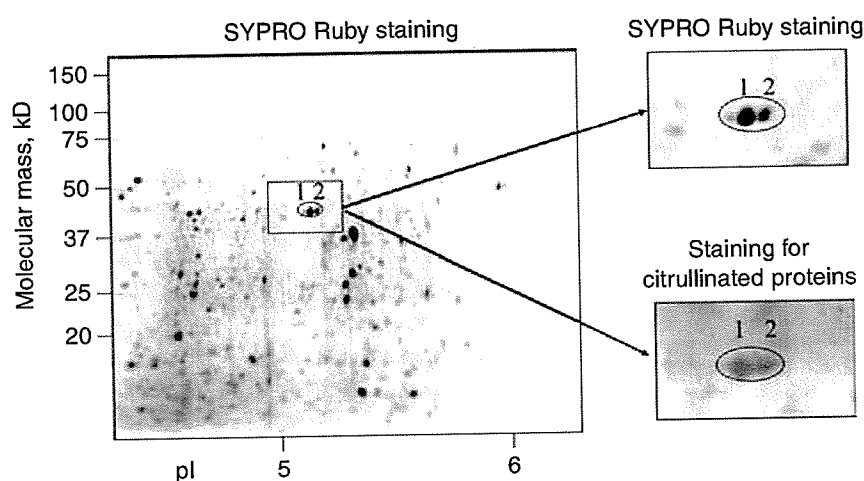


**Fig. 8.** Representative sections stained for periodic acid-Schiff (PAS) (A and B), peptidylarginine deiminases (PAD) type II (C and D), and citrullinated protein (E and F) of rats that lived with unilateral ureteral obstruction (UVO) for 5 weeks (A, C, and E) or that received operation to release the ureteral obstruction by ureter-bladder bypass 2 week after UVO operation and then lived for 4 weeks (B, D, and F). Under light microscope, although glomeruli of obstructed kidneys had thickened Bowman's capsules and cuboidal changes of parietal epithelium (A), these changes returned to normal in rats receiving bypass operation, in which parietal epithelial cells were simple and flat squamous (B). PAD type II expression was strongly observed preferentially in parietal epithelial cells around the whole Bowman's capsule of rats with UVO (C). On the other hand, parietal epithelial cell of rats with the ureter-bladder bypass expressed much less PAD type II (D). Similarly, citrullinated proteins were clearly detected preferentially in Bowman's capsules of rats with UVO for 5 weeks (E). By the ureter-bladder bypass, citrullinated proteins in Bowman's capsules were apparently decreased (F).



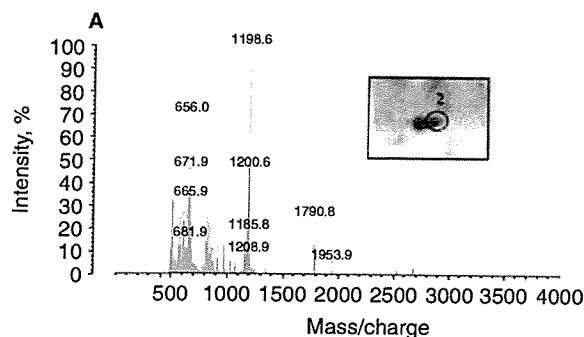
**Fig. 9.** Sypro ruby stained protein map of rat kidney with unilateral ureteral obstruction (UVO). A total of 100  $\mu$ g protein was separated using 18 cm pH 4 to 7 immobilized pH gradients (IPG) and 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The proteins were resolved by differential isoelectric point (pI) for the first dimensional running (x axis) and differential molecular weight (MW) for the second dimension (y axis). Proteins were stained with sypro ruby gel stain. To detect citrullinated protein, after sypro ruby staining of two-dimensional electrophoresis gel, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane and incubated with antibody. Two protein spots were detected (spot 1, 2). Enlarged region of sypro ruby stained two-dimensional electrophoresis gel are in right side. Sypro ruby staining is shown in the upper side and staining for citrullinated protein is shown in lower side.

the right unobstructed kidneys from UVO-treated rats scarcely expressed PAD type II, the significant increase of PAD type II only in the left obstructed kidneys (Table 1) evidently arose from the mechanical stress of ureteral obstruction, not circulating factors.

PADs catalyze the citrullination reaction, which converts protein arginine to citrulline residues in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner [11]. Possibly related is a previous report that endothelin and platelet-activating factor (PAF) act on the parietal sheet of Bowman's capsule by increasing intracellular concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  [18]. In addition, endothelin and PAF were induced by ureteral obstruction [16, 19]. On the basis of those reports, presumably intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations rise in parietal epithelial cells of Bowman's capsule after ureteral obstruction, and

this elevated concentration would be available to function with PAD type II in the increased catalysis of protein citrullination at that site (Fig. 7). Therefore, when we assessed our three groups of kidneys with Western blotting, citrullinated proteins were detected only in kidneys with ureteral obstruction (Fig. 5). Although PAD type II expression was clearly detected in cytoplasm of parietal epithelial cells, we could not decide whether citrullinated proteins were located in the parietal epithelium or the basement membrane of Bowman's capsules. In future, immunoelectron microscopy will reveal the location.

Our studies using UVO model for 1 week indicated that citrullination occurs preferentially in Bowman's capsules of the renal glomeruli and increases markedly during the course of obstructive nephropathy. Next, to



## B

## Protein identities and peptide masses

| Protein        | SWISS-PROT.<br>Accession no. | Mr (Da) | pI   | Coverage | Score | Matched masses          |
|----------------|------------------------------|---------|------|----------|-------|-------------------------|
| Actin (spot 2) | P60711                       | 42052   | 5.29 | 45%      | 123   | 976.34 2155.95 2382.83  |
|                |                              |         |      |          |       | 1198.61 1354.57 800.36  |
|                |                              |         |      |          |       | 1953.88 2295.08 3199.25 |
|                |                              |         |      |          |       | 1639.69 1629.70 1790.77 |
|                |                              |         |      |          |       | 2093.88 1580.64 1036.53 |
|                |                              |         |      |          |       | 795.59 923.43           |
|                |                              |         |      |          |       |                         |

**Fig. 10. Identification of protein spots by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight (MALDI/TOF) mass spectrometry analysis.** MALDI mass fingerprint spectrum of spot 2 was shown in the upper (A). Peptide mass fingerprinting was performed using the MASCOT search engine ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) based on the SWISS-PROT database. Results of the search are shown in the bottom. Protein spot 2 was identified as actin (B) and spot 1 was also actin [SWISS-PROT accession no. P60711 (data not shown)].

investigate whether expression of PAD type II and citrullinated proteins reflects damages of Bowman's capsules by ureteral obstruction, a ureter-bladder anastomosis to release the obstruction was made 1 week after UUO operation. Four weeks after the bypass, the appearance of Bowman's capsules returned to normal under the light microscope (Fig. 8B). On the other hand, Bowman's capsules of kidneys 5 weeks after UUO were severely thickening and had cuboidal epithelial cells (Fig. 8A). By the ureter-bladder bypass, PAD type II expression of parietal epithelial cells was significantly decreased compared with that in UUO kidneys not only for 5 weeks but also for 1 week (Fig. 8) (Table 1). Similarly, citrullinated proteins were also markedly attenuated in kidneys with the bypass compared with those in kidneys with UUO for 5 weeks and for 1 week (Fig. 8) (Table 1). These results indicate that besides being markers of Bowman's capsules, PAD type II, and citrullinated proteins can reflect the damages of Bowman's capsules. In crescentic glomerulonephritis, Bowman's capsules become similarly cuboidal. Therefore, we histologically examined rats that were induced crescentic glomerulonephritis by rabbit antglomerular basement membrane antibody to investigate whether citrullination in Bowman's capsules participates in cuboidal formation of parietal epithelial cells. Our study showed that PAD type II and citrullinated proteins were not detected in their Bowman's capsules (data not shown). Therefore, although it was speculated that increment of citrullination in Bowman's capsules should specifically occur in response to mechanical stress to glomeruli, it remains to be solved what roles citrullination in the kidney plays.

Western blotting (Fig. 5) located several sites of citrullinated proteins in the obstructed kidneys examined here. To explain the roles of citrullination in the kidney, we performed proteome analysis of these citrullinated proteins. By two-dimensional electrophoresis, two protein spots which were citrullinated were obtained (Fig. 9). Their molecular weights were approximately 40 kD although main band was present at approximately 60 kD rather than 40 kD in Western blotting for citrullinated proteins (Fig. 5). The analysis of mass fingerprint spectra of these spots at 40 kD revealed that these were actins (Fig. 10). Although we wanted to identify the 60 kD citrullinated protein, the protein could not be detected by two-dimensional electrophoresis (Fig. 9), probably caused by technical difficulties. Therefore, we think these proteome analyses are now incomplete. In future, 60 kD citrullinated proteins should be identified to explain further fundamental roles of citrullination in kidneys. Previous reports described intermediate filaments of cytoskeletal proteins such as keratin and vimentin that were also citrullinated [20, 21]. Such citrullination abolished the positive charge of protein molecules, inevitably causing significant alteration in their structure [4, 5]. Therefore, if citrullinated proteins in Bowman's capsule are cytoskeletal proteins, that would explain defense mechanism of Bowman's capsule against mechanical stress to glomeruli.

Only one suitable marker of Bowman's capsule has been reported previously [1]. Our study described here greatly extends that report by indicating that PAD type II and citrullinated proteins are preferentially expressed in Bowman's capsules and, additionally, that their

expression increases in damaged kidneys by ureteral obstruction. These newfound markers of Bowman's capsule are expected to broaden the experimental possibilities for research on kidney diseases.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Phyllis Minick for critical editing of the manuscript. We also acknowledge Dr. A. Shimizu and Dr. Y. Masuda for kindly providing tissue samples of rat anti-GBM nephritis. This study was supported a grant from the Health Science Research Grants for Comprehensive Research on Aging and Health from Ministry of Health Labor and Welfare, Japan, and a grant-in-aid for Scientific Research from Ministry of Education, Science and Culture, grant 15790436 Japan to T.I.

Reprint requests to Toshiyuki Imasawa M.D., Ph.D., Department of Internal Medicine and Division of Immunopathology, Clinical Research Center, Chiba-East National Hospital, 673 Nitona, Chuoh, Chiba, 260-8712, Japan.

E-mail: timasawa@yahoo.co.jp

## REFERENCES

- SHIRATO I, ASANUMA K, TAKEDA Y, et al: Protein gene product 9.5 is selectively localized in parietal epithelial cells of Bowman's capsule in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 11:2381-2386, 2000
- KUBILUS J, WAITKUS RF, BADEN HP: Partial purification and specificity of an arginine-converting enzyme from bovine epidermis. *Biochim Biophys Acta* 615:246-251, 1980
- ROGERS GE, SIMMONDS DH: Content of citrulline and other amino acids in a protein of hair follicles. *Nature* 182:186-187, 1958
- MOSCARELLO MA, PRITZKER L, MASTRONARDI FG, WOOD DD: Peptidylarginine deiminase: A candidate factor in demyelinating disease. *J Neurochem* 81:335-343, 2002
- STEINERT PM, PARRY DA, MAREKOV LN: Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: Multiple cross-bridging roles in the inner root sheath. *J Biol Chem* 278:41409-41419, 2003
- ISHIGAMI A, ASAGA H, OHSAWA T, et al: Peptidylarginine deiminase type I, type II, type III and type IV are expressed in rat epidermis. *Biomed Res* 22:63-65, 2001
- SHELLEKENS GA, DE JONG BA, VAN DEN HOOGEN FH, et al: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101:273-281, 1998
- SUZUKI A, YAMADA R, CHANG X, et al: Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34:395-402, 2003
- ASAGA H, ISHIGAMI A: Protein deimination in the rat brain after kainate administration: Citrulline-containing proteins as a novel marker of neurodegeneration. *Neurosci Lett* 299:5-8, 2001
- WATANABE K, SENSU T: Isolation and characterization of cDNA clones encoding rat skeletal muscle peptidylarginine deiminase. *J Biol Chem* 264:15255-15260, 1989
- TARCSA E, MAREKOV LN, ANDREOLI J, et al: The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases. *J Biol Chem* 272:27893-27901, 1997
- ISHIGAMI A, KURAMOTO M, YAMADA M, et al: Molecular cloning of two novel types of peptidylarginine deiminase cDNAs from retinoic acid-treated culture of a newborn rat keratinocyte cell line. *FEBS Lett* 433:113-118, 1998
- WATANABE K, AKIYAMA K, HIKICHI K, et al: Combined biochemical and immunochemical comparison of peptidylarginine deiminases present in various tissues. *Biochim Biophys Acta* 966:375-383, 1988
- SENSU T, SATO T, INOUE T, et al: Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane. *Anal Biochem* 203:94-100, 1992
- SENSU T, AKIYAMA K, KAN S, et al: Detection of deiminated proteins in rat skin: Probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues. *J Invest Dermatol* 105:163-169, 1995
- KLAHR S, MORRISSEY J: Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F861-F875, 2002
- ASAGA H, NAKASHIMA K, SENSU T, et al: Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *J Leukoc Biol* 70:46-51, 2001
- MARCHETTI J, MENETON P, LEBRUN F, et al: The parietal sheet of Bowman's capsule of rat renal glomerulus: A target of endothelin and PAF. *Am J Physiol* 268:F1053-F1061, 1995
- REYES AA, KLAHR S: Renal function after release of ureteral obstruction: Role of endothelin and the renal artery endothelium. *Kidney Int* 42:632-638, 1992
- SENSU T, KAN S, OGAWA H, et al: Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 225:712-719, 1996
- ASAGA H, YAMADA M, SENSU T: Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 243:641-646, 1998

## トピックス

## タンパク質のシトルリン化と病態

丸山直記\*\* 石神昭人\*

自然界にはおよそ 500 種類のアミノ酸が存在しているが、そのうちの遺伝子により規定されたわずか 20 種類のアミノ酸の組み合わせにより 10 万種類ものタンパク質を作り出す。加えて、タンパク質の翻訳後修飾は生体分子の機能の多様性を著しく増加させる。そのような翻訳後修飾の 1 つとして、最近注目されているタンパク質のシトルリン化がある。遺伝子に規定されたアミノ酸の 1 つであるアルギニンが、遺伝子に規定されないアミノ酸であるシトルリンにカルシウム依存性の酵素を介して変換され、さまざまな細胞機能や病態と関連している。この現象は、病態を把握する際の指標として応用が期待される。本稿では、その出現に生理学的側面と病理学的側面が存在していることを解説したい。

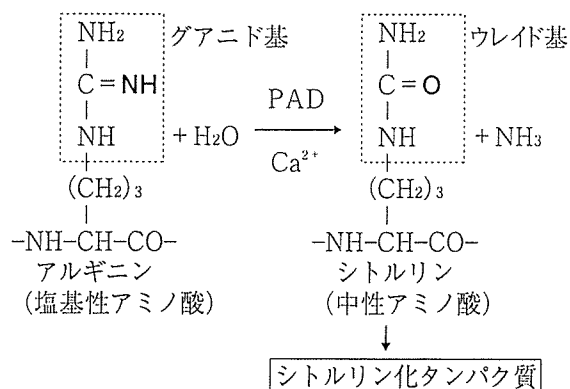
分子内のアルギニン中のグアニド基は、カルシウム依存性に酵素の peptidylarginine deiminase (PAD) によりウレイド基に変換され、シトルリンとなる (図 1)。アルギニンは塩基性であるが、シトルリンに変換した後は中性となる。その結果、シトルリン化が生じたタンパク質には大きな構造的な変化が生ずる。シトルリン化による構造変化をもたらす影響は、① 電荷と抗原性の変化、② タンパク質分解酵素に対する感受性の変化、③ 細胞構造維持の変化などが挙げられる。生体組織内におけるシトルリン化タンパク質の同定は容易ではない。シトルリンは遺伝的に規定されていないが、生体内には常に存在しているので免疫学的寛容が誘導されており、シトルリンそのものに対する抗体の作製は極めて困難である。リウマチ患者血

清には抗シトルリン化抗体が存在するので病態マーカーとなっているが、その自己抗体は免疫組織学的な応用には不十分である。我々はシトルリン特異的な化学修飾を行ったタンパク質を家兎に免疫し、特異的な抗体をアフィニティーカラムにより精製した。組織中のシトルリン残基を化学修飾した後この抗体を用いることにより、シトルリン化タンパク質の特異的な検出が可能となった (図 2)。

シトルリン化を担う酵素は PAD である。PAD はヒトでは 1 型、2 型、3 型、4/5 型、6 型の 5 種類のアイソタイプが同定されている。皮膚ではすべての型の PAD が発現しているが、他臓器では発現する PAD の型には特徴がある。しかし、2 型はほとんどすべての臓器での発現が認められる<sup>1)</sup>。

従来から関節リウマチ患者血清が扁平上皮細胞に免疫反応を示し、いわゆる抗ケラチン抗体

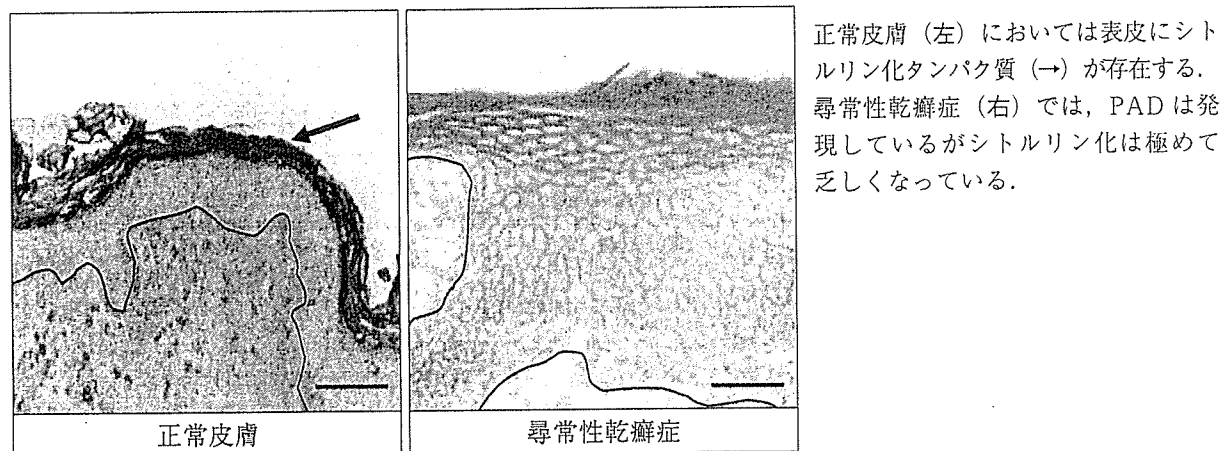
図 1 PAD によるアルギニンからシトルリンへの転換



高濃度のカルシウム存在下で PAD が活性化され、アルギニン中のグアニド基がウレイド基に変換されることにより、塩基性アルギニンが中性のシトルリンとなる。PAD: peptidylarginine deiminase

\* 東京都老人総合研究所 \*\* 同 副所長

図2 表皮形成におけるシトルリン化現象と乾癬におけるシトルリン化不全



として知られていた。そこで Serre の研究グループが表皮内の対応抗原を解析した結果、表皮中のフィラグリンが対応抗原であることが分かった<sup>2)</sup>。さらに van Venrooij グループも加わり、よりシトルリン化した分子に対する自然抗体であることを報告した<sup>3)4)</sup>。すなわち、アルギニン残基の変換により新しい抗原決定基となったシトルリン残基に対するものであった。加えて、これまで診断に用いられていた幾つかの自己抗体がシトルリン化タンパク質に対応することも報告された。例えば抗 Sa 抗体はシトルリン化ビメンチンに特異的に反応するものであった。このように従来リウマチ患者血清に認められていた自己抗体の特性は、別の観点から整理されると思われる<sup>5)</sup>。この事実は関節リウマチの診断に応用され、シトルリンを含み環状に配列した環状シトルリン化ペプチド (CCP) を抗原として自己抗体を検出すると、抗シトルリン化抗体が出現した場合の診断率は従来のリウマトイド因子が 61% であったのに比較して 87% となり、確定診断に利用できることが分かった。その後、1塩基多型 (SNP) 解析により関節リウマチと相関する遺伝子が 4/5 型 PAD であることが明らかとなり、病因解析に重要な示唆を与えた<sup>6)</sup>。特に、4/5 型 PAD の有する基質特異性と病変の関連が注目されている<sup>7)</sup>。病変と関連するシトルリン化タンパク質としてフィブリンが候補となっているが、今後の解析が期

待される<sup>8)</sup>。

シトルリン化現象が生体内で発見された当初は、シトルリン化による分子構造の変化は生理学的なものと考えられていた。代表的な事例としては、表皮の角化過程においてケラチンを束ねるフィラグリンがシトルリン化タンパク質となり、分解されて正常な表皮が形成されることが知られている (図2)。これは関節リウマチにおける抗シトルリン抗体の検出のきっかけとなった現象でもある。PAD の活性化にはカルシウムイオンが必須であるが、皮膚においては基底層から表皮に向かってカルシウム濃度が上昇することが知られている。このカルシウム濃度変化に伴い PAD が活性化されてシトルリン化が生じ、正常な表皮の角化が進行すると考えられている。マウス新生児表皮のシトルリン化を観察すると、胎児期から出産直後を経た約 72 時間の間にシトルリン化の消長が認められた。このことは、羊水に接している胎内から空気に満ちた外界に移る際に、シトルリン化が生理学的に重要な機能を有していることを示唆している。しかし皮膚疾患である尋常性乾癬では、このシトルリン化は著しく抑制されている (図2)。すなわち、保水性が高いアミノ酸を多く含んだフィラグリンのシトルリン化が強く抑制されているために分解されないことが病態の背景にあると推測されている<sup>9)</sup>。この事実は、シトルリン化を生理学的な現象と見なすものであ

る。皮膚以外では神経軸索の絶縁作用をもたらすミエリン鞘の形成に、シトルリン化が重要な役割を果たしているようである<sup>10)</sup>。すなわち、ミエリン鞘の形成時にミエリン塩基性タンパク質 (MBP) が特異的にシトルリン化を受け、タンパク質の高次構造変化をもたらす。これによりオリゴデンドロサイトやシュワン細胞でミエリン鞘の形成が行われる。この事実から、シトルリン化の異常は脱髄疾患の重要な要素とも考えられている。以上に述べたように、タンパク質のシトルリン化は神経系においても生理的な機能を持つことが明らかである。

中枢神経系にはシトルリン化酵素、主に2型 PAD が多く発現されている。この事実から、我々は中枢神経系における病態との関連を解析した。ラットにカイニン酸を投与すると神経細胞の脱落が顕著となる。その脱落部位に対応して PAD2 とシトルリン化タンパク質が出現してくる<sup>11)</sup>。この事実は、他の神経変性疾患においても同様の現象が存在することを示唆している。そのような代表的な神経変性疾患としてアルツハイマー病がある。筆者らは臨床的にも、また神経病理学的にも明確に診断された多数のアルツハイマー病患者脳を有するブレインバンクを利用する機会を得た。これらの試料より、代表的なアルツハイマー病脳 10 例と年齢等が一致する 9 例の非アルツハイマー病脳中のシトルリン化タンパク質と PAD2 の発現を比較検討した。その結果、重症のアルツハイマー病患者脳には多くのシトルリン化タンパク質が蓄積していることが明らかとなった<sup>1)</sup>。ウエスタンブロッティングの結果は、多種類の分子種がシトルリン化していることを示していた。また、海馬領域では PAD2 発現も亢進していた。他方、対照となる非アルツハイマー病患者脳でのシトルリン化タンパク質の蓄積は極めて軽度であった。海馬領域におけるシトルリン化タンパク質の局在を検討すると、分子細胞層と歯状回との間の接合部位と CA1 および CA2 領域に認められた。また PAD2 もほぼ同一部位において

発現が亢進していた。シトルリン化タンパク質および PAD2 の染色性からアストロサイトにも局在していることが示唆されたので、GFAP との二重染色を行ったところ完全に一致した。表皮の角化におけるフィラグリンに対応する脳内のタンパク質を同定するために MALDI-TOF-MS 解析を行った。その結果、多数のシトルリン化タンパク質の一部として、中間径フィラメントのビメンチンと GFAP が同定された。すでにシトルリン化されたビメンチンは中間径フィラメントの機能を失うという報告もあり、細胞機能に重要な影響をもたらすことが示唆された<sup>12)</sup>。

PAD はほぼ全身に分布し、また神経変性疾患においてシトルリン化タンパク質が重要な指標となることから、他の臓器障害においても同様の現象が出現している可能性がある。最近我々は、ラットの片側尿管を1週間結紮すると、結紮された側の腎臓にシトルリン化タンパク質の出現と PAD2 の発現亢進を認めた。その局在を検討すると、PAD2 は糸球体ボーマン嚢上皮細胞に特異的に発現亢進が認められた。また、シトルリン化タンパク質はボーマン嚢周囲の間質に検出された。しかし結紮開放後、時間が経つと次第に両者が観察されなくなったことから、病勢を反映していると思われる<sup>6)</sup>。この解析ではシトルリン化と PAD2 の発現は糸球体ボーマン嚢に限局しており、その組織特異性も極めて強く、興味深い結果である。ヒトの腎疾患でもシトルリン化タンパク質を検出することから、神経変性疾患ばかりではなく、シトルリン化が広範囲の臓器において病理的な指標となることを示唆している。

## 文 献

- 1) Ishigami A, et al: Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 80: 120-128, 2005.

- 
- 2) Simon M, et al: The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 92: 1387-1393, 1993.
  - 3) Schellekens G A, et al: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101: 273-281, 1998.
  - 4) Girbal-Neuhauser E, et al: The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 162: 585-594, 1999.
  - 5) Vossenaar ER, et al: Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 6: R142-R150, 2004.
  - 6) Suzuki A, et al: Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34: 395-402, 2003.
  - 7) Nakayama-Hamada M, et al: Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 192-200, 2005.
  - 8) Masson-Bessiere C, et al: The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific anti-filaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 166: 4177-4184, 2001.
  - 9) Ishida-Yamamoto A, et al: Sequential reorganization of cornified cell keratin filaments involving filaggrin-mediated compaction and keratin 1 deimination. *J Invest Dermatol* 118: 282-287, 2002.
  - 10) Gould RM, et al: Messenger RNAs located in myelin sheath assembly sites. *J Neurochem* 75: 1834-1844, 2000.
  - 11) Asaga H, et al: Protein deimination in the rat brain after kainate administration: citrullin-containing in cerebrum as a novel marker of neurodegeneration. *Neurosci Lett* 299: 5-8, 2001.
  - 12) Inagaki M, et al: Ca<sup>2+</sup>-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. *J Biol Chem* 264: 18119-18127, 1989.
  - 13) Feng D, et al: Citrullination preferentially proceeds in glomerular Bowman's capsule and increases in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 68: 84-95, 2005.
- 

#### Citrullinated Proteins in Diseases

Naoki Maruyama, Akihito Ishigami  
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

# 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

石神 昭人      山本 尚吾      田口ひろみ      丸山 直記\*

## 1. 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心アミノ酸であるシトルリンに変換する翻訳後修飾酵素である(図1)。蛋白質シトルリン化反応は、陽電荷が消失するため、蛋白質の高次構造に著しい変化をもたらす<sup>1)</sup>。生体内には、組織分布や基質特異性、遺伝子の異なる5種類のアイソフォーム(1, 2, 3, 4/5, 6型)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<sup>2)</sup>。5種類の中で、特に2型PAD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、他型の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<sup>3)</sup>。

最近、RT-PCR法を用いた解析により、神経細胞にも2型PADの存在が確認された。われわれは、中枢神経系における2型PADの役割を解析するため、ラットを用いて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、グリア線維性酸性蛋白質(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や、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<sup>4,5)</sup>。本研究では、ヒトの神経細胞の傷害でもPADが活性化されるかを調べるために、アルツハイマー病(AD)患者の脳について検討

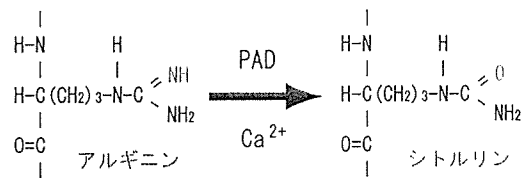


図1 ペプチジルアルギニンデアミナーゼ(PAD)によるアルギニン(塩基性)からシトルリン(中性)への変換

を行った。

## 2. 方法

AD患者および非AD者の脳(海馬領域)は、東京都老人総合研究所ブレインバンクより提供していただいた。シトルリン化蛋白質、2型PADの検出と同定は、1次元および2次元ゲル電気泳動法、ウエスタン法とMALDI-TOF mass spectrometry法を用いたプロテオーム解析により行った。免疫組織染色はジアミノベンチジンで呈色し、ヘマトキシリンで対比染色した。

## 3. 結果および考察

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、AD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2 A)。しかし、非AD者ではシトルリン化蛋白質はほとんど認められなかった。プロテオーム解析を行った結果、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)、ビメンチン、グリア線維性酸性蛋白質(GFAP)がシトルリン化されていることがわ

\*東京都老人総合研究所 老化制御



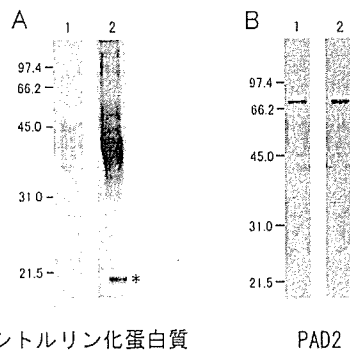


図2 シトルリン化蛋白質, PAD2のウエスタンブロット解析

レーン1: 非アルツハイマー病者の海馬領域抽出物, レーン2: アルツハイマー病患者の海馬領域抽出物。  
\*: ミエリン塩基性蛋白質(MBP)。

かった。一方, 2型PADはAD患者, 非AD者ともに検出された(図2B)。しかし, その発現量はAD患者の方が多かった。このように, AD患者の脳では2型PADが増加し, シトルリン化蛋白質が多く蓄積している。

免疫組織染色の結果, AD患者の海馬領域では, シトルリン化蛋白質が強染された(図3)。細胞の形態からアストロサイトが陽性であることがわかった<sup>6)</sup>。また, 2型PADの染色でもアストロサイトが強染された。

AD患者の脳では, 神経細胞の脱落によりグリア細胞の浸潤がみられる。2型PADはグリア細胞に多く存在し, 何らかの刺激により一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇が起こり活性化され, シトルリン化蛋白質が出現すると考えられる。今後, ADの発症初期や種々のケースについて, 系統的に解析していく必要がある。

#### 文 献

1) 石神昭人, 丸山直記: シトルリン化蛋白質と関節リウマ

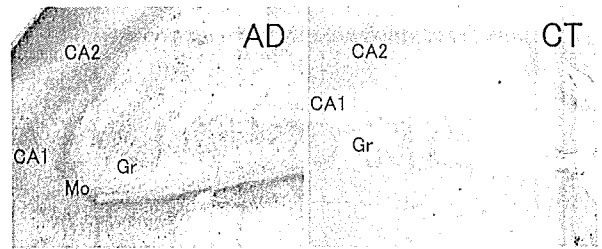


図3 アルツハイマー病(AD)患者および非アルツハイマー病者(CT)の海馬領域におけるシトルリン化蛋白質の免疫染色

チ. 医学のあゆみ 211: 253-254, 2004.

- 2) Ishigami, A., Asaga, H., Ohsawa, T. et al.: Peptidylarginine deiminase type I, type II, type III and type IV are expressed in rat epidermis. *Biomed. Res.* 22: 63-65, 2001.
- 3) Asaga, H., Akiyama, K., Ohsawa, T. et al.: Increased and type II-specific expression of peptidylarginine deiminase in activated microglia but not hyperplastic astrocytes following kainic acid-evoked neurodegeneration in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 326: 129-132, 2002.
- 4) Asaga, H. and Ishigami, A.: Protein deimination in the rat brain: generation of citrulline-containing proteins in cerebrum perfused with oxygen-deprived media. *Biomed. Res.* 21: 197-205, 2000.
- 5) Asaga, H. and Ishigami, A.: Protein deimination in the rat brain after kainate administration: citrulline-containing proteins as a novel marker of neurodegeneration. *Neurosci. Lett.* 299: 5-8, 2001.
- 6) Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M. et al.: Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 80: 120-128, 2005.

## 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

丸山 直記 石神 昭人

Key words : シトルリン化蛋白質, PAD, カルシウム, 表皮角化, アルツハイマー病

(日老医誌 2005; 42: 519-522)

## はじめに

生体分子は翻訳後に様々な修飾を受けて多様な機能を獲得する。その一方で不要な修飾を受け疾患の重要な因子ともなる。もっとも典型的な例は動脈硬化における酸化LDLや糖尿病におけるAGEなどがあげられる。加齢においても様々な生体分子の修飾が知られている。タンパク質のカルボニル化やグアニンの酸化によるSOHdGの出現などは代表的なものである。そしてこれらの加齢に伴う分子修飾は必ずしも合目的なものとは見なされていない。ところが分子内のアルギニンがpeptidylarginine deiminase (PAD)によりシトルリンに変換されたシトルリン化蛋白質には正と負の側面が報告されている。我々の研究でも生理学的な、そして病理学的なシトルリン化現象をそれぞれ見いだしている。本稿では老年病と関連するシトルリン化蛋白質について概説したい。

## シトルリン化蛋白質

蛋白質内のアルギニンを構成するグアニド基はカルシウム依存性の酵素反応によりウレイド基に変換されDNAに規定されていないアミノ酸であるシトルリンとなる(図1)。基質となるアルギニンは塩基性であり、変換したシトルリンは中性となる。この変換によりシトルリン化蛋白質には大きな変化が生じることが予想される。立体構造の変化は電荷、分子機能、蛋白分解酵素に対する感受性など多様な変化へとつながる。このシトルリン化を担う酵素がpeptidylarginine deiminase (PAD)である。PADはヒトではI型、II型、III型、IV型、VI型の5種類のisotypeが同定されている。皮膚では全て

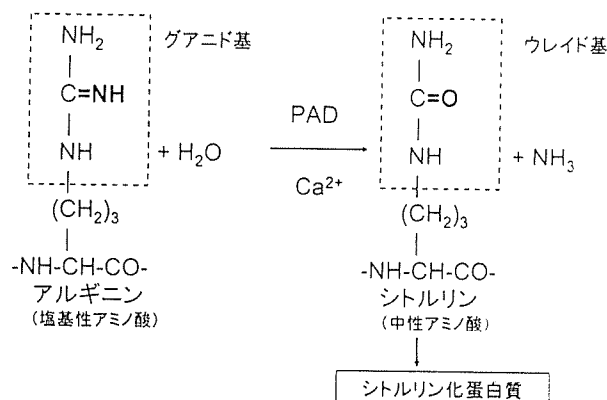


図1 PADによるシトルリン化蛋白質の形成  
高濃度のカルシウム存在下でPADが活性化されアルギニン中のグアニド基がウレイド基に変換されことにより塩基性アルギニンが中性のシトルリンとなる。

の型のPADが発現しているが他の臓器では発現するPADの型には特徴がある。しかしII型は殆ど全ての臓器での発現が認められる<sup>1)</sup>。

シトルリン化蛋白質の検出は必ずしも容易ではない。シトルリンは遺伝的に規定されていないが後述するように生理学的に存在しているので免疫学的寛容が誘導されていると思われる。シトルリンそのものに対する抗体の作製はきわめて困難である。我々はこの問題を克服するためにシトルリン特異的な化学修飾を行った蛋白質を家兎に免疫し、特異的抗体をアフィニティーカラムにより精製した。組織中のシトルリン残基も化学修飾した後、この抗体を用いて免疫染色を行うと特異的に検出が可能となった(図2)。

## シトルリン化蛋白質の生理学的機能

シトルリン化現象が生体内で発見された当初はシトルリン化による分子構造の変化は生理学的なものと考えられていた。代表的な事例としては表皮の角化過程におい

Pathophysiological significances of citrullinated proteins in geriatric diseases

Naoki Maruyama, Akihito Ishigami : 東京都老人総合研究所

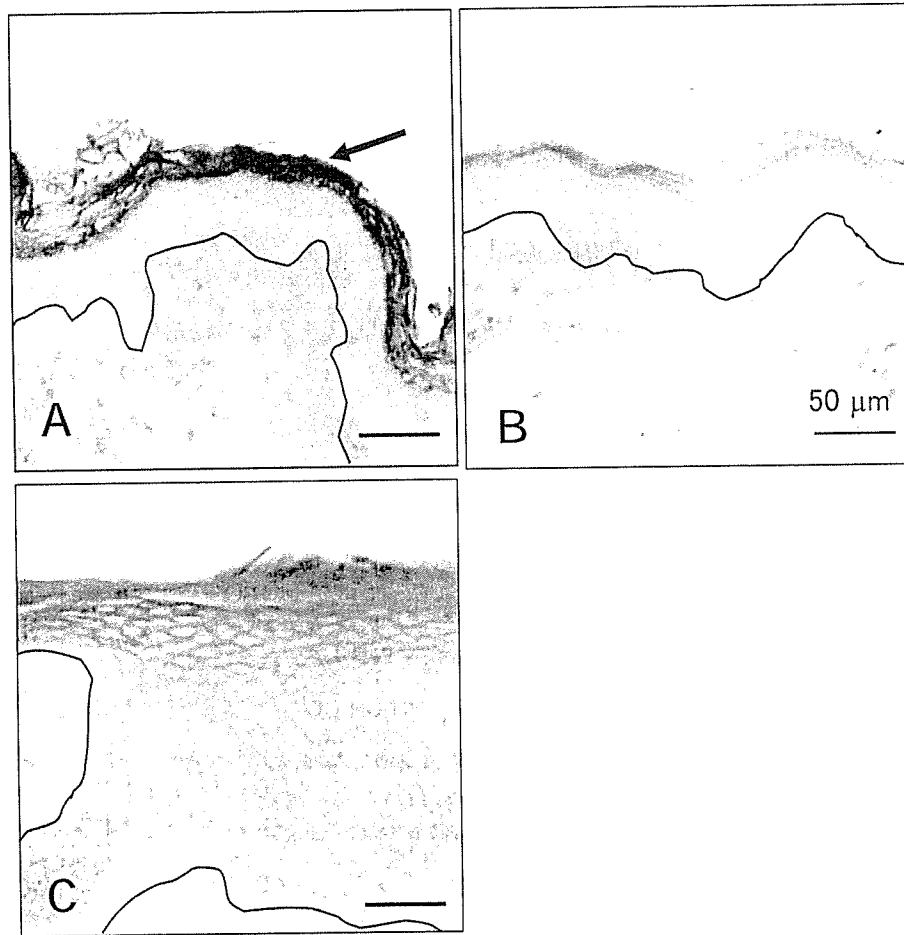


図2 表皮形成と尋常性乾癬症におけるシトルリン化現象  
 正常皮膚 (A) においては表皮にシトルリン化蛋白質 (↑) を検出できる。化学修飾しない組織 (B) では検出ができない。尋常性乾癬症 (C) ではシトルリン化は極めて乏しくなっている。

てケラチンを束ねるフィラグリンがシトルリン化蛋白質となり分解されて正常な表皮が形成されることが知られている (図2)。これは関節リウマチにおける抗シトルリン抗体の検出のきっかけとなった現象でもある。PADが活性化されるにはカルシウムイオンが必須であるが、皮膚においては基底層から表皮に向かい、カルシウム濃度が上昇することが知られている。このカルシウム濃度変化に伴いPADが活性化されシトルリン化が生じ、正常な表皮の角化が進行する。マウス新生児表皮のシトルリン化を観察すると胎児期から出産直後を経た約72時間の間にシトルリン化の消長が認められた。このことは羊水に接している胎内から空気に満ちた外界に移る際にシトルリン化が生理学的に重要な機能を有していることを示唆している。しかし皮膚疾患である尋常性乾癬ではこのシトルリン化は著しく抑制されている (図2)。すなわち保水性が高いアミノ酸を多く含んだフィラグリンのシトルリン化が強く抑制されているために分解されな

いことが病態の背景にある<sup>2)</sup>。この事実はシトルリン化を生理学的な現象と見なすものである。

皮膚以外では神経軸索の絶縁作用をもたらすミエリン鞘の形成にシトルリン化が重要な役割を果たしているようである<sup>3)</sup>。即ち、ミエリン鞘の形成時にミエリン塩基性蛋白質 (MBP) が特異的にシトルリン化を受け、蛋白質の高次構造変化をもたらす。これによりオリゴデンドロサイトやシュワン細胞がミエリン鞘をきちんと巻けるのである。この事実からシトルリン化の異常が脱髄疾患の重要な要素とも考えられている。以上に述べたように蛋白質のシトルリン化は神経系においても生理的な機能を持つことが明らかとなっている。

### シトルリン化蛋白質出現と病態

中枢神経系にはシトルリン化酵素、主にII型PAD (PAD2) が多く発現されている。この事実から我々は中枢神経系における病態との関連を解析した。ラットに

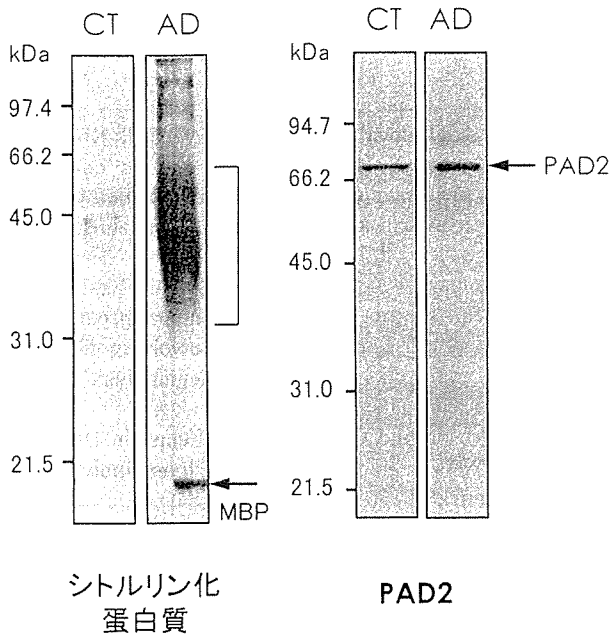


図3 アルツハイマー病脳におけるシトルリン化蛋白質の異常蓄積  
 アルツハイマー病脳 (AD) においてはシトルリン化蛋白質が幅広い分子サイズにわたり検出できる。これに対して非アルツハイマー病脳 (CT) では殆ど検出できない。MBPのシトルリン化は明瞭に観察される。PAD2は非アルツハイマー病脳 (CT) にも発現しているがアルツハイマー病脳 (AD) では発現が亢進している。

カイニン酸を投与すると神経細胞の脱落が顕著となる。その脱落部位に対応してPAD2とシトルリン化蛋白質が出現してくる<sup>4)</sup>。この事実は他の神経変性疾患においても同様の現象が存在することを示唆している。我々が扱う代表的な神経変性疾患としてアルツハイマー病がある。著者らが所属する研究所には臨床的にも、また神経病理学的にも明確に診断された多数のアルツハイマー病患者脳を有するブレインバンクがある。これらの試料より代表的なアルツハイマー病脳10例と年齢等が一致する9例の非アルツハイマー病脳中のシトルリン化蛋白質とPAD2の発現を比較検討した。その結果、重症のアルツハイマー患者脳には多くのシトルリン化蛋白質が蓄積していることが明らかとなった<sup>5)</sup> (図3)。また海馬領域のPAD2発現も亢進していた。他方、対照の非アルツハイマー病患者脳でのシトルリン化蛋白質の蓄積は極めて軽度であった。海馬領域におけるシトルリン化蛋白質の局在を検討すると molecular layer と dentate gyrus 間の接合部位と CA1 および CA2 領域に認められた。また PAD2 もほぼ同一部位において発現が亢進していた。

シトルリン化蛋白質およびPAD2の染色性からアストロサイトにも局在していることが示唆されたのでGFAPとの二重染色を行ったところ完全に一致した。表皮の角化におけるフィラグリンに対応する脳内の蛋白質を同定するためにMALDI-TOF-MASS解析を行った。その結果、多数のシトルリン化蛋白質の一部として中間径フィラメントのヴィメンチンとGFAPが同定された。既にシトルリン化されたヴィメンチンは中間径フィラメントの機能を失うという報告もあり細胞機能に重要な影響をもたらすことが示唆された<sup>6)</sup>。

PADはほぼ全身に分布し、また神経変性疾患においてシトルリン化蛋白質が重要な指標となることから他の臓器障害においても同様の現象が出現している可能性がある。高齢者の剖検時では腎硬化症が高頻度に出現するが、併せて貯留性嚢胞も発症している。最近、我々は貯留性腎あるいは水腎症のモデルとして片側尿管閉塞実験を行った。ラットの片側尿管を一週間結紮し開放すると、BUNの上昇とともに病理組織学的には正常時には扁平であったボウマン嚢上皮細胞が立方化していた。腎臓ではPAD2のみが発現しているが、Western blottingでは結紮された側の腎臓にシトルリン化蛋白質の出現とPAD2の発現亢進が認められた<sup>7)</sup>。その局在を検討するとPAD2は糸球体ボウマン嚢上皮細胞に特異的に発現亢進が認められた。片側尿管閉塞を行わない腎組織にはPAD2は殆ど認められなかった。またシトルリン蛋白質はボウマン嚢上皮よりは周囲の間質に強く認められた。しかし結紮開放後、時間が経つと次第に両者が観察されなくなったことから病勢を反映していると思われる。この解析ではシトルリン化とPAD2の発現は糸球体ボウマン嚢に局限しており、その組織特異性も極めて強く、興味深い結果である。このボウマン嚢でシトルリン化されている分子を解析したところ、その内の一つがβアクチンであることがわかった。アルツハイマー病脳に蓄積したシトルリン化蛋白質がヴィメンチンとGFAP等の中間径フィラメントであったこともあわせて考えると細胞骨格蛋白質のシトルリン化がボウマン嚢上皮細胞の立方化の要因であると思われる。以上の事実は神経変性疾患ばかりではなくシトルリン化が広範囲の臓器において病理的な指標となることを示唆している。今後、老年病の病態解明に応用されることを期待している。

### 抗シトルリン抗体と関節リウマチ

従来から関節リウマチ患者血清が皮膚に免疫反応を示すことから、表皮内の対応抗原を解析した。その結果、表皮中のフィラグリンが対応抗原であることがわかつ

た。さらに解析を行いシトルリン化した分子に対する自然抗体であることを見いだした。すなわち変換により新しい抗原決定基となったシトルリン残基に対するものであった。加えてこれまで診断に用いられていた自己抗体がシトルリン化蛋白質に対応することも報告された。例えば抗Sa抗体はシトルリン化ヴィメンチンに特異的に反応するものであった。このように従来の自己抗体の特性が別の観点から整理されると思われる<sup>9)</sup>。この事実は関節リウマチの診断に応用されシトルリンを含み環状に配列した環状シトルリン化ペプチド(CCP)を抗原に自己抗体を検出すると抗シトルリン化抗体が出現した場合の診断率は従来のリウマチ因子が61%であったのに比較して87%となり、確定診断に利用できることがわかった。その後SNP解析により関節リウマチと相関する遺伝子がIV型PADであることが明らかとなり、関節リウマチの病因に重要な示唆を与えた<sup>9)</sup>。特にIV型PADの有する基質特異性と病変の関連が注目されている<sup>10)</sup>。病変部の構成分子におけるシトルリン化はフィブリンであることも報告されているが、今後の解析が期待される。

#### おわりに

これまでの我々の研究からはシトルリン化蛋白質の出現について正負のどちらにも相応する現象が観察されている。従って、シトルリン化蛋白質の生理学的あるいは病理学的意義を統一的に説明する研究成果が望まれる。本稿において述べられた現象からは今後の幾つかの課題が出されている。最も重要な事柄は、各臓器でのシトルリン化が原因なのか結果なのかということである。またPAD活性化に至る組織傷害性のカルシウム濃度上昇の機序の解明、関節リウマチにおけるシトルリン残基に対する自己抗体とその免疫複合体による組織傷害は存在するのかという課題である。老年医学の領域においては加齢によりシトルリン化蛋白質の増加が生じるのかということも重要な課題である。そして蛋白質のシトルリン化による機能変化の解析や生体内における処理の分子メカニズムの解析も他の医学生物学的領域への貢献が期待される。以上の研究成果を基にした病的状態を把握する臨床検査医学と老年医学への応用は今後も重要な課題であ

る。

#### 文 献

- 1) Ishigami A, Ohsawa T, Asaga H, Akiyama K, Kuramoto M, Maruyama N: Human peptidylarginine deiminase Type II: Molecular cloning, gene organization and expression in human skin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002; 407: 25-31.
- 2) Ishida-Yamamoto A, Senshu T, Eady RA, Takahashi H, Shimizu H, Akiyama M, et al.: Sequential reorganization of cornified cell keratin filaments involving filaggrin-mediated compaction and keratin 1 deimination. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 282-287.
- 3) Gould RM, Freund CM, Palmer F, Feinstein DL: Messenger RNAs located in myelin sheath assembly sites. *J Neurochem* 2000; 75: 1834-1844.
- 4) Asaga H, Ishigami A: Protein deimination in the rat brain after kainite administration: citrullin-containing in cerebrum as a novel marker of neurodegeneration. *Neurosci Lett* 2001; 299: 5-8.
- 5) Ishigami A, Ohsawa T, Hiratsuka M, Taguchi H, Kobayashi S, Saito Y, et al.: Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2005; 80: 120-128.
- 6) Inagaki M, Takahara H, Nishi Y, Sugawara K, Sato C: Ca<sup>2+</sup>-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. *J Biol Chem* 1989; 264: 18119-18127.
- 7) Feng D, Imasawa T, Nagano T, Kikkawa M, Takayanagi K, Ishigami A, et al.: Citrullination preferentially proceeds in glomerular Bowman's capsule and increases in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2005; 68: 84-95.
- 8) Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, et al.: Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arth Res Ther* 2004; 6: R142-R150.
- 9) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokunishi S, Sawada T, Suzuki M, et al.: Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics* 2003; 34: 395-402.
- 10) Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, et al.: Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 327: 192-200.

---

第44回東海・北陸支部総会

---

期 日：平成17年3月6日

場 所：福井商工会議所

総会長：吉田 治義(福井大学医学部病態解析医学講座)

---

---

特別講演

---

老化の分子異常—臨床検査医学への貢献

丸 山 直 記\*<sup>1</sup> 石 神 昭 人\*<sup>2</sup> 近 藤 嘉 高\*<sup>3</sup>

---

**Molecular Abnormality in Aging  
: Its Contribution to Clinical Pathology**

*Naoki MARUYAMA, MD\*<sup>1</sup>, Akihito ISHIGAMI, PhD\*<sup>2</sup> and Yoshitaka KONDO\*<sup>3</sup>*

During a survey of age-associated changes in the liver, we discovered a novel protein SMP30. SMP30 expression decreased with aging due to oxidative stress. We studied the effects of SMP30 on the plasma membrane calcium pump. SMP30 enhances its activity. This finding suggests that the decrease of SMP30 with aging induces cellular frailty and various injuries. This frailty is one of the critical factors in the development of senescence. To elucidate its role in senescence we established a knockout. Its life span was shorter than the wild type. The enzymatic functions of SMP30 have been reported. SMP30 is an organophosphatase. SMP30 is also gluconolactonase having natural substrates. This activity is associated with the pentose phosphate pathway and the ascorbic acid synthesis pathway. These findings indicate the pivotal role of SMP30.

Another contribution of gerontology to clinical pathology is citrullination. Citrullinated proteins are the products of post-translational modification of the arginine residues to citrulline, catalyzed by a peptidylarginine deiminase (PADs) in a calcium ion-dependent manner. We detected abnormal accumulation of citrullinated proteins in the Alzheimer disease (AD) hippocampus, but not in the normal brain. Two of the citrullinated proteins were identified as a vimentin and GFAP. Type II PAD expression was enhanced in the AD brain. Citrullinated protein could be a useful hallmark of organ injuries. The physiological aspect of citrullinated proteins was also recognized in epidermal differentiation. The normal epidermis contains citrullinated proteins but not the epidermis affected by psoriasis. This finding suggests that the citrullination is critical for skin differentiation. The findings observed in this aging study may contribute to clinical pathology.

[Rinsho Byori 53 : 728~734, 2005]

\*<sup>1</sup>Department of Molecular Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015

---

\*<sup>1-3</sup> 東京都老人総合研究所(〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2)

【Key Words】 aging(老化), Senescence Marker Protein-30 : SMP30(加齢指標蛋白質-30), citrullin(シトルリン), peptidylarginine deiminase : PAD(脱イミノ化酵素)

ある年齢を過ぎると老化は自分にとって差し迫った問題となる。しかし、その様相には個体差が大きいことに気がつくだろう。この個体差が大きいことは老化の重要な特徴である。すなわち個体差をもたらすことは言い換えると老化が多面的(pleiotropic)な現象であり、数多くの要因が関与している証左である。その多数の要因から最も重要と推定される要因を同定し、解析することは老化に伴う臓器機能の低下抑制や、老年病の予防に貢献し、健康寿命の延伸をもたらす。さらに老化という複雑な現象の解明は他の医学・生物学領域にとって大きな貢献が期待できる。このような観点から老化研究の過程で発見された分子 SMP30 とシトルリン化蛋白質が臨床検査医学への応用へとつながる可能性を紹介したい。

### I. 加齢指標蛋白質 SMP30

老化抑制蛋白質 SMP30 は肝臓での発現量が加齢に伴い減少することからプロテオーム解析により発見された分子量約3万の分子である(Fig. 1)。加齢に伴い発現量が変化する分子の中から、この分子が注目されたのは、多くの分子は雄でのみ発現低下が認められるが、この分子の減少には雌雄差が無いためであった。分子量が約30~34kDであることから Senescence Marker Protein-30(SMP30)と命名した<sup>1)</sup>。

その後、多くの動物種の SMP30 がクローニングされたが、その分子構造は細菌、酵母を含めた殆ど全ての動物種間で高度に保存されており、重要な機能を有することが推定されていた。しかし発見当初は機能を示唆するようなドメイン構造は報告されておらず機能が不明であった。著者等の発見後に他の研究グループがカルシウム結合蛋白質としての SMP30 のクローニングを報告した。しかし現在までの我々の研究では SMP30 がカルシウム結合能を有するという確実な結果は得られていない。この報告を元に SMP30 の機能、特に細胞内カルシウム濃度の維持について解析を行った。その結果 SMP30 は細胞膜カルシウムポンプの活性を亢進し、結果的にアポトーシスを抑制することが明らかとなった<sup>2)3)</sup>。この機能は細胞に外的な傷害がもたらされた場合に細胞死に至る閾値を高めるものである。加齢に伴う SMP30 は高齢者における臓器障害の一因となっている可能性が示唆されている。

SMP30 分子の生物学的意義を解析する目的で著者等は SMP30 ノックアウトマウスを作製した。この SMP30 ノックアウトマウスは短寿命で、腫瘍、炎症、出血などが認められず高度の羸瘦を呈しており明確な死因が特定できなかった<sup>4)</sup>。しかし SMP30 欠損マウスには外的および内的な原因による細胞・

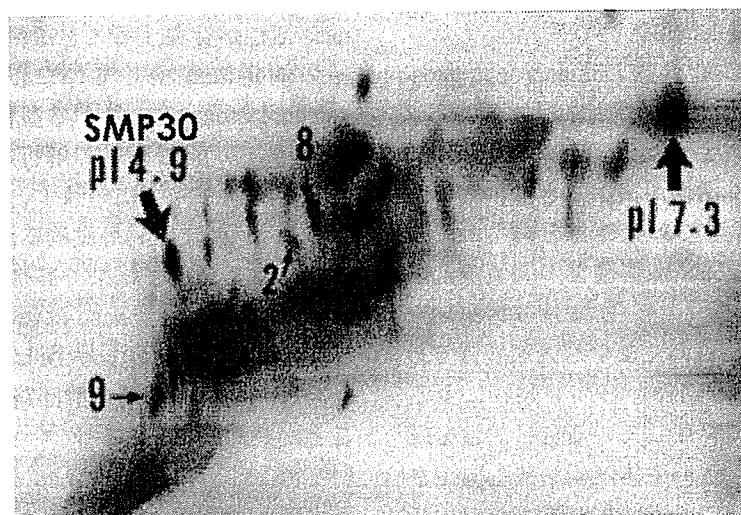
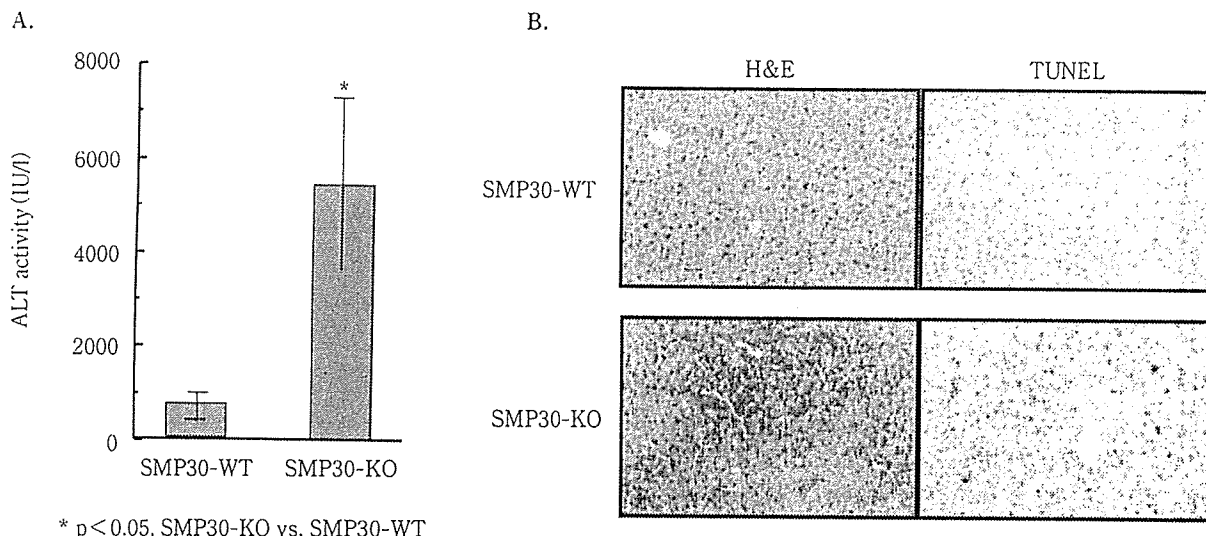


Figure 1 Discovery of SMP30 by proteomic analysis.

Soluble proteins from rat liver were analyzed by two dimensional gel electrophoresis. pI4.9 molecule was identified as a novel molecule, SMP30.



**Figure 2** Enhanced sensitivity to anti-Fas antibody in SMP30 knockout mouse liver.

Sublethal amounts anti-Fas antibody were applied to wild type and SMP30-knockout mice. Significant increase of serum ALT activity was observed in SMP30-knockout mouse (A). Massive hemorrhage and TUNEL positive cells were prominent in SMP30-knockout mouse liver (B).

臓器障害に対する閾値が低いことが明らかとなった。野生型マウスに傷害を発生しない程度の抗 Fas 抗体を SMP30 欠損マウスに投与すると著明な出血とアポトーシス陽性細胞が認められた (Fig. 2)<sup>5)</sup>。この事実は加齢に伴う SMP30 の減少は細胞膜カルシウムポンプの機能不全をもたらし、高齢者における臓器障害の背景となることが示唆された。

細胞膜機能における SMP30 の役割に加えて他の機能を有することも報告された。我々の発見後に LaDu 等は SMP30 がサリンなどの有機リン化合物を分解することを報告した<sup>6)</sup>。著者等は精製ラット SMP30 を用いて有機リン化合物の diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) 分解活性を検討したところ 2 価陽イオン存在下で強い活性を示した。また SMP30 欠損マウス肝臓では全く活性が検出できないところから唯一の DFP 分解酵素であることを明らかにした<sup>7)</sup>。この事実は加齢に従い臓器傷害の閾値が低下することを示唆している。しかしながらサリンや DFP 等の有機リン化合物はあくまでも人工基質であり、SMP30 遺伝子が下等動物から高等動物に至るまで高い相同性を有して存在している合目的性を説明できない。ところが最近、生体内の基質も同定され始めた。臨床検査試薬にも用いられるルシフェリンはホタルの体内においてルシフェラーゼにより酸化ルシフェリンに変化するが、中間体である 2-cyano-6-hydroxybenzothiazole を経てルシフェリンに

再生する。五味等はこの中間体に変換する酵素がホタル SMP30 (LRE) であることを報告した<sup>8)</sup>。しかしホタルの発光器内に含まれる SMP30 量は全身 SMP30 量の 1% とされることから、より重要な酵素作用を有することが推定される。著者等が SMP30 を発見した当時には全く相同性を有する分子のクローニングが報告されていなかった。最近、著者等は改めて相同性の検索を行ったところ藍藻 gluconolactonase がラット SMP30 との相同性を有することが明らかとなった。高等動物においても gluconolactonase 活性が存在することは報告されていたが酵素分子の同定に成功していなかった。著者等は藍藻 gluconolactonase に対する基質を用いて精製ラット SMP30 での酵素活性の解析を行った。その結果、基質特異性は完全に一致することが明らかになった。これは SMP30 が高等動物における gluconolactonase であることを示す結果である。生体内代謝マップにおける gluconolactonase は極めて示唆的な位置に存在している (Fig. 3)。大別してアスコルビン酸合成経路とペントースリン酸回路の双方に位置していることが特徴的である。アスコルビン酸合成経路においては SMP30 は L-gulonate から gulonolactone への転換酵素である。そして gulonolactone は L-ascorbic acid (ビタミン C) の前駆体である。ヒトの細胞内ではビタミン C は生合成できないがマウスでは合成されている。従来からビタミン C は抗酸化作用を介し



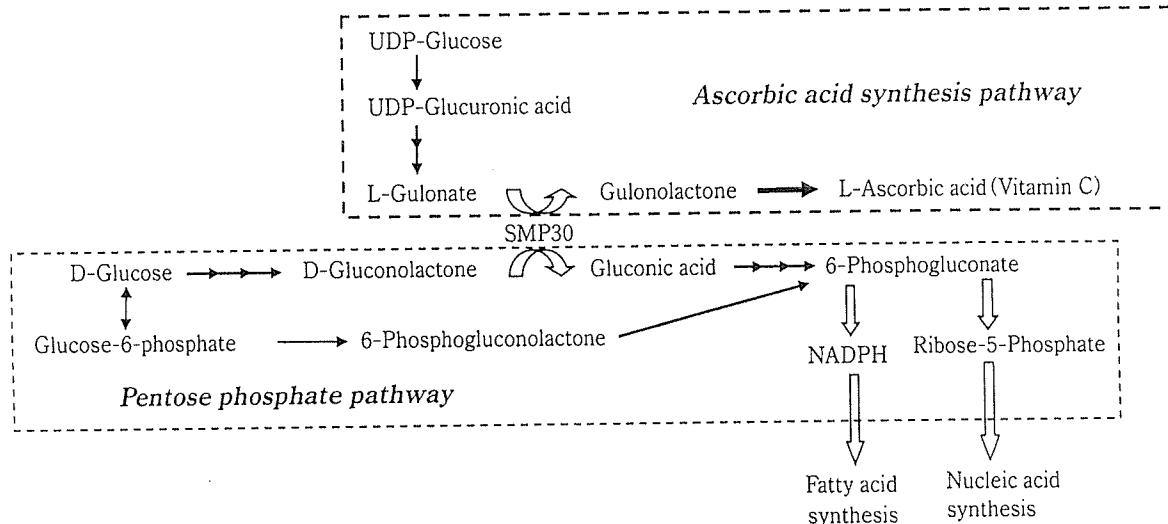


Figure 3 Location of SMP30 enzymatic activity in metabolic map.  
SMP30 plays a role in both ascorbic synthetic pathway and pentose phosphate pathway.

て老化抑制機能を示すことが報告されてきた。我々の結果は老化抑制に関するビタミンCの役割を改めて認識させるものである。もう一方のペントースリン酸回路においてはSMP30はD-gluconolactoneをgluconic acidに転換する機能を有する。この経路におけるSMP30の存在もまた老化における医学生物学的意義を強調するものである。D-gluconolactoneは酸化glucoseのアナログでありD-gluconolactoneを実験的にラットに大量投与すると糖尿病マーカーのHbA1cが増加することが報告されている<sup>9)</sup>。またこの代謝マップの下流には核酸合成や脂肪酸合成の経路が存在しており、今後の解析が期待される。

老化研究から導かれたSMP30分子の発見と機能解析によりSMP30の減少や欠損が臓器傷害の閾値が低下させ老化病態をもたらすと考えられる。著者等は試験的にヒトの血清中のSMP30量を測定した。その結果は加齢に伴い減少していることが明らかである(Fig. 4)。現在、臨床検査試薬への応用を目指して、より高感度の測定系を開発しており、SMP30の定量化は老化を「測る」可能性を示唆すると同時に疾患の理解に貢献することを期待している。

## II. シトルリン化分子

老化研究から導かれたもう一つの分子異常の病態生理学的意義を紹介したい。近年、関節リウマチの診断に抗シトルリン抗体の検出が有意義であることが報告されている。分子中に存在する塩基性のアルギニンから中性のシトルリンへの変換に伴いチャー

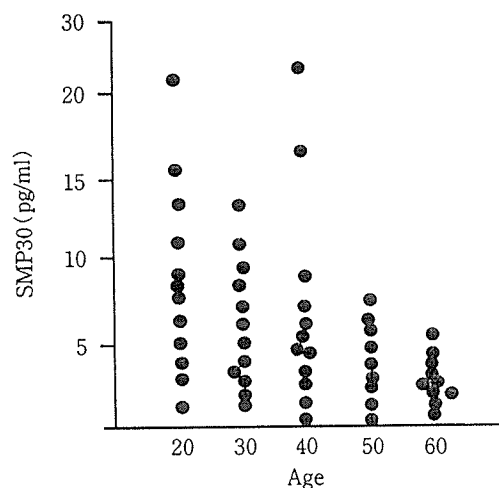


Figure 4 Age-associated decrease of SMP30 in human sera.

Amounts of serum SMP30 in various aged donors were evaluate by conventional assay system.

ジが変化し、その結果、分子構造の大きな変化が生じて抗原特異性が認識されるのである。この変換をカルシウム依存性に担うのがペプチジルアルギニンデミネース(PAD)である(Fig. 5)<sup>10)</sup>。シトルリン化蛋白質の意義を考察する上で、我々は一見、相反した研究成果を得ている。その一つは表皮の分化におけるシトルリン化蛋白質の意義である。例えば表皮角化の過程ではケラチンを束ねるフィラグリンがシトルリン化蛋白質となり、その結果として正常な表皮が形成されると考えられる<sup>11)</sup>。しかし尋常性乾癬

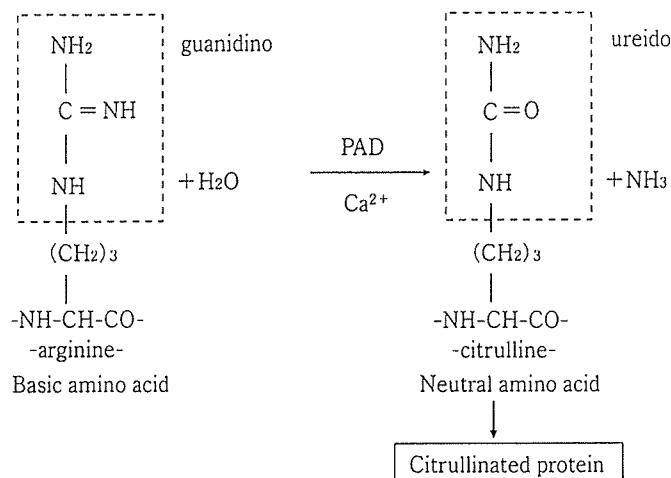


Figure 5 Action of PAD.

Peptidylarginine deiminase (PAD) converts arginine to citrulline residue in the presence of calcium ion. The deimination of arginine residues results in citrullinated proteins.

ではこのシトルリン化は著しく抑制されている (Fig. 6)<sup>12)</sup>。このフィラグリン蛋白には親水性アミノ酸が多く含まれておりプロフィラグリンのプロセッシングが充分に行われない場合には皮膚の保水性が低下して、皮膚乾燥に至ると考えられている。この事実は表皮におけるシトルリン化を生理学的な現象とするものである。皮膚以外でも神経ミエリン鞘が形成される際に MBP がシトルリン化されることが必要であるとする報告もある。これもまたシトルリン化の生理学的意義を支持する者である。

一方、病的なシトルリン化も著者等は経験している。例えばカイニン酸を脳内投与により海馬におけるシトルリン化分子が増加していることを報告した。さらにヒトの脳の変性疾患について解析を行った。我々はアルツハイマー患者脳と同年齢の他の疾患で死亡した患者脳を用いてシトルリン化蛋白質の比較を行った。その結果、アルツハイマー病患者脳海馬領域においてはアストロサイト内の分子が著しくシトルリン化されているが、対照の非アルツハイマー病患者脳では極めて軽度であることが明らかとなった (Fig. 7)<sup>13)</sup>。特にアストロサイトにおいてシトルリン化が顕著であることも見出した。さらにシトルリン化された蛋白質はヴィメンチンと GFAP であることをプロテオーム解析により同定した。同時にこのシトルリン化を担う PAD の発現がアルツハイマー患者脳で亢進していた。今後は神経変性疾患における PAD の活性化やシトルリン化蛋白質の検出が臨床病理学的に応用されることが期待される。このよ

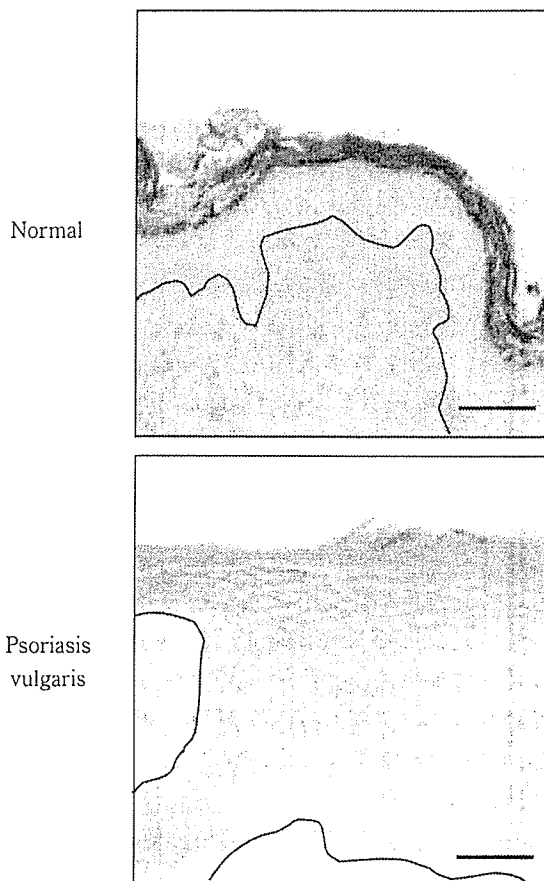


Figure 6 Presence of citrullinated proteins in cornified epidermis of normal skin.

In normal epidermis citrullinated protein is significantly prominent. In contrast definitive citrullination is hardly recognized in epidermis from a psoriasis vulgaris patient.

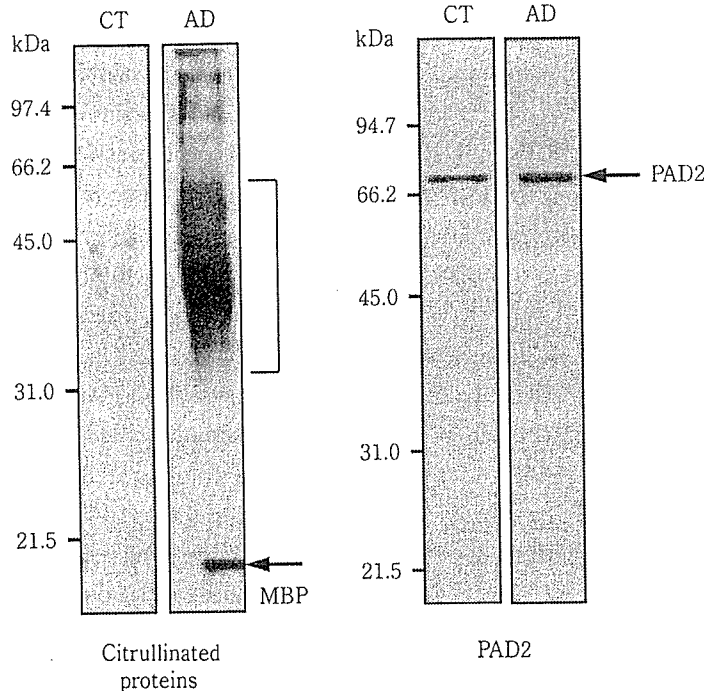


Figure 7 Abnormal accumulation of citrullinated protein in the Alzheimer disease-affected brain.

Abnormal accumulation of citrullinated proteins was observed in the AD-affected brain. There is no accumulation of citrullinated protein in the brain of age-matched controls (CT). Type II PAD (PAD2) was also increased in Alzheimer's disease.

うな現象はシトルリン化が中枢神経系ばかりではなく他の臓器にも生じることが我々の実験により明らかにされている。ラットの片側腎の尿管を閉塞すると糸球体ボウマン嚢内の分子がシトルリン化されることを観察した<sup>14)</sup>。これまであまり注意が払われなかったボウマン嚢上皮細胞の重要性を示唆する発見となっている。PADがほぼ全身に分布していることも併せて、以上の事実はシトルリン化が現象は広範な臓器傷害に認められる可能性を示唆している。著者等はシトルリン化蛋白質の生理学的あるいは病理学的意義の双方を経験した。今後はその意義の統一的な解釈が求められている。

老化という多面的な現象の解析から導き出された2つの分子の異常は他の生物学的現象の解明に大きな貢献をする可能性を含んでいる。それは同時に医学への応用も示唆しており、2つの分子異常に関した臨床検査試薬の開発が進行している。

#### 文 献

1) Fujita T, Uchida K, Maruyama N. Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver.

Biochimica et Biophysica Acta 1992; 1116: 122-8.

- 2) Fujita T, Inoue H, Kitamura T, Sato N, Shimosawa T, Maruyama N. Senescence marker protein-30 (SMP30) rescues cell death by enhancing plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-pumping activity in Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 374-80.
- 3) Inoue H, Fujita T, Kitamura T, Shimosawa T, Nagasawa R, Inoue R, et al. Senescence marker protein-30 (SMP30) enhances the calcium efflux from renal tubular epithelial cells. *Clin Exp Nephrol* 1999; 3: 261-7.
- 4) Ishigami A, Kondo Y, Nanba R, Ohsawa T, Handa S, Kubo S, et al. Senescence marker protein-30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 575-80.
- 5) Ishigami A, Fujita T, Handa S, Shirasawa T, Koseki H, Kitamura T, et al. Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to TNF- $\alpha$ - and Fas-mediated apoptosis. *Amr J Pathol* 2002; 161: 1273-81.
- 6) La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-

- Parmo S, Sorenson RC, et al. On the physiological role (s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120: 379-88.
- 7) Kondo Y, Ishigami A, Kubo S, Handa S, Gomi K, Hirokawa K, Kajiyama N, et al. Senescence marker protein-30 is a unique enzyme that hydrolyzes diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) in the liver. *FEBS Lett* 2004; 570: 57-62.
- 8) Gomi K, Hirokawa K, Kajiyama N. Molecular cloning and expression of the cDNAs encoding luciferin-regenerating enzyme from *Luciola cruciata* and *Luciola lateralis*. *Gene* 2002; 294: 157-66.
- 9) Lindsay RM, Smith W, Lee WK, Dominiczak MH, Baird JD. The effect of delta-gluconolactone, an oxidised analogue of glucose, on the nonenzymatic glycation of human and rat haemoglobin. *Clin Chim Acta* 1997; 263: 239-47.
- 10) Ishigami A, Ohsawa T, Asaga H, Akiyama K, Kuramoto M, Maruyama N. Human peptidyldeiminase Type II: Molecular cloning, gene organization and expression in human skin. *Arch Biochem Biophys* 2002; 407: 25-31.
- 11) Ishigami A, Asaga H, Ohsawa T, Akiyama K, Maruyama N. Protein deimination and peptidylarginine deiminase expression during cornification of rat epidermal keratinocytes. *Biomedical Research* 2002; 23: 145-51.
- 12) Ishida-Yamamoto A, Senshu T, Takahashi H, Akiyama K, Nomura K, Iizuka H. Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 701-5.
- 13) Ishigami A, Ohsawa T, Hiratsuka M, Taguchi H, Kobayashi S, Saito Y, et al. Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2005; 80: 120-8.
- 14) Feng D, Imasawa T, Nagano T, Kikkawa M, Takayanagi K, Ishigami A, et al. Citrullination preferentially proceeds in glomerular Bowman's capsule and increases in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 68: 84-95.
-