

令和元年5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07107

研究課題名(和文) タンパク質シトルリン修飾酵素PADI2が大腸がんにも果たす役割の解明

研究課題名(英文) PADI2 suppresses proliferation of colon cancer cells through protein citrullination

研究代表者

舟山 亮 (Funayama, Ryo)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20452295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PADI2 (Peptidyl arginine deiminase 2) はタンパク質のアルギニン残基をシトルリン残基へ変換する酵素である。正常な大腸上皮組織で高発現する一方、がん組織と大腸がん由来の細胞株では発現量が低下していた。PADI2を安定に過剰発現する大腸がん細胞株は、PADI2を発現しない細胞に比べて増殖能が低下した。増殖の遅延は、酵素活性のないPADI2変異体を発現した細胞では見られないことから、PADI2による基質タンパク質のシトルリン化が細胞の増殖を抑制すると考えられた。またPADI2を高発現する大腸の正常組織にはシトルリン化タンパク質が存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質のシトルリン修飾の異常は関節リウマチやアルツハイマー病の進行に関与しているが、シトルリン修飾の異常がどのように病態を引き起こすのかは不明である。本研究では、大腸がんの進行の過程でシトルリン化酵素PADI2の発現量が低下することを見出した。また、PADI2によるタンパク質のシトルリン化は大腸上皮細胞の増殖を抑制することを明らかにした。タンパク質のシトルリン修飾状態の変化が細胞の増殖能を通して大腸組織のがん化に影響することを明らかにした点に意義がある。

研究成果の概要(英文)：PADI2 was expressed in normal colon epithelial cells and downregulated during colon carcinogenesis. Overexpression of PADI2 suppressed proliferation of colon cancer cells in vitro concomitant with increased protein citrullination. The growth defect was not caused by increased apoptosis but by suppression of cell cycle progression. Some citrullinated proteins were found in normal colon tissues. Our data thus suggest that PADI2 suppresses proliferation of colon epithelial cells through protein citrullination, and that downregulation of PADI2 expression might contribute to colon carcinogenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：シトルリン化 PADI2 大腸がん 翻訳後修飾

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のシトルリン修飾はアルギニン残基がシトルリン残基へ変化する修飾で、酵素 Peptidyl arginine deiminase (PADI) が触媒する。アルギニン残基がシトルリン残基へ変わるとアミノ酸側鎖の正電荷が失われるので、基質タンパク質の構造と機能が大きく変化すると考えられている。これまでにヒストンやビメンチンなどの構造タンパク質がシトルリン修飾を受けることが知られており、ヒストンのシトルリン修飾は遺伝子の転写を制御している。

タンパク質の翻訳後修飾の異常はしばしば疾患を引き起こすが、シトルリン修飾の異常もまた疾患に関与している。自己免疫疾患である関節リウマチでは、関節局所でシトルリン化タンパク質を認識する自己抗体が検出され、特異性の高い診断マーカーとして利用されている。しかしながら、シトルリン修飾の異常がどのように関節リウマチの病態を引き起こすのかは不明である。また、シトルリン修飾の異常と大腸がんとの関連についてはほとんど明らかでない。

我々は研究開始の当初、大腸がんの抗がん剤耐性を解析しており、大腸の正常組織、腫瘍組織および大腸がん由来細胞株のトランスクリプトームデータを取得して、抗がん剤を排出する ABC 輸送体遺伝子の発現制御機構を解析した。その過程で偶然、シトルリン化酵素 PADI2 と大腸がんとの密接な関連を示す興味深い実験データを得た。

2. 研究の目的

トランスクリプトームデータを精査した結果、ヒトに存在する 5 種類の PADI 遺伝子のうち、大腸正常組織で発現しているのは PADI2 だけであった。特に興味深いことに、正常組織に比べて腫瘍組織では PADI2 の発現量が著しく低下していた。また、大腸がん細胞株でも PADI2 の発現量が軒並み低下していた。そこで、抗 PADI2 抗体を用いた免疫組織染色を行った結果、PADI2 タンパク質は正常な大腸上皮組織で高発現しているが、腫瘍組織では発現量が大きく低下していた。これらの予備の結果から、大腸上皮細胞のがん化の過程でシトルリン化酵素 PADI2 の発現量が著しく低下しており、シトルリン修飾量の低下が、がん化の過程で重要な役割を果たしていると考えられた。そこで本研究では、タンパク質のシトルリン化酵素 PADI2 が大腸上皮細胞のがん化に果たす役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では以下の 3 つのアプローチで、PADI2 が大腸上皮細胞のがん化に果たす役割を解析した。

(1) 大腸がんの患者より大腸の正常組織と腫瘍組織を切除し、RNA とタンパク質を抽出した。また、5 種類の大腸がん由来細胞株から同様に RNA とタンパク質を抽出した。RNA-seq、RT-qPCR、ウエスタンブロットおよび免疫組織染色を行い、大腸がんの進行の過程で変化する PADI2 遺伝子の発現量を解析した。マイクロアレイデータの再解析には、米国国立生物学情報センター (NCBI) の Gene Expression Omnibus (GEO) に公開されているデータセット GSE41258、GSE20842 および GSE9348 を使用した。

(2) PADI2 の発現が大腸がん細胞の増殖に与える影響を調べるために、PADI2 遺伝子を安定に発現する HCT 116 細胞株を作製した。細胞をプラスチック培養皿に播種し、3 日ごとに細胞数を計測して、細胞の増殖速度を調べた。細胞周期の解析には FACS Canto II フローサイトメトリーを使用した。細胞のコロニー形成能は、マトリゲルを用いた三次元培養により測定した。

(3) PADI2 によりシトルリン化される基質タンパク質を同定するために、シトルリン残基を選択的にビオチン標識して、ストレプトアビジンビーズを用いて標識タンパク質を濃縮することを試みた。このために、PADI2 を安定に発現する HCT 116 細胞株および大腸正常組織からタンパク質を抽出し、ビオチン化 phenylglyoxal 試薬を添加して低 pH 条件下で反応させた。反応後、タンパク質を SDS-PAGE で分離し、ストレプトアビジン-HRP を用いてビオチン標識されたシトルリン化タンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) 大腸のがん組織では PADI2 遺伝子の発現量が低下している。大腸がんの抗がん剤耐性を解析する目的で、大腸正常組織、大腸腫瘍組織および大腸がん由来細胞株のトランスクリプトームデータを取得し、抗がん剤を排出する ABC 輸送体遺伝子 ABC3 遺伝子の発現制御機構を解明した (Kobayashi M. et al, 2016)。この解析の過程で、大腸がん組織では

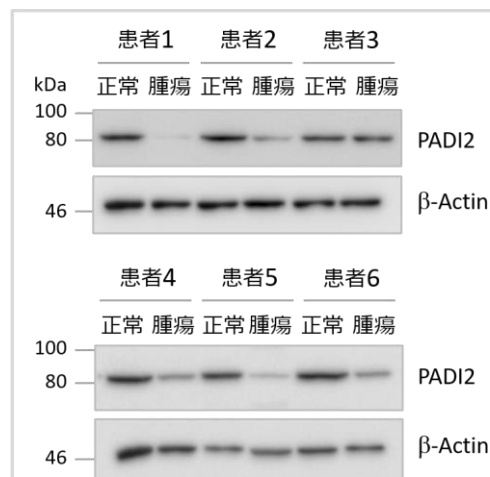


図1 大腸のがん組織ではPADI2 タンパク質の発現量が低下している

シトルリン化酵素PADI2のmRNA発現量が著しく低下していることを見出した。大腸がん と PADI2 遺伝子との関係をさらに調べるために、データベースに公開されている大腸がん組織のマイクロアレイデータを再解析した結果、PADI2 mRNA 発現量は大腸がんの進行に伴い低下することが明らかになった。また、抗 PADI2 抗体を用いたウエスタンブロット解析と免疫組織染色の結果、PADI2 タンパク質は正常な大腸の上皮細胞で高発現しているが、腫瘍細胞では発現が低下していることが明らかになった(図1、図2)。

PADI2の発現量が大腸のがん組織で低いことと一致して、大腸がん由来の細胞株でも PADI2 mRNA 発現量は低く抑制されていた。大腸がん細胞株における PADI2 の発現制御機構を調べるために、細胞を 5-azacytidine (DNA メチル化酵素阻害剤) または Trichostatin A (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤) で処理した。その結果、PADI2 の発現量は 5-azacytidine 処理により変化しなかったが、Trichostatin A 処理により大きく増加した。したがって、大腸がん細胞における PADI2 遺伝子の発現抑制は、主にヒストンの脱アセチル化により起きていると考えられた。

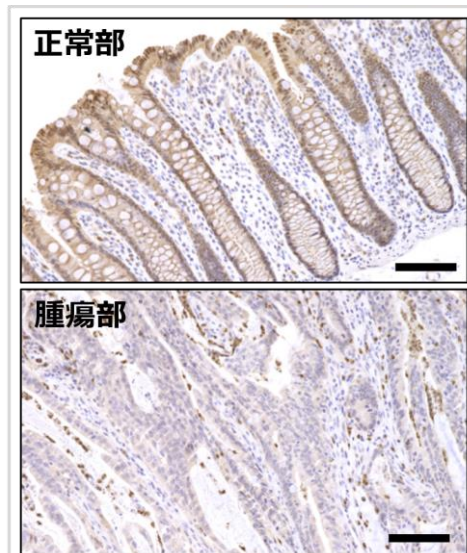


図2 PADI2は大腸の上皮組織で発現している

(2) PADI2 遺伝子の発現は大腸がん細胞の増殖能を抑制する。

大腸のがん組織では PADI2 遺伝子の発現量が低下していることから、PADI2 によるタンパク質のシトルリン化は正常細胞の腫瘍形成を抑制すると考えた。この仮説を調べるために、野生型 PADI2 遺伝子を過剰発現する大腸がん細胞株 HCT 116 を作製した。また陰性対照として、酵素活性のない 2 種類の PADI2 遺伝子 (C647A 変異体および transcript isoform2) を発現する細胞を作製した。作製した細胞からタンパク質を抽出し、抗シトルリン抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った結果、野生型 PADI2 を発現する細胞でシトルリン化タンパク質の量が増加していた。

そこで作製した HCT 116 細胞の増殖能を調べたところ、野生型 PADI2 を発現する細胞は陰性対照の細胞に比べて増殖速度が低下していた (図3左)。フローサイトメトリー解析の結果、この増殖の遅延は細胞周期が G1 期で停止しているためであることが分かった。生体内での環境を模倣して、マトリゲルを用いた三次元培養法により細胞の増殖能をさらに調べた結果、野生型 PADI2 を発現する細胞はコロニー形成能が低下していた (図3右)。細胞増殖速度の低下やコロニー形成能の低下は酵素活性のない PADI2 変異体を導入した細胞では見られないことから、PADI2 過剰発現による増殖能の低下はタンパク質のシトルリン化活性に依存して起きていると考えられた。

(3) 大腸の正常組織にはシトルリン化されたタンパク質が存在する。

PADI2 が細胞の増殖を抑制する分子機構を解明するために、PADI2 によってシトルリン化される基質タンパク質を探索した。PADI2 を過剰発現する大腸がん細胞株および PADI2 を高発現する大腸正常組織にはシトルリン化された複数のタンパク質が存在することが、抗シトルリン抗体を用いたウエスタンブロット解析により明らかになった。

そこで、タンパク質のシトルリン残基を選択的にビオチンで標識し、ストレプトアビジンビーズを用いてシトルリン化タンパク質を濃縮することを試みた。タンパク質抽出液にビオチン化 phenylglyoxal を添加して低 pH 条件下で反応させることにより、シトルリン化タンパク質を効率よくビオチン標識することに成功した。しかし低 pH 条件下ではタンパク質が変性して析出してしまい、シトルリン化タンパク質を濃縮することができなかった。現在、濃縮条件の最適化を行っており、引き続き、PADI2 によりシトルリン化される基質タンパク質の同定を進め、PADI2 が

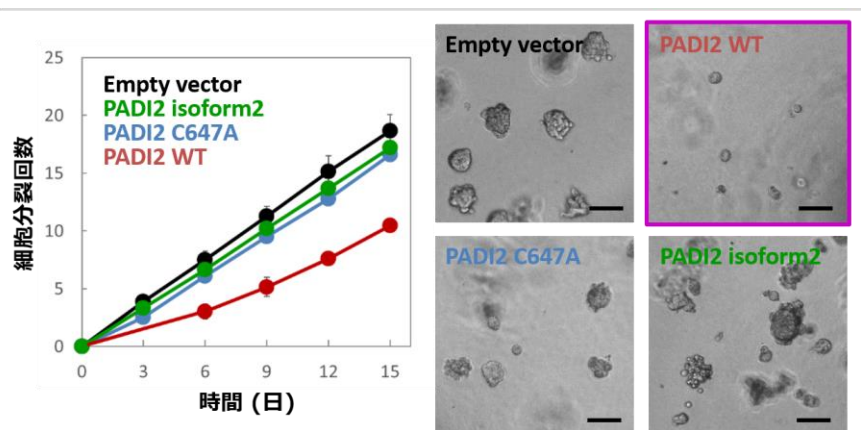
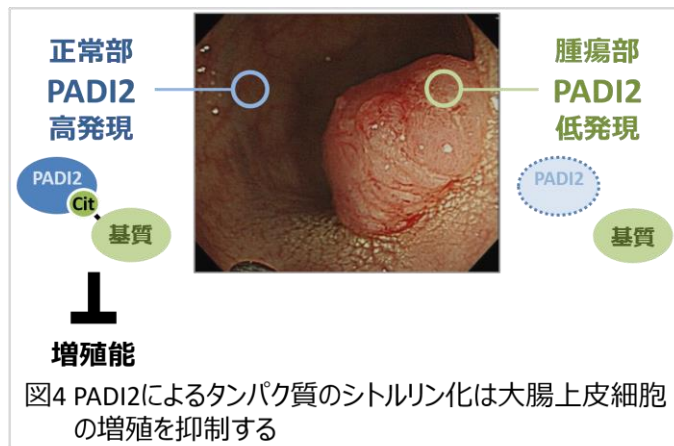


図3 PADI2によるタンパク質のシトルリン化は大腸がん細胞の増殖を抑制する

細胞の増殖を制御する分子機構を解明する予定である。

以上の解析結果から、PADI2は大腸の正常上皮組織で高発現し、基質タンパク質のシトルリン化を介して正常細胞の増殖能を抑制していると考えられた(図4)。大腸の腫瘍細胞では、ヒストンの脱アセチル化を介したエピジェネティックな機構によりPADI2の発現が抑制されるため、タンパク質のシトルリン化が起こりにくくなり、これが大腸がん細胞の異常な増殖を引き起こしている可能性がある。PADI2による大腸がんの制御機構をより理解するためには、PADI2によりシトルリン化される基質タンパク質を同定し、その機能を明らかにすることが重要である。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

- ① [Funayama R](#), Taniguchi H, Mizuma M, Fujishima F, Kobayashi M, Ohnuma S, Unno M, Nakayama K. Protein-arginine deiminase 2 suppresses proliferation of colon cancer cells through protein citrullination. *Cancer Sci.* 2017;108(4):713-8. DOI 10.1111/cas.13179. 査読有
- ② Kobayashi M, [Funayama R](#), Ohnuma S, Unno M, Nakayama K. Wnt-beta-catenin signaling regulates ABCC3 (MRP3) transporter expression in colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2016;107(12):1776-84. DOI 10.1111/cas.13097. 査読有

[学会発表] (計 4件)

- ① Keiko Nakayama, [Ryo Funayama](#), Hajime Taniguchi. PADI2 suppresses proliferation of colon cancer cells through protein citrullination. 11th AACR-JCA Joint Conference. 2019年;2月11日. アメリカ合衆国ハワイ. ポスター発表.
- ② [舟山亮](#), 遠山慎吾, 高唯真, 中山啓子. 大腸がんにおける Fibulin 2 スプライスバリエントの役割. 第41回日本分子生物学会年会. 2018年;11月30日. 神奈川県横浜市. ポスター発表.

[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

東北大学大学院医学系研究科細胞増殖制御分野ホームページ

<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中山 啓子

ローマ字氏名：(Nakayama, keiko)

研究協力者氏名：谷口 肇

ローマ字氏名：(TANIGUCHI, hajime)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。