

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580128

研究課題名(和文) 網膜視細胞特異的に発現するタンパク質アルギニン脱イミノ酵素の機能解明

研究課題名(英文) The function of peptidylarginine deiminase expressed in the retina of chicken

研究代表者

高原 英成 (Takahara, Hidenari)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：30122063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質アルギニン脱イミノ酵素(以下PAD)は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。本研究はニワトリPAD遺伝子群でコードされている3つのPADの機能解明を目的とした。まず、各ニワトリPADのDNAクローニングとその全塩基配列を決定した。さらに、組換え型PAD1-3タンパク質のパキキュロウイルス-昆虫細胞発現系を構築し、精製に成功した。両PADは類似した基質特異性を有し、哺乳動物のPADのそれとは大きく異なることが判った。PAD1とPAD3は眼球の網膜に存在し、PAD1は水平細胞もしくは双極細胞の細胞質に局在し、cPAD3は視細胞層の錐体・桿体細胞のラメラ構造体に局在した。

研究成果の概要(英文)：Peptidylarginine deiminase is a post-translational modification enzyme that catalyzes the conversion of protein-bound arginine to citrulline in a calcium ion dependent manner. Although PAD1 genes are widely conserved among vertebrates, their function in the chicken is poorly understood. We cloned and sequenced three chicken PAD1 cDNAs and analyzed the expression of their proteins in various tissues. Immunoblotting analysis showed that chicken PAD1 and PAD3 were present in cells of several central nervous system tissues including the retina. The chicken PAD1 and PAD3 recombinant proteins required calcium ions as an essential cofactor for their catalytic activity. The two recombinant proteins showed similar substrate specificities toward synthetic arginine derivatives. We conclude that chicken PAD1 and PAD3 might play specific roles in the nervous system, but that chicken PAD2 might not be functional under normal physiological conditions.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：タンパク質アルギニン脱イミノ酵素 ニワトリ 網膜 視細胞 双極細胞 水平細胞

1. 研究開始当初の背景

タンパク質アルギニン脱イミノ酵素 (PAD と略す) は Ca^{2+} 存在下で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。脱イミノ化(シトルリン化)により生じたシトルリン残基は無電荷であるため、この反応はアルギニンが有する陽電荷の消失を伴う。アルギニン残基は側鎖が持つ強い塩基性のためにタンパク質表面に位置する傾向があり、タンパク質全体、あるいは局所的な電気的性質の決定に大きく寄与している。そのために PAD によるアルギニンのシトルリン化はタンパク質の生理機能の発現や変換に関与していることが知られている。PAD は哺乳動物以外にもニワトリ(Takahara et al., 1986)、カメ、カエル、コイなどにも存在することが確認されている(Kubilus et al., 1985)。近年の分子生物学研究の発展により様々なゲノムデータベースが構築され、2004 年にはニワトリ (*Gallus gallus*) の全ゲノムが解読された (Consortium, I.C.G.S., 2004; Wallis et al., 2004)。そしてニワトリ PAD 様遺伝子は 3 つ存在し、哺乳動物より 2 つ少ないことが判明した(Ying et al., 2009)。さらに、様々な生物のゲノム情報が解読され、それらのゲノム情報解析から PAD 遺伝子は脊椎動物以上の高等生物に存在し、魚類までの生物には 1 種類、両生類、爬虫類、鳥類では 3 種類のアイソザイムが存在することが明らかとなった。これらのことから、脊椎動物の出現とともに現れた PAD 遺伝子が進化の過程で重複し、その数を増やしてきたことが示唆された。特に、生物の進化の過程で複数の PAD を持つに至った鳥類 PAD について総合的に研究することは、鳥類の PAD の特徴付けとともに PAD の分子進化と機能分化の関係を明らかにすることも期待でき、また、哺乳類が鳥類よりさらに 2 つの PAD アイソザイムを持つことになったことについて

も考察することができるものと思われる。ヒトの 5 つの PAD 遺伝子とその産物である PAD については多くの知見が蓄積されていることから、本研究ではニワトリの 3 つの PAD を明らかにし、ヒトの PAD との比較も含め詳細に研究することにより、PAD 遺伝子がどのような役割を果たすために分子進化してきたのか、ニワトリがなぜ 3 つの PAD で十分なのか明らかにすることで、PAD の分子進化の意味するところが具体的に解明できるのではないかと考えた。

参考文献

- Kubilus J., et al., (1985) *J. Invest. Dermatol.*, 85, 232-234.
- Takahara H., et al., (1986) *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1303-1306.
- Wallis et al., (2004) *Nature* 432, 761-764.
- Ying S., et al., (2009) *J. Dermatol. Sci.* 53, 2-9.

2. 研究の目的

我々は、先行する研究によりニワトリの PAD のアイソザイムの一つが眼球網膜視細胞の光シグナルの場である外節に存在すること、しかも錐・桿体両視細胞の光受容を担うラメラ構造体に局在していることを発見した。ニワトリは光受容研究に非常によく使用されているモデル動物であり、その基本的メカニズムは哺乳類のものと同じある。PAD の機能を解明するうえで最も重要な研究課題は、標的となっている基質タンパク質を明らかにすることである。我々はニワトリ網膜内に脱イミノ化されているタンパク質の存在を免疫組織化学により確認していることから、網膜内で発現している PAD が実際に何らかのタンパク質を標的にしていることは間違いない。また、ニワトリは目が大きいため卵の殻に窓を開けることにより、ニワトリ胚でウイルスベクターを導入することで、効率よく RNA 干渉をおこなうことができることから、生体での PAD 遺伝子の機能を調べることも可能であ

る。そこで、本研究では以下の点を明らかにすることを目的として研究した。

ニワトリ網膜抽出液中に含まれる脱イミノ化タンパク質、PADの標的タンパク質の分離並びにその同定とcDNAクローニングによる構造決定

遺伝子組み換え型PADの標的タンパク質の調製と脱イミノ化反応による機能変換の解析

ニワトリ胚眼胚におけるin ovo RNA 干渉法(RNAi)による網膜PADの機能解析

3. 研究の方法

(1)平成23年度の研究では、ニワトリゲノム情報についてはBlast searchによる*in silico*解析を用いた。また、cPAD1、2、3の組換えタンパク質の発現はバキュロウイルス-昆虫細胞発現系を利用した。

(2)平成24年度の研究では、各cPADの組織局在性とその標的タンパク質局在性を明らかにするため、各cPADに対する特異的抗体を作成するため、特異性がありかつ抗体ができやすいとされる領域の配列情報に基づき合成ペプチドを業者に委託合成し、免疫動物としてウサギを利用して免疫、抗体価の上昇が認められたウサギから抗血清を採取し、各合成ペプチドをリガンドする親和性クロマトグラフィーにより抗体を精製して利用した。各種組織での発現をwestern blotにより、組織・細胞内局在性については免疫組織化学により調べた。また、標的タンパク質の局在性については抗シトルリン化抗体を用いた免疫組織化学によって調べた。

(3)平成25年度(最終年度)の研究では、ニワトリ胚でのRNA干渉法を利用して2つのPADアイソザイムの機能を解析するため、遺伝子換変鳥類アデノ随伴ウイルスを作成した。RNA抑制する可能性の遺伝子配列とRNAの合成は業者委託により行った。

4. 研究成果

(1)平成23年度の研究では、ニワトリゲノム情報の*in silico*解析から3種のPAD様遺伝子はニワトリの21番染色体上にクラスターとして座乗しており(図1)、これらをヒトPAD遺伝子群の物理地図や登録されている塩基配列との相同性比較により、これらはそれぞれヒトPAD type I、type II、type IIIにオルソログな遺伝子であることが判った(図2)。

図1

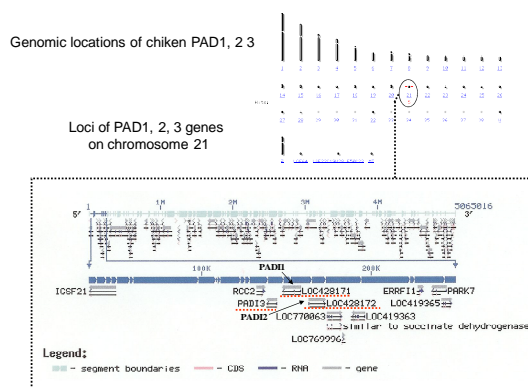


図2

Homology of nucleotide and amino acid between chicken and human PADI-3.

	cPAD1	cPAD2	cPAD3	hPAD1	hPAD2	hPAD3
cPAD1	■	60.4	67.3	65.9	63.3	63.7
cPAD2	51.1	■	61.9	59.7	70.9	60.1
cPAD3	60.2	53.7	■	63.7	63.9	64.3
hPAD1	58.2	49.1	58.5	■	63.1	66.8
hPAD2	52.8	68.7	55.9	52.2	■	63.2
hPAD3	55.2	50.3	56.3	57.0	51.9	■

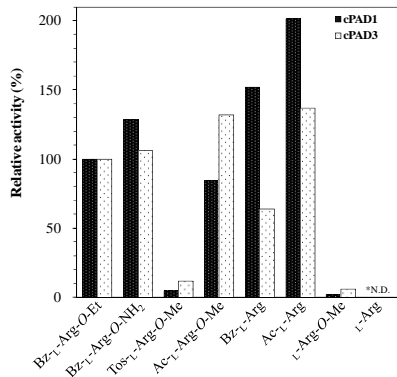
よって、これらのニワトリPAD遺伝子を本研究ではニワトリPAD type I(cPAD1/cPAD11)、type II(cPAD2/cPAD12)、type III(cPAD3/cPAD13)と名付けた。次いで、転写が確認された組織由来のmRNAを用い各ニワトリPADIのcDNAクローニングとその全塩基配列並びに推定アミノ酸配列を決定した(図3)。

図3 cPAD1, 2, 3のcDNA配列と推定アミノ酸配列



さらに、N 末端に His-tag を付加させた組換え型 cPAD1, cPAD2, cPAD3 タンパク質のパキユロウイルス-昆虫細胞発現系を構築し、精製に成功した。cPAD1 並びに cPAD は哺乳動物の PAD と同様に触媒活性に Ca イオンが必須であるが、各種合成基質並びに天然基質に対する反応性を検討した結果、両 PAD は類似した基質特異性を有しており哺乳動物の PAD とは大きく異なることが判った (図 4)。

図 4 各種基質に対する特異性

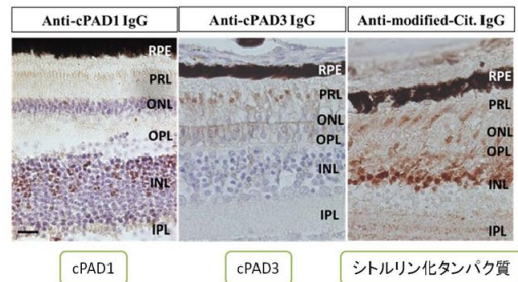


(2) 平成24年度の研究では、各cPAD の組織局在性とその標的タンパク質局在性を明らかにするため、各cPAD に対する特異的抗体を作製し、各種組織での発現をwestern blot により、組織・細胞内局在性については免疫組織化学により調べた。また、標的タンパク質の局在性については抗シトルリン化抗体を用いた免疫組織化学によって調べた。

その結果、cPAD1 とcPAD3 は脳の各種組織、眼球の網膜に存在し、cPAD2 はいずれの組織もその発現は認められなかった。また、cPAD1 は脳や延髄の神経細胞に局在し、網膜では水平細胞もしくは双曲細胞の細胞質に局在することを明らかにした。

一方、cPAD3 は視葉、小脳、延髄のグリア細胞やオリゴデンドロサイトの細胞質に、また網膜では視細胞層の錐体・幹細胞のラメラ層に局在することが判った。さらに、cPAD1 とcPAD3 が局在する組織には脱イミノ化タンパク質が存在することも明らかした (図 5)。

図 5 ニワトリ網膜での組織発現



このような結果から、ニワトリは進化の過程で獲得した3 つのPAD のうち、2 つのPAD (cPAD1 とcPAD3) を視覚機能に關与する重要な酵素として分子進化してきたことを推測する新たな知見を得ることができた。さらに、網膜内におけるPADの標的蛋白質としてグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)がその候補であることを明らかにすることができた。GAPDHは解糖系酵素として細胞生理機能に不可欠な酵素であり、組織全般に広く分布する酵素であるが、近年の研究では細胞情報伝達や遺伝子発現制御に關わることも判明している。網膜PADによるGAPDHの脱イミノ化がどのような関わりがあるかは大変興味深い。また、先の研究により、網膜内顆粒層に標的蛋白質が存在することが既に明らかとなっているが、この組織にはPAD3が存在しない。よってこの点を明確にしておくことは今後研究を進めるうえで大変重要である。本年度はこの問題を解決するための研究を行い、結果として内顆粒層上部にはPAD1が局在すること、またその局在部が脱イミノ化蛋白質と一致していることが明確となった。これらの結果からニワトリ網膜視細胞外節と内顆粒層上部に存在する2つのPADアイソザイムがそれぞれ分担して恒常

的に機能していることは間違いないことが判った。

(3) 平成25年度(最終年度)の研究では、ニワトリ胚でのRNA干渉法を利用して2つのPADアイソザイムの機能を解析するための研究を行った。ニワトリは卵の殻に窓を開けることにより、胚の観察や操作が簡単にでき、また目が大きいため、網膜の研究を行う上で非常に都合が良い。加えて、RNA干渉法により特定の遺伝子の機能を調べることも可能である。RNAi法は簡便で有効な遺伝子機能抑制法として広く利用されているが、本来の標的遺伝子以外の遺伝子に対しても意図せぬ抑制効果(off-target効果)をもたらすこともある。そこで、本研究では、作製したsiRNAがPAD遺伝子の発現を干渉すること、また特異的であることを調べるため、虹彩色素上皮細胞から視細胞への分化誘導した細胞を用いて、それを確認することができた。さらに、cPAD1とcPAD3の網膜における機能解明のために有用な、各cPADの過剰発現とsiRNAによる発現抑制、それぞれを可能とする遺伝子換変鳥類アデノ随伴ウイルスの作成に成功した。残念ながら、最終年度内に作成した遺伝子換変鳥類アデノ随伴ウイルスをニワトリ胚に感染させ、それに伴う視覚機能の変化を解析することはできなかったが、今後継続して研究する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Akira Shimizu, Kenji Handa, Tomonori Honda, Naoki Abe, Toshio Kojima, Hidenari Takahara

「Three isozymes of peptidylarginine deiminase in the chicken: Molecular cloning, characterization, and tissue distributi

on」, Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 167, 65-73, 2014.

(査読有)

[学会発表](計2件)

Akira Shimizu, Tomonori Honda, Toshio Kojima, Tetsuya Kohsaka, Hidenari Takahara 「Chicken peptidylarginine deiminase type I and III are constitutively expressed in the retinal neuron」, European Association for Vision and Eye Research, 2013.9.15 (Nice, France).

Akira Shimizu, Toshio Kojima, Hidenari Takahara 「Three Isozymes of Peptidylarginine deiminases in Chicken: Molecular cloning, characterization, and tissue distribution」, 第84回日本生化学会大会、2013.9.12、パシフィコ横浜国際会議場

[図書](計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高原 英成 (TAKAHARA HIDENARI)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：30122063

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し