

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15060

研究課題名(和文)蛋白質シトルリン化制御因子の探索とその生体機能調節における役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulatory factors for protein citrullination and their roles in biological functions

研究代表者

堀内 久徳 (Hisanori, Horiuchi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90291426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：いくつかの蛋白質ではカルシウム依存的酵素(PAD)によって、陽性荷電を持つアルギニン残基が中性のシトルリンに変換され、その機能が大きく影響を受ける。我々は、PAD4の活性制御因子を見出し、iPAD1と名付けた。iPAD1存在下にはカルシウム感受性が大きく改善した。さらに、いくつかのシトルリン化が報告されているいくつかの蛋白質でアフィニティ精製を行い、細胞成長に重要なING4に関して、いくつかの重要な相互作用因子がシトルリン化依存的に親和性を変えていることを見いだした。現在、このアフィニティの変化が、ING4および、その結合蛋白質の機能にどのような影響を与えているか解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：Arginine residues in some proteins are citrullinated, which is mediated by calcium-dependent enzymes PADs. The citrullination often affects their functions such as epigenetic control of gene expression, tumorigenesis, autoimmune diseases, since positively-charged arginine is changed into neutral citrulline. However, much remains unclear in the regulation of PAD activity. We found a PAD4 regulating factor and named it iPAD1 that positively regulated PAD4. While mM order of calcium ion has been required for the efficient activity of PAD4 in vitro, iPAD1 drastically enhanced the calcium-sensitivity. Further, we performed affinity purification with several proteins that have been reported to undergo citrullination to identify their binding proteins that change the affinity. Among them, we found a few proteins that change their affinity to ING4, a critical factor for cell growth. Currently, we are investigating functional relevance about the affinity-change in the protein function.

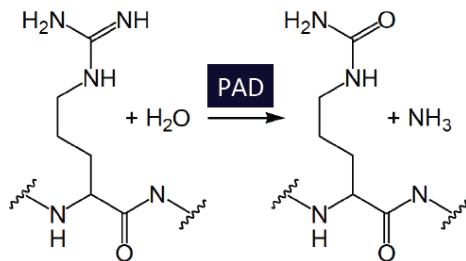
研究分野：生化学、内科学

キーワード：蛋白質シトルリン化 翻訳後修飾 PAD4 好中球

1. 研究開始当初の背景

いくつかの蛋白質では、アルギニン残基が脱イミノ化され、シトルリンに変換されている(図1)。アルギニンは正電荷をもつが、シトルリンは電荷を持たないので、蛋白質の立体

図1. 蛋白質シトルリン化。正電荷をもつアルギニン残基がPADが担う脱イミノ反応によって、電荷を持たないアミノ酸であるシトルリンに変換される反応である。



構造に大きな変化をもたらし、その機能に影響を与える。このシトルリン化反応を担うのは、peptidylarginine deiminase (PAD)であり、生体には5つ存在する。PAD1とPAD3は角化細胞等に発現してケラチンやfilaggrinのシトルリン化を介して、角化に重要な働きをする。PAD2は脳を含め全身に広く発現し、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) を基質とするが、過度のPAD2によるMBPのシトルリン化は脱髄を引き起こし、多発性硬化症を発症させる(*J Neurochem*, 81, 335-343, 2002)。また、PAD2はエストロゲン刺激に伴って、核内に移行して、ヒストンH3 Arg26やH4 Arg3をシトルリン化して遺伝子発現を制御する(*PNAS* 109, 13331-13336, 2012)。PAD4は白血球や癌細胞に強発現し、PADの中で唯一核内に存在する。Lamin Cやコアクチベータp300、またヒストンH3 Arg8やArg17をシトルリン化する。PAD4はp53標的遺伝子のプロモータ上に結合してヒストンをシトルリン化し、DNA損傷に際して同部より解離してp53標的遺伝子の転写を促進する(*Mol Cell Biol* 28, 4745-4758, 2008)。また、ヒストンH3でmonomethyl arginineも脱イミノ化し、シトルリン化したヒストンは

methyl化されないことで、遺伝子発現のエピジェネティック制御に寄与している(*Science* 306, 279-283, 2004)。さらに、活性化好中球では、脱凝縮したクロマチン(NETs)を細胞外に放出するが、NETsは生体防御に重要な働きをする一方、全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患の原因となっている。PAD4はNETs形成時のクロマチン脱凝縮に必須である(*J Cell Biol* 184, 205-213, 2009)。最近、細胞のreprogrammingに際してPAD4は早期に発現誘導され、reprogrammingに重要な働きをしていることが報告された(*Nature* 507, 104-108, 2014)。PAD6は卵巣に発現して受精・初期発生に重要である。以上のように蛋白質シトルリン化の医学・生物学的な重要性がこの約10年の間に次々と明らかにされた。しかし、蛋白質シトルリン化・PADの制御メカニズムに関してはほとんど報告がない。

2. 研究の目的

以上のように、蛋白質シトルリン化の重要性が明らかとなりつつある中、本研究では蛋白質シトルリン化の制御因子を同定し、その生体機能調節における役割を解明することを目的とする。また、PAD4が活性化好中球でヒストンをシトルリン化し、クロマチンを脱凝縮することがNETs形成に必須であることが示されているが、その分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) **iPAD1の同定**:我々は、組換えPAD4を作成・精製し、そのヒストンH3に対するシトルリン化活性への影響をin vitroで評価し、カラムクロマトグラフィー法によってHeLa細胞核抽出液に複数のPAD4制御活性を確認した。生化学的にその同定を進めた。

(2) **同定した蛋白質 (iPAD1)の解析**: PAD4制御活性を担うひとつの蛋白質を同定し、iPAD1 (interactor of PAD)と名付けた。組換えiPAD1を作成し、in vitroでiPAD1のPAD4活性化へ影響を評価する。さらに、PAD4やiPAD1を細胞に強制発現し、あるいはsiRNA等を用いてノックダウンし、発現量を操作し、ヒストン等のシトルリン化を評価する。

(3) **iPAD1の細胞機能調節における役割の解明**: 好中球細胞株 (HL60等) でNETs形成を評価可能な解析系を構築する。それにPAD4やiPAD1遺伝子を強制発現・ノックダウンし、NETs形成を評価し、iPAD1の細胞機能調節における役割を明らかにする。

(4) **蛋白質シトルリン化の蛋白質機能に対する役割の解明**: 種々の蛋白質がシトルリン化されることが報告されている。そのような組み換え蛋白質を作成し、in vitroでシトルリン化後、プルダウン法によってシトルリン化によって親和性が変化する結合蛋白質を同定する。

(5) **好中球 NETs 形成の分子機構の解明**: PAD4 が活性化好中球でヒストンをシトルリン化し、クロマチンを脱凝縮することがNETs 形成に必須であることが示されているが、そのメカニズムに関して多くが不明である。薬理学的手法等によって、そのメカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1) **iPAD1 の同定**: PAD4 の活性に影響を与える活性を複数確認したが、そのうちのひとつを同定し、iPAD1 と名付けた。

(2) **iPAD1 の機能解析**: iPAD1 は、PAD4 のカルシウム感受性を上げた。in vitro でこれまで、PAD4 が有効な活性を発揮するためには mM オーダーの Ca^{2+} を要したが、iPAD1 存在下にはこのカルシウム感受性が大きく亢進した。

このような活性はこれまで知られていない。生理的条件下でもヒストンシトルリン化が生じ、遺伝子発現を制御しているという報告もあり、iPAD1 等が関与している可能性がある。現在、論文作成中である。

(3) **iPAD1 の細胞機能調節における役割の解明**: iPAD1 の細胞機能における役割を明らかにするため、好中球細胞株 (HL60 等) で NETs 形成を評価可能な解析系を構築した。今後、PAD4 や iPAD1 遺伝子を強制発現・ノックダウンし、NETs 形成を評価し、iPAD1 の細胞機能調節における役割を明らかにする計画である。

(4) **蛋白質シトルリン化の蛋白質機能に対する役割の解明**: 種々の蛋白質がシトルリン化されることが報告されているが、そのような蛋白質としてING4とnucleophosminに注目した。組み換え蛋白質を作成し、in vitroでシトルリン化後、プルダウン法によってシトルリン化によって親和性が変化する結合蛋白質をいくつか同定し、解析中である。多くは、シトルリン化によって親和性が減弱するものであった。現在、それらの蛋白質シトルリン化の細胞機能調節における役割について解析中である。

(5) **好中球 NETs 形成の分子機構の解明**:

NETs 形成制御の分子メカニズムに関しては多くが不明であるが、我々は炎症組織で産生されるプロスタグランジン E₂ が、好中球のEP2およびEP4受容体を介して、細胞内cAMP濃度を上昇させることでNETs形成を抑制することを明らかにした (Shishikura et al, Br J Pharmacol, 2016)。

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 2 件)

1. 宍倉匡祐、堀内久徳 (2017) NETs形成の分子メカニズム、医学のあゆみ 260, 989-990, 査読無,
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=aa7ayuma/2017/026011/010&name=0989-0990j&UserID=130.34.163.21>
2. K. Shishikura, T. Horiuchi, N. Sakata, D-A Trinh, R. Shirakawa, T. Kimura, Y. Asada, H. Horiuchi (2016) Prostaglandin E₂ inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP. *Br J Pharmacol*, 173, 319-331, DOI: 10.1111/bph.13373, 査読有,

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 木村朋寛、宍倉匡祐、堀内嵩弘、坂田菜摘、Trinh Anh Duc、白川龍太郎、堀内久徳 Prostaglandin E₂ inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP.日本生化学会大会、2015. 12.1-2015. 12. 4、神戸国際会議場ほか (兵庫・神戸)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等 : 当研究室ホームページ <http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mcb/study-nets.html#nets> にて、研究紹介を行った。

6 . 研究組織

(1)研究代表者
堀内 久徳 (HORIUCHI, Hisanori)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号: 90291426

(2)研究分担者
()

研究者番号 :

(3)連携研究者
()

研究者番号 :

(4)研究協力者
()