

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20700335

研究課題名（和文） 協調的タンパクメチル化による新たな神経突起伸展機構

研究課題名（英文） Cooperative functions of PRMTs in neuronal differentiation.

研究代表者

宮田 信吾 (MIYATA SHINGO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70403194

研究成果の概要（和文）：これまでに多くの研究者が神経突起伸展機構の解明を目指し、タンパク質のリン酸化を中心として様々な検討を行ってきたものの、未だその分子機序の全容は解明されていないのが現状である。このような状況の中、リン酸化とは全く異なる翻訳後修飾であるタンパクのメチル化修飾と神経突起伸展作用との関連性に注目し、神経突起伸展惹起時に協調的なタンパクメチル化が核内及び細胞質で起こることが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Neurite outgrowth is extremely important for the formation of the neuronal circuit. Recent progress in understanding the nature of protein arginine N-methyltransferases (PRMTs) have given rise to the possibility that protein methylation plays an important role in signal transduction during neuronal differentiation. In this study, we show that protein arginine methylation plays a pivotal role in neurite outgrowth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学・神経薬理学

キーワード：protein methylation、neurite outgrowth、immediately early gene、PRMT1、CARM1、Btg2、Neuro2a cells、RNAi

1. 研究開始当初の背景

生体では、その生命活動と維持のために様々なタンパク質が適切な時期に必要な機能を果たすことが必須である。このタンパク質の正常な機能発現にとって重要なのがタンパク質の翻訳後修飾である。タンパク質の翻訳後修飾には、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化、糖鎖修飾などが存在し、これらの修飾をタンパク質が受けることにより、そ

の相互作用、酵素活性、細胞内局在などを大きく変化させることが可能になると共に、ひとつのタンパク質が異なる修飾を受け、様々な機能を担うことも知られている。

神経科学分野においても、神経細胞の突起伸展に重要なシグナル伝達として、この翻訳後修飾のひとつであるタンパク質のリン酸化が一過性に引き起こされることが必要ではないかとの知見が、数多く報告されている

事実は、翻訳後修飾の果たす役割の重要性を改めて示している。しかし、これまでに多くの研究者が神経突起伸展機構の解明を目指し、このリン酸化を中心として様々な検討を行ってきたものの、未だその分子機序の全容は解明されていないのが現状である。

このような状況の中、最近ようやく大きく視点を変えた研究が報告された。そのひとつは神経突起伸展作用とタンパクのメチル化修飾の関連性を明らかにした研究である。この研究では、交感神経様の突起伸展モデル細胞である PC12 細胞を神経栄養因子 NGF で処理すると、細胞内タンパク質のアルギニン残基のメチル化が惹起されることを明らかにし、神経突起伸展にアルギニン残基のメチル化を介したシグナル伝達系が深く関与する可能性を示唆した (Cimato et al., *J. Cell Biol.*, Vol. 138, 1089-1103, 1997; Cimato et al., *J. Neurosci. Res.*, Vol. 67; 435-442, 2002)。

また、これとは独立して、タンパク質のアルギニン残基に対するメチル基転移酵素 Protein Arginine N-methyltransferases (PRMTs) がクローニングされ、一群のファミリーを形成することが明らかとなった (McBride et al., *Cell*, Vol. 106, 5-8, 2001; Bedford et al., *Cell*, Vol. 18, 263-272, 2005)。現在までに PRMT 1 から 9 のサブタイプがクローニングされており、それらの活性中心はサブタイプ間で比較的良好に保存されているが、その前後の配列は多様であり、それぞれ細胞内局在や基質の選択を行っているものと考えられている。しかし、これまで神経細胞におけるタンパク質のメチル化の生理学的意義に関しては全く不明のままである。

2. 研究の目的

すでに 30 年以上前に、脳においてリジン残基やアルギニン残基にメチル化を受けたタンパク質が豊富に存在することは示されていたものの、これまでほとんど注目されることはなく、その修飾の意義に関する研究はほとんど存在しない (Kakimoto et al., *J. Biol. Chem.*, Vol. 245, 5751-5758, 1970)。

さらに、PRMTs と神経突起伸展効果の関連性について、アルギニン残基のメチル化が細胞分裂の停止から分化誘導に至る過程に関与しているのか、神経突起伸展を正に制御することのみに関与しているのか、などの詳細については未だ解明されていない。

また、脳内でメチル化を受けているタンパク質の多くが RNA 結合タンパク質であるという報告はあるものの、神経細胞において、PRMTs の基質となりうるタンパク質を網羅的に解析した研究はこれまで皆無であり、RNA 結合タンパク質のメチル化の重要性についても

ほとんど明らかになっていない。

そこで本研究では、PRMTs と神経突起伸展効果の関連性について神経分化関連遺伝子の発現変動との関連性を詳細に検討する。まず始めに、神経様分化モデル細胞として汎用されている Neuro2a 細胞を用いて分化刺激直後に観察される分化関連調節因子 Btg2/TIS21/PC3 (Btg2) mRNA の一過性の発現上昇に注目した。この Btg2 mRNA の発現上昇は神経様突起の伸展とその維持に必須であることが報告されていること (El-Ghissassi et al., *Oncogene*, Vol. 21; 6772-6778, 2002) と共に PRMT1 の酵素活性を正に制御すること (Lin et al., *J. Biol. Chem.*, Vol. 271; 15034-15044, 1996) が報告されており、タンパクメチル化による神経突起伸展機構という新たなメカニズムを明らかに出来るのではないかと考えられた。

さらに Btg2 遺伝子の 5' 上流域の転写調節領域にガン抑制因子 p53 が結合し、その発現を正に制御している (Rouault et al., *Nat. Genet.*, Vol. 14, 482-486, 1996; Duriez et al., *Gene*, Vol. 282, 207-214, 2002) との報告があることから、この Btg2 mRNA の一過性の発現上昇に関連する可能性のある因子 (p53 と結合し、Btg2 mRNA の転写調節を行う Co-factors) のタンパクメチル化レベルと突起伸展レベルとの間の関連性を検討できれば、タンパクメチル化による神経突起伸展制御機構のひとつとして解明できるものと考えた。

これまでに p53 に結合することが知られている転写調節因子であり、なおかつ PRMT ファミリーの一員である CARM1 により、アルギニン残基にメチル化を受けるタンパク質として CBP (CREB binding protein) が報告されている (Xu et al., *Science*, Vol. 294; 2507-2511, 2001; Chevillard-Briet et al., *EMBO J.*, Vol. 21; 5457-5466, 2002)。

これらの報告から、神経分化誘導時にまず CARM1 による CBP のメチル化を介した p53 による Btg2 mRNA の転写活性化が観察されるのかを明らかにする。さらに、CARM1 siRNA により分化誘導時の神経突起伸展効果を評価する。もし、突起伸展効果が低下していたならば、Btg2 mRNA の一過性の発現上昇の有無との関連性を明らかにし、Btg2 により活性調節を受ける PRMT1 の分化誘導時の一過性の活性上昇または、それ以外での酵素活性を比較検討することにより、これまで全く解明されてこなかったタンパクメチル化による神経分化誘導機構の分子メカニズムを明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) PRMT1 遺伝子ノックダウン Neuro2a 細胞

での突起伸展効果の検討。

①Btg2によるPRMT1の一過性の酵素活性の上昇が神経突起伸展に必要なのか否か、直接確認するために、PRMT1のsiRNAによるRNAiにより神経突起伸展効果への影響をControl細胞と比較検討する。さらに、PRMT1 siRNAに反応しないよう変異を入れたPRMT1 insを哺乳動物細胞用発現ベクターに組み込み、PRMT1 siRNAにより低下したPRMT1の発現量を回復させることにより神経突起伸展効果にどのような影響が現れるのか検討を加えた。

(2) CARM1によるCBPのアルギニン残基のメチル化修飾の有無とp53を介したBtg2 mRNAの発現レベルの間に相関性があるか否かの検討。

①ラット及びマウスで共通のCARM1のsiRNA oligonucleotideおよびScrambled oligonucleotideを合成し、マウス由来Neuro2a細胞にそれぞれトランスフェクションし、特異的にCARM1が抑制されていることをWestern blottingにより確認した。

②次に、siRNAによるCARM1 Knockdown細胞でのCBPのメチル化レベルをmono/di-methyl Arginineを特異的に検出する抗体を用いて、Control細胞と比較検討した。さらに、p53タンパク質とCBPの相互作用の変化について免疫沈降法を用いて検討すると共に、クロマチン免疫沈降法(ChIP Assay)により、CBPのメチル化の有無とp53とBtg2 mRNAのプロモーター領域との結合の関連性を検討した。

(3) CARM1 Knockdown細胞での突起伸展効果の比較検討。

①siRNAによるCARM1 Knockdown細胞およびControlのNeuro2a細胞を用いて、血清除去による分化誘導刺激による突起伸展レベルに差異が観察されるか検討した。両者に差が確認されたなら、CARM1のKnockdownは突起伸展レベルのみに影響を与えるのか、ほかの生理的要因(細胞増殖、細胞移動、細胞毒性など)にも影響を与えるのか、細胞増殖assay、Migration assay、Cell death assayなどにより、比較検討した。

(4) 神経突起伸展刺激による細胞内のタンパクメチル化レベルの経時的な変動の有無の検討、およびCARM1の発現レベルとの関連性の検討。

①以前に報告された分化誘導刺激直後のアルギニン残基のメチル化レベルの一過性の上昇が、Neuro2a細胞でも観察されるか検討し、もし観察されたならCARM1 knockdownにより影響を受けるのか否か、非対称的なジメチル化タンパク質を特異的に検出する抗体ASYM24を用いて検討した。

②さらに、CARM1によるBtg2 mRNA発現レベルの一過性の上昇が抑制されることによ

り、Btg2タンパクによる活性調節を受ける因子PRMT1の酵素活性そのものが低下しているのか、それとも分化誘導刺激直後に必要であると思われる酵素活性の上昇の抑制が起きているのか検討した。

4. 研究成果

まず始めに、神経芽細胞種Neuro2a細胞において、タンパクメチル化酵素CARM1によるCBPのメチル化が起きるのか検討した。その結果、これまでの非神経系細胞での検討と同様にCBPはCARM1によりメチル化を受けることを見出した。また、タンパクメチル化酵素PRMT1をRNAiによりノックダウンし、突起伸展作用への影響をNeuro2a細胞で検討した。すると、PRMT1の発現抑制により突起伸展効果が減弱する事が明らかとなった。さらに、PRMT1活性の調節因子であり、初期応答因子でもあるBtg2のRNAiでもNeuro2a細胞で突起伸展効果の抑制が観察された。この時、細胞質でのタンパクメチル化よりも核内でのタンパクメチル化レベルの減少が観察された。以上の結果から、PRMT1による核内でのタンパクメチル化がNeuro2a細胞での神経突起伸展作用に必要であることが明らかとなった。このPRMT1およびBtg2の突起伸展への関与に関する内容をまとめたものが、Neuroscience Lettersへ掲載された。

さらに詳細にPRMT1およびCARM1によるタンパク質メチル化と突起伸展機構の関連性を検討した。その結果、突起伸展時に観察されるこのBtg2 mRNAの発現上昇機構に、PRMTファミリーであるCARM1がCBPをメチル化し、転写因子p53と結合することにより、Btg2転写調節領域に結合することを見出すことが出来た。これらの検討から、神経突起誘導時にはPRMT1およびCARM1の両者の活性化により、協調的なタンパクメチル化が核内及び細胞質で起こることが重要であることを明らかにした。本研究成果は、今までほとんど機能を解析されてこなかったタンパク質メチル化酵素PRMTファミリーの神経細胞における機能のひとつを新規に明らかにするものであり、「脳に恒常的に頻繁に惹起するタンパク質のメチル化」の意義が世界で初めて解明でき、リン酸化と比類しうるタンパク質の機能発現のための新たな制御機構が我が国を発信源として国際社会に発信した意義深い成果である。

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12件)

① Miyata S* (First author & corresponding

author), Koyama Y, Takemoto K, Yoshikawa K, Ishikawa T, Taniguchi M, Inoue K, Aoki M, Hori O, Katayama T, Tohyama M. Plasma Corticosterone Activates SGK1 and Induces Morphological Changes in Oligodendrocytes in Corpus Callosum. PLoS One, In press. (2011). 査読 有。

② Takemoto K †, **Miyata S †***(First author (contributed equally) & corresponding author), Takamura H, Katayama T, Tohyama M. Mitochondrial TRAP1 regulates the unfolded protein response in the endoplasmic reticulum. Neurochem Int. In press. (2011). 査読 有。

③ **宮田信吾**、遠山正彌
ゴルジストレスによる細胞機能異常
脳 21、14(1)、44-49 (2011) 査読 無。

④ Hiratsuka T, Matsuzaki S, **Miyata S**, Kinoshita M, Kakehi K, Nishida S, Katayama T, Tohyama M.
Yokukansan inhibits neuronal death during ER stress by regulating the unfolded protein response. PLoS One. 5(10), e13280 (2010). 査読 有。

⑤ **Miyata S***(First author & corresponding author), Mori Y, Tohyama M.
PRMT3 is essential for dendritic spine maturation in rat hippocampal neurons. Brain Res. 1352: 11-20 (2010). 査読 有。

⑥ Kanazawa S, Fujiwara T, Matsuzaki S, Shingaki K, Taniguchi M, **Miyata S**, Tohyama M, Sakai Y, Yano K, Hosokawa K, *Kubo T. bFGF regulates PI3-kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. PLoS One. 5(8): e12228 (2010). 査読 有。

⑦ Okuda H, Kuwahara R, Matsuzaki S, **Miyata S**, Kumamoto N, Hattori T, Shimizu S, Yamada K, Kawamoto K, Hashimoto R, Takeda M, Katayama T, Tohyama M.
Dysbindin regulates the transcriptional level of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate via the interaction with NF-YB in mice brain. PLoS One, 5(1), e8773 (2010) 査読 有。

⑧ 小山佳久、**宮田信吾**、遠山正彌
最近の in situ hybridization 法の進歩-低分子 RNA 検出を中心として- (1)
脳 21、13(3)、82-86 (2010) 査読 無。

⑨ 小山佳久、**宮田信吾**、遠山正彌
最近の in situ hybridization 法の進歩-低分子 RNA 検出を中心として- (2)
脳 21、13(4)、69-74 (2010) 査読 無。

⑩ Kousaka A, Mori Y, Koyama Y, Taneda T, **Miyata S**, Tohyama M.
The distribution and characterization of endogenous protein arginine

N-methyltransferase 8 in mouse CNS. Neuroscience. 163: 1146-1157 (2009). 査読 有。

⑪ **Miyata S***(First author & corresponding author), Mori Y, Tohyama M.

PRMT1 and Btg2 regulates neurite outgrowth of Neuro2a cells. Neuroscience Lett. 445: 162-165 (2008). 査読 有。

⑫ Bassuk A, Wallace R, Buhr A, Buller A, Shimojo M, **Miyata S**, Chen S, Gonzalez-Alegre P, Griesbach H, Shu W, Nashelsky M, Vladar E, Antic D, Ferguson P, Cirak S, Voit T, Scott M, Axelrod J, Gurnett C, Daoud A, Afawi Z, Neufeld M, Korczyn A, Kivity S, Mazarib A, Straussberg R, Walid S, Slusarski D, Berkovic S, El-Shanti H.

A homozygous mutation in human PRICKLE1 causes an autosomal-recessive progressive myoclonus epilepsy-ataxia syndrome. American Journal of Human Genetics. 83: 572-581 (2008). 査読 有。

[学会発表] (計 24 件)

① **宮田信吾**、小山佳久、吉川景子、石川淑子、谷口学、嶽本香菜、遠山正彌、慢性ストレス応答によるオリゴデンドロサイト特異的なシグナル伝達機構の解明 第15回グリア研究会、2010.10.23、福岡

② **宮田 信吾**、Molecular pathogenesis of major depression: The relationship between oligodendrocyte dysfunctions、Neuro2010 合同学会、2010.9.2-9.4、神戸

③ 森 泰丈、**宮田 信吾**、遠山 正彌、An alternative mechanism of NGF-induced neurite outgrowth is based on protein arginine、Neuro2010 合同学会、2010.9.2-9.4、神戸

④ 平塚 徹、松崎 伸介、**宮田 信吾**、木下 充弘、掛樋 一晃、片山 泰一、遠山 正彌、Inhibitory effect of Ferulic acid against ER stress could suggest the clinical validity of Yokukansan, a Japanese herbal medicine、Neuro2010 合同学会、2010.9.2-9.4、神戸

⑤ 桑原 隆亮、松崎 伸介、森 泰丈、服部 剛志、山田 浩平、**宮田 信吾**、高村 明孝、遠山 正彌、片山 泰一、Analysis of Protein Arginine Methyltransferase under ER stress、Neuro2010 合同学会、2010.9.2-9.4、神戸

⑥ 吉川 景子、**宮田 信吾**、石川 淑子、遠山 正彌、Comprehensive analysis of variation of gene expression levels in the brains of chronically stressed mice、Neuro2010 合同学会、2010.9.2-9.4、神戸

⑦ 石川 淑子、**宮田 信吾**、吉川 景子、小山 佳久、遠山 正彌、Identification and

characterization of novel interacting proteins of the stress-related factor SGK1 in the human brain, Neuro2010 合同学会、2010.9.2-9.4、神戸

⑧ 平塚徹、松崎伸介、**宮田信吾**、木下充弘、掛樋一晃、西田慎二、片山泰一、遠山正彌、抑肝散に含まれるフェルラ酸はERストレスによる神経細胞死を抑制する、2010.8.28-8.29、第27回和漢医薬学会学術集会、京都

⑨ **宮田信吾**、吉川景子、石川淑子、嶽本香奈、谷口学、小山佳久、片山泰一、遠山正彌、慢性ストレス応答によるオリゴデンドロサイト機能異常の可能性 第115回日本解剖学会総会、2010.3.28-3.30、岩手

⑩ 石川淑子、**宮田信吾**、吉川景子、嶽本香菜、遠山正彌、ヒト脳におけるserum/glucocorticoid regulated kinase 1 (Sgk1) との相互作用因子の網羅的探索、第115回日本解剖学会総会、2010.3.28-3.30、岩手

⑪ 森泰丈、**宮田信吾**、遠山正彌、alphaCaMKII mRNAの樹状突起への輸送を制御するタンパク質群の同定、第115回日本解剖学会総会、2010.3.28-3.30、岩手

⑫ 嶽本香奈、**宮田信吾**、吉川景子、片山泰一、遠山正彌、神経細胞におけるミトコンドリア局在TRAP1とERストレスとの関連性、第85回日本解剖学会近畿支部学術集会、2009.11.28、奈良

⑬ **宮田信吾**、吉川景子、嶽本香奈、小山佳久、遠山正彌、オリゴデンドロサイト特異的な発現変動因子によるうつ病発症機構の解明、第14回グリア研究会、2009.11.14、大阪

⑭ **宮田信吾**、橋本亮太、嶽本香菜、吉川景子、遠山正彌、精神疾患発症機構へのmicroRNAの関与、第62回日本自律神経学会総会、2009.11.5-11.6、和歌山

⑮ 吉川景子、**宮田信吾**、嶽本香菜、遠山正彌、慢性ストレスモデルマウスを用いたうつ病発症の分子機序の解析 第62回日本自律神経学会総会、2009.11.5-11.6、和歌山

⑯ 平塚 徹、松崎伸介、**宮田信吾**、片山泰一、遠山正彌、小胞体ストレスを起源とするアルツハイマー病発症機構への抑肝散の効果、第32回日本神経科学学会、2009.9.16-9.18、名古屋

⑰ **宮田信吾**、森泰丈、遠山正彌、タンパクメチル化酵素 Protein Arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) によるラット海馬神経細胞樹状突起での翻訳制御機構、第51回日本神経化学学会大会、2009.9.11-9.13、富山

⑱ 森泰丈、幸坂葵、**宮田信吾**、遠山正彌、alphaCaMKII mRNAの3'-非翻訳領域に結合するタンパク質群の単離とその機能解析、第51回日本神経化学学会大会、2009.9.11-9.13、

富山

宮田信吾、橋本亮太、遠山正彌、microRNAによる神経細胞成熟化機構の解析、第11回RNAミーティング (第11回日本RNA学会年会)、2009.7.27-7.29、新潟

⑲ **宮田信吾**、森泰丈、遠山正彌、ラット海馬神経細胞での局所的翻訳におけるrpS2の安定化の重要性、第52回日本神経化学学会大会、2009.6.21-6.24、群馬

⑳ 森泰丈、**宮田信吾**、遠山正彌、alpha CaMKII mRNAの輸送機構に関与するタンパク質の同定、第52回日本神経化学学会大会、2009.6.21-6.24、群馬

㉑ **宮田信吾**、森泰丈、遠山正彌、ラット海馬神経細胞樹状突起でのタンパクメチル化酵素の役割、第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009.3.28-3.30、岡山

㉒ 森泰丈、**宮田信吾**、幸坂葵、遠山正彌、alphaCaMKII mRNAの樹状突起への局在を決定するタンパク質因子の探索、第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009.3.28-3.30、岡山

㉓ **宮田信吾**、森泰丈、遠山正彌、新規原腸形成制御因子Prickleによる神経突起伸展の可能性、第31回日本神経科学大会、2008.7.9-7.11、東京

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：神経伝達及び/又はシナプス形成関連物質の転写調節用組成物

発明者：松崎 伸介、遠山 正彌、桑原 隆亮、奥田 洋明、熊本 奈都子、**宮田 信吾**、橋本 亮太

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2008-225183

出願年月日：平成 19 年 9 月 2 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 信吾 (MIYATA SHINGO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70403194

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：