

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01942

研究課題名(和文) タンパク質アルギニンメチル化修飾の個体機能の解明

研究課題名(英文) The physiological functions of protein arginine methylation.

研究代表者

加香 孝一郎 (KAKO, Koichiro)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：60311594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は既に、タンパク質アルギニン残基の非対称性ジメチル化(ADMA化)を担う prmt-1 と対称性ジメチル化(SDMA化)を担う prmt-5 を同時に欠損した変異体線虫では、タンパク質中のADMAとSDMAの両方が消失するものの、prmt-1/prmt-5二重変異体でもモノメチルアルギニン(MMA)は完全には消失しないことを明らかにしていた。そこで本研究では、逆遺伝学的手法と質量分析技術を駆使して、in vivoでMMA化に寄与するメチル化酵素遺伝子の探索を行い、候補遺伝子の変異体を取得することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メチル基転移酵素は、全ゲノムの約1%を占めるスーパーファミリーを形成するものの、基質が異なる酵素間では一次構造上の類似性がほとんど認められない。本研究において、線虫や酵母など種の違いや基質の違いに捉われることなく、広く既知のメチル基転移酵素に認められる二次構造上の類似性に基づいて、新規のメチル化酵素を探索し得られた知見は、単に線形動物のタンパク質アルギニンメチル化に留まらず、より高等な哺乳動物における様々な基質に対するメチル化酵素の研究にも、十分活用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have already shown that both ADMA and SDMA are lost in mutant *C. elegans* lacking prmt-1, which is responsible for asymmetric dimethylation (ADMA) of protein arginine residues, and prmt-5, which is responsible for symmetric dimethylation (SDMA), but that monomethylarginine (MMA) is not completely lost in the prmt-1/prmt-5 double mutant. In this study, we used reverse genetics and mass spectrometry techniques to search for methyltransferase genes that contribute to MMA conversion in vivo, and succeeded in obtaining mutants of the candidate genes.

研究分野：生物有機化学、生化学

キーワード：アルギニンメチル化 線虫 in vivo LC-MS/MS

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のアルギニンメチル化反応を触媒するタンパク質アルギニンメチル基転移酵素ファミリー(PRMTs)は、これまで主として *in vitro* の解析から、タンパク質中のアルギニン側鎖 γ -窒素原子に、*S*-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として、モノメチル化(MMA)を経て、非対称型(ADMA: Type I)に、または対称型(SDMA: Type II)にジメチル化反応を触媒すると考えられている¹(図1)。これまでに我々は、*in vivo* での酵素活性を評価するために、線虫の *prmt-1* 変異体と *prmt-5* 変異体の全タンパク質中のメチルアルギニン量を定量したと

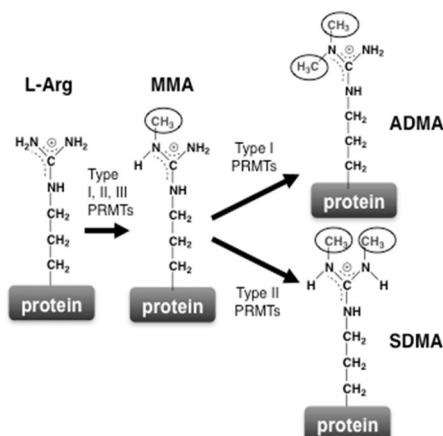


図1 PRMTsによるアルギニン残基のメチル化反応

ころ、*prmt-1* 変異体では、野生型線虫に比べ、ADMA がほぼ消失したのみならず MMA が4割程度減少し、SDMA が1.5倍程上昇した。一方、*prmt-5* 変異体ではSDMA は生成しないものの、MMA とADMA の量は野生型と差異は認められなかった(図2A, B)²。

2. 研究の目的

上記の研究に基づき、線虫のPRMT-1及びPRMT-5のアルギニンメチル化に対する寄与をさらに詳細に調べるために *prmt-1;prmt-5* 二重欠損変

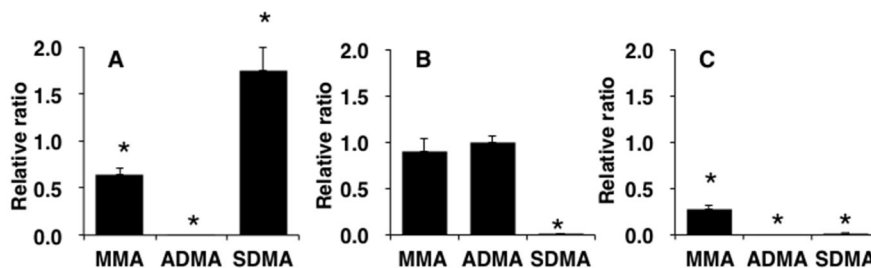


図2 *prmt-1* (A) と *prmt-5* (B) の各変異体、および両者の二重変異体 (C) のそれぞれにおけるメチル化アルギニンの比 (野生型の値を1.0として表記)

異体を作成したところ、ADMA とSDMA がほぼ消失し、体躯の矮小化や産卵数の低下、各種ストレスに対する感受性の増大等の表現形を示した³。さらにこの二重欠損変異体にもMMA が検出されたこと(図2C、未発表データ)から、PRMT-1以外のモノメチル化のみを触媒するType III PRMT の存在が強く示唆された。そこで本研究では、線虫のType III PRMT を探索し、PRMT-1、PRMT-5 との機能的連携を探ることにより、タンパク質アルギニンメチル化の生物学的役割に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LC-MS/MS のMRM機能による各メチルアルギニンの選択的定量法の確立

メチル化アミノ酸には、分子量が同一でもメチル化部位が異なるADMAとSDMAのような構造異性体が存在するが、本研究ではLC-MS/MSの多反応モニタリング(multiple reaction monitoring: MRM)機能を用いることで、各異性体を識別して定量した。3種類のメチルアルギニンはLC部分で分離された後、プレカーサーイオンを検出した後、アルゴンガスによる衝突誘起解離(collision induced dissociation: CID)により生成するフラグメントイオンを検出することにより、各メチルアミノ酸のLCにおける溶出時間が近接していても、構造特異的に定量分析を

行うことが可能となる（図3）。

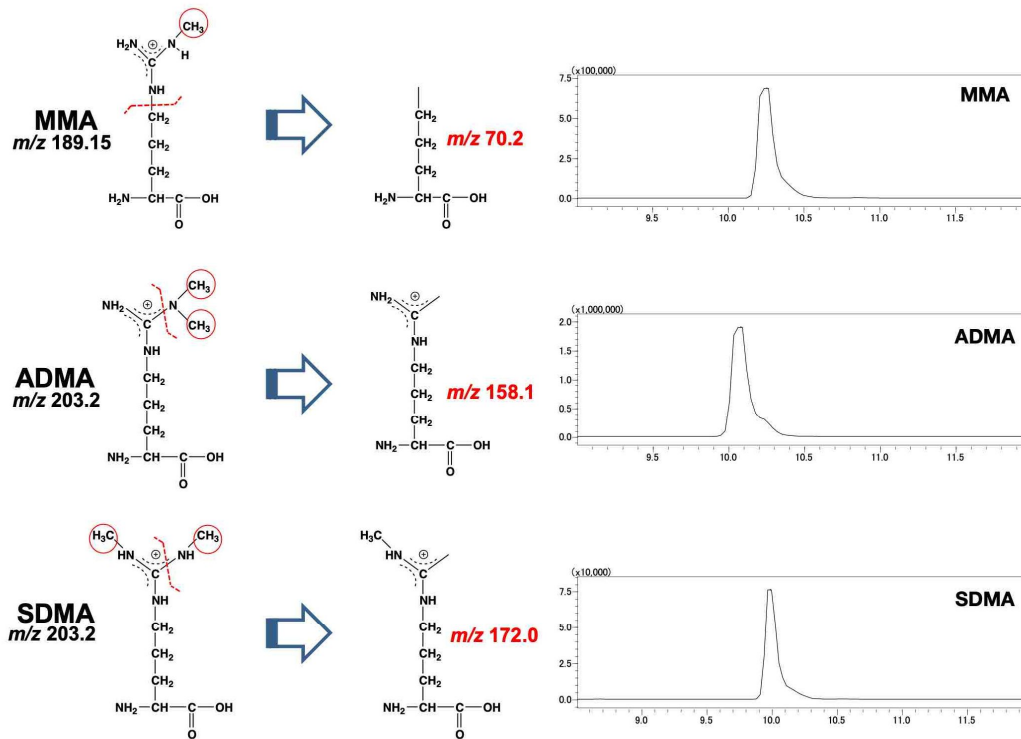


図3 各メチルアルギニンのMRMとMSクロマトグラム

（2）線虫メチル基転移酵素オルソログのノックダウン

タンパク質二次構造の類似性を元に線虫遺伝子を選別し、線虫メチル基転移酵素のノックダウンライブラリー（dsRNA）を発現した大腸菌を、食餌として与える feeding 法により *prmt-1* 変異体線虫に導入し、MMA 量をさらに有意に減少させるクローンを探索した。この際、ベクターのみを導入した *prmt-1* 変異体線虫を陰性コントロールとし、*prmt-5* の dsRNA を導入した *prmt-1* 変異体線虫を陽性コントロールとして、（1）に記載した方法で線虫抽出物の酸加水分解物から、それぞれ MMA と SDMA を測定した。

（3）線虫の脱メチル化酵素オルソログのノックダウン

これまで知られている、タンパク質や DNA、RNA の脱メチル化酵素のノックダウンライブラリーを構築し、上記の（2）同様の方法（feeding 法）で線虫に脱メチル化酵素のノックダウンを行った。これらの線虫に対して同様に（1）に記載した方法で、線虫抽出物の酸加水分解物から、それぞれ MMA と SDMA を測定した。

（4）既存の欠失変異体を用いたメチル化解析

米国ミネソタ大学の *Caenorhabditis Genetics Center*（CGC）及び東京女子医科大学の *National Biological Resource Project*（NBRP）から methyltransferase X（MTase-X）及び methyltransferase Y（MTase-Y）の変異体を購入し、outcross をかけて系統を樹立した。これらの変異体に対して、同様に（1）に記載した方法で、線虫抽出物の酸加水分解物からそれぞれメチルアルギニンを測定した。さらにこれらの変異体のうち、MMA 量が有意に減少した変異体の表現型解析を行った。

(1) 線虫メチル基転移酵素オルソログのノックダウン

PRMT-1 は線虫で唯一のタイプ に分類されるアルギニンメチル基転移酵素であり、*prmt-1* 欠損変異体は ADMA を全く有さない上に、MMA 化活性の約半分を担っていることがわかっている。そこで、残存する MMA 化酵素を探索するには、*prmt-1* 欠損変異体を用いることが有利と考えられた。当初、*prmt-1* の欠損変異体を宿主に、*prmt* ファミリーに加え、7-strand 型 (class I) メチル基転移酵素ノックダウンを行ったところ、コントロールノックダウンに比べ、若干低下を認める遺伝子はあるものの、アルギニンメチル化の量には有意な変化は認められなかった。

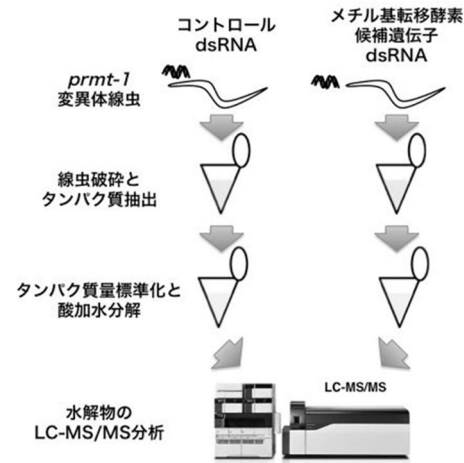


図4 メチル化酵素候補遺伝子スクリーニングの概略

(2) 脱メチル化酵素のノックダウン

一方、近年ヒストンの研究を中心に、タンパク質のメチル化状態がメチル基転移酵素と脱メチル化酵素の活性のバランス、即ちメチル化と脱メチル化により調節されることが明らかとなってきた^{4,5}。当初候補の可能性が高いメチル化酵素オルソログをノックダウンしても、有意な MMA の減少が認められなかったことは、そもそも脱メチル化酵素の作用がメチル化状態の変化をより検出し難くしている可能性が考えられた。すなわち、その遺伝子欠失変異体を用いて、スクリーニングを行うことで、より効率的に MMA 化酵素を単離できるのではないかと考えた。

そこで他生物種におけるタンパク質脱メチル化酵素や DNA 及び RNA の脱メチル化酵素の線虫オルソログについて、逆にメチルアルギニン量を上昇させる候補遺伝子について、ノックダウンスクリーニングを行なった。その結果、24 種類の脱メチル化酵素をノックダウンしたところ、どの遺伝子のノックダウンにおいても、MMA レベルの大きな上昇はなかった。これに対し、JMC ファミリーに属する遺伝子群と ALKBH ファミリーに属する遺伝子群の一部で、ノックダウンにより、コントロールと比べて 1.5 倍近くの SDMA レベルの上昇が見られた (未発表データ)。

(3) 既存メチル基転移酵素変異体を用いたメチル化解析と表現型解析

脱メチル化酵素のノックダウンで SDMA レベルの上昇は見られても、MMA 化に変化が認められなかったことから、メチル基転移酵素のノックダウンで有意な MMA の減少が認められなかったことに対する脱メチル化酵素の影響は少ないと考えられた。そこで、(1) のノックダウンで減少傾向が認められたいくつかの遺伝子について、CGC 及び NBRP から欠失変異体線虫を購入した。これらの変異体線虫のうち、methyltransferase X (MTase-X) 及び methyltransferase Y (MTase-Y) の変異体では、野生型よりもそれぞれ、38% 及び 22% ずつ有意に MMA が減少したことから、それぞれが PRMT-1 とは独立にアルギニン残基のメチル化を触媒する可能性が示唆された (未発表データ)。

そこでこれらの表現型を調べたところ、どちらの変異体も野生型よりも寿命が顕著に長くなる傾向を示し、さらに MTase-Y については、未受精卵が多くかつ産仔数が極端に少なくなった (未発表データ)。今後は、これら MTase X 及び MTase X の特異的基質タンパク質の探索を進め、アルギニンモノメチル化修飾の老化や生殖に対する役割を明らかにしていく予定である。

<引用文献>

Kako, K. *et al.* Emerging impacts of biological methylation on genetic information. *J. Biochem.* 165, 2019, 9-18

Kanou, A. *et al.* PRMT-5 converts monomethylarginines into symmetrical dimethylarginines in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.*, 161, 2017, 231-235

Hirota, K. *et al.* Simultaneous ablation of *prmt-1* and *prmt-5* abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.*, 161, 2017, 521-527

Walport, L.J. *et al.* Arginine demethylation is catalysed by a subset of JmjC histone lysine demethylases. *Nat. Commun.* 7, 2016, 1197

Wesche, J. *et al.* Protein arginine methylation: a prominent modification and its demethylation. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2017, 3305-3315

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noguchi, K., Ishida, J., Kim JD, Muromachi, N., Kako, K., Mizukami, H., Lu, W., Ishimaru, T., Kawasaki, S., Kaneko, Fukamizu, A	4. 巻 117
2. 論文標題 Histamine receptor agonist alleviates severe cardiorenal damages by eliciting anti-inflammatory programming.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	6. 最初と最後の頁 3150-3156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1909124117.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato Anna, Kim Jun-Dal, Mizukami Hayase, Nakashima Misaki, Kako Koichiro, Ishida Junji, Itakura Atsuo, Takeda Satoru, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 65
2. 論文標題 Gestational changes in PRMT1 expression of murine placentas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.placenta.2018.04.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kako Koichiro, Kim Jun-Dal, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 165
2. 論文標題 Emerging impacts of biological methylation on genetic information	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 9 ~ 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy075.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hada Kazumasa, Hirota Keiko, Inanobe Ai, Kako Koichiro, Miyata Mai, Araoi Sho, Matsumoto Masaki, Ohta Reiya, Arisawa Mitsuhiro, Daitoku Hiroaki, Hanada Toshikatsu, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 294
2. 論文標題 Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 3091 ~ 3099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.004726.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirota Keiko, Shigekawa Chihiro, Araoi Sho, Sha Liang, Inagawa Takayuki, Kanou Akihiko, Kako Koichiro, Daitoku Hiroaki, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 161
2. 論文標題 Simultaneous ablation of prmt-1 and prmt-5 abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 521 ~ 527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvw101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araoi Sho, Daitoku Hiroaki, Yokoyama Atsuko, Kako Koichiro, Hirota Keiko, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 163
2. 論文標題 The GATA transcription factor ELT-2 modulates both the expression and methyltransferase activity of PRMT-1 in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 433 ~ 440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Wataru, Hirota Keiko, Wan Huahua, Sumi Naoaki, Miyata Mai, Araoi Sho, Nomura Naoto, Kako Koichiro, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 163
2. 論文標題 rRNA adenine methylation requires T07A9.8 gene as rram-1 in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 465 ~ 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchiyama Chihiro, Fukuda Akane, Mukaiyama Minagi, Nakazawa Yoshiki, Kuramochi Yuka, Muguruma Kyohei, Arimoto Mitsue, Ninomiya Akihiro, Kako Koichiro, Katsuyama Yohei, Konno Sho, Taguchi Akihiro, Takayama Kentaro, Taniguchi Atsuhiko, Nagumo Yoko, Usui Takeo, Hayashi Yoshio	4. 巻 60
2. 論文標題 Structural Revision of Natural Cyclic Depsipeptide MA026 Established by Total Synthesis and Biosynthetic Gene Cluster Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 8792 ~ 8797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202015193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安彩伽、大前勇馬、有本光江、加香孝一郎、礪田博子、深水昭吉、繁森英幸、宮前友策
2. 発表標題 生体直交型反応を示す官能基を付加したPPAR リガンドの合成と活性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張文瑜； 田島達也； 大徳浩照； 染谷百香； 加香孝一郎； 深水昭吉
2. 発表標題 線虫を用いたタンパク質アルギニンモノメチル化酵素の同定と機能解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 春木陽香理； 大徳浩照； 田島達也； 加香孝一郎； 深水昭吉
2. 発表標題 線虫の新規ヒスチジンメチル化酵素METL-18の自己メチル化と生物学的意義の解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷百香； 大徳浩照； 加香孝一郎； 深水昭吉
2. 発表標題 siRNAスクリーニングによる新規ヒスチジンメチル基転移酵素の探索
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大徳浩照; 田島達也; 春木陽香理; 染谷百香; 加香孝一郎; 深水昭吉
2. 発表標題 線虫における新規ヒスチジンメチル化酵素METL-18の機能解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加香孝一郎; 中原大輔; 大徳浩照; 深水昭吉
2. 発表標題 線虫 (C. elegans) 開始メチオニンtRNAの精製とそのメチル化解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向山海凧、山崎洋平、内山千尋、福田茜、有本光江、加香孝一郎、谷口敦彦、林良雄、南雲陽子、白井健郎
2. 発表標題 MA026の構造訂正とTJ開口活性に関する構造活性相関検討
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口和之、石田純治、室町直人、金俊達、加香孝一郎、山縣 邦弘
2. 発表標題 心腎連関係態モデルマウスの確立と解析
3. 学会等名 第62回 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林岳宏、大徳浩照、中島実咲、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 線虫ヒストンにおける新規ヒスチジンメチル基転移酵素の探索
3. 学会等名 2019年度 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星川 紗更、池本 光志、有本 光江、加香 孝一郎、深水 昭吉、繁森 英幸
2. 発表標題 アルツハイマー型認知症予防を指向したカフェオイルキナ酸の機能解明
3. 学会等名 新規素材探索研究会第18回セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加香孝一郎、石田純治、金俊達、室町直人、深水昭吉
2. 発表標題 高血圧誘導性心不全モデルマウス（ANSマウス）におけるヒスタミンの定量
3. 学会等名 第23回 活性アミンに関するワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島寛乃、有本光江、加香孝一郎、深水昭吉、繁森英幸
2. 発表標題 ブドウ種子由来ポリフェノールによるアミロイドポリペプチド凝集阻害
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林岳宏、大徳浩照、中島実咲、田島達也、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 In vivoスクリーニング系による新規ヒスチジンメチル基転移酵素の探索
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加香孝一郎、石田純治、金俊達、室町直人、深水昭吉
2. 発表標題 高血圧誘導性心腎病態モデルマウス（ANSマウス）におけるヒスタミンの分析
3. 学会等名 第22回 日本ヒスタミン学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田純治、野口和之、金俊達、水上早瀬、陸偉哲、権哲源、加香孝一郎、山縣邦弘、深水昭吉
2. 発表標題 ヒスタミンH3受容体アゴニストによる心腎病態への抗炎症プログラミング
3. 学会等名 第22回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中原大輔、加香孝一郎、野村直人、深水昭吉
2. 発表標題 メチル化ヌクレオシドデータベース（MNSDB）の構築
3. 学会等名 2018年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加香孝一郎、波田一誠、宮田真衣、大徳浩照、深水昭吉
2. 発表標題 線虫におけるアセチル化スペルミジンの同定
3. 学会等名 第22回活性アミンに関するワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中原大輔、加香孝一郎、野村直人、深水昭吉
2. 発表標題 Analysis of RNA methylation of C.elegans using newly established methyl-nucleosides database (MNSDB)
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加香孝一郎、波田一誠、大徳浩照、深水昭吉
2. 発表標題 線虫初期発生におけるトリカルボン酸回路とポリアミンの役割
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第10回年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田純治、野口和之、金俊達、水上早瀬、陸偉哲、権哲源、加香孝一郎、石丸友博、川崎祥平、山縣邦弘、深水昭吉
2. 発表標題 ヒスタミンH3アゴニストによる心腎病態への抗炎症プログラミング
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学生存ダイナミクス研究センター深水研究室（ゲノム情報生物学）
http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/Top_iweb/Welcome.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	廣田 恵子 (HIROTA Keiko) (00375370)	東京女子医科大学・医学部・講師 (32653)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------