

正常皮膚角化における蛋白質脱イミノ化の役割解明

— 瑞々しい肌をいつまでも保つために —

東京都老人総合研究所 加齢臓器障害研究グループ

石 神 昭 人

Peptidylarginine deiminases (PADs) are a group of enzymes which convert protein arginine residues to citrulline residues in the presence of calcium ion. Enzymatic deimination abolishes positive charges of protein molecules inevitably causing significant alteration in the structure and function of native proteins. In mammalian tissues, PADs are found as four different isoforms (type I, type II, type III and type IV), which differ in specificity for various synthetic substrates and in tissue distribution. We have previously reported that multiple deiminated proteins, composed largely of keratins and filaggrin, which is a keratinocyte terminal differentiation marker synthesized in granular cell layers, were present and localized in the granular and cornified cell layers of the epidermis. The presence of deiminated proteins in such a restricted region of the epidermis strongly suggests that PAD enzyme is involved in the cornification of epidermal keratinocytes.

In this study, we analyzed the localization of deiminated proteins in psoriatic epidermis and atopic epidermis. Immunostaining based on chemical modification of citrulline residues showed that both the psoriatic epidermis and atopic epidermis had no detectable levels of deiminated proteins. On the other hand, immunostaining with polyclonal antibody against filaggrin showed no significant change in psoriatic epidermis and atopic epidermis. These results indicated that the causes of psoriasis vulgaris and atopic dermatitis may be defective in protein deimination.

1. 緒 言

蛋白質翻訳後修飾は情報伝達、遺伝子発現、細胞分化や老化に深く関与している。特に、蛋白質中のアルギニン残基がシトルリン残基に変わる脱イミノ化反応は、アルギニン残基の塩基性が失われる分、蛋白質の等電点が酸性側にシフトするなど、蛋白質の本来の電化や高次構造に著しい変化をもたらすことから機能解明が急がれている。ヒトの皮膚角層や毛嚢には脱イミノ化蛋白質が多く存在する。プロテオーム解析により中間径フィラメント蛋白質のケラチン K1 や K10、皮膚水分保湿に重要なフィラグリニンやトリコヒアリンが高度に脱イミノ化していることを明らかにした¹⁻³⁾。興味深いことに、炎症性角化症の1つである乾癬では脱イミノ化蛋白質がまったく検出されなかった。乾癬は、表皮の角層と有棘層が肥厚し、少し盛り上がった赤い皮疹（紅色局面という）ができるのが特徴である。また、皮膚表面には、白くてかさかさした乾燥した厚い垢（鱗屑-りんせつという）が付着する。乾癬の原因の1つは、不完全な角化にあると考えられている。乾癬では、脱イミノ化蛋白質がほとんど検出されないことから、蛋白質脱イミノ化反応は、正常な表皮角化に重要な役割を果たしていることが推察される。

蛋白質脱イミノ化反応は、蛋白質脱イミノ化酵素（ペプチジルアルギニンデイミナーゼ、PAD）により触媒される。遺伝子解析により生体内には、4種類の異なるアイソフォーム（I, II, III, IV型）が存在し、表皮では、I, II, III, IV型全てのPADが発現している⁴⁻⁶⁾。同じ活性を持つ4種類の酵素がどうして皮膚で発現しているのか、その生理的意義については現在明らかではない。

本研究は、正常皮膚角化における蛋白質脱イミノ化の役割解明を目的としている。特に、乾癬と同じように皮膚炎症症状を呈するアトピー性皮膚炎での脱イミノ化蛋白質の動態を詳細に解析した。歳をとってもしわのない瑞々しい肌をいつまでも保ち、化粧品と健康とのバランス良い関係を保つことを最終目的とした基礎的研究である。

2. 実 験

2.1 皮膚組織

正常なヒト皮膚組織は、整形外科時に患者同意を得て採取した。また、乾癬やアトピー性皮膚炎の皮膚組織は、外科的処置時に患者同意を得て採取した。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、個人の情報は、公表しない。個人や病院の承諾書を得る。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している。

2.2 脱イミノ化蛋白質の免疫組織化学的染色

皮膚組織は4%パラホルムアルデヒド固定し、OCT compound 4583 (Miles) で包埋した。次に、6μm厚に切片化し、スライドガラスに接着させた。脱イミノ化蛋白質



Role of the protein deimination during the cornification of epidermal keratinocytes

Akihito Ishigami

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (TMIG) Organ Disorder and Aging Research Group

の検出は、以下のように行った⁷⁾。

皮膚切片を2.5%グルタルアルデヒドで後固定した。次に、誘導体化溶液*を切片にかけ、37℃の保温器で3時間保温してシトルリン残基を誘導体化した。1次抗体には、ウサギ抗誘導体化シトルリン抗体⁸⁾を用いた。呈色には、Elite ABC kit (Vector Laboratories) と発色基質としてジアミノベンチジンをを用いた。組織観察のため、ヘマトキシリン染色を行った。

*誘導体化溶液は、蒸留水と下記の保存溶液1および2を、容積比で1:1:2の割合で使用時に混合して使用。

保存溶液1 (2% ジアセチルモノキシムと1% アンチピリンを含む1N 酢酸)。

保存溶液2 (0.025% FeCl₃を含む水と85% リン酸および95% 硫酸を55:20:25の容積比で混合した溶液)。

2.3 フィラグリンの免疫組織化学的染色

皮膚組織をOCT compound 4583で包埋し、6μm厚に切片化した。1次抗体としてウサギ抗ラットフィラグリン抗体¹⁾を用いた。呈色には、Elite ABC kit (Vector Laboratories) と発色基質としてジアミノベンチジンをを用いた。組織観察のため、ヘマトキシリン染色を行った。

3. 結果と考察

3.1 皮膚での脱イミノ化蛋白質の役割

ヒト皮膚における脱イミノ化蛋白質の局在を免疫組織化学的検出法を用いて調べた。脱イミノ化蛋白質の検出は、我々が独自に開発した化学修飾したシトルリン残基に特異的な抗体、組織切片上でのシトルリン残基の化学修飾法を用いている。この方法では、シトルリン残基の前後のアミノ酸配列に拘わらず、微量の脱イミノ化蛋白質を高感度で検出できる。ヒト正常皮膚では、表皮顆粒層上部から角層にかけて脱イミノ化蛋白質が陽性であった(図A)。特に、角層下部には脱イミノ化蛋白質が多く存在しており、基底層や有棘層ではまったく検出されなかった。また、真皮においても脱イミノ化蛋白質は陰性であった。一方、フィラグリンは有棘層上部から角層下部にかけて陽性であった(図D)。

表皮では、I, II, III, IV型全てのPADが発現している⁴⁻⁶⁾。免疫組織染色により、I, II型PADは基底層から有棘層、顆粒層に分布しており、角層では検出されなかった。何れのPADも酵素活性発現にカルシウムイオンを必要とする。

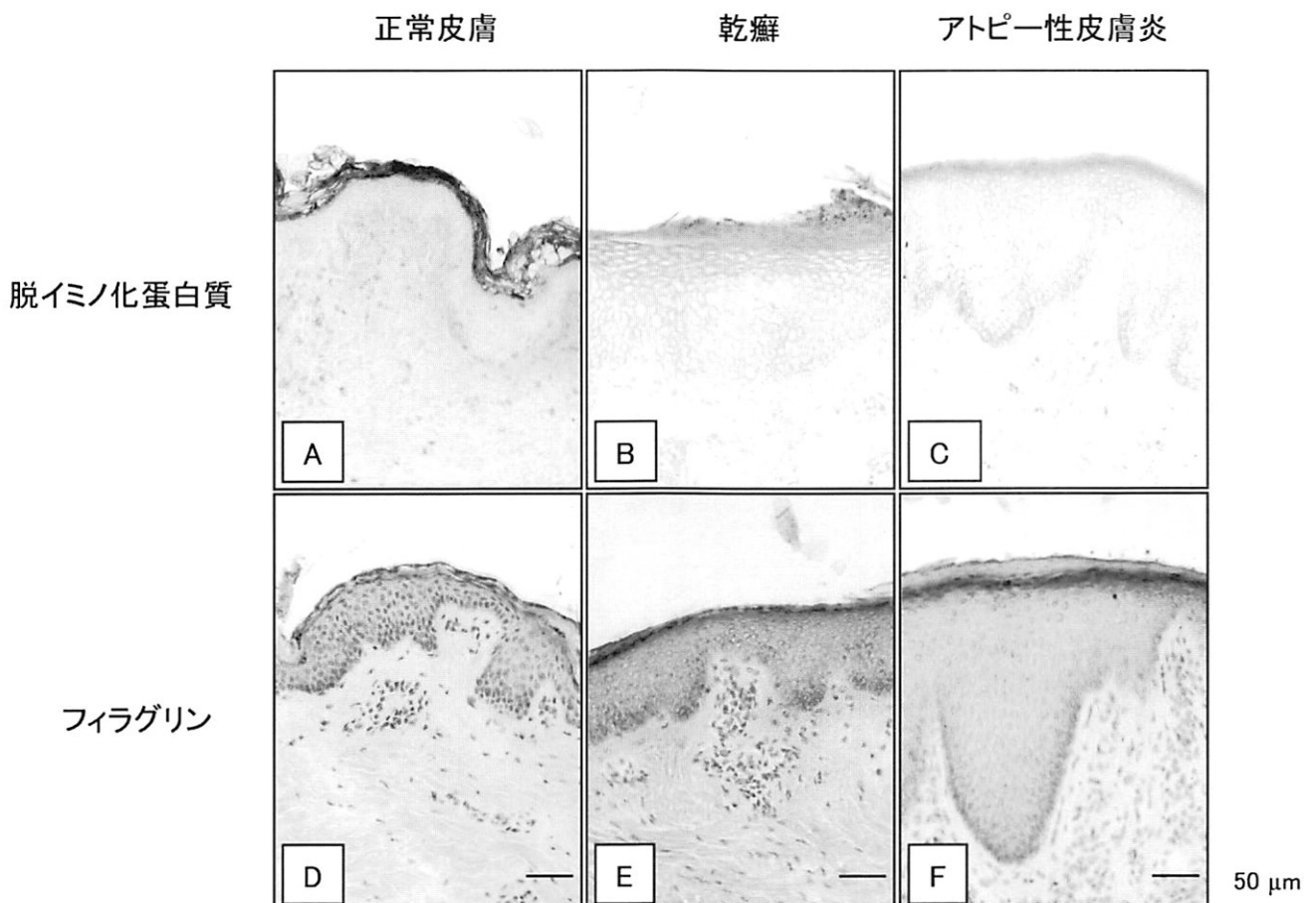


図 ヒト皮膚における脱イミノ化蛋白質、フィラグリンの免疫組織染色

A, D: 正常、B, E: 乾癬、C, F: アトピー性皮膚炎

A, B, C: 脱イミノ化蛋白質、D, E, F: フィラグリン

表皮は、基底層から表層に移行するに連れ、カルシウム濃度が高くなるよう濃度勾配が形成されている。PADは、基底層、有棘層、顆粒層の細胞で発現し、そのほとんどが活性化されない状態で蓄積し、顆粒層上部まで移行する。顆粒層の外側では、細胞核消失、ケラチン繊維の凝集、辺縁帯形成を含む急激な形態変化（角化）が起こり角層を形成する。顆粒層上部では、細胞内カルシウム濃度が臨界点に達し、一気に蛋白質脱イミノ化反応が進行すると考えられる。この時、脱イミノ化される蛋白質は、角層のケラチン模様を構成するケラチンK1やK10、皮膚の水分保湿因子として働くフィラグリンを同定した¹⁻³⁾。特に、ケラチンの脱イミノ化は、ケラチン繊維の凝集や辺縁帯形成に重要である。また、フィラグリンの脱イミノ化は、ケラチンとの電気的相互作用を弱め、ケラチン繊維からの離脱と分解に働いていると考えられる。フィラグリンは、角層上部でアミノ酸にまで切断されて皮膚の保湿成分として働く。

3.2 皮膚疾患における PAD の関与

乾癬では、脱イミノ化蛋白質がほとんど検出されなかった（図B）。しかし、フィラグリンの分布に特に異常は認められなかった（図E）。乾癬は、ウイルスや細菌、かびが原因となる皮膚疾患ではないため、ヒトにうつる心配はない。また、乾癬の根本的治療法や有効な医薬品は、未だ確立されていない。従ってその治療法は、対症療法的なものとなり、症状が良くなっている期間をできる限り長くすることが治療の目的になる。乾癬の角層では、脱イミノ化蛋白質が検出されないことから、表皮角化に蛋白質脱イミノ化反応が非常に重要であることがわかる。では、同じような皮膚炎症反応を呈するアトピー性皮膚炎の皮膚では、脱イミノ化蛋白質は存在するのであろうか。アトピー性皮膚炎における脱イミノ化蛋白質の動態を調べた。その結果、アトピー性皮膚炎では、乾癬同様に角層に脱イミノ化蛋白質がまったく検出されなかった（図C）。また、フィラグリンの分布には、特に異常は認められなかった（図F）。アトピー性皮膚炎でのPADの発現は、未だ明らかではない。しかし、フィラグリンの発現に異常が見られないことから、PADの正常な発現が予想される。PADは、酵素活性発現にカルシウムイオンを必要とする。アトピー性皮膚炎では、カルシウム濃度勾配がきちんと形成されていない可能性がある。

4. 総括

今回の研究により、アトピー性皮膚炎の原因が皮膚角層での蛋白質脱イミノ化の機能不全による可能性が強く示唆された。また、アトピー性皮膚炎の治療への可能性として次のように考える。『皮膚軟膏へのカルシウムの添加』である。これは、化粧品への応用も可能であると考えている。

歳をとってもしわのない瑞々しい肌を維持することは、女性のみならず男性でも望みである。皮膚における脱イミノ化蛋白質、PADの役割がもっとはっきりすれば、様々な皮膚疾患の治療のみならず、瑞々しい肌を保つための美容療法に新しい光を浴びせかけるものと期待している。

謝辞

本研究に対して助成いただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

(文献)

- 1) Senshu T, Akiyama K, Kan S, Asaga H, Ishigami A, Manabe M: Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues, *J. Invest. Dermatol.*, 105, 163-169, 1995.
- 2) Senshu T, Akiyama K, Ishigami A, Nomura K: Studies on specificity of peptidylarginine deiminase reactions using an immunochemical probe that recognizes an enzymatically deiminated partial sequence of mouse keratin K1, *J. Dermatol. Sci.*, 21, 113-126, 1999.
- 3) Ishigami A, Asaga H, Ohsawa T, Akiyama K, Maruyama N: Protein deimination and peptidylarginine deiminase expression during cornification of rat epidermal keratinocytes, *Biomed. Res.*, 23, 145-151, 2002.
- 4) Ishigami A, Asaga H, Ohsawa T, Akiyama K, Maruyama N: Peptidylarginine deiminase type I, type II, type III and type IV are expressed in rat epidermis, *Biomed. Res.*, 22, 63-65, 2001.
- 5) 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, *Arch. Biochem. Biophys.*, 407, 25-31, 2002.
- 6) Guerrin M, Ishigami A, Mechin MC, Nachat R, Valmary S, Sebbag M, Simon M, Senshu T, Serre G: cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I, *Biochem. J.*, 370, 167-174, 2003.
- 7) Asaga H, 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.
- 8) Senshu T, Sato T, Inoue T, Akiyama K, Asaga H: Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane, *Anal. Biochem.*, 203, 94-100, 1992.