

200500362A

厚生労働科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石神 昭人

平成18(2006)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	-----	5
--------------------------------	-------	---

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	-----	10
-----------------------------	-------	----

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	-----	16
-----------------------------	-------	----

久保 幸穂

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	20
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	21
-----------------	-------	----

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
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・老化制御・主任研究員

研究要旨

アルツハイマー病（AD）での特徴的な病理所見としてアミロイドベータ蛋白質（Aβ）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線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（シトルリン化蛋白質と総称）が多く出現することを初めて見出した。本研究では、シトルリン化蛋白質やシトルリン化蛋白質産生酵素（ペプチジルアルギニンデアミナーゼ；PAD）を高感度に検出するELISAシステム（酵素免疫測定法）を開発し、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。また、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か明らかにする。本年度、以下のような興味深い結果を得ることができた。

- ① アルツハイマー病の早期診断を行うELISAシステムを開発するため、PADやシトルリン化蛋白質に対する多種多様なモノクローナル抗体を作製した。PADに対するモノクローナル抗体は約30種類確立した。検出感度の高いELISAシステムを開発するため、特異性の高い固相抗体、標識抗体の組み合わせを検討中である。
- ② 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か明らかにするため、神経細胞やグリア細胞を培養し、様々な酸化ストレスによるPADの活性化やシトルリン化蛋白質の出現を解析した。PADの酵素活性発現には、高濃度カルシウムイオンを必要とする。酸化ストレスは、一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、細胞死（アポトーシス）を誘導する。アルツハイマー病の原因の一つにも挙げられる。今回、神経細胞やグリア細胞に様々な酸化ストレスを与えたところ、これらの細胞で早期にPADが誘導され、細胞死が起こる以前にシトルリン化蛋白質が出現することがわかった。これらの結果は、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の引き金となる可能性を強く示唆している。

【研究組織】

分担研究者

石神 昭人 東京都老人総合研究所・主任研究員

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アミナーゼ(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。

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に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

本年度は、アルツハイマー病の早期診断を行うELISAシステムを開発するため、PADやシトルリン化蛋白質に対する多種多様なモノクローナル抗体を作製した。PADに対するモノクローナル抗体は約30種類確立した。検出感度の高いELISAシステムを開発するため、特異性の高い固相抗体、標識抗体の組み合わせを検討中である。

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か明らかにするため、神経細胞やグリア細胞を培養し、様々な酸化ストレスによるPADの活性化やシトルリン化蛋白質の出現を解析した。PADの酵素活性発現には、高濃度カルシウムイオンを必要とする。酸化ストレスは、一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇

を引き起こし、細胞死（アポトーシス）を誘導する。アルツハイマー病の原因の一つにも挙げられる。本年度、神経細胞やグリア細胞に様々な酸化ストレスを与えたところ、これらの細胞で早期にPADが誘導され、細胞死が起こる以前にシトルリン化蛋白質が出現することがわかった。これらの結果は、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の引き金となる可能性を強く示唆している。

D. 考察および今後の課題

今年度、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の発症や進行に深く関与する可能性を強く示唆する多くのデータを得た。また、シトルリン化蛋白質を産生するペプチジルアルギニ

ンデイミナーゼ（PAD）を高感度に検出するELISAシステムも完成間近である。神経細胞やグリア細胞を用いた基礎研究からもシトルリン化蛋白質が早期細胞障害時に出現することは明らかである。従って、PAD、シトルリン化蛋白質のELISAシステムはアルツハイマー病の早期診断薬に成りうる可能性が高い（図2）。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。

シトルリン化タンパク質

ペプチジルアルギニンデヒミナーゼ (PAD) により
構成アミノ酸のアルギニンがシトルリンに変換される

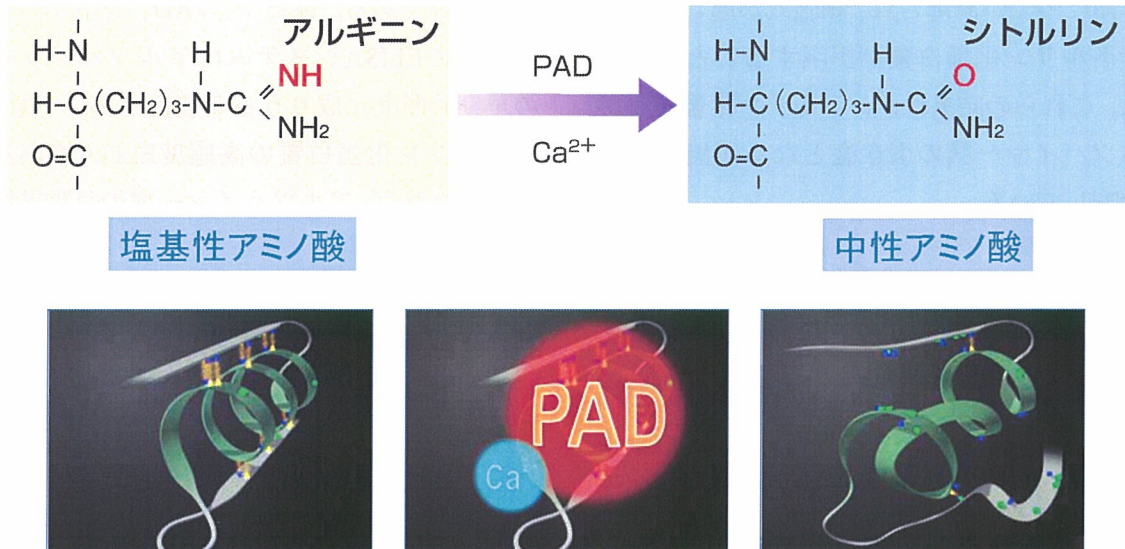
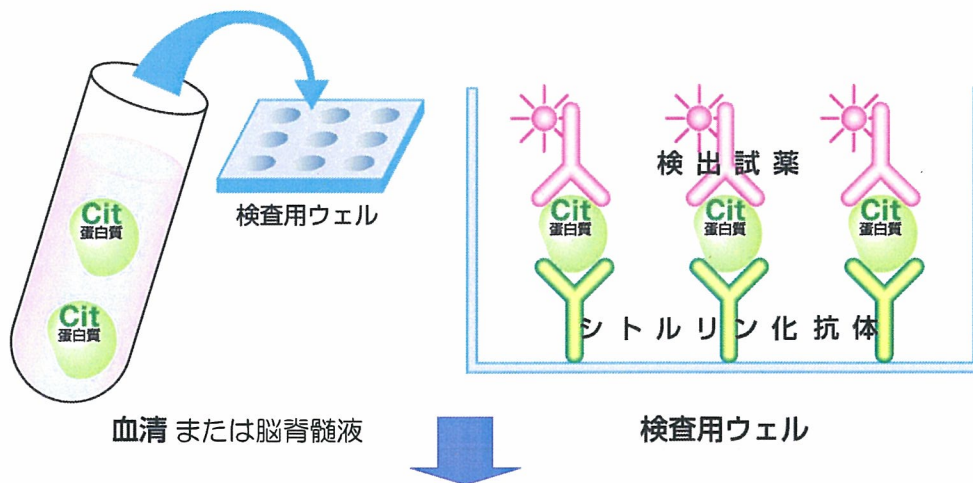


図 1

高感度臨床検査試薬の開発



アルツハイマー病の早期診断

図 2

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
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・老化制御・主任研究員

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存在している。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か明らかにするため、神経細胞やグリア細胞に様々な酸化ストレスを与えた。その結果、これらの細胞で早期にPADが誘導され、細胞死が起こる以前にシトルリン化蛋白質が出現することがわかった。これらの結果は、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の引き金となる可能性を強く示唆している。

A. 研究目的

ペプチジルアルギニンデアミナーゼ (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することを明らかにした。本研究では、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か明らかにするため、神経細胞やグリア細胞を培養し、様々な酸化ストレスによるPADの活性化やシトルリン化蛋白質の出現を解析した。更に、中枢神経系での蛋白質シトルリン化酵素の機能を明らかにするため、酵素遺伝子を破壊したノックアウトマウスの作製を行った。シトルリン化蛋白質の生成がアルツハイマー病の発症原因とするならば、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。

B. 研究方法

1. 神経細胞やグリア細胞での酸化ストレスによるシトルリン化蛋白質の誘導

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か明らかにするため、神経細胞やグリア細胞を培養し、過酸化水素や6-hydroxydopamine (6-OHDA)を添加し、酸化ストレスを与えた。この時、PADの活性化やシトルリン化蛋白質の出現を特異抗体を用いたウエスタン法や細胞染色により解析した。

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した。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った。

(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

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か明らかにするため、神経細胞やグリア細胞を培養し、様々な酸化ストレスによるPADの活性化やシトルリン化蛋白質の出現を解析した。その結果、これらの細胞で早期にPADが誘導され、細胞死が起こる以前にシトルリン化蛋白質が出現することがわかった。

また、PAD2 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製するため、PAD2の第1エクソンを欠失させた遺伝子組換え体を作製した。

D. 考察

PADの酵素活性発現には、高濃度カルシウムイオンを必要とする。酸化ストレスは、一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、細胞死(アポトーシス)を誘導する。アルツハイマー病の原因のひとつにも挙げられる。神経細胞やグリア細胞に様々な酸化ストレスを与えたところ、これらの細胞で早期にPADが誘導され、細胞死が起こる以前にシトルリン化蛋白質が出現することがわかった。これらの結果は、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の引き金となる可能性を強く示唆している。

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。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(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線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の脳では、シトルリン化蛋白質が多く存在している。神経細胞やグリア細胞に様々な酸化ストレスを与えたところ、これらの細胞で早期にPADが誘導され、細胞死が起こる以前にシトルリン化蛋白質が出現することがわかった。これらの結果は、シトルリン化蛋白質がアルツハイマー病の引き金となる可能性を強く示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.* 320 243-249 (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.* 20 761-768 (2005)

Feng, D., Imasawa, T., Nagano, T., Kikkawa, M., Takayanagi, K., Ohsawa, T., Akiyama, K., Ishigami, A., Toda, T., Mitarai, T., Machida, T. and Maruyama, N. : Citrullination preferentially proceeds in glomerular Bowman's capsule and increases in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 68 84-95 (2005)

Jung, K.J., Maruyama, N., Ishigami, A., Yu, B.P. and Chung, H.Y. : The redox-sensitive DNA binding sites responsible for the age-related down-regulation of SMP30 by the ERK pathway and its reversal by calorie restriction. *Antioxidants & Redox Signaling* (in press)

Son, T.G., Zou, Y., Jung, K.J., Je, J.H., Yu, B.P., Ishigami, A., Maruyama, N. and Lee, J. : The increased protein oxidation and the altered expression of Ca²⁺ regulatory proteins in senescence marker protein 30 deficient brain. *Mech. Aging Dev.* (in press)

Yumura, W., Imasawa, T., Suganuma, S., Ishigami, A., Handa, S., Kubo, S. and Maruyama, N. : Accelerated tubular cell senescence in

SMP30 knockout mice. *Histol. Histopathol.* (in press)

Kondo, Y., Inai, Y., Sato, Y., Handa, S., Kubo, S., Shimokado, K., Goto, S., Nishikimi, M., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Senescence Marker Protein 30 Functions as Gluconolactonase in L-Ascorbic Acid Biosynthesis and Its Knockout Mice Are Prone to Scurvy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (in press)

森貴紀、瀬山邦明、石神昭人、丸山直記、福地義之助 : Senescence marker protein-30 ノックアウトマウス. 分子呼吸器病 9 55-60 (2005)

丸山直記、石神昭人、近藤嘉高 : 老化の分子異常〜臨床検査医学への貢献. 臨床病理 53 728-734 (2005)

石神昭人、山本尚吾、田口ひろみ、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. 日本未病システム学会雑誌 11 84-85 (2005)

丸山直記、石神昭人 : 老年病におけるシトルリン化蛋白質の病態生理学的意義. 日本老年医学会雑誌 42 519-522 (2005)

丸山直記、石神昭人 : タンパク質のシトルリン化と病態. 最新医学 60 2498-2501 (2005)

2. 学会発表

石神昭人 : アルツハイマーとアトピーにひそむ謎のタンパク質. 「科学技術週間」参加行事特別講演 東京都老人総合研究所, 東京, 2005.4.21

石神昭人：加齢臓器障害発症におけるSMP30の役割解明. 第47回日本老年医学会, 東京, 2005.6.15-17

石神昭人：老化研究の基礎と応用. 日本機械学会関東支部 第12期総会 ワークショップ, 埼玉, 2006.3.10-11

井内陽子、石神昭人、丸山直記、錦見盛光：ラットグルコノラクトナーゼのSMP30としての同定. 日本ビタミン学会第57回大会, 三重, 2005.5.26-27

佐藤匡、石神昭人、佐藤安訓、丸山直記、森貴紀、児玉裕三、瀬山邦明、福地義之助：SMP30ノックアウトマウスの肺におけるカルボニル化蛋白質量の加齢変化. 第47回日本老年医学会, 東京, 2005.6.15-17

佐藤安訓、石神昭人、佐藤匡、後藤佐多良、丸山直記：SMP30ノックアウトマウスにおけるカルボニル化蛋白質の増加. 第28回日本基礎老化学会, 東京, 2005.6.15-17

近藤嘉高、石神昭人、下門顕太郎、丸山直記：SMP30はグルコノラクトナーゼである. 第28回日本基礎老化学会, 東京, 2005.6.15-17

今澤俊之、馮冬芸、田口ひろみ、町田武生、山本尚吾、久保幸穂、半田節子、石神昭人、丸山直記：腎糸球体ボウマン嚢におけるシトルリン化蛋白質の同定. 第28回日本基礎老化学会, 東京, 2005.6.15-17

青島拓也、石神昭人、高原英成、高坂哲也：マウス精子形成過程における新規蛋白質アルギニン脱イミノ化酵素(PAD6)の特異的発現とシトルリン化蛋白質の証明. 第98回日本繁殖生物学会, 静岡, 2005.9.14-16

Handa, S., Kubo, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : Senescence marker protein-30 (SMP30) protects oxidative stress. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

Kondo, Y., Inai, Y., Nishikimi, M., Shimokado, K., Maruyama, N., Ishigami, A. : Recombinant rat SMP30 protein expressed in *E. coli* using a chaperon co-expression system exhibits gluconolactonase activity. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

Sato, Y., Inai, Y., Nishikimi, M., Goto, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : SMP30-knockout mouse is a L-ascorbic acid deficiency mouse. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

Inai, Y., Sato, Y., Maruyama, N., Ishigami, A., Nishikimi, M. : *In vivo* evidence that SMP30 is gluconolactonase functioning in L-ascorbic acid biosynthesis. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

Yamamoto, S., Fukai, N., Urano, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : Oxidative stress induces citrullinated proteins in SH-SY5Y cells. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

山本尚吾、浦野四郎、丸山直記、石神昭人：SH-SY5Y細胞における酸化ストレス誘導シトルリン化蛋白質の解析. 第29回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会, 神戸, 2005.10.26-27

Kondo, Y., Shimokado, K., Maruyama, N., Ishigami, A. : Multiple functions of Senescence Marker Protein-30 (SMP30). The 7th KOREA-JAPAN Joint Symposium on Cancer

and Aging Research, Muju, Korea, 2005.11.3-5

Ishigami, A., Yamamoto, S., Kubo, S., Handa, S., Fukai, N., Yucho, Y., Taguchi, H., Saito, Y. Murayama, S. and Maruyama, N. : Citrullinated proteins and Alzheimer's disease. The Society for Neuroscience 35rd Annual Meeting, Washigton D.C., 2005.11.12-16

Kitamura, T., Enomoto, N., Matsuyama, S., Zheng, D., Ikejima, K., Takei, Y., Fujita, T., Ishigami, A., Handa, S., Mauyama, N., Satao, N. : Aging and hepatocyte apoptosis: role of senescence marker protein-30 (SMP30). Internationa Symposium on Energy Metabolism and Oxidative Stress in Liver Pathophysiology, Tokyo, 2005.11.16-17

Inai, Y., Sato, Y., Kondo, Y., Maruyama, N., Ishigami, A., Nishikimi, M. : Senescence marker protein-30 functions as gluconolactonase in ascorbic acid biosynthesis. International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005, Awaji, Japan, 2005.11.6-11

井内陽子、佐藤安訓、丸山直記、石神昭人、錦見盛光 : Senesence Marker Protein-30 (SMP30) はアスコルビン酸合成経路で働くグルコノラクトナーゼである-ノックアウトマウスを用いた証明-. 第118回ビタミンC研究委員会, 東京, 2005.11.19

近藤嘉高、佐藤安訓、井内陽子、錦見盛光、丸山直記、石神昭人 : ラットグルコノラクトナーゼのSMP30としての同定(続報). 第118回ビタミンC研究委員会, 東京, 2005.11.19

佐藤安訓、井内陽子、後藤佐多良、錦見盛光、丸山直記、石神昭人 : SMP30ノックアウトマウスにおける酸化ストレスの亢進. 第118回ビタミンC研究委員会, 東京, 2005.11.19

石神昭人、佐藤安訓、井内陽子、近藤嘉高、半田節子、久保幸穂、後藤佐多良、錦見盛光、丸山直記 : SMP30ノックアウトマウス-ビタミンC欠乏、壊血病モデルマウス-. 第126回日本薬学会, 仙台, 2006.3.28-30

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・老化制御・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、PADやその反応産物であるシトルリン化蛋白質が多く蓄積していることを明らかにした。また、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PAD2やシトルリン化蛋白質陽性であることがわかった。更に、PAD2の増加は海馬領域のみならず小脳、頭頂葉、扁桃核、橋でも起こっていることがわかった。

A. 研究目的

ペプチジルアルギニンデアミナーゼ（PAD）は、蛋白質中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する酵素である。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、扁桃核、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の役割を解明するため、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、扁桃核、視床下部、大脳皮質などでグリア線維酸性蛋白質(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(MS: multiple sclerosis)では、MBPが高度にシトルリン化していた。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した。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。PAD2についても同様に免疫組織染色を行った。

(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

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、シトルリン化蛋白質の異常な蓄積が確認された(図1、2)。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。また、シトルリン化蛋白質を産生する酵素PAD2もアルツハイマー病患者の脳で増加していることが確認された(図1、2)。

染色像を強拡大した結果、シトルリン化蛋白質、PAD2陽性細胞は、グリア細胞のひとつであるアストロサイト様の形態を示した。検証するため、アストロサイトのマーカー蛋白質であるグリア線維性酸性蛋白質(GFAP)との蛍光二重染色を行った(図3)。その結果、GFAP陽性細胞とシトルリン化蛋白質、PAD2陽性細胞が良く一致した。これらの結果は、アルツハイマー病患者の脳ではアストロサイトにPAD2が多く発現し、同細胞にシトルリン化蛋白質が多く蓄積していると考えられる。

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線維変化とシトルリン化蛋白質陽性の染色部位がよく一致した。A β やリン酸化タウがシトルリン化されているかは未だ明らかではない。

アルツハイマー病では、海馬以外にもPAD2の発現が亢進しているかを調べるため、他の部位(小脳、頭頂葉、扁桃核、橋)についてもPAD2の免疫染色を行った(図4)。その結果、調べた全ての部位で正常脳に比べてアルツハイマー病ではPAD2の発現亢進が確認された。

D. 考察

アルツハイマー病患者の脳では、PAD2とその反応産物であるシトルリン化蛋白質が多く蓄積していた。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、その結果としてシトルリン化蛋白質が生じ、蓄積したと考えられる。また、アルツハイマー病の脳でのPAD2高発現部位は海馬領域にとどまらず小脳、頭頂葉、扁桃核、橋でも起こっていることがわかった。今後、小脳、頭頂葉、扁桃核、橋でもシトルリン化蛋白質が多く蓄積しているか詳細に検討する必要がある。

E. 結論

アルツハイマー病患者の脳内には、PAD2やシトルリン化蛋白質が多く蓄積していることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.* **320** 243-249 (2005)

Yumura, W., Imasawa, T., Suganuma, S., Ishigami, A., Handa, S., Kubo, S. and Maruyama, N. : Accelerated tubular cell senescence in SMP30 knockout mice. *Histol. Histopathol.* (in press)

Kondo, Y., Inai, Y., Sato, Y., Handa, S., Kubo, S., Shimokado, K., Goto, S., Nishikimi, M., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Senescence Marker Protein 30 Functions as Gluconolactonase in L-Ascorbic Acid Biosynthesis and Its Knockout Mice Are Prone to Scurvy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (in press)

2. 学会発表

今澤俊之、馮冬芸、田口ひろみ、町田武生、山本尚吾、久保幸穂、半田節子、石神昭人、丸山直記：腎糸球体ポウマン囊におけるシトルリン化蛋白質の同定。第 28 回日本基礎老化学会，東京，2005.6.15-17

Handa, S., Kubo, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : Senescence marker protein-30 (SMP30) protects oxidative stress. 第 78 回日本生化学会，神戸，2005.10.19-22

Ishigami, A., Yamamoto, S., Kubo, S., Handa, S., Fukai, N., Yucho, Y., Taguchi, H., Saito, Y. Murayama, S. and Maruyama, N. : Citrullinated proteins and Alzheimer's disease. The Society for Neuroscience 35rd Annual Meeting, Washigton D.C., 2005.11.12-16

Kitamura, T., Enomoto, N., Matsuyama, S., Zheng, D., Ikejima, K., Takei, Y., Fujita, T., Ishigami, A., Handa, S., Mauryama, N., Satao, N. : Aging and hepatocyte apoptosis: role of senescence marker protein-30 (SMP30). Internationa Symposium on Energy Metabolism and Oxidative Stress in Liver Pathophysiology, Tokyo, 2005.11.16-17

石神昭人、佐藤安訓、井内陽子、近藤嘉高、半田節子、久保幸穂、後藤佐多良、錦見盛光、丸山直記：SMP30 ノックアウトマウスービタミン C 欠乏、壊血病モデルマウスー。第 126 回日本薬学会，仙台，2006.3.28-30

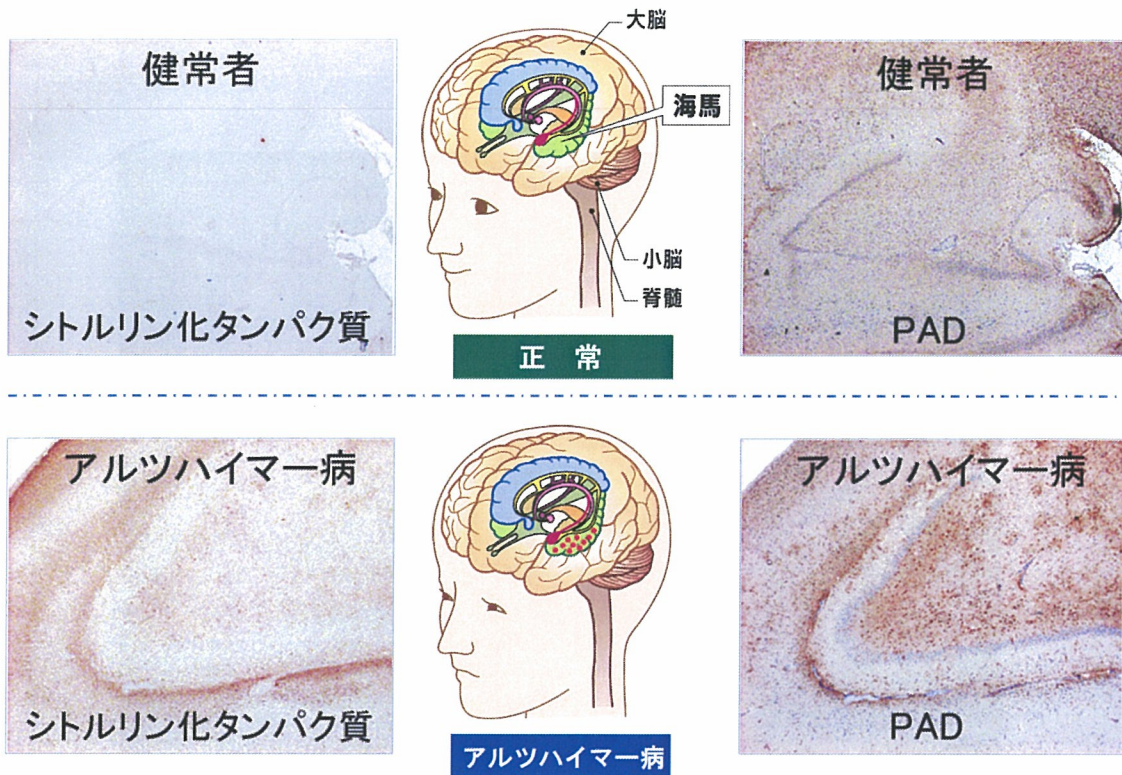
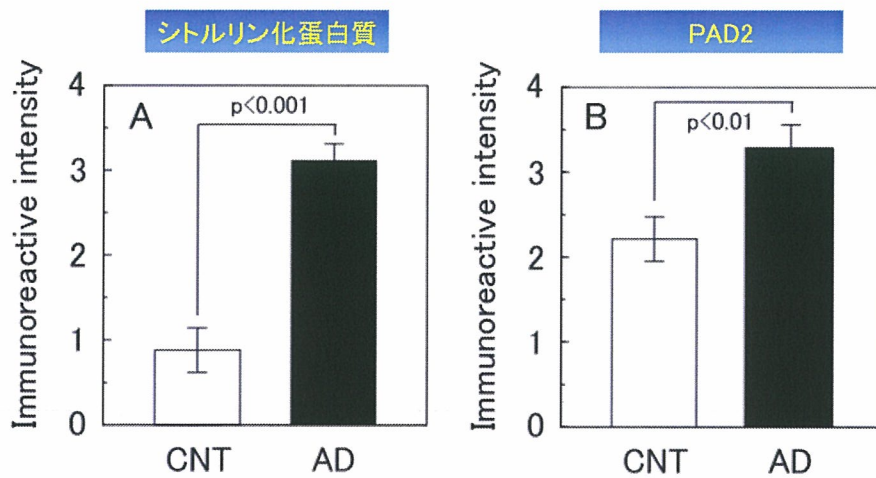


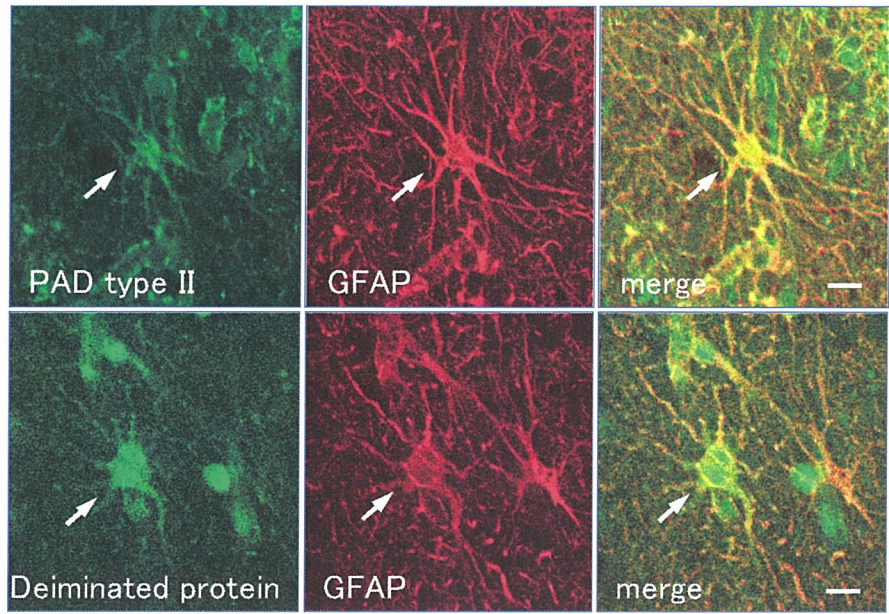
図 1

シトルリン化蛋白質とPAD2の免疫染色強度



The immunoreactivity of citrullinated proteins (A) and PAD2 (B) in the hippocampus was graded (grade 0 to 4). Values are expressed as means \pm SEM of ten AD and nine control subjects. Data were compared using Student's *t*-test.

図 2

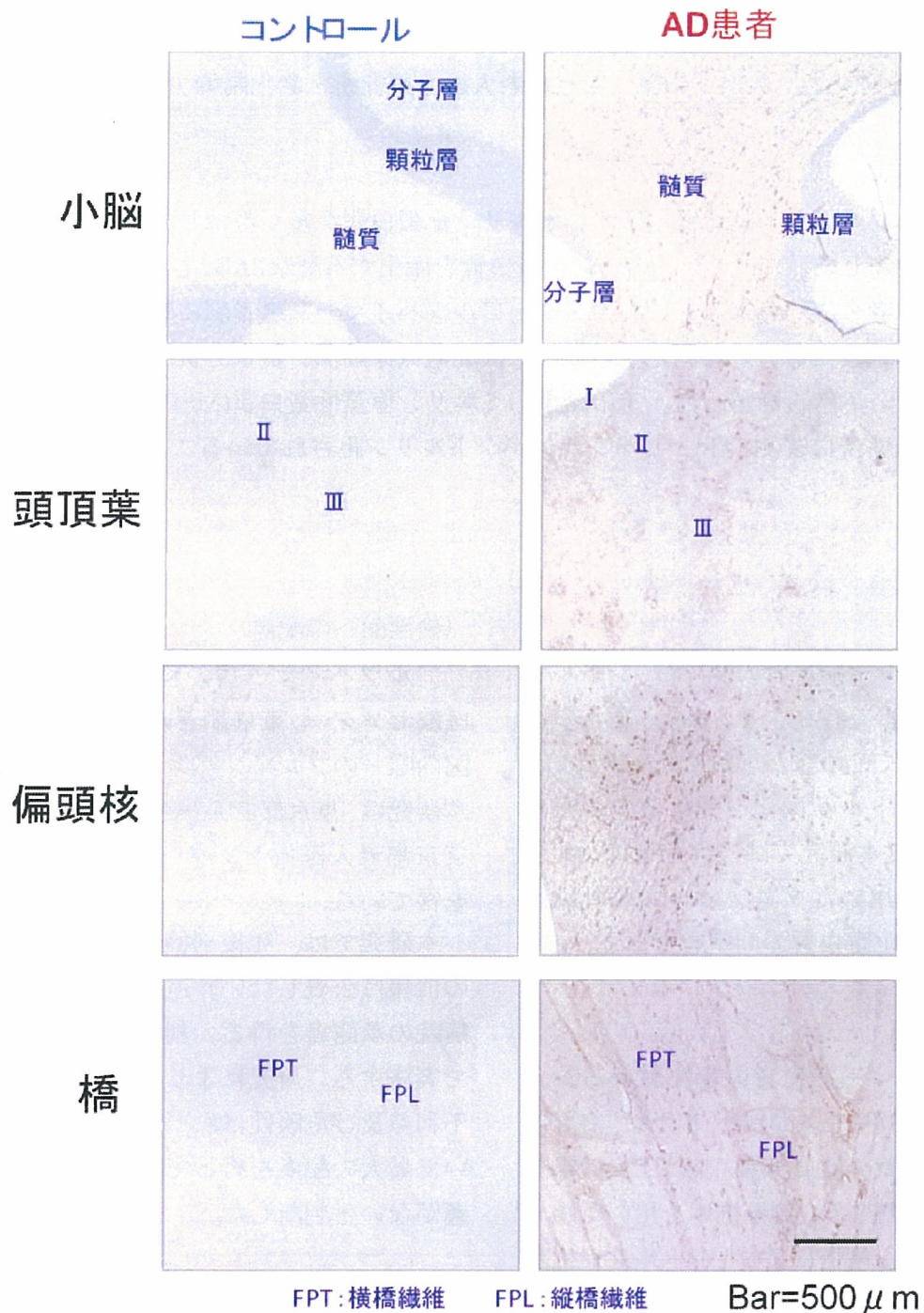


10 μ m

☒ 3

免疫組織化学染色—海馬以外の領域

AD患者脳をPAD2抗体で免疫組織染色した。



脳の各部位にPAD2が発現している。
AD脳ではPAD2が多く存在する。

図 4

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
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・老化制御・研究助手

研究要旨

アルツハイマー病患者の脳でシトルリン化蛋白質が多く蓄積していることを明らかにした。また、シトルリン化蛋白質を産生する酵素PAD2もアルツハイマー病患者の脳で増加していた。更に、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)、グリア線維性酸性蛋白質(GFAP)、ビ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、海馬領域抽出物を一次元電気泳動、又は二次元電気泳動により展開した。特異抗体を用いたウエスタンブロット解析により、シトルリン化蛋白質を検出した。更に、シトルリン化蛋白質陽性スポットを切り出し、トリプシン消化した。蛋白質の同定は島津質量分析計、Mascot Search プログラムを用いて行った。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

シトルリン化蛋白質に特異的な抗体を用いたウエスタン法による解析から、アルツハイマー病患者の脳では分子量約35-50 kDaに多くのシトルリン化蛋白質が検出された(図1)。しかし、正常脳ではシトルリン化蛋白質

質はほとんど認められなかった。一方、PAD2はアルツハイマー病患者の脳、正常脳ともに検出された(図1)。しかし、その発現量はアルツハイマー病患者の方が多かった。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)、ビメンチンであることを同定した(図2)。

D. 考察

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、グリア線維性酸性蛋白質、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。そのため、高感度シトルリン化蛋白質検出法の開発やメンブレン上での質量分析計を用いたシトルリン化部位の同定法の確立が必要である。また、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(A β)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)、グリア線維性酸性蛋白質(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., 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.* 320 243-249 (2005)

Shigemoto, K., Kubo, S., Maruyama, N., Hato, N., Yamada, H., Jie, C., Kobayashi, N., Mominoki, K., Abe, Y., Ueda, N. and Matsuda S. : Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J. Clin. Invest.* (in press)

Yumura, W., Imasawa, T., Suganuma, S., Ishigami, A., Handa, S., Kubo, S. and Maruyama, N. : Accelerated tubular cell senescence in SMP30 knockout mice. *Histol. Histopathol.* (in press)

Kondo, Y., Inai, Y., Sato, Y., Handa, S., Kubo, S., Shimokado, K., Goto, S., Nishikimi, M., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Senescence Marker Protein 30 Functions as Gluconolactonase in L-Ascorbic Acid Biosynthesis and Its Knockout Mice Are Prone to Scurvy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (in press)

2. 学会発表

今澤俊之、馮冬芸、田口ひろみ、町田武生、山本尚吾、久保幸穂、半田節子、石神昭人、丸山直記: 腎糸球体ボウマン嚢におけるシトルリン化蛋白質の同定. 第28回日本基礎老化学会, 東京, 2005.6.15-17

Handa, S., Kubo, S., Maruyama, N., Ishigami, A. : Senescence marker protein-30 (SMP30) protects oxidative stress. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005.10.19-22

Ishigami, A., Yamamoto, S., Kubo, S., Handa, S., Fukai, N., Yucho, Y., Taguchi, H., Saito, Y. Murayama, S. and Maruyama, N. : Citrullinated proteins and Alzheimer's disease. The Society for Neuroscience 35rd Annual Meeting, Washigton D.C., 2005.11.12-16

タミン C 欠乏、壊血病モデルマウス。第 126 回日本薬学会, 仙台, 2006.3.28-30

石神昭人、佐藤安訓、井内陽子、近藤嘉高、半田節子、久保幸穂、後藤佐多良、錦見盛光、丸山直記 : SMP30 ノックアウトマウス。ビ