

令和 2 年 11 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08465

研究課題名(和文) SCYL1メチル化を介したゴルジ体形態・機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of the methylation of SCYL1 in the regulation of golgi formation and function

研究代表者

松崎 伸介 (Matsuzaki, Shinsuke)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60403193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体の恒常性維持には、生体を構成する細胞が生体の構成成分であるタンパク質を正しく産生し、機能させる必要がある。細胞内においてタンパク質の合成に関わる細胞内小器官はいくつか存在するが、とりわけ、分泌タンパク質・膜タンパク質の成熟化機構においては小胞体・ゴルジ体が連動し正常に働くということは、非常に重要である。

我々はタンパク質アルギニンメチル基転移酵素protein arginine methyltransferase 1(以下PRMT1)によるタンパク質SCYL1のメチル化修飾が、ER-ゴルジ体形態および機能の維持に関与することで、ゴルジ体の形態維持・機能維持に関与することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体とゴルジ体によるタンパク質成熟化は生体が正常に機能する上で非常に重要な経路である。そのため、本経路については多角的に研究が進められている。他家の報告により、小胞体とゴルジ体間の輸送に関わる因子SCYL1の重要性が報告されているが、我々はSCYL1がPRMT1を介してメチル化修飾を受けることで軸索伸長を制御することを明らかとした。

また、ゴルジ体形態異常は神経変性疾患等でも多数報告されている病理学的所見であること、SCYL1が脊髄小脳変性症に関与することから、上記修飾経路の異常が軸索伸長の異常を誘導し、神経変性疾患発症の可能性も新たに示した。

研究成果の概要(英文)：Proteins, which compose organisms, are synthesized in the rough-surfaced endoplasmic reticulum(rER) and transported between ER and Golgi by vesicles (transitional vesicles).

Thus, to elucidate the mechanism of transportation between ER and golgi is very important to regulate the homeostasis of cells. Previous studies have shown the involvement of SCYL1 for the transportation. In our study, we elucidates that protein arginine methyltransferases 1 (PRMT1) causes the methylation of SCYL1 and regulates the transportation. These results suggest that the regulation of PRMT1 could be one of remedy for the diseases based on the impairment of golgi such as neruodegenerative diseases.

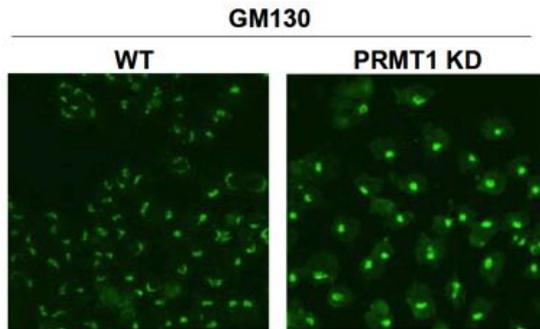
研究分野：神経科学 薬理学 分子生物学

キーワード：SCYL1 PRMT1 ゴルジ体 メチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内において分泌タンパク質・膜タンパク質の成熟化機構に関わる小胞体(以下ER)・ゴルジ体が正常に働くということは、細胞・生体機能の恒常性という観点からも非常に重要である。これらの機能異常が、糖尿病・神経変性疾患などの発症経路へ関与するとの報告がなされており、ER-ゴルジ体機能制御の確立は、生物学的および病態医学的に重要な喫緊の課題である。そこで我々は、ERストレスの下流で変動する因子の探索を行い、蛋白質アルギニンメチル基転移酵素 protein arginine methyltransferase 1(以下PRMT1)を見出し、RNA干渉法を用いて作成したPRMT1発現低下細胞がゴルジ体形態異常を示すことを明らかとした。本結果に基づき、ERおよびゴルジ体領域でPRMT1によるメチル化制御を受ける蛋白質群を網羅的に探索するため、ER-ゴルジ体蛋白質分画に対して質量分析を行い、COPI小胞輸送にかかわるSCYL1がPRMT1の基質としてメチル化を受け、ER-ゴルジ体形態および機能の維持に作用している可能性を見出した。そこで、SCYL1のメチル化制御によるER-ゴルジ体形態・機能制御についての検討に着手した。



(左図)ゴルジ体マーカーである GM130 を用いた検討により、PRMT1 発現低下細胞 (PRMT1 KD) では、通常 (WT) に比べて集積・凝集したゴルジ体が観察される。

2. 研究の目的

近年、ER ストレスにより蓄積する異常タンパク質を細胞から除去する機構として、分子シャペロンの誘導、ユビキチン化によるタンパク質分解経路の促進、また翻訳関連タンパク質のリン酸化によるタンパク質合成の抑制などのタンパク質品質管理機構が知られており、それらに対する詳細な検討が進められている。

上述のように、我々は ER 及びゴルジ体領域で PRMT1 によりメチル化修飾を受ける基質タンパク質の同定を行うため、抗メチル化タンパク質抗体 (ASYM24 抗体) による免疫沈降後、**質量分析 (以下 MS) を行い、その結果、ゴルジ体関連タンパク質 SCYL1 を PRMT1 の基質として同定した。**他家より SCYL1 は ER-ゴルジ体間の COPI 小胞輸送に関わること (Burman et al 2008)、ゴルジ体の形態制御に関連すること (Burman et al.2010) が報告されており、**SCYL1 は ER への逆行性輸送のトリガーとなり、ゴルジ体の機能及び形態を維持していると考えられる。**ER ストレスを誘導するプレフェルジン A が COPI の輸送を阻害しゴルジ体の形態異常を誘導することはよく知られている。また、兵庫県立大学の吉田らはゴルジ体ストレス応答と ER ストレス応答のバランスが細胞の恒常性維持に重要であると提唱している。このことは、両者をつなぐ因子が細胞の恒常性維持にとって鍵となる役割を果たしていることを示唆している。そこで本研究課題においては、**ゴルジ体機能・形態制御における PRMT1 による SCYL1 メチル化の意義、さらには小胞体ストレス制御における SCYL1 メチル化の意義**を明らかにすることを主たる目的として研究実施した。

3. 研究の方法

各種実験手技の内容

・細胞培養について

HEK293T 細胞、SK-N-SH 細胞、HeLa 細胞を使用した。これらの細胞は全て 10%ウシ血清を含む DMEM により培養した。

・ER ストレス負荷について

ER ストレス誘導剤としてツニカマイシン (TM)、プレフェルジン A (BFA) を使用した。これらの薬剤は DMSO を溶媒とし調整した。コントロールとしては同量の DMSO を使用した。

・メチル化阻害剤について

メチル化阻害剤として AdOx(Adenosine-2',3'-dialdehyde)を使用した。遺伝子導入後 12 時間時点で細胞培養メディアウムに添加し、最終濃度 0,20,40 μM で使用した。

・免疫沈降法について

細胞を細胞溶解液で溶かし、細胞ライセートを回収したのち、免疫沈降用磁気ビーズ (ダイナビーズ)、ASYM24 特異的抗体又は FLAG 特異的抗体又はコントロール IgG を混和し、4 にて 6 時間反応させた。反応終了後、ビーズを細胞溶解液で 5 回以上洗浄し、ビーズに付着している

タンパク質を SDS サンプルバッファーにて分離させ、免疫沈降サンプルとして使用した。

・ウェスタンブロット法 (WB) について

細胞ライセートを SDS 処理したサンプル、および免疫沈降サンプルを、e-PAGE5-20% グラディエントゲルを用いて電気泳動を行った。PVDF 膜へトランスファーを行った後、PBST 5 % スキムミルクにてブロッキング操作を行い、PRMT1, ASYM24, FLAG, 2-COP ならびに GAPDH 特異的抗体と反応させた。その後、各種 2 次抗体、ECL 試薬を用いて蛋白質を検出した。

・細胞内遺伝子・RNAi 導入について

培養細胞に対し、各種発現ベクターおよび siRNA を導入した。導入は Lipofectamine2000、RNAi Max を用いたリポフェクション法を用いた。

・細胞死アッセイについて

HeLa 細胞をコーティングした 96well ディッシュに均一に培養し、PRMT1 に対する siRNA を導入した。翌日、メディウム変更後 3 時間静置し、TM または DMSO をメディウムに添加し反応させた。その後、CellTiter-Glo[®] 用いて細胞生存率・細胞死率を計算した。

各実験項目の内容

PRMT1 阻害薬を用いたメチル化抑制による COPI 小胞複合体低下に対する検討

SCYL1 メチル化状態が COPI 小胞との結合状態に関与するか否かを検討するため、ADOX 処理による細胞内メチル化抑制状態での細胞サンプルを回収した。それらサンプルを用いて、免疫沈降法を実施し、複合体形成への影響を検討した。

SCYL1 点変異体を用いた COPI 小胞形成に関わるメチル化領域についての検討

SCYL1 の配列上、数十箇所のアルギニン領域が存在する。他家からの報告により、SCYL1 C 末端が 2-COP との結合重要であることが示された。そこで、SCYL1 C 末端に存在するアルギニンをアラニンに置換した点変異体を作成した。この発現ベクターを用いて免疫沈降ならびに WB を行い、SCYL1 が 2-COP の結合能を確認した。

各種細胞・各種 ER ストレス誘導剤による PRMT1 誘導の一般性についての検証

ER ストレス誘導試薬・細胞腫により反応・感受性の違いが生じることが予想される。そこで、細胞腫、ER ストレス誘導剤による PRMT1 誘導性について、WB を用いて検討した。

PRMT1 発現抑制による細胞死への影響検討

SCYL1 は COPI 小胞輸送すなわち ER-ゴルジ体間の輸送に関わる因子である。SCYL1 の PRMT1 によるメチル化を抑制した場合に、小胞体ストレス性細胞死に影響するか否かを検討した。そのため、RNA 干渉法により一過性に PRMT1 の発現を抑制し、ER ストレス剤による細胞死への影響を観察した。

4. 研究成果

PRMT1 阻害薬を用いたメチル化抑制による COPI 小胞複合体低下に対する検討

HEK293 細胞に SCYL1 を発現させ、メチル化阻害剤 AdOx を添加し、細胞サンプルを回収。その後、flag 抗体で免疫沈降したのち、ASYM24 抗体、2-COP 抗体による WB を行った。Input を用いた WB の結果が示す如く AdOx 濃度依存的に細胞内メチル化レベルは減少した (図1、左)。細胞内メチル化レベルの低下に伴い SCYL1 のメチル化も減少した (図1、右中段)。また、メチル化レベル減少に伴い 2-COP との結合も減弱した (図1、右下段)。本結果より、SCYL1 のメチル化レベルが低下することで COPI 小胞から解離が促進することを明らかとした。

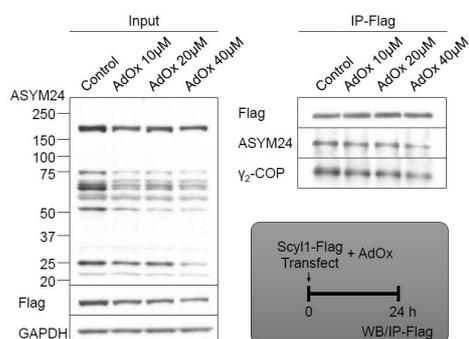


図1: Scyl1-Flag を強制発現させた細胞にメチル化阻害剤 AdOx を負荷し、サンプルを回収。ライセートを用い細胞内メチル化レベルを確認するため ASYM24 による WB (左図) を実施。また、AdOx 負荷サンプルを Flag 抗体により免疫沈降した後に行った WB (右図) の結果を示す。

SCYL1 点変異体を用いた COPI 小胞形成に関わるメチル化領域についての検討

SCYL1 の配列上、数十箇所のアルギニン領域が存在する。他家からの報告により、SCYL1 C 末端が 2-COP との結合重要であることが示された。そこで、SCYL1 C 末端に存在するアルギニンをアラニンに置換した点変異体を作成し、これらを用いて免疫沈降ならびに WB を行い、SCYL1 が 2-COP の結合能を確認した。その結果、アルギニンをアラニンに変換することで C 末端領域のメチル化を抑制した変異型 SCYL1 が 2-COP との結合能低下を示した。

図 2

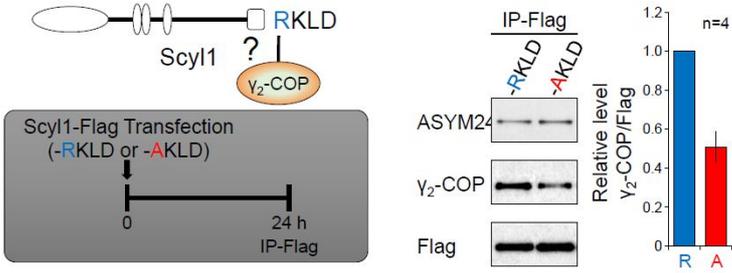


図 2 : SCYL1 C 末端に存在するアルギニン (R) をアランニン (A) に変換した点変異体 (-AKLD) (左図)。本点変異体を発現させた細胞サンプルを用いて Flag 抗体による免疫沈降各種抗体による WB 法を実施 (中図)。また、SCYL1/ 2-COP の結合レベルの変化を数値化 (右図)。

各種細胞・各種ERストレス誘導剤によるPRMT1誘導の一般性についての検証

ERストレス誘導試薬・細胞腫により反応・感受性の違いが生じることが予想される。そこで、本事象が、特殊な細胞系にのみに認められる事象なのか、一般的な細胞反応として認められるものかを明らかとするため、SK-N-SH細胞・HeLa細胞に対して、ERストレス誘導剤BFAおよびTMを負荷によるPRMT1誘導性についてWB法を用いて検討した。その結果、本検討に用いた両細胞群においていずれのERストレス負荷後においてもPRMT1は上昇を示し、一定時間で低下を示すとの結果を得た。

図 3



図 3 : 各種 ER ストレス誘導剤 TM (左)、BFA (右) 負荷による PRMT1 誘導性に対する検討。コントロールとして DMSO (溶媒) を使用

PRMT1発現抑制による細胞死への影響検討

SCYL1はCOPI小胞輸送すなわちER-ゴルジ体間の輸送に関わる因子である。SCYL1のPRMT1によるメチル化を抑制した場合に、小胞体ストレス性細胞死に影響するかどうかを検討した。そのため、RNA干渉法により一過性にPRMT1の発現を抑制し、ERストレス剤による細胞死への影響を観察した。その結果、PRMT1 KD細胞において有意な生存細胞率の低下を認めた。このことは、PRMT1発現抑制による細胞内メチル化、すなわち、SCYL1メチル化の抑制がERストレス脆弱性を誘導したことを示している。

図 4

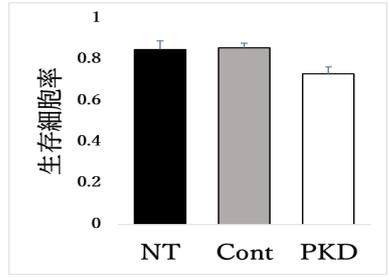


図 4 : ER ストレス誘導剤 TM 負荷後の細胞生存率の検討。
 NT: RNAi 干渉使用なし
 Cont: コントロール siRNA 処理
 PKD: PRMT1 siRNA 処理

これらの結果より、ER ストレスにより (一過性に) 誘導される PRMT1 は細胞内で SCYL1 メチル化を誘導し、ER ストレス毒性を回避するために作用している可能性を見出した。さらに、本作用は、SCYL1 の C 末端領域のメチル化により制御されていることも明らかとなった。

さらに、胎生期のラットの脳から単離培養した神経細胞を用いた検討により、神経細胞の発達 (軸索の伸長) に SCYL1 タンパク質のアルギニンメチル化修飾が必要であることを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Knock E, Matsuzaki S, Takamura H, Satoh K, Rooke G, Han K, Zhang H, Staniszewski A, Katayama T, Arancio O, Fraser PE., SUMO1 impact on Alzheimer disease pathology in an amyloid-depositing mouse model. Neurobiol Dis. 110:154-165. 2018.

- Amano G, Matsuzaki S, Mori Y, Han S, Shikada S, Takamura H, Yoshimura T, Kayatama T., SCYL1 arginine methylation by PRMT1 is essential for neurite outgrowth via Golgi morphogenesis. Mol Biol Cell 31(18):1963-1973

〔学会発表〕(計 9 件)

- 天野元揮、松崎伸介、森泰丈、高村明孝、韓薩日娜、鹿田星、佐藤大樹、伊藤麻衣、三好耕、片山泰一 『PRMT1 を介した SCYL1 アルギニンメチル化による COPI 小胞輸送への影響』、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 03 月
- 天野元揮、松崎伸介、森泰丈、高村明孝、韓薩日娜、鹿田星、佐藤大樹、伊藤麻衣、三好耕、片山泰一 『Effect on the COPI vesicle trafficking by arginine methylation of Scyl1』、第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会合同年会、2016 年 09 月
- 天野元揮、松崎伸介、森泰丈、高村明孝、韓薩日娜、鹿田星、佐藤大樹、伊藤麻衣、三好耕、片山泰一、 『PRMT1 を介した SCYL1 メチル化による COPI 小胞輸送への影響』、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 09 月
- Genki Amano, Shinsuke Matsuzaki, Yasutake Mori, Hironori Takamura, Sarina Han, Sho Shikada, Hiroki Sato, Mai Ito, Ko Miyoshi, Takeshi Yoshimura, Taiichi Katayama, 『Regulation of COPI vesicle transport via Scyl1 methylation in the pathogenesis of ER-stress induced neurodegenerative diseases』 International Society for Neurochemistry. 2017 年
- 松崎伸介、天野元揮、森泰丈、雑賀史浩、小林大地、木口倫一、高村明孝、韓薩日娜、鹿田星、佐藤大樹、伊藤麻衣、三好耕、片山泰一、岸岡史郎、 『小胞体ストレス応答によるタンパク質メチル化とゴルジ体形態制御』第 131 回日本薬理学会近畿部会、2017 年
- Shinsuke Matsuzaki, Genki Amano, Yasutake Mori, Daichi Kobayashi, Hironori Takamura, Ko Miyoshi, Takeshi Yoshimura, Fumihiro Saika, Norikazu Kiguchi, Taiichi Katayama, Shiro Kishioka, 『Regulation of COPI vesicle transport via Scyl1 methylation under ER stress』、2017 ASCB / EMBO Meeting、2017 年
- 天野元揮、松崎伸介、森泰丈、片山泰一、 『小胞体ストレス下における Scyl1 メチル化を介した COPI 小胞輸送の制御』、第 12 回小胞体ストレス研究会、2017 年
- 天野元揮、松崎伸介、森泰丈、高村明孝、韓薩日娜、鹿田星、佐藤大樹、伊藤麻衣、三好耕、吉村武、片山泰一、 『Regulation of COPI vesicle transport via Scyl1 methylation in the pathogenesis of ER-stress induced neurodegenerative diseases』、第 60 回日本神経化学学会大会、2017 年
- Matsuzaki S, Amano G, Mori Y, Kobayashi D, Takamura H, Miyoshi K, Yoshimura T, Saika F, Kiguchi N, Katayama T, Kishioka S, 『Golgi body is regulated by COPI vesicle transport via Scyl1 methylation under ER stress.』 WCP2018、2018 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 森 泰丈

ローマ字氏名： MORI Yasutake

所属研究機関名： 国際医療福祉大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)： 00343252

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。