

シトルリン化分子と老年病

石神 昭人

要約 シトルリン化タンパク質は、ペプチド中の塩基性アミノ酸であるアルギニンが中性アミノ酸であるシトルリンに酵素的に修飾されたタンパク質の総称である。この反応を触媒するカルシウム依存性の酵素がペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) である。タンパク質シトルリン化反応は、正常な表皮の角化や神経軸索の絶縁作用をもたらすミエリン鞘の形成に重要な役割を果たす。生理的な機能を持つ反面、疾患との関わりも深い。例えば、アルツハイマー病患者の脳では、シトルリン化タンパク質が出現し、病状の進行程度評価に応じてその量が増加する。関節リウマチでは、シトルリン化タンパク質に対する自己抗体が生ずる。また、皮膚疾患である尋常性乾癬やアトピー性皮膚炎では、表皮のカルシウム濃度勾配がきちんと形成されていないため、タンパク質のシトルリン化がうまく行っていない可能性がある。このようにシトルリン化タンパク質と疾患は密接な関係にあると考えられる。

Key words : シトルリン化タンパク質, PAD, アルツハイマー病, 関節リウマチ, 皮膚疾患

(日老医誌 2014; 51: 314-320)

はじめに

アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基の両方の官能基を持つ有機化合物の総称である。自然界にはおよそ500種類以上のアミノ酸が存在しているが、そのうち遺伝子により規定されているアミノ酸はわずか20種類である。それら20種類のアミノ酸の組み合わせによりヒトではおよそ2~3万種類ものタンパク質を作り出す。さらにリン酸化や糖鎖修飾など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ひとつに最近注目されているのがタンパク質のシトルリン化(脱イミノ化)である。遺伝子に規定されたアミノ酸のひと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、様々な細胞機能に関連する¹⁾。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、シトルリン化タンパク質と老年病との関連について解説する。

シトルリン化タンパク質と PAD

シトルリン化タンパク質は、ペプチド中の塩基性アミ

ノ酸であるアルギニンが中性アミノ酸であるシトルリンに酵素的に修飾されたタンパク質の総称である。このタンパク質シトルリン化反応を触媒する翻訳後修飾酵素がペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD, peptidyl-arginine deiminase) である(図1)¹⁾。タンパク質シトルリン化反応は、タンパク質の陽電荷を減少させるため高次構造に著しい変化をもたらす^{2)~4)}。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)受容体結合能の変化、4)細胞構造維持の変化、5)脱メチル化を介した遺伝子発現制御などがあげられる⁵⁾。

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。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、特異的抗体をアフィニティーカラムにより精製した。そして、組織中や転写膜上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を特異的に検出することが可能となった(図2)⁶⁾。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、微量のシトルリン化タンパク質を高感度に検出できる。

生体内には、組織分布や基質特異性、そして遺伝子の異なる5種類のPADアイソフォーム(PAD1, PAD2, PAD3, PAD4, PAD6)が存在し、そのいずれもが活性発現に1mM以上という高濃度のカルシウムイオンを必要とする⁷⁾⁸⁾。ヒトにおける5種類のPAD遺伝子は

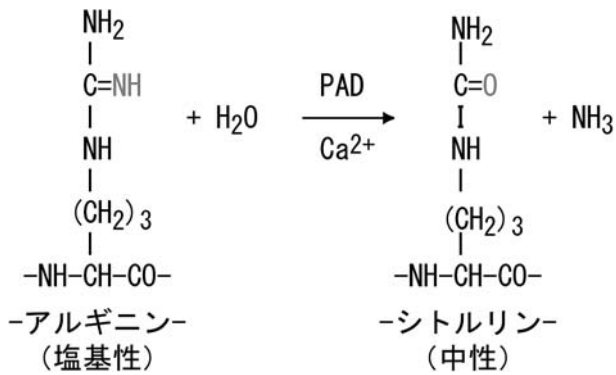


図1 ペプチジルアルギニンデアミナーゼ (PAD) によるアルギニンからシトルリンへの変換
 酵素活性発現にはカルシウムイオンを必要とする。ヒトでは遺伝子の異なる5種類のPADアイソフォーム (PAD1, PAD2, PAD3, PAD4, PAD6) が存在する。

第1染色体上に縦列して存在する。遺伝子の系統学的解析からPAD2が最も古い祖先遺伝子であると考えられている。ヒトでのPADアイソフォームのアミノ酸配列相同性は約60~70%である^{9)~13)}。RT-PCR法やノーザンブロット解析による組織発現解析から5種類のPADアイソフォームの発現部位は大きく異なる¹⁴⁾。即ち、ラットでのPAD1は表皮と胃にのみ、PAD3は主に表皮、卵巣、毛嚢、PAD2とPAD4は表皮、肺、脾臓、胃、腎臓、卵巣、子宮など幅広い組織でmRNAの発現が認められた。唯一、表皮でのみPAD1, 2, 3, 4の発現が確認されており、後述する表皮角化細胞(ケラチノサイト)の分化及び表皮角層の形成に重要な役割を果たすことが報告されている^{14)~16)}。

シトルリン

中性アミノ酸であるシトルリンは、アンモニアから尿素を生成する代謝回路である尿素回路においてカルバモイルリン酸とオルニチンからオルニチントランスカルバミラーゼによりリン酸と共に生成する。しかし、シトルリンはDNAに書き込まれた遺伝暗号にはないため転写、翻訳など一連のタンパク質合成過程でタンパク質に組み込まれることはない。従って、生体内のシトルリン化タンパク質はPADによる酵素反応でのみ生成する。

シトルリン化タンパク質の生理学的機能

シトルリン化タンパク質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

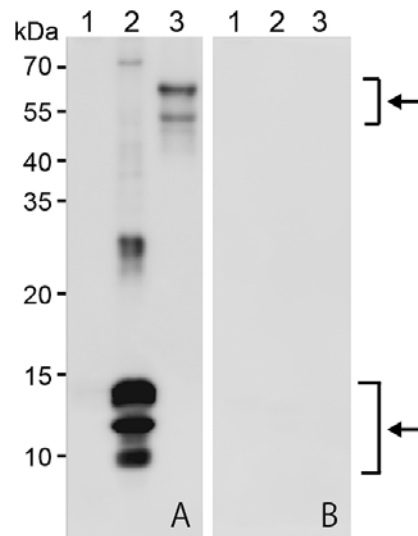


図2 ウェスタンブロットによるシトルリン化タンパク質の特異的検出

レーン1:ヒストン, レーン2:シトルリン化ヒストン, レーン3:ヒトの皮膚角層抽出物

A: PVDF膜をシトルリンの化学修飾処理を行った, B: 化学修飾処理しない。

矢印はヒストン(分子量10~15kDa)とケラチン(分子量55~65kDa)を示す。

※ウサギ抗化学修飾シトルリンポリクローナル抗体で検出した。シトルリンの化学修飾処理を行わない(B)とシトルリン化タンパク質は検出されない。

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。表皮では、PAD1, 2, 3, 4が発現している^{14)~16)}。免疫組織染色により、PAD1, 2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¹⁵⁾¹⁶⁾。PAD3, 4の免疫組織染色については、未だ報告がない。何れのPADも酵素活性発現に高濃度のカルシウムイオンを必要とする。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、一気にタンパク質シトルリン化反応が進行すると考えられる。この時、シトルリン化されるタンパク質として我々は、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^{17)~19)}。特に、ケラチンのシトルリン化は、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

ンのシトルリン化は、ケラチンとの電氣的相互作用を弱め、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。このような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タンパク質が生じ、正常な表皮の角化が進行すると考えられる。

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²⁰⁾。即ち、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²¹⁾。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多発性硬化症などの脱髄疾患の重要な要素とも考えられている²²⁾²³⁾。この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。

アルツハイマー病とシトルリン化タンパク質

中枢神経系には5種類のPADアイソフォームの中でPAD2が多く発現している¹⁴⁾。特にPAD2は海馬、扁桃体、視床下部、大脳皮質など脳全体に広く分布している²⁴⁾。また、PAD2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化状態で存在している²⁵⁾。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²⁶⁾。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。著者が所属する東京都健康長寿医療センター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と年齢等が一致する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、アルツハイマー病脳では、シトルリン化タンパク質が多く出現し、Braak Stageによる病状の進行程度評価に応じてその量が増加することを明らかにした²⁷⁾。海馬領域におけるシトルリン化タンパク質の局在性を検討したところ分子層と歯状回の接合部位、及びCA1とCA2領域に認められた。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タンパク質の蓄積は極めて軽度であった。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への局在が示唆されたのでグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) との二重染色を行ったところ一致した。

アルツハイマー病脳でのシトルリン化タンパク質を同定するために二次元電気泳動と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、アルツハイマー病脳に存在する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、MBPを同定した。既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²⁸⁾、細胞機能に重要な影響をもたらすことが示唆された。これらシトルリン化タンパク質の異常な蓄積がアルツハイマー病の発症やその進行に関与している可能性が考えられる。

シトルリン化タンパク質の生成、蓄積がどのようにして起こるのかは未だ明らかではない。健常者の脳でもPAD2が多く存在する。また、PADの活性化には高濃度のカルシウムイオンを必要とすることから、脳梗塞、脳出血などの脳卒中や酸化ストレス、老化などが原因で一過的に細胞内外のカルシウム濃度が上昇し、それが引き金となってPADが活性化してシトルリン化タンパク質が出現する可能性がある (図3)。シトルリン化タンパク質の長期的な蓄積がアルツハイマー病発症や病態進行の原因となる可能性も十分に考えられる。

アルツハイマー病以外の神経変性疾患としてプリオン病^{29)~31)}、パーキンソン病³²⁾や免疫性神経疾患の多発性硬化症²²⁾²³⁾でもシトルリン化タンパク質の蓄積やPAD活性の亢進が報告されている。

腎障害とシトルリン化タンパク質

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。高齢者の剖検時には腎硬化症が高頻度出現するが、併せて貯留性嚢胞も発症している。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、血中尿素窒素 (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た。腎臓ではPAD2のみが発現している³³⁾。ウエスタン法による解析では、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の発現亢進が認められた³³⁾。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はほとんど認められ

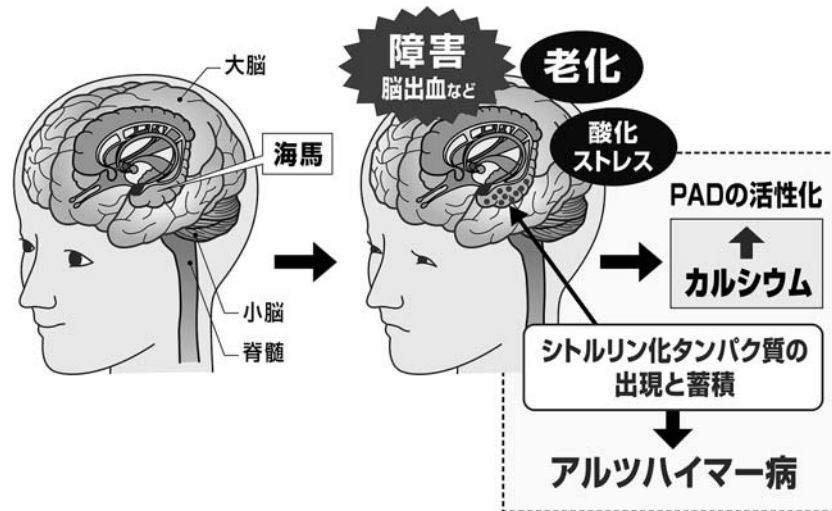


図3 アルツハイマー病とシトルリン化タンパク質

脳梗塞、脳出血などの脳卒中や酸化ストレス、老化などが原因で一過的に細胞内外のカルシウム濃度が上昇し、それが引き金となってPADが活性化してシトルリン化タンパク質が出現する可能性がある。

なかった。また、シトルリン化タンパク質は、ボウマン嚢上皮よりも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、そのうちのひとつがβアクチンであった。アルツハイマー病脳に蓄積したシトルリン化タンパク質がビメンチンやGFAPなどの中間径フィラメントであったことも併せて考えると細胞骨格タンパク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。

関節リウマチとシトルリン化タンパク質

関節リウマチは、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。関節リウマチは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。従来より関節リウマチ患者の血清中に含まれる自己抗体としてリウマチ因子(RF)、抗ケラチン抗体(AKA)、抗核周因子(APF)、抗Sa抗体や軟骨、または関節膜タンパクに対する抗体の存在が知られていた。これらの中で、RFは最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

でも陽性に出してしまうことがある。RFに比べてAKAは、90%以上の高い診断特異性を示す。AKAは、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、ケラチン繊維を束ねる作用を持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。表皮角化の間、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3万7千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PADによるシトルリン化により塩基性が失われ中性フィラグリンとなる。1998年、1999年にオランダとフランスの研究グループが相次いで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³⁴⁾³⁵⁾。また、今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。

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、一遺伝子多型(SNP, Single nucleotide polymorphism)を用いた全ゲノム疾患関連遺伝子解析により、関節リウマチ発症の原因遺伝子のひとつがPAD4であると報告した³⁶⁾。生体内で生ずるシトルリン化タンパク質は、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³⁷⁾は表皮の角化過程に重要なタンパク質であるフィラグリンの

アミノ酸配列からシトルリンを含むペプチドを合成し、関節リウマチ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関節リウマチ患者血清の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かった。近年、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ている。

PAD4の活性化やその結果生ずるシトルリン化タンパク質に対する自己抗体の生成が関節リウマチの原因であるならば、PAD4を定量化する臨床検査診断薬は関節リウマチの早期診断や疾患活動性の指標と成りうる。そのため、我々はヒト血中PAD4濃度の測定系、及びヒトPAD4自己抗体の検出系を確立し、関節リウマチ患者の血中PAD4濃度、及びPAD4自己抗体の有無を調べた³⁸⁾。その結果、関節リウマチ患者ではPAD4濃度が高い値を示す患者が多かったのと同時にPAD4が全く検出されないゼロ値を示す患者が多く存在した。さらに、ゼロ値を示す患者のほとんどはPAD4自己抗体が陽性であった。一方、変形性関節症患者や健常者では、関節リウマチ患者に比べて血中PAD4濃度が低い値であった。また、ゼロ値を示す変形性関節症患者や健常者はいなかった。これらの結果は、関節リウマチの初期に何らかの理由により血中PAD4が高値となり、関節リウマチの発症や進行に伴いPAD4に対する自己抗体ができる可能性を示唆している。我々が開発したヒト血中PAD4測定法、及びヒトPAD4自己抗体有無の検出法は関節リウマチの早期診断、及び疾患の活動性を評価する指標に応用できる可能性がある。

皮膚疾患とシトルリン化タンパク質

ヒトの皮膚角層や毛嚢にはシトルリン化タンパク質が多く存在する。我々は、プロテオーム解析により中間径フィラメントのケラチンK1やK10、皮膚水分保湿に重要なフィラグリンやトリコヒアリンが高度にシトルリン化していることを明らかにした^{17)~19)}。また、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³⁹⁾。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。

興味深いことに、炎症性角化症のひとつである尋常性乾癬ではシトルリン化タンパク質がほとんど検出されなかった⁴⁰⁾。尋常性乾癬は、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)が付着する。尋常性乾癬は、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、尋常性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。尋常性乾癬の角層では、シトルリン化タンパク質が検出されないことから、表皮角化にタンパク質シトルリン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、シトルリン化タンパク質は存在するのであろうか。そこでアトピー性皮膚炎におけるシトルリン化タンパク質の動態を調べた。その結果、アトピー性皮膚炎では、尋常性乾癬と同様に角層にシトルリン化タンパク質がまったく検出されなかった。また、フィラグリンの局在性には特に異常が認められなかった。アトピー性皮膚炎でのPADの発現は明らかではない。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、酵素活性発現に高濃度のカルシウムイオンを必要とする。アトピー性皮膚炎や尋常性乾癬では、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。

おわりに

近年、プロテオーム解析により多くのシトルリン化タンパク質が同定され、疾患との関わりが明らかになってきた。また、シトルリン化タンパク質を指標とした臨床検査診断薬も開発されている。検査の次には治療がある。PAD活性阻害剤やシトルリン化タンパク質の効率的な除去方法が疾患の治療に結びつくかは、今後注目される。

最近、免疫の分野でPADによるシトルリン化の重要性が多く報告されている。病原体に感染すると一部の白血球のDNAに結合しているヒストンがシトルリン化され、細胞外にタンパク質とDNAからなる網状のトラップが形成される⁴¹⁾。病原体の除去には、このトラップが重要な働きをすることが明らかになった。他にも遺伝子の発現調節⁴²⁾など、生体の維持に欠かすことのできない生理的な役割が次々と明らかになってきている。

参考文献

- 1) Ishigami A, Maruyama N: Importance of research on peptidylarginine deiminase and citrullinated proteins in age-related disease. *Geriatr Gerontol Int* 2010; 10 Suppl 1: S53-58.
- 2) Imparl JM, Senshu T, Graves DJ: Studies of calcineurin-

- calmodulin interaction: probing the role of arginine residues using peptidylarginine deiminase. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318: 370-377.
- 3) Lamensa JW, Moscarello MA: Deimination of human myelin basic protein by a peptidylarginine deiminase from bovine brain. *J Neurochem* 1993; 61: 987-996.
 - 4) Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee S-C, Steinert PM: Protein Unfolding by Peptidylarginine Deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem* 1996; 271: 30709-30716.
 - 5) Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ: PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 2003; 25: 1106-1118.
 - 6) Senshu T, Sato T, Inoue T, Akiyama K, Asaga H: Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane. *Anal Biochem* 1992; 203: 94-100.
 - 7) Watanabe K, Akiyama K, Hikichi K, Ohtsuka R, Okuyama A, Senshu T: Combined biochemical and immunochemical comparison of peptidylarginine deiminases present in various tissues. *Biochim Biophys Acta* 1988; 966: 375-383.
 - 8) Terakawa H, Takahara H, Sugawara K: Three types of mouse peptidylarginine deiminase: characterization and tissue distribution. *J Biochem (Tokyo)* 1991; 110: 661-666.
 - 9) Tsuchida M, Takahara H, Minami N, Arai T, Kobayashi Y, Tsujimoto H, et al.: cDNA nucleotide sequence and primary structure of mouse uterine peptidylarginine deiminase. Detection of a 3'-untranslated nucleotide sequence common to the mRNA of transiently expressed genes and rapid turnover of this enzyme's mRNA in the estrous cycle. *Eur J Biochem* 1993; 215: 677-685.
 - 10) Ishigami A, Kuramoto M, Yamada M, Watanabe K, Senshu T: Molecular cloning of two novel types of peptidylarginine deiminase cDNAs from retinoic acid-treated culture of a newborn rat keratinocyte cell line. *FEBS Lett* 1998; 433: 113-118.
 - 11) Watanabe K, Senshu T: Isolation and characterization of cDNA clones encoding rat skeletal muscle peptidylarginine deiminase. *J Biol Chem* 1989; 264: 15255-15260.
 - 12) Nishijyo T, Kawada A, Kanno T, Shiraiwa M, Takahara H: Isolation and molecular cloning of epidermal- and hair follicle-specific peptidylarginine deiminase (type III) from rat. *J Biochem (Tokyo)* 1997; 121: 868-875.
 - 13) Rus'd AA, Ikejiri Y, Ono H, Yonekawa T, Shiraiwa M, Kawada A, et al.: Molecular cloning of cDNAs of mouse peptidylarginine deiminase type I, type III and type IV, and the expression pattern of type I in mouse. *Eur J Biochem* 1999; 259: 660-669.
 - 14) 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* 2001; 22: 63-65.
 - 15) 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* 2002; 407: 25-31.
 - 16) Guerrin M, Ishigami A, Mechin MC, Nachat R, Valmary S, Sebbag M, et al.: cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. *Biochem J* 2003; 370: 167-174.
 - 17) 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* 1995; 105: 163-169.
 - 18) 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* 1999; 21: 113-126.
 - 19) Ishigami A, Asaga H, Ohsawa T, Akiyama K, Maruyama N: Protein deimination and peptidylarginine deiminase expression during cornification of rat epidermal keratinocytes. *Biomed Res* 2002; 23: 145-151.
 - 20) Gould RM, Freund CM, Palmer F, Feinstein DL: Messenger RNAs located in myelin sheath assembly sites. *J Neurochem* 2000; 75: 1834-1844.
 - 21) Pritzker LB, Joshi S, Harauz G, Moscarello MA: Deimination of myelin basic protein. 2. Effect of methylation of MBP on its deimination by peptidylarginine deiminase. *Biochemistry* 2000; 39: 5382-5388.
 - 22) Moscarello MA, Wood DD, Ackerley C, Boulias C: Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *J Clin Invest* 1994; 94: 146-154.
 - 23) Moscarello MA, Mastronardi FG, Wood DD: The role of citrullinated proteins suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem Res* 2007; 32: 251-256.
 - 24) Shimada N, Handa S, Uchida Y, Fukuda M, Maruyama N, Asaga H, et al.: Developmental and age-related changes of peptidylarginine deiminase 2 in the mouse brain. *J Neurosci Res* 2010; 88: 798-806.
 - 25) Asaga H, Akiyama K, Ohsawa T, Ishigami A: 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* 2002; 326: 129-132.
 - 26) Asaga H, Ishigami A: Protein deimination in the rat brain after kainate administration: citrulline-containing proteins as a novel marker of neurodegeneration. *Neurosci Lett* 2001; 299: 5-8.
 - 27) 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.
 - 28) Inagaki M, Takahara H, Nishi Y, Sugawara K, Sato C: Ca²⁺-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. *J Biol Chem* 1989; 264: 18119-18127.
 - 29) Jang B, Kim E, Choi JK, Jin JK, Kim JI, Ishigami A, et al:

- Accumulation of citrullinated proteins by up-regulated peptidylarginine deiminase 2 in brains of scrapie-infected mice: a possible role in pathogenesis. *Am J Pathol* 2008; 173: 1129–1142.
- 30) Jang B, Jin JK, Jeon YC, Cho HJ, Ishigami A, Choi KC, et al.: Involvement of peptidylarginine deiminase-mediated post-translational citrullination in pathogenesis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 199–210.
 - 31) Jang B, Jeon YC, Choi JK, Park M, Kim JI, Ishigami A, et al.: Peptidylarginine deiminase modulates the physiological roles of enolase via citrullination: links between altered multifunction of enolase and neurodegenerative diseases. *Biochem J* 2012; 445: 183–192.
 - 32) Nicholas AP: Dual immunofluorescence study of citrullinated proteins in Parkinson diseased substantia nigra. *Neuroscience letters* 2011; 495: 26–29.
 - 33) Feng D, Imasawa T, Nagano T, Kikkawa M, Takayanagi K, Ohsawa T, et al.: Citrullination preferentially proceeds in glomerular Bowman's capsule and increases in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2005; 68: 84–95.
 - 34) Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273–281.
 - 35) Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, 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* 1999; 162: 585–594.
 - 36) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, et al.: Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; 34: 395–402.
 - 37) Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ: Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273–281.
 - 38) Ishigami A, Uchida Y, Miyazaki T, Handa S, Choi EK, Kim YS, et al.: Two novel sandwich ELISAs identify PAD4 levels and PAD4 autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2013; 23: 794–803.
 - 39) Akiyama K, Senshu T: Dynamic aspects of protein deimination in developing mouse epidermis. *Exp Dermatol* 1999; 8: 177–186.
 - 40) 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.
 - 41) Liu CL, Tangsombatvisit S, Rosenberg JM, Mandelbaum G, Gillespie EC, Gozani OP, et al.: Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 2012; 14: R25.
 - 42) Christophorou MA, Castelo-Branco G, Halley-Stott RP, Oliveira CS, Loos R, Radziskeuskaya A, et al.: Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature* 2014; 507: 104–108.
-