



RGGモチーフに対するシトルリン化修飾の意義を解明 ～タンパク質凝集性およびALS発症への関与～

1. 発表者：

谷川千津（東京大学医科学研究所シーケンス技術開発分野 助教）

松田浩一（東京大学新領域創成科学研究科 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆翻訳後修飾の一種であるシトルリン化が、FETタンパク質の凝集性を制御することにより、ALS発症に関与することを示しました。
- ◆網羅的スクリーニングによりPAD4の基質と標的モチーフ、またヒト疾患における意義を明らかとしました。
- ◆PAD4の活性低下によるALSの発症メカニズムの一端を解明し、難治性疾患であるALSの治療薬の開発につながる可能性が示されました。

3. 発表概要：

シトルリン化修飾はPADファミリーによって担われる翻訳後修飾の一種ですが、その生理的意義の全貌は明らかになっていません。東京大学の谷川千津助教、松田浩一教授、がん研究会、理化学研究所、名古屋大学らの研究グループは、シトルリン化修飾が、FETタンパク質の凝集性を制御することにより、ALS発症に関与することを示しました。

質量分析を用いた網羅的探索により、159のタンパク質がPAD4の基質として同定され、これらには、ALS関連タンパク質であるFETタンパク質やhnRNPファミリーなどのRNA結合タンパク質が多く含まれていました。さらに、シトルリン化修飾のコンセンサス配列としてRGGモチーフを決定し、同モチーフを標的とするアルギニンメチル化修飾とシトルリン化は競合的に働き、タンパク質の機能を制御していることを明らかとしました。

また、ALS関連タンパク質はその凝集性が病態と深く関係していますが、これらタンパク質の凝集性がシトルリン化修飾により強く制御されていることが明らかとなり、ALSにおけるタンパク質凝集のメカニズムの一端が示されました。本成果は、難治性疾患であるALSの治療薬の開発につながる可能性が期待されます。

本研究成果は、2018年2月6日午後12時（アメリカ東部時間）に米科学誌「Cell Reports」にオンライン公開されます。

4. 発表内容：

シトルリン化修飾（注1）はPADファミリーによって担われる翻訳後修飾の一種ですが、その生理的意義の全貌は明らかになっていません。これまで我々は、PAD4ががん抑制遺伝子p53により発現制御されること、および、ヒストンのシトルリン化修飾を介しクロマチン構造を変化させ、ダメージを受けた細胞に対してアポトーシスを誘導することを明らかとしました（Cancer research 69, 8761–8769 (2009), Nature communications 3, 676

(2012))。本研究では、PAD4の機能をさらに詳細に調べるため、基質の網羅的探索を行いました。これまで基質の探索は主にカルシウム存在下で行われてきましたが、本研究では質量分析を用い、生理的条件下においてシトルリン化修飾により生じる約1Daの変化を網羅的に同定することに成功しました。

解析の結果、PAD4を発現させた細胞内で159タンパク質においてシトルリン化修飾が起きていることを確認しました。これらにはRNAスプライシングなどに関わるRNA結合タンパク質が多く含まれていました。さらに我々は、同定した配列情報を元に、これまで明らかとされていなかったシトルリン化修飾のコンセンサス配列としてRGGモチーフを決定しました。このモチーフはアルギニンメチル化修飾のコンセンサス配列として知られており、hnRNPファミリー（注2）やFETタンパク質（注3）などRNA結合タンパク質に多く含まれます。これらRGGタンパク質はメチル化により機能制御されますが、今回、同じアルギニン残基に対してシトルリン化とメチル化が競合的に作用することが確認されました。

これまでに、シトルリン化修飾はアルギニン側鎖の正電荷を消失させることによりタンパク質の高次構造を変化させ機能に影響を与えることが知られています。一方、一部のRGGタンパク質はストレス下において凝集体を形成し核外のストレス顆粒（注4）に局在することが報告されています。そこで、シトルリン化修飾がRGGタンパク質の可溶性または凝集性に関与するか検討しました。細胞溶解液を可溶性画分と不溶性画分に分画したところ、TAF15やhnRNPファミリーは、PAD4により不溶性画分から可溶画分に移行していることが示されました。さらに、Pad4を欠失させたマウスから作成したMEF (mouse embryonic fibroblast)においては、TAF15やFUSがストレス顆粒に局在していることがわかりました。

FETタンパク質の凝集やストレス顆粒への局在は、神経変性疾患ALS（注5）において見られる現象であることから、PAD4によるシトルリン化とALS発症の関連性について検討しました。PAD4遺伝子上のSNP（注6）は慢性関節リウマチとの関連が報告されていますが、同SNPがALS発症にも関連していることが明らかとなりました。さらに、リスクアレルの場合に脳組織においてPAD4の発現が低いことがわかり、PAD4がALS発症に関連している可能性が示唆されました。本研究により、PAD4によるシトルリン化の新しい生理的機能が明らかとなるとともに、難治性疾患であるALSの治療薬の開発につながる可能性が期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：Cell Reports（2月6日オンライン版）

論文タイトル：Citrullination of RGG Motifs in FET Proteins by PAD4 Regulates Protein Aggregation and ALS Susceptibility

著者：Chizu Tanikawa, Koji Ueda, Akari Suzuki, Aritoshi Iida, Ryoichi Nakamura, Naoki Atsuta, Genki Tohnai, Gen Sobue, Naomi Saichi, Yukihide Momozawa, Yoichiro Kamatani, Michiaki Kubo, Kazuhiko Yamamoto, Yusuke Nakamura, Koichi Matsuda*

DOI番号：<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.031>

アブストラクトURL：<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.031>

6. 注意事項：

2018年2月6日午後12時（アメリカ東部時間）以前の公表は禁じられています。

7. 問い合わせ先：

東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター シークエンス技術開発分野

助教 谷川千津

電話：03-5449-5374

E-mailアドレス：tanikawa@ims.u-tokyo.ac.jp

8. 用語解説：

（注1）シトルリン化修飾：タンパク質中のアルギニン残基をカルシウム依存的に脱イミノ化し、シトルリン残基に変換する翻訳後修飾。アルギニン側鎖の正電荷が消失する結果、タンパク質の高次構造や活性に大きな影響を与える。また修飾を受けたタンパク質が非自己と認識されることにより免疫反応が活性化され自己免疫疾患の発症に寄与すると考えられている。シトルリン化反応はPADファミリーによって担われ、ヒトには5種類存在する（PAD1-4,6）。

（注2）hnRNPファミリー：一本鎖RNA（hnRNA：heterogeneous nuclear RNA）に結合する一群のRNA結合タンパク質の総称。スプライシングなど転写後プロセシングの多くの過程に関与する。

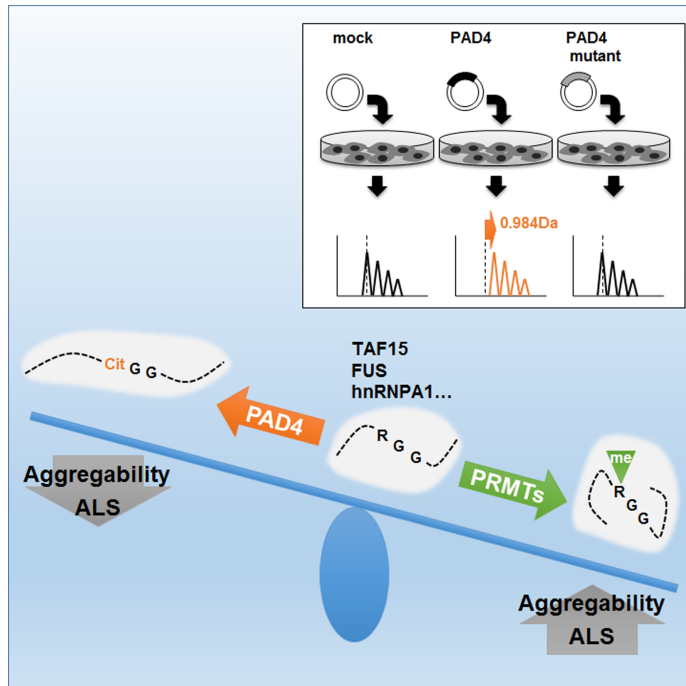
（注3）FETタンパク質：FUS, EWS, TAF15という相同性の高いタンパク質からなるファミリー。プリオン様ドメインが存在し凝集しやすい傾向にあり、変性したニューロンにおいては核から細胞質に移行している。

（注4）ストレス顆粒：ストレス刺激に応答して一過性に形成される細胞質内構造体であり、RNAやRNA結合タンパク質からなる凝集体。ALSでは異常にストレス顆粒が形成され、細胞毒性を発揮すると考えられている。

（注5）ALS：筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis）は、重篤な筋肉の萎縮と筋力低下をきたす神経変性疾患。TDP-43やFUSなどの凝集が病態に関与することが知られている。

（注6）SNP：一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism）はゲノム配列中の多様性の一つ。

9. 添付資料：



図解説：質量分析を用いた網羅的探索により、TAF15、FUS、hnRNPA1をはじめ、シトルリン化修飾を受けるタンパク質が多数同定された。これらタンパク質中のRGGモチーフに対し、シトルリン化修飾とメチル化修飾が競合的に作用することで、タンパク質の凝集性さらにはALS発症に影響を与える。