

142. シトルリン化タンパク質の網羅的解析と機能解析

谷川 千津

Key words : シトルリン化, PADI4

東京大学 医科学研究所
ゲノムシーケンス解析分野

緒言

我々の研究室では、これまでに癌抑制遺伝子 *p53* の下流遺伝子を多数同定し、*p53* が癌化抑制能を発揮するメカニズムの解明に取り組んできた。私もこれまで *p53AIP1*, *p53RDL1*, *XEDAR*, *CLCA2*などを新規 *p53* 下流遺伝子として報告し、*p53* が細胞の生死を決定する機序を明らかとしてきた¹⁻⁵⁾。2009年に新規 *p53* 下流遺伝子として報告した *Padi4* は、カルシウム依存的にタンパク質中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する翻訳後修飾酵素である⁶⁾。私は現在までに、DNA 損傷を受けた細胞において *p53*-*PADI4* 経路を介して複数のタンパク質がシトルリン化修飾を受けることを明らかにし、またその基質として *NPM1*, ヒストン H4, *Lamin C* を同定した^{6,7)}。

シトルリン化されたタンパク質は、アルギニン残基の持つ正電荷を失うことによりタンパク質の立体構造および機能が大きく変化するとされており、シトルリン化されたヒストンについても、その N 末部分の構造変化が報告されている。我々の解析の結果、ヒストンのシトルリン化修飾を認める細胞のほとんどにおいて核の断片化が起き、またアポトーシスマーカーに対し陽性であった。さらに、我々は *PADI4* の導入によりクロマチンが脱凝縮し、DNA の切断が促進される事を明らかとした。これらの結果より、ヒストンのシトルリン化修飾がクロマチンの構造変化を介し、アポトーシス時の核の断片化を促進している可能性が示唆された。実際に *Padi4* ノックアウトマウスの胸腺組織において、X線照射後のアポトーシス陽性細胞が顕著に減少していたことから、アポトーシス誘導における *PADI4* の重要性が示唆された。これまで *p53* とアポトーシスの関連は、ミトコンドリアを介した経路 (*BAX*, *NOXA*, *p53AIP1* などの *p53* 下流遺伝子が関与) およびレセプターを介した経路 (*FAS*, *DR5* などの *p53* 下流遺伝子が関与) によって説明されてきた。両経路ともにカスパーゼの活性化を介し最終的に DNA の切断および核の断片化が誘導されるが、我々のデータから、*p53*-*PADI4* 経路はクロマチン修飾を制御することによって直接的にアポトーシスに特徴的な核内のイベントに寄与していることが示された。

ヒストン修飾は発生、分化、発癌など様々な生理現象と関連しているが、近年アポトーシスを規定するヒストンコードとして“Death code”という概念が提唱されている。人の肺癌組織からなる組織マイクロマレイ解析により、シトルリン化ヒストン陽性症例では腫瘍サイズが小さい傾向を認め、*p53*-*PADI4* を介したヒストンのシトルリン化が“Death code”として機能している可能性が示された。

これまでの我々の解析によって、*PADI4* によって細胞内の多数のタンパク質がシトルリン化修飾される事が明らかとなっている。本研究では、プロテオミクス解析によりシトルリン化基質を網羅的にスクリーニングし、それら基質におけるシトルリン化修飾の生理学的意義を明らかにすることを目的とする。

方法

はじめに網羅的解析として、HEK293T 細胞に *PADI4* を一過性に発現させた際の、細胞内の全シトルリン化タンパク質を質量分析により同定した。コントロールとしては、空ベクターおよび酵素活性がない変異型 *PADI4* をそれぞれ発現させたサンプルを用いた。

プロテオミクス解析により同定されたシトルリン化ペプチドの配列情報を用いて、修飾を受けるアルギニン残基の前後配列にどのような特徴があるか検討した。また、どのようなタンパク質群がシトルリン化を受けるか検討するため、GO (Gene Ontology) 解析を施行した。

さらに PADI4 の生理的役割を解明するため、ノックアウトマウスを用いて生存に与える影響を検討した。

結果および考察

はじめに、PADI4 の基質を網羅的に同定するため、プロテオミクス解析によるスクリーニングを行った。各サンプルにおいて 10,000 を超えるペプチドを解析した結果、PADI4 を発現させた細胞において 2.17% のペプチドがシトルリン化修飾を受けていることが明らかとなった (図 1)。また、これらシトルリン化を受けるタンパク質群には、RNA 結合タンパク質として知られる hnRNP ファミリーが多く含まれていた。最も顕著にシトルリン化を受けた RBMX (hnRNP G) に対する抗体を作成した結果、シトルリン化されることを *in vivo* で証明した。

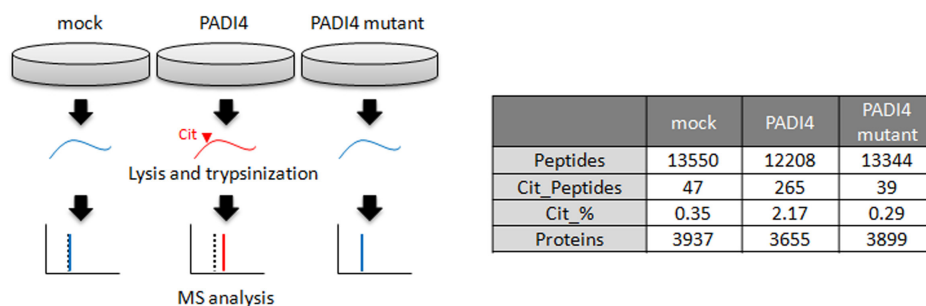


図 1. プロテオミクス解析の概略と結果。

PADI4 を発現させた細胞において 2.17% のペプチドにおいてシトルリン化修飾を認めた。

次に、プロテオミクス解析により同定されたシトルリン化ペプチドの配列情報を用いて、修飾を受けるアルギニン残基の前後配列にどのような特徴があるか検討した。その結果、酸性アミノ酸と一部の極性アミノ酸が周辺に多いことが明らかとなった。そこで、このシトルリン化修飾におけるコンセンサス配列に対してペプチドを作製し、実際にシトルリン化されるかどうかを *in vitro* シトルリン化反応を行うことで確認した (図 2)。さらにコンセンサス配列に対するシトルリン化抗体を作製し、*in vivo* においてこの配列がシトルリン化を受けていることを証明した。

さらに、プロテオミクス解析により同定されたシトルリン化基質群を用いて、GO 解析を行った。これにより PADI4 のスプライシングへの関与が示唆されたため、マウス組織中で Padi4 の発現が最も高い骨髄を用いて、RNA シークエンスを施行した。その結果、Padi4 野生型マウスとノックアウトマウス間で、10 遺伝子について、variant の発現パターンが異なることが明らかとなった。

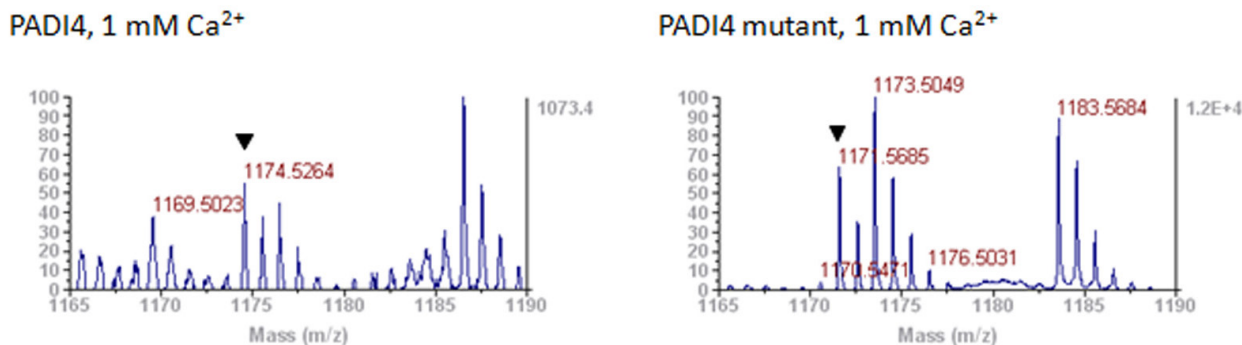


図 2. コンセンサス配列に対する *in vitro* シトルリン化反応。

ペプチド (GGGRGGGRGGGRGGG) を PADI4 および変異型 PADI4 と Ca 存在下で反応させた結果、3ヶ所のアルギニンにおいてシトルリン化修飾を認めた。

また、PADI4 の癌化における生理的な意義を検討する目的で、 $p53^{+/-}Padi4^{-/-}$ マウスおよび $p53^{+/-}Padi4^{+/+}$ 間での発癌、生存を検討した。その結果、 $p53^{+/-}Padi4^{-/-}$ で生存期間の有意な短縮と、腫瘍発生が増加する傾向が認められた(図3)。またがん組織で報告されている変異について、酵素活性に与える影響を検討したところ、多くの変異が機能消失型であることが示された。以上の結果より、PADI4 はがん抑制遺伝子として機能する可能性が示された。

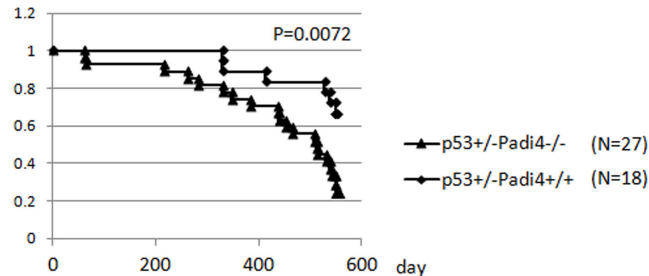


図3. *Padi4* ノックアウトマウスの生存への影響。
 $p53^{+/-}Padi4^{-/-}$ マウスにおいて生存期間の有意な短縮を認めた。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの松田浩一および東京大学新領域創成科学研究科の植田幸嗣である。

文 献

- 1) Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. & Taya, Y. : p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, **102** : 849-862, 2000.
- 2) Tanikawa, C., Matsuda, K., Fukuda, S., Nakamura, Y. & Arakawa, H. : p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nature cell biology*, **5** : 216-223, 2003.
- 3) Tanikawa, C., Furukawa, Y., Yoshida, N., Arakawa, H., Nakamura, Y. & Matsuda, K. : XEDAR as a putative colorectal tumor suppressor that mediates p53-regulated anoikis pathway. *Oncogene*, **28** : 3081-3092, 2009.
- 4) Tanikawa, C., Ri, C., Kumar, V., Nakamura, Y. & Matsuda, K. : Crosstalk of EDA-A2/XEDAR in the p53 signaling pathway. *Mol. Cancer Res.*, **8** : 855-863, 2010.
- 5) Tanikawa, C., Nakagawa, H., Furukawa, Y., Nakamura, Y. & Matsuda, K. : CLCA2 as a p53-inducible senescence mediator. *Neoplasia*, **14** : 141-149, 2012.
- 6) Tanikawa, C., Ueda, K., Nakagawa, H., Yoshida, N., Nakamura, Y. & Matsuda, K. : Regulation of protein Citrullination through p53/PADI4 network in DNA damage response. *Cancer Res.*, **69** : 8761-8769, 2009.
- 7) Tanikawa, C., Espinosa, M., Suzuki, A., Masuda, K., Yamamoto, K., Tsuchiya, E., Ueda, K., Daigo, Y., Nakamura, Y. & Matsuda, K. : Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway. *Nature communications*, **3** : 676, 2012.