

# 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性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、扁桃核、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

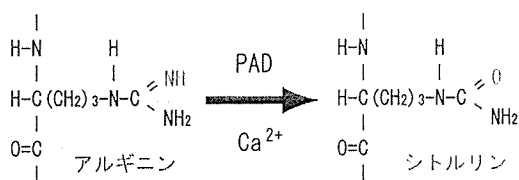


図1 ペプチジルアルギニンデアミナーゼ(PAD)によるアルギニン(塩基性)からシトルリン(中性)への変換

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

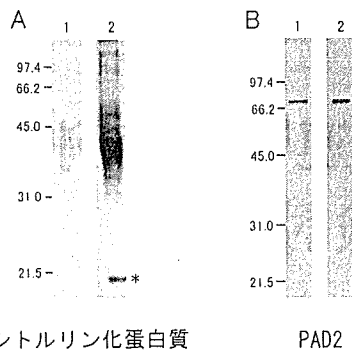


図2 シトルリン化蛋白質, PAD2のウエスタンブロット解析

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

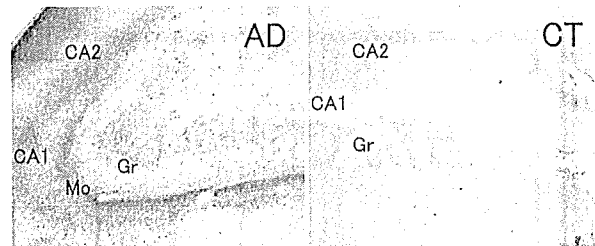


図3 アルツハイマー病(AD)患者および非アルツハイマー病患者(CT)の海馬領域におけるシトルリン化蛋白質の免疫染色

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8OHdG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

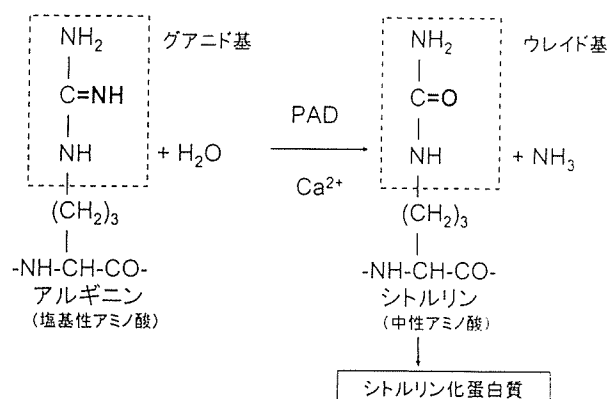


図1 PADによるシトルリン化蛋白質の形成  
高濃度のカルシウム存在下でPADが活性化されアルギニン中のグアニド基がウレイド基に変換されことにより塩基性アルギニンが中性のシトルリンとなる。

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

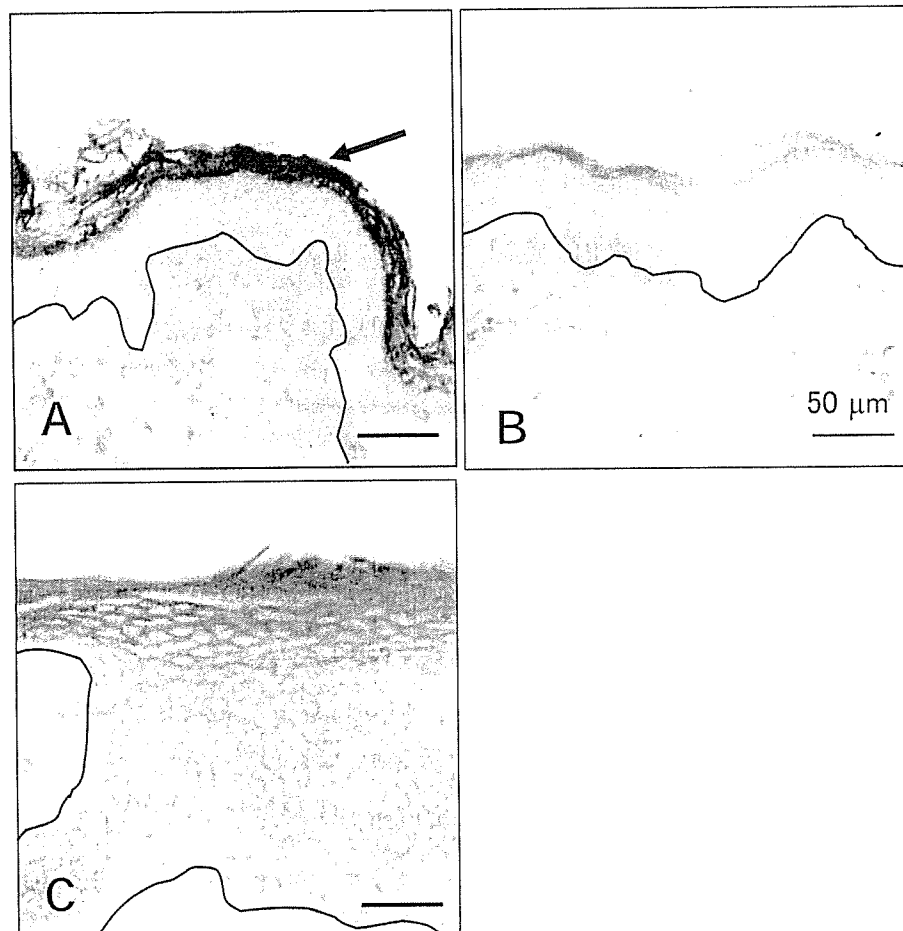


図2 表皮形成と尋常性乾癬症におけるシトルリン化現象  
 正常皮膚 (A) においては表皮にシトルリン化蛋白質 (↑) を検出できる。化学修飾しない組織 (B) では検出ができない。尋常性乾癬症 (C) ではシトルリン化は極めて乏しくなっている。

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

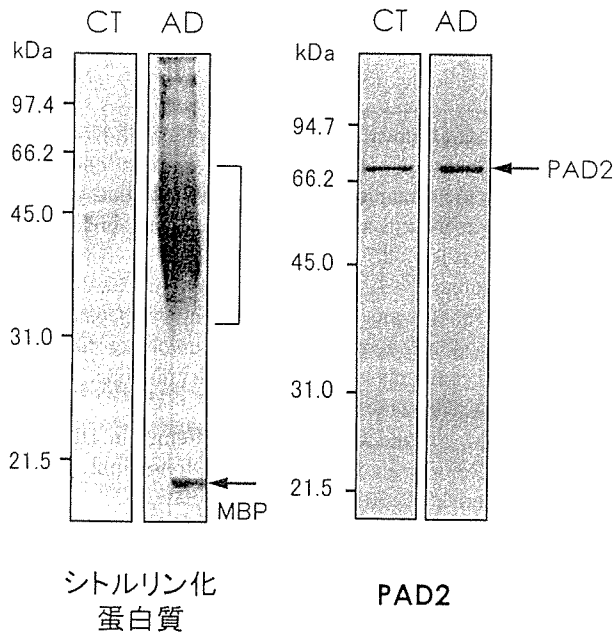


図3 アルツハイマー病脳におけるシトルリン化蛋白質の異常蓄積

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。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っ

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>8)</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, Tokuhira 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\*1 石 神 昭 人\*2 近 藤 嘉 高\*3

---

Molecular Abnormality in Aging  
: Its Contribution to Clinical Pathology

*Naoki MARUYAMA, MD\*1, Akihito ISHIGAMI, PhD\*2 and Yoshitaka KONDO\*3*

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]

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

---

\*1~3 東京都老人総合研究所(〒173-0015 東京都板橋区柴町 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見えられた分子 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 30~34 kD 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・

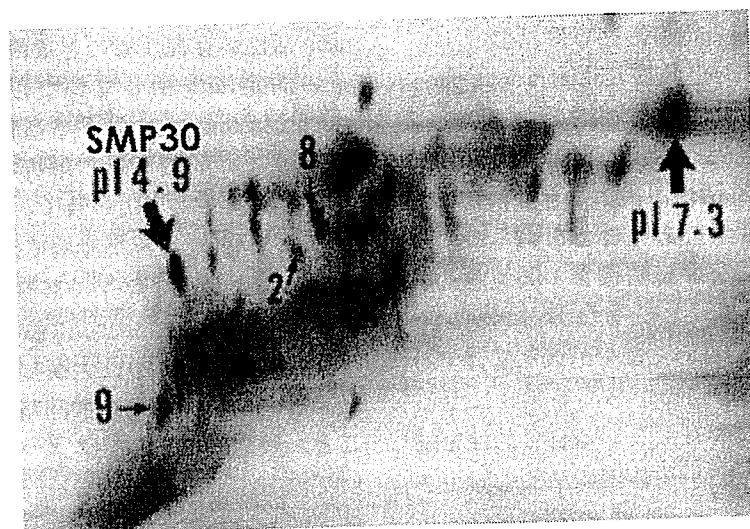
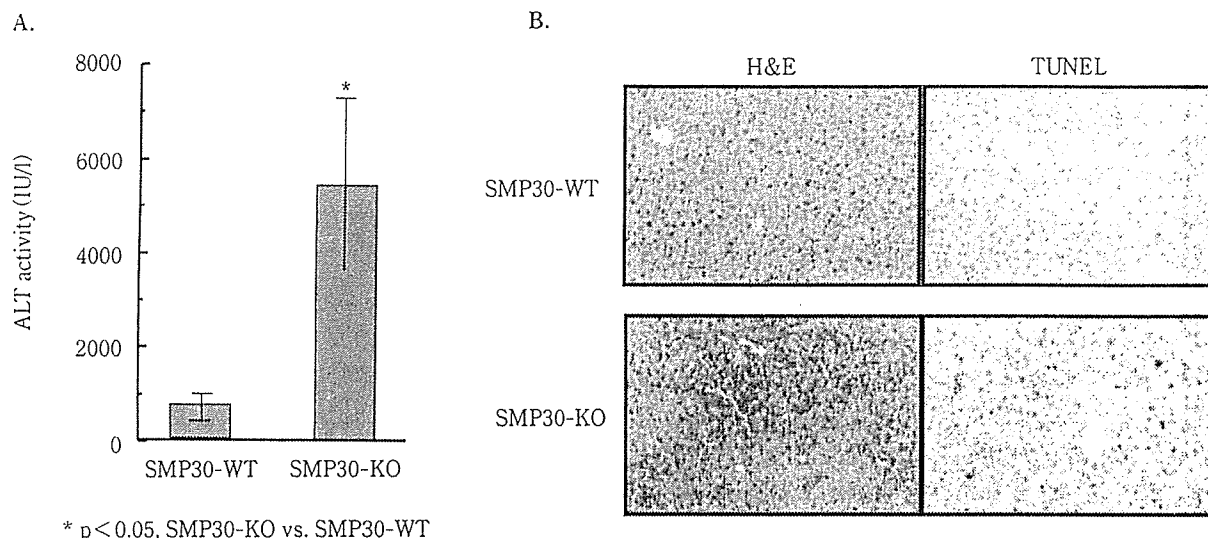


Figure 1 Discovery of SMP30 by proteomic analysis.

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

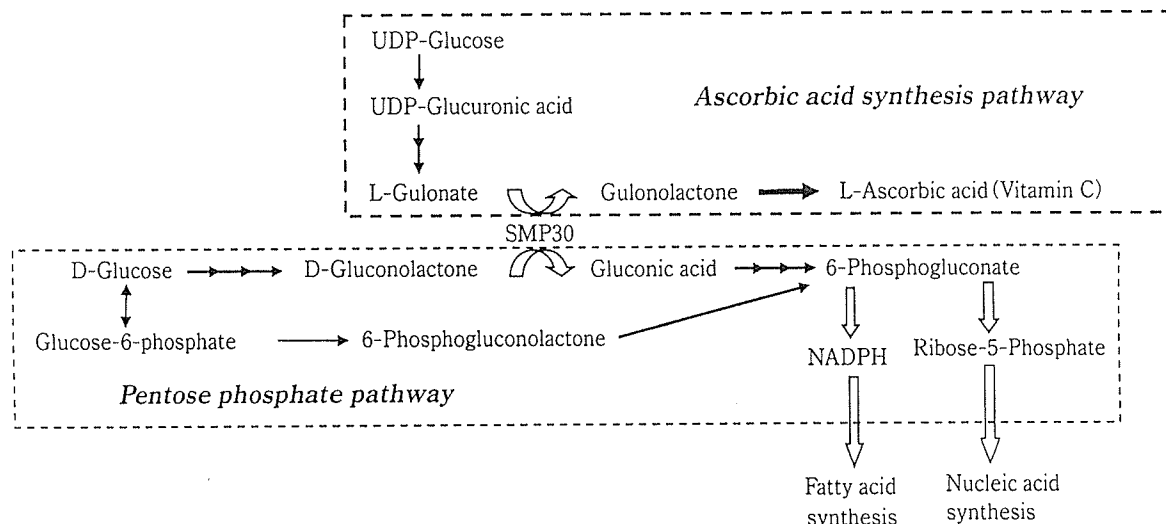


Figure 3 Location of SMP30 enzymatic activity in metabolic map.  
SMP30 plays a role in both ascorbic synthetic pathway and pentose phosphate pathway.

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

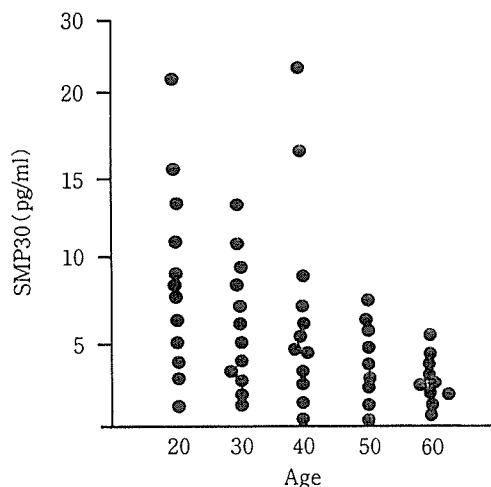


Figure 4 Age-associated decrease of SMP30 in human sera.

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イミネース (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

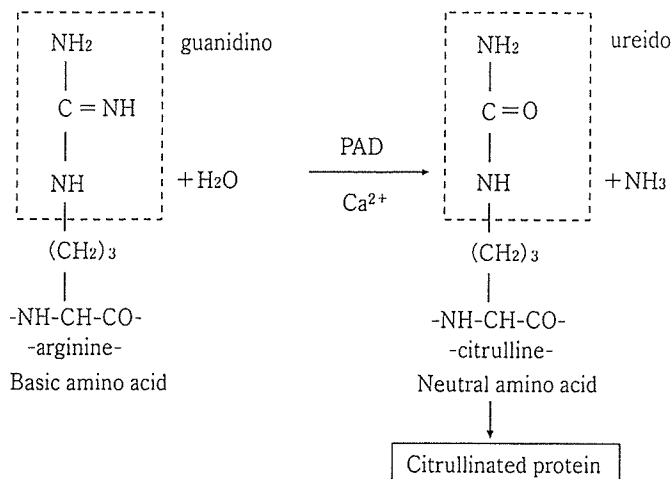


Figure 5 Action of PAD.

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

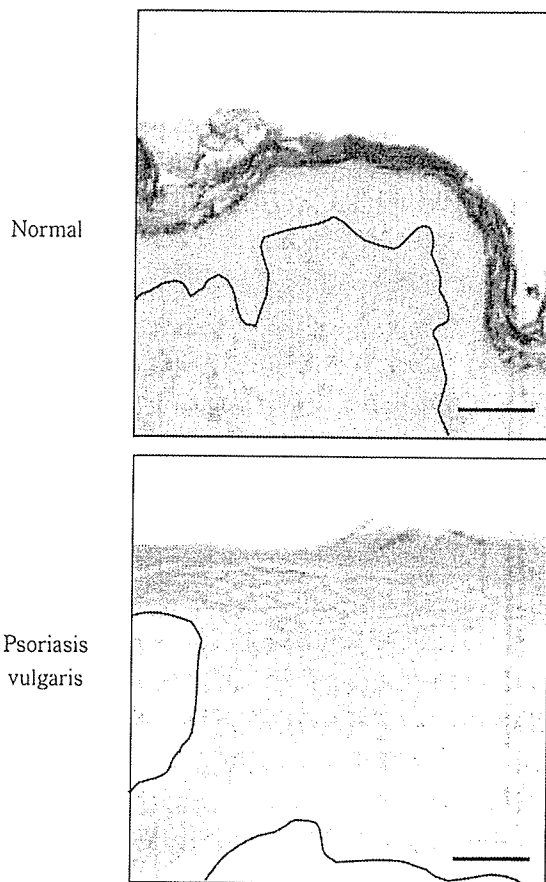
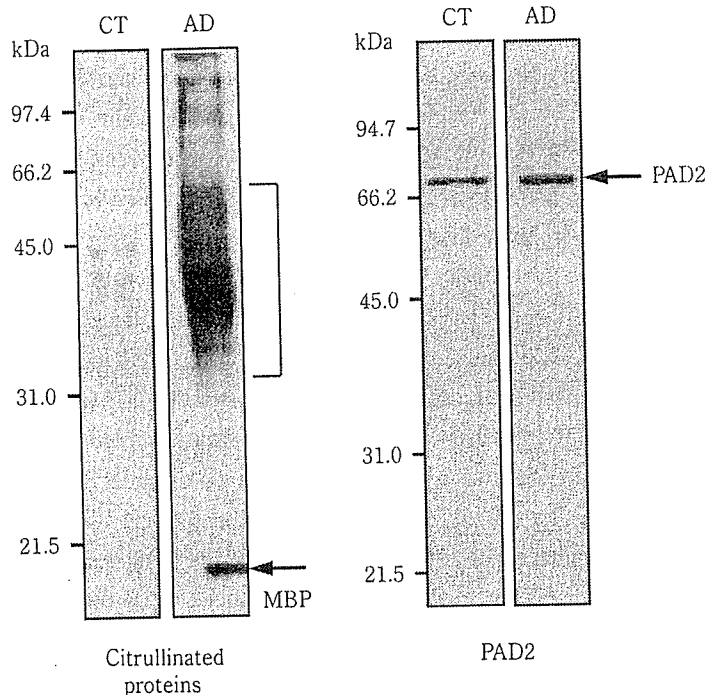


Figure 6 Presence of citrullinated proteins in cornified epidermis of normal skin.

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つの分子異常に関する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  $Ca^{2+}$ -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.
-

免疫学

# シトルリン化蛋白質と関節リウマチ

*Citrullinated protein and rheumatoid arthritis*

関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)は、全身の関節が腫れて痛み、関節の破壊をもたらす自己免疫疾患のひとつである。RAは30~50歳代に多く発症し、女性の罹患率は男性のその4~5倍であり、加齢とともに罹患率が上昇する。RAの原因として以前より、遺伝要因・環境要因の両方が関与していると考えられていた。最近、1遺伝子多型(single nucleotide polymorphism: SNP)を用いたホールゲノム疾患関連遺伝子解析により、RA発症の遺伝要因の一端が明らかになってきた。

## シトルリン化フィラグリン抗体の発見

従来より、RA患者の血清中に含まれる自己抗体として rheumatoid factor(RF), anti-keratin (AKA), anti-perinuclear factor (APF), anti-Sa 抗体や軟骨、または関節膜蛋白に対する抗体の存在が知られている。これらのなかで、RFはもっとも一般的な血清マーカーとして使用されているが、特異性が低く、感染症や健康な高齢者などでも陽性に出ることがある。RFに比べてAKAは90%以上の高い診断特異性を示す。AKAは1979年にラット上皮組織を蛍光染色した結果、表皮細胞に存在するケラチンとして同定された。その後のエピトープ解析により、AKAはケラチンではなく、ケラチン線維を束ねる作用をもつフィラグリンであることがわかった。表皮角化の最終段階においてフィラグリンは、高分子量前駆体、プロフィラグリンとして合成され、細胞質中のケラトヒアリン顆粒に蓄えられる。角化の間、プロフィラグリンは、リン酸化、脱リン酸化、プロテアーゼ消化により、

分子量37,000の機能的塩基性フィラグリンユニットとして遊離される。さらに、これら塩基性フィラグリンユニットは、二次的修飾として蛋白質中のアルギニンがシトルリンに変換されることにより塩基性が失われ、中性フィラグリンとなる。この反応は、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)という酵素により仲介される<sup>1)</sup>(図1)。

1998年、1999年にオランダとフランスの研究グループがあいついで、AKA抗体がシトルリン化フィラグリンを特異的に認識していると報告した<sup>2,3)</sup>。さらに、いまままで別の抗原と考えられていたAPFとAKAは、実は同じシトルリン化フィラグリンであることも判明した。

## RA関連遺伝子の同定

2003年に理化学研究所、東京大学、三共株式会社の共同研究グループは1遺伝子多型を用いたホールゲノム疾患関連遺伝子解析により、RA発症の原因遺伝子のひとつがペプチジルアルギニンデイミナーゼタイプ4(PADI4)であることを報告した<sup>4)</sup>。これはシトルリン化フィラグリンがRAの自

己抗原である先の結果を強く支持する。生体内で生じるシトルリン化蛋白質は免疫系から異物として認識され、それに対する自己抗体が産生される。Schellekensら<sup>2)</sup>は、フィラグリンの配列からシトルリンを含むペプチドを合成し、RA患者血清との反応性を調べた。その結果、合成ペプチドに対する抗体はRA患者血清の76%に存在し、96%の特異度を示した。さらに、この合成ペプチドを環状にした抗原は直線状よりも感度が高いこともわかった。近年、ヨーロッパでは環状合成シトルリンペプチド(CCP)を抗原とした関節リウマチの血清診断法が臨床応用され、感度70~80%、特異度95~99%と優れた検出成績をあげている。

## 今後の展望

ペプチジルアルギニンデイミナーゼは、はじめに発見された表皮を含む幅広い組織で発現が認められる。また、滑膜ではタイプ2とタイプ4の発現が報告されている。一方、フィラグリンは表皮特異的に発現し、滑膜には存在しない。したがって、シトルリン化フィラグリンがRAの真の自己抗原である可能性は低いと考えられる。シトルリン化フィラグリンとよく似たエピトープをもつ別のシトルリン化抗原の存在が示唆される。Masson-Bessiereら<sup>5)</sup>は、血中

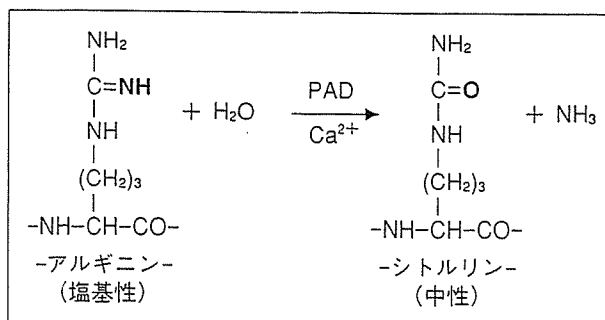


図1 ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)によるアルギニンからシトルリンへの変換  
酵素活性発現にカルシウムイオンを必要とする。ヒトでは遺伝子の異なる5種類(タイプ1, 2, 3, 4, 6)の存在が知られている。

のシトルリン化フィブリン $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖が自己抗原であると報告している。しかし、RA に対する特異度はシトルリン化フィラグリンに比べてかなり低い。

今後、真に病因と関連するシトルリン化抗原が明らかになれば、RA 発症の詳細なメカニズムが解明され、診断や治療に大きく貢献するであろう。

- 1) Ishigami, A. et al. : Human peptidylarginine deiminase type II : molecular cloning, gene organization, and expression in human skin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 407 : 25-31, 2002.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) Masson-Bessiere, C. et al. : The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains of fibrin. *J. Immunol.*, 166 : 4177-4184, 2001.

石神昭人, 丸山直記 /

Akihito ISHIGAMI and Naoki MARUYAMA  
東京都老人総合研究所 加齢臓器障害研究グループ

シングし、その NS4A 領域の 54 残基のアミノ酸の中心領域(21~30 アミノ酸)が NS3 セリンプロテアーゼ活性増強に必要かつ十分な部位であることが明らかにされている。この NS4A の中心領域は NS3 蛋白と強固なヘテロダイマーを形成していることも、1996 年に X 線結晶化解析から明らかとなっている<sup>1)</sup>。

以上の基礎情報をもとに HCV セリンプロテアーゼ阻害剤の開発が行われ、Boehringer Ingelheim 社から報告された BILN 2061 と、Vertex 社の VX-950 が最近注目されている(図 1)<sup>2,3)</sup>。BILN 2061 は世界で最初の HCV セリンプロテアーゼ阻害剤で、*in vitro* で genotype 1b の HCV セリンプロテアーゼを強力かつ特異的に阻害する。また、低分子量であるため経口投与が可能である。

昨年(2003)の『Nature』誌に報告された phase I の臨床試験の結果では、genotype 1b の HCV 感染者(8 名、対照者 2 名)に 2 日間、1 日 2 回経口投与を行って 2~3 log の HCV RNA の低下を認めている<sup>3)</sup>。投与 2 日間では BILN 2061 投与による致死性の副作用は認めず、投与終了後 1~2 週間で投与前の HCV RNA レベルに戻ったと報告されているが、長期投与試験に移る段階で副作用が出現し、現在の化合物は何らかの副作用を軽減するような修飾が必要であるとの情報が得られている。

## 消化器内科学

# HCV セリンプロテアーゼ阻害剤

## —新しい HCV 治療薬

HCV serine protease inhibitor as a new anti-HCV agent

C 型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス療法としては、これまでインターフェロン療法単独やリバビリンとの併用療法が行われてきた。また、平成 16 年(2004)の年末からは PEG 化インターフェロンとリバビリンの 48 週間の併用療法が保険収載される予定で、治療奏効率の上昇が期待される。しかし、それでもなお genotype 1b HCV 高ウイルス量感染者では 50% 以上がインターフェロン療法抵抗性であり、新しい抗 HCV 治療薬の開発が待たれている。

HCV はエンベロープを有する一本鎖の(+)鎖 RNA ウィルスである。感染後肝細胞内で脱殻し、HCV RNA が翻訳されて 1 本の長いポリプロテインを生成する。そのポリプロテインは、宿主由来および HCV 由来のプロテアーゼにより C, E1, E2, NS2, NS3, NS4A,

NS4B, NS5A, NS5B の 10 種の蛋白にプロセスされる。このなかで、NS3 セリンプロテアーゼとヘリケース、NS5B RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは HCV RNA とともに、HCV 複製複合体を形成し、HCV 増殖の key enzyme とされている。NS3(正確には NS3-4A)セリンプロテアーゼは NS4A, NS4B, NS5A, NS5B をプロセッ

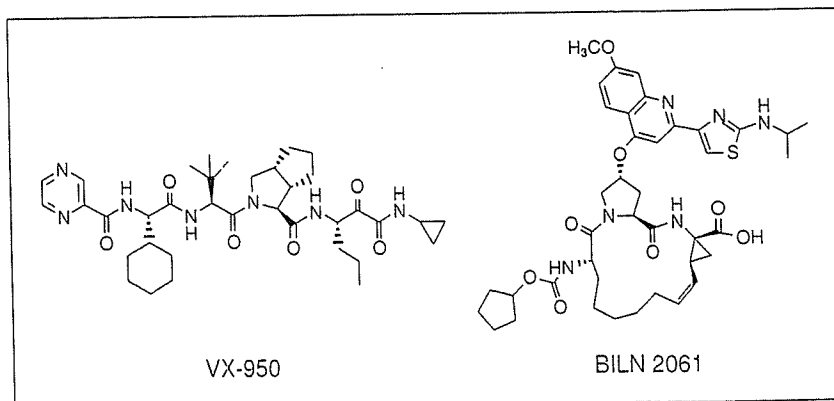


図 1 HCV NS3 プロテアーゼ阻害剤, VX-950 と BILN 2061 の化学構造<sup>2)</sup>