **54** 167-173 (2004)

Kondo, Y., Ishigami, A., Kubo, S., Handa, S., Gomi, K., Hirokawa, K., Kajiyama, N., Chiba, T., Shimokado, K. and Maruyama, N. : Senescence marker protein-30 is a unique enzyme that hydrolyzes diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) in the liver. *FEBS Lett.* **570** 57-62 (2004)

Maruyama, N., Ishigami, A., Kuramoto, M., Handa, S., Kubo, S., Imasawa, T., Seyama, K., Shimosawa, T., Kasahara, Y. : Senescence Marker Protein-30 Knockout Mouse as an Aging

Model. *Ann. NY Acad. Sci.* 1019 383-387 (2004)

Ishigami, A., Fujita, T., Inoue, H., Handa, S., Kubo, S., Kondo, Y. and Maruyama, N. : Senescence Marker Protein-30 (SMP30) induces formation of microvilli and bile canaliculi in Hep G2 cells. *Cell & Tissue Res.* (in press) (2005)

2. 学会発表

久保幸穂、重本和宏、石神昭人、半田節子、丸山直記 : 筋細胞におけるアセチルコリン受容体凝集の解析と応用. 第 11 回東京都老年学会, 東京, 2004.11.5

重本和宏、久保幸穂、太田光熙、太田潔江、丸山直記 : MuSK 自己抗体により発症する重症筋無力症の分子病態についての解析. 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会 合同大会 (Neuro2004), 2004.9.21-23

Shigemoto; K., Kubo; S., Ochi; T., Kobayashi; N., Matsuda, S.; Mominoki; K., Abe; Y., Ueda; N., Watanabe, K.; Maruyama, N. : Autoantibodies against MuSK ectodomain inhibited multiple pathways of AChR clusterintg. The Society for Neuroscience 34rd Annual Meeting, San Diego, 2004.10.23-27

Ohta, K.; Shigemoto; K., Kubo; S., Maruyama; N., Abe; Y., Ueda; N., Ohta, M. : MuSK antibodies in AChR Ab - seropositive MG versus AChR Ab - seronegative MG 684 Neuromuscular Disease I. The Society for Neuroscience 34rd Annual Meeting, San Diego, 2004.10.23-27

重本和宏、久保幸穂、羽藤直人、山田啓之、松田正司、丸山直記 : 抗 MuSK 抗体と重症筋無力症および分子病態についての解析. 第 17 回日本神経免疫学会, 2005.3.3-4

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., Murayama, S., Asaga, H., Toda, T., Kimura, N., Maruyama, N.	Abnormal accumulation of deiminated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease.	J. Neurosci. Res	80	120-128	2005
石神昭人、 丸山直記	シトルリン化蛋白質と 関節リウマチ	医学のあゆ み	211	253-254	2004

Abnormal Accumulation of Citrullinated Proteins Catalyzed by Peptidylarginine Deiminase in Hippocampal Extracts From Patients With Alzheimer's Disease

Akihito Ishigami,^{1*} Takako Ohsawa,² Masaharu Hiratsuka,³ Hiromi Taguchi,¹ Saori Kobayashi,¹ Yuko Saito,⁴ Shigeo Murayama,⁴ Hiroaki Asaga,⁵ Tosifusa Toda,⁶ Narimichi Kimura,² and Naoki Maruyama¹

¹Department of Molecular Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

²Cellular Signaling Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

³Department of Molecular and Cell Genetics, Graduate School of Medical Science, Tottori University, Tottori-shi, Tottori, Japan

⁴Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

⁵Biological Science Laboratory, Meiji University, Suginami-ku, Tokyo, Japan

⁶Proteomics Collaboration Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

Citrullinated proteins are the products of a posttranslational process in which arginine residues undergo modification into citrulline residues when catalyzed by peptidylarginine deiminases (PADs) in a calcium ion-dependent manner. In our previous report, PAD2 expressed mainly in the rat cerebrum became activated early in the neurodegenerative process. To elucidate the involvement of protein citrullination in human neuronal degeneration, we examined whether citrullinated proteins are produced during Alzheimer's disease (AD). By Western blot analysis with antimodified citrulline antibody, citrullinated proteins of varied molecular weights were detected in hippocampal tissues from patients with AD but not normal humans. Two of the citrullinated proteins were identified as vimentin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) by using two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. Interestingly, PAD2 was detected in hippocampal extracts from AD and normal brains, but the amount of PAD2 in the AD tissue was markedly greater. Histochemical analysis revealed citrullinated proteins throughout the hippocampus, especially in the dentate gyrus and stratum radiatum of CA1 and CA2 areas. However, no citrullinated proteins were detected in the normal hippocampus. PAD2 immunoreactivity was also ubiquitous throughout both the AD and the normal hippocampal areas. PAD2 enrichment coincided well with citrullinated protein positivity. Double immunofluorescence staining revealed that citrullinated protein- and PAD2-positive cells also coincided with GFAP-positive cells, but not all GFAP-positive cells were positive for PAD2. As with GFAP, which is an astrocyte-specific marker protein, PAD2 is distributed mainly in astrocytes. These collective results, the

abnormal accumulation of citrullinated proteins and abnormal activation of PAD2 in hippocampi of patients with AD, strongly suggest that PAD has an important role in the onset and progression of AD and that citrullinated proteins may become a useful marker for human neurodegenerative diseases. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Alzheimer's disease; astrocyte; citrulline; glial fibrillary acidic protein; PAD; vimentin

Numerous proteases and posttranslational modification enzymes participate in neurodegeneration, such as that in patients with Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (Keller et al., 2000; Maccioni et al., 2001). However, little attention has been paid to one such group of agents, peptidylarginine deiminases (PADs; EC 3.5.3.15; Rogers and Simmonds, 1958; Kubilus et al., 1980; Kubilus and Baden, 1983; Ishigami et al., 1996). PADs are a group of posttranslational modification enzymes that citrullinate (deiminate) protein arginine residues in a calcium ion-dependent manner, yielding citrulline residues. Enzymatic citrullination abolishes positive charges of native protein molecules, inevitably causing significant alterations in their structure and functions (Lamensa and Moscarello, 1993; Imparl et al., 1995; Tarcsa et al., 1996). In mammalian tissues, PADs are found as

*Correspondence to: Akihito Ishigami, PhD, Department of Molecular Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan. E-mail: ishigami@tmig.or.jp

Received 4 October 2004; Revised 22 December 2004; Accepted 4 January 2005

Published online 9 February 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20431

TABLE I. Subject Demographic Data*

	Age (years)	PMI (hr)	Gender	BW (g)	Braak stage	
					NFT	SP
AD	84.5 ± 1.4	7.9 ± 2.1	3 M/7 F	1,104 ± 99	VI (10)	C (10)
Control	79.2 ± 1.6	6.5 ± 2.4	5 M/4 F	1,226 ± 31	I (9)	0 (6), A (3)

*Data are expressed as mean ± SEM. Parentheses indicated the number of subject. PMI, post-mortem interval; BW, brain weight; NFT, neurofibrillary tangle; SP, senile plaque; AD, Alzheimer disease.

five different isoforms (i.e., types 1–4, 6), which differ in specificity for various synthetic substrates, such as benzoyl-L-arginine ethyl ester and benzoyl-L-arginine, and in tissue distribution (Watanabe et al., 1988; Terakawa et al., 1991; Chavanas et al., 2004). All these isoforms display nearly identical amino acid sequences (Watanabe and Senshu, 1989; Tsuchida et al., 1993; Nishijyo et al., 1997; Ishigami et al., 1998; Nakashima et al., 1999; Rusd et al., 1999), but they appear to be dissimilar in tissue-specific expression, as evidenced by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Ishigami et al., 2001). Among them, only PAD2 has been proved to be an occupant of the rat central nervous system (Kubilus and Baden, 1983; Watanabe et al., 1988; Terakawa et al., 1991). Immunocytochemical studies have localized PAD2 in glial cells, especially astrocytes (Vincent et al., 1992; Asaga and Ishigami, 2000, 2001), microglial cells (Vincent et al., 1992; Asaga et al., 2002), and oligodendrocytes (Akiyama et al., 1999). Because citrullinated proteins were rarely located in the enzyme-positive glial cells examined with our sensitive detection method (Senshu et al., 1992), we assumed that PAD2 is normally inactive (Asaga and Ishigami, 2000, 2001; Asaga et al., 2002). However, glial fibrillary acidic protein (GFAP) was highly susceptible to the attack of PAD2 in excised rat brains deliberately left at room temperature (Asaga and Senshu, 1993). These findings provided a clue that PAD2 normally remains inactive but becomes active and citrullinates cellular proteins when the intracellular calcium balance is upset during neurodegenerative changes.

The pathological presentation of AD involves the selective death of pyramidal neurons and an accumulation of two main abnormal protein aggregates, senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles (NFTs; Katzman, 1986; Smith, 1998). Although NFTs and SPs are found in many areas of the cerebrum, they are concentrated mainly in the hippocampus and cerebral cortex. The former site actually appears to be more important, since pathological indices are first localized in that region (Maccioni et al., 2001). Our previous report indicates that levels of PAD2 are more than threefold higher in the hippocampus than in the cortex of rat brains (Asaga and Ishigami, 2000). Moreover, PAD2 activates and citrullinates various cerebral proteins under hypoxic conditions (Asaga and Ishigami, 2000) and during kainic acid-evoked neurodegeneration (Asaga and Ishigami, 2001; Asaga et al., 2002), suggesting the involvement of protein citrullination in neurodegenerative processes. The present study was therefore designed to test the hypothesis that PAD2 plays a role in AD and that citrullinated proteins

are active participants in the neurodegenerative process, particularly in the hippocampus.

MATERIALS AND METHODS

Human Subjects

Brain specimens used in this study were removed at autopsy from 10 patients with AD (seven women and three men) and nine (four women and five men) normal subjects. The subjects' demographic data are summarized in Table I. Specimens were taken from the hippocampus and divided into two parts. One part was fixed with 4% paraformaldehyde and processed for paraffin embedding. Another part was immediately frozen in dry ice. All AD patients met accepted criteria for the neuropathologic diagnosis of AD based on the National Institute of Aging (NIA)-Reagan Institute Criteria for the Neuropathological Diagnosis of AD (1997), combining abundant neuritic plaques in the neocortex (definite AD with Consortium to Establish a Registry for AD Criteria) and a profusion of NFTs in the limbic and neocortical areas (Braak and Braak stage VI). Normal subjects used as controls were individuals with no history of dementia or other neurologic disorders. Neuropathologic evaluation of control brains revealed only age-associated gross and histopathologic alterations (Braak and Braak NFT stage I and senile plaque stage 0 or A). The human studies were approved by the Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (TMIG) Review Boards.

Preparation of Tissue Samples

Frozen hippocampi of AD and control subjects' brains were homogenized in a lysis buffer (0.01 M Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1% NP-40) with a Polytron homogenizer. For sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), an aliquot of the homogenates was mixed with an equal volume of 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, and 0.005% bromophenol blue (sample buffer) and heated in boiling water for 5 min. The protein content of cell homogenates was measured by the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as a standard.

Detection of Citrullinated Proteins

Citrullinated proteins were detected by Western blotting as described previously (Senshu et al., 1992). Briefly, equal amounts of protein (10 µg/lane) were separated by SDS-PAGE on vertical slab 10% acrylamide gels (1 mm × 9 cm) by the method of Laemmli (1970). Proteins were then electrophoretically transferred from acrylamide gels onto a membrane of poly-

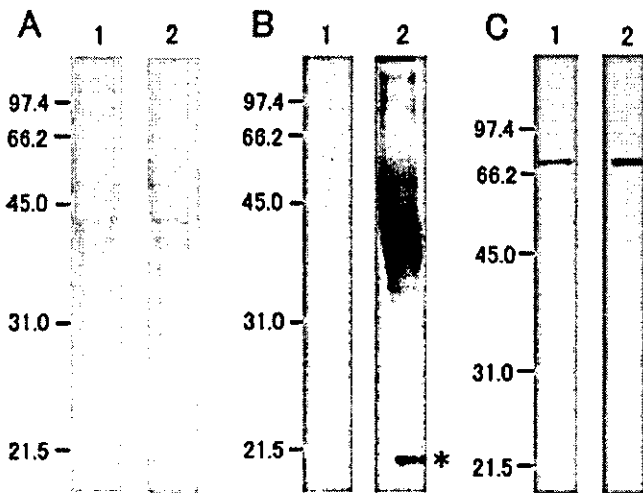


Fig. 1. Western blot analysis of citrullinated proteins and PAD2 in the hippocampus of AD and control brain. Tissue homogenates (10 μ g) were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. **A:** Typical protein profiles detected by amido black staining. **B:** Citrullinated protein profiles detected as described in Materials and Methods. **C:** Immunoreactive PAD2 profiles. Lane 1, age-matched control; lane 2, AD. Asterisks indicate the citrullinated MBP.

vinylidene difluoride (PVDF; Millipore, Billerica, MA) by the method of Towbin et al. (1979). Citrulline residues on the membrane were modified by overnight incubation at 37°C in modification medium [1 volume of 1% diacetyl monoxime/0.5% antipyrine/1 N acetic acid, and two volumes of a mixture of 85% H_3PO_4 /98% H_2SO_4 /H₂O (20/25/55) containing 0.025% FeCl_3]. The membrane was then incubated successively with antimodified citrulline IgG antibody produced in a rabbit and with purified (Senshu et al., 1992), horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad, Hercules, CA). Chemiluminescence signals were detected on Kodak XAR films with ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ).

Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Proteome Analysis

Protein extraction and two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) were performed as reported previously (Toda et al., 1998; see also <http://proteome.tmig.or.jp/2D/2DE.method.html>). Briefly, 100 mg of tissue sample were crushed in liquid nitrogen and lysed with 300 μ l of 5 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% SB3-10, 1% Pharmalyte (pH 3–10; Amersham Bioscience), 1% dithiothreitol (DTT), and 1% proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) with sonication. One hundred micrograms of protein were loaded onto gel strips with an immobilized pH gradient (pH 4–7; 18 cm; Amersham Biosciences), and isoelectric focusing was performed on a Cool-PhoreStar model 3610 (Anatech, Tokyo, Japan). After isoelectric focusing, strips were equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6 M urea, 2 M thiourea, 2% SDS, 30% glycerol, and 1% DTT for 30 min and then with the same solution containing 4% iodoacetamide instead of DTT for 30 min. Each equilibrated strip was mounted on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and fixed

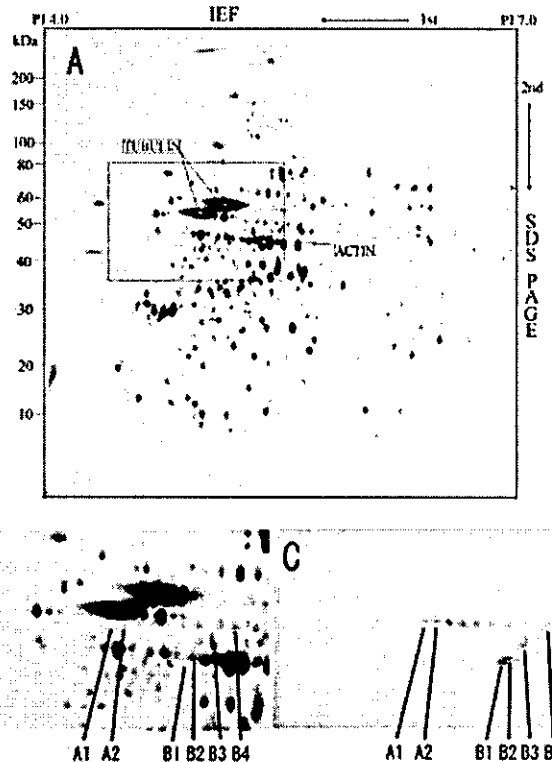


Fig. 2. Proteome analysis of citrullinated proteins in the hippocampus of AD brain. **A:** Two-dimensional protein profiles of the AD hippocampus. Proteins were separated on the basis of pI (x-axis) and molecular mass (y-axis). Spots were visualized with Sypro Ruby gel staining. IEF, isoelectric focusing. Tubulin and actin were identified by peptide mass fingerprinting and a subsequent database search. **B:** Enlarged proteins of AD hippocampus from 2-DE gels indicated as a rectangular area in A. **C:** Western blot analysis of citrullinated proteins from 2-DE gels indicated as rectangular area in A. Numbered spots were identified by mass spectrometry.

with shark-tooth combs. SDS-PAGE was performed on a vertical format using a Tricine buffer system. After second-dimension electrophoresis, gels were fixed in 10% methanol and 6% acetic acid for 30 min, and protein spots were visualized by Sypro Ruby (Molecular Probes, Eugene, OR) staining, following the manufacturer's recommendations.

A square (8 \times 8 cm) containing tubulin was cut off from the gel slab and then applied to Western blots to detect the citrullinated proteins according to the method described above, because these citrullinated proteins were previously detected at the same position of tubulin on 2-DE using minislab gel (8 \times 8 cm). At this time, the citrullinated proteins were detected by using the highly sensitive reagent ECL Advance (Amersham Bioscience). Thereafter, the protein spots visualized with Cypro Ruby and matched with the citrullinated proteins were excised with a Proteome-Works Spot Cutter (Bio-Rad) followed by in-gel digestion with trypsin according to the manufacturer's specifications. The digested peptide was directly mixed with an equal volume of 10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, and peptide mass spectra were obtained on an AXIMA-CFR MALDI-TOF-MASS (Shimadzu, Kyoto, Japan) platform. Peptide mass mapping was