様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2013～2015
課題番号：２５７１０００９

研究課題名（和文）シトルリン化タンパク質の網羅的解析と発癌における機能解析

研究課題名（英文）Proteomic analysis of citrullinated targets regulated by the p53-PADI4 pathway

研究代表者
谷川　千津（Tanikawa, Chizu）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：３０４２２４２１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　19,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、PADI4のシトルリン化基質をプロテオミクス解析により網羅的に探索し、150以上のタンパク質をシトルリン化基質として同定した。その多くがRNA結合タンパク質であり、シトルリン化によりタンパク質間の複合体形成が阻害される事が示された。Padi4 ノックアウトマウスのRNA sequence解析の結果、300以上の遺伝子のスプライシングが影響を受けている事が示された。
次に、シトルリン化のコンセンサス配列を決定し、肝癌患者の17.5%でこの配列に対する自己抗体が陽性となっている事がわかった。本研究により、シトルリン化修飾についての知見が深まり、生理的な意義が明らかとなったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Although recent proteome analyses have provided a comprehensive overview of various posttranscriptional modifications, the functions associated with protein citrullination remain unclear. Thus, we performed a proteomic screen and identified more than 100 PADI4 substrates associated with RNA processing and translation. Citrullination of RBMX inhibited the interaction with other hnRNP family members. RNA sequence analyses revealed that the splicing patterns of more than 300 genes were disrupted in bone marrow derived from Padi4-/- mice. Citrullination at the RGG motifs was elevated in a number of cancer tissues, and an antibody against citrullinated RGG motifs was observed in 17.5% of serum samples from patients with HCV-induced HCC. Our findings revealed that PADI4-mediated citrullination is associated with RNA processing and tumor immunogenicity and suggest that PADI4 activation has potential therapeutic implications for neurodegenerative disease treatment and cancer immunotherapy.

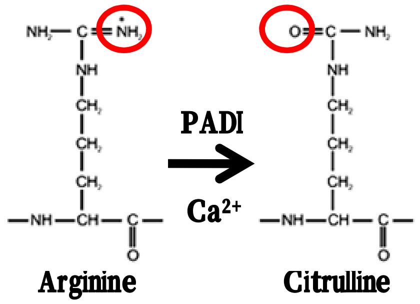
研究分野：分子腫瘍学

キーワード：p53　シトルリン化

１．研究開始当初の背景

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 p53RDL1、XEDAR、p53AIP1、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。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（図 1）。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。

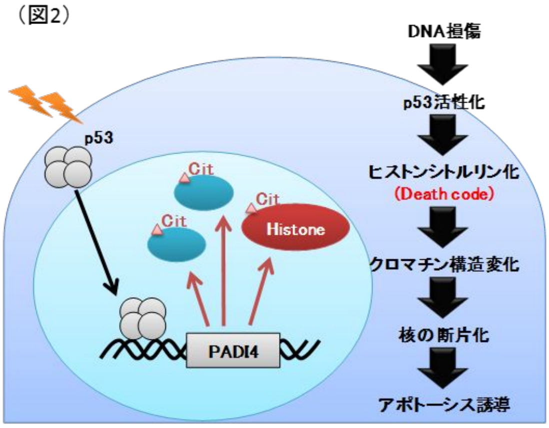
(図1)



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（図 1）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（図 2）。

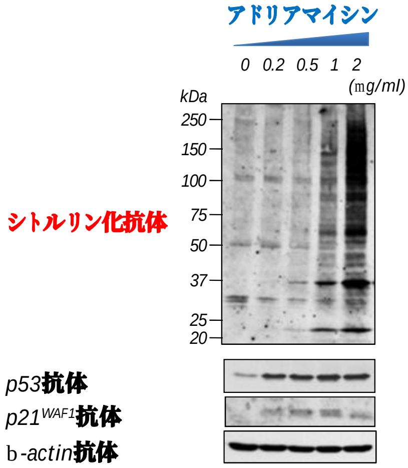
（図2）



２．研究の目的

我々の解析によって、DNA ダメージによって細胞内の複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（図 3）。

(図3)



この結果を元に、研究期間内に新規のシトルリン化基質の同定とその生理学的意義を明らかにするのが本研究の目的である。修飾によってタンパク質の機能に及ぼす影響及びその生理的意義について機能解析を進めていく。生理的意義の一つとして注目しているのが、抗原性の獲得である。シトルリン化修飾についてはこれまで、慢性関節リウマチおよび多発性硬化症における自己抗体産生との関連が知られている。これらの疾患ではシトルリン化されたタンパク質が非自己として認識され、抗原性を獲得するとされている。癌においてもシトルリン化タンパク質が免疫細胞活性化の目印となる可能性について検討を進めていった。

p53 は癌組織において、変異や欠失などのゲノムレベルにおける異常だけでなく、転写レベルにおける抑制やタンパク質分解の亢進など多くの機序により不活性化されている。また p53 遺伝子の生殖細胞変異は、家系内に癌・肉腫が多発する遺伝性疾患である Li-Fraumeni 症候群の原因となるなど、p53 は発癌の過程において最も重要な癌抑制遺伝子と考えられている。p53 は転写因子として機能し、細胞周期制御やアポトーシス誘導などに関連する様々な下流遺伝子の発現量を制御することによって癌抑制機能を発揮する。本研究の特色として、p53 がタンパク質のシトルリン化修飾酵素である PADI4 の発現誘導を介して様々なタンパク質の質的な制御にも関与することに着目している点が挙げられる。本研究によって、シトルリン化修飾の生理的意義をさらに明らかにすることは、癌分子生物学の分野のみならず生命科学の分野全般に大きなインパクトを持つと考えられる。シトルリン化タンパク質が癌抗原として機能していることが証明できれば、腫瘍免疫の活性化など臨床的な応用にもつながると期待できる。

３．研究の方法

本研究では、シトルリン化基質の網羅的同定のため、PADI4 過剰発現後の細胞抽出液を用いてプロテオミクス解析を行った。PADI4 を導入した HEK293T 細胞から細胞抽出液を準備し、質量分析によりシトルリン化修飾による 1Da の違いを網羅的に探索した。次に、これら新規シトルリン化タンパク質に対し、以下の解析を進めていく。

a)in vivo におけるシトルリン化の検討

b)シトルリン化部位の決定と特異的抗体の作成

c)基質タンパク質にシトルリン化修飾が及ぼす影響の解析

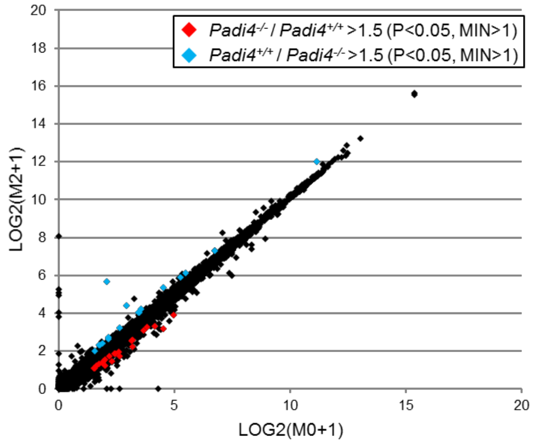
これらの解析によってシトルリン化基質の網羅的同定とその意義について明らかになると考えられる。

４．研究成果

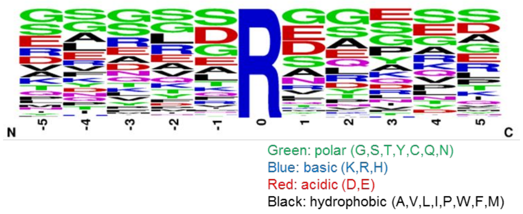
質量分析による網羅的解析の結果、100 以上の基質を同定し、特に hnRNP ファミリーなど RNA 修飾に関係する分子が有意にシトルリン化を受けることが明らかとなった。

最も顕著にシトルリン化を受けた RBMX に対する抗体を作成した結果、シトルリン化されることが in vivo で証明された。

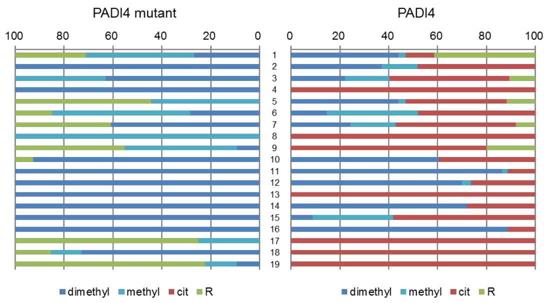
さらに、RNA splicing に対する影響を検討する目的で PADI4 を過剰発現させた細胞由来の mRNA を用いて、RNA シークエンスを施行した結果、PADI4 が様々な遺伝子の発現やスプライシングを制御することが示された（図 4）。



また質量分析による網羅的解析の結果、シトルリン化修飾のコンセンサス配列を明らかとした（図 5）。さらに、そのモチーフに対するシトルリン化抗体を作成した。



また、アルギニン残基はメチル化修飾も受けうることから、メチル化とシトルリン化の両修飾の関係性について検討したところ、両修飾が同一アルギニンに対して競合している可能性が、in vitro および in vivo の実験にて示唆された（図 6）。



また PADI4 の癌化における生理的な意義を検討する目的で、PADI4-/-p53+/-マウス及び PADI4+/+p53+/-間での発癌、生存を検討した。その結果、PADI4-/-p53+/-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。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所、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。

シトルリン化修飾は、アルギニン残基の正電荷を消失させることで、タンパク質の高次構造に影響を与えることが知られている。これまでに、慢性関節リウマチをはじめ様々な疾患において、シトルリン化ペプチドが非自己として認識されることで、疾患発症と関連することが報告されている。そこで、本研究で決定したシトルリン化コンセンサス配列の修飾ペプチドを合成し、リウマチや癌などの患者血清中に同配列に対する抗体が存在するかどうか検討した。その結果、肝がん患者の 17.5%の患者で自己抗体が陽性となっていた。シトルリン化修飾については慢性関節リウマチなどにおいて自己抗体産生との関連が知られているが、一部の癌においてもこの修飾が免疫細胞活性化の目印となる可能性が示された。

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　８　件）

[1] Koguchi T, Tanikawa C, Mori J, Kojima Y, Matsuda K. Regulation of myo-inositol biosynthesis by p53-ISYNA1 pathway. Int J Oncol. in press.
[2] Mori J, Tanikawa C, Funauchi Y, Lo PH, Nakamura Y, Matsuda K. Cystatin C as a p53-inducible apoptotic mediator that regulates cathepsin L activity. Cancer Sci. 107(3), 298-306 (2016).
[3] 谷川千津，松田浩一、 がんとシトルリン化タンパク質、 医学のあゆみ 255(9): 871-876, 2015
[4] Funauchi Y, Tanikawa C, Yi Lo PH, Mori J, Daigo Y, Takano A, Miyagi Y, Okawa A, Nakamura Y, Matsuda K. Regulation of iron homeostasis by the p53-ISCU pathway. Sci Rep. 5, 16497 (2015).
[5] Deng Z, Matsuda K, Tanikawa C, Lin J, Furukawa Y, Hamamoto R, Nakamura Y. Late

Cornified Envelope Group I, a novel target of p53, regulates PRMT5 activity. Neoplasia 16(8), 656-664 (2014).
[6] Lin J, Deng Z, Tanikawa C, Shuin T, Miki T, Matsuda K, Nakamura Y. Downregulation of the tumor suppressor HSPB7, involved in the p53 pathway, in renal cell carcinoma by hypermethylation. Int J Oncol. 44(5), 1490-1498 (2014).
[7] Tanikawa C, Nakagawa H, Furukawa Y, Nakamura Y, Matsuda K. CLCA2 as a p53-Inducible Senescence Mediator. Neoplasia 14(2), 141-149 (2012).
[8] 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. Nat Commun. 3, 676 (2012).

〔学会発表〕（計　5　件）

[1] 谷川千津、植田幸嗣、中川英刀、中村祐輔、松田浩一、Proteomic analysis of citrullinated targets regulated by the p53-PADI4 pathway、日本癌学会学術集会、2013年10月2日-2013年10月4日、横浜
[2] Chizu Tanikawa, Koji Ueda, Hidewaki Nakagawa, Yusuke Nakamura, Koichi Matsuda、Proteomic analysis of citrullinated targets regulated by the p53-PADI4 pathway、AACR Annual Meeting、2014年4月5日-2014年4月9日、San Diego、USA
[3] 谷川千津、植田幸嗣、中川英刀、中村祐輔、松田浩一、Regulation of RNA processing by p53-PADI4 pathway、日本癌学会学術集会、2014年9月25日-2014年9月27日、横浜
[4] Chizu Tanikawa, Koji Ueda, Yusuke Nakamura, Koichi Matsuda、Regulation of RNA processing by PADI4 pathway、AACR Annual Meeting、2015年4月18日-2015年4月22日、Philadelphia、USA
[5] 谷川千津、Zhang Yao-shong、井元清哉、山口類、宮野悟、中川英刀、中村祐輔、松田浩一、p53による転写制御の組織網羅的解析、日本癌学会学術集会、2015年10月8日-2015年10月10日、名古屋

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計0　件）

○取得状況（計0　件）

〔その他〕
ホームページ等
http://square.umin.ac.jp/matsudalab/index.html

６．研究組織

(1)研究代表者
谷川　千津（TANIKAWA, Chizu）
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：　30422421

(2)研究分担者
（　　　）
研究者番号：

(3)連携研究者
（　　　）
研究者番号：