

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650183

研究課題名（和文）

神経損傷・修復時に発現するタンパク質メチル化酵素（PRMT）の機能を解析する

研究課題名（英文）

Spinal cord injury (SCI)-mediated expression of protein arginine N-methyltransferase 8 (PRMT8) expression in activated microglia/macrophage

研究代表者 森 泰文 (MORI YASUTAKE)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00343252

研究成果の概要（和文）：

タンパク質アルギニンメチル化酵素であるPRMT8はニューロン特異的に発現するが、脊髄損傷に出現する活性化マイクログリア細胞にも発現する。マイクログリア細胞においてPRMT8は細胞質優位な発現パターンを示し、見かけの分子量が60kDaとニューロンに発現する42kDaよりも高分子側にシフトする。我々はその相違が細胞種における翻訳開始点の違いに由来するものと考え、RNAの5'末端の配列に注目した。PRMT8には3か所の予測翻訳開始コドンが存在する。マイクログリア細胞では最も5'側にある開始コドンが使われると予想し、その開始点からタンパク質を合成するプラスミドを作製しマイクログリア細胞に強制発現させたが、見かけの分子量は42kDaとニューロンに発現するものと同じであった。そこで翻訳開始コドン周囲の配列を考慮に入れ、5'側の非翻訳領域を含むmRNAを合成する発現ベクターを作製し、マイクログリア細胞に発現させた。すると60kDa付近に高分子側にシフトしたタンパク質を確認することができた。このことからPRMT8遺伝子は少なくとも2か所の翻訳開始点からタンパク質合成が起き、マイクログリア細胞特異的に最も5'側に位置する開始コドンが選択されることを明らかにした。さらに高分子側へのシフトにはPRMT8のリン酸化が必須であること、また最も5'側の開始コドンより翻訳されたPRMT8にはN末端にミリスチル基が付加され細胞膜へ移行することを明らかにした。現在、PRMT8の発現をノックダウンしたマイクログリア細胞へのリカバリー実験をおこない、機能回復が起きるかどうかを検討している。さらにマイクログリア細胞において特異的な翻訳開始コドンが選択されるメカニズムを解明する目的で、5'非翻訳領域に結合するトランス因子の検索をおこない、マイクログリア特異的な選択的翻訳開始のメカニズムを解明を試みている。

研究成果の概要（英文）：

Protein arginine N-methyltransferase 8 (PRMT8) was originally reported as a neuron-specific type II PRMT with dominantly nuclear distribution. However, when we examined changes in PRMT8 expression level in the spinal cords injured by hemisection, unambiguous signals were observed in the cytoplasm of round-shaped cells that were densely packed around the lesion site. This group of cells were well-overlapped with CD11b-positive cells, not with neurons, demonstrating that PRMT8 is expressed in the activated microglia/macrophage cells. By Western blot analysis, PRMT8 from the injured

spinal cord showed a slower mobility shift band with Mw of 60-62kDa than that from brain lysate with Mw of 42kDa. We demonstrated that the high molecular weight (HMW) PRMT8 is due to phosphorylation and the myristoylation might be caused by an additional N-terminal stretch harboring consensus myristoylation site that would stem from usage of another in-frame translation initiation site. These data raise the possibility that membrane bound type of PRMT8 can be a novel marker for activated microglia.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：タンパク質メチル化

1. 研究開始当初の背景

PRMTファミリーは全身の臓器に広く分布し明確な臓器特異性を示さないが、唯一PRMT8だけが中枢神経特異的な分布を示す。PRMT8はLeeらによりPRMT1とのホモロジー検索により同定された酵素であり、アミノ酸配列では両者は90%以上の相同性を示す。そのcDNA配列からN末端から2番目のグリシン残基がミリスチル化され、細胞膜に移行することが予測された。しかしin frameで候補となる開始コドンが複数存在することから、N末端側の配列は現在も不明である。我々はPRMT8に特異的な配列を抗原としてウサギポリクローナル抗体を作製し、内在性のPRMT8タンパク質の分布を検討したところ、小脳顆粒細胞を除くほぼ全てのニューロンに免疫反応を確認することができた。しかし、細胞内分布は核優位であり、ミリスチル化のような膜移行性の修飾は否定的であった。

2. 研究の目的

我々はさらにニューロンにおけるPRMT8の機能を解析すべく神経損傷後の軸索再生過程におけるPRMT8の発現変化を検討することにした。特に軸索が切断されたニューロンの細胞体や再生軸索に注目して発現の変動を観察することにした。

3. 研究の方法

深麻酔下ICRマウスの脊髄を第5腰髄レベルで露出しメスにより背側半分を切断し、半側損傷モデルマウスを作製した。損傷後7日目に損傷部位から逆行性トレーサーを注入し、トレーサーにより染色された領域におけるPRMTの発現量をsham群と比較した。

4. 研究成果

PRMT1はshamと比較して染色性の減少を認めたが、PRMT8に関しては見かけの発現

量に変化を認めず、再生過程のニューロンにおいては PRMT8 の量および細胞内局在は大きく変動しないことが分かった。ところが、再生軸索末端における PRMT8 の変化を観察する目的で、脊髄の損傷部位における切片を作製し免疫組織化学法により解析をおこなったところ、意外な結果が得られた。損傷部位の周囲からは核様のシグナルは完全に消失し、これは損傷によるニューロンの細胞死によるものと考えられたが、それとは全く細胞内発現パターンを異にする細胞群の出現を確認することができた。この細胞は円形から類円形の細胞で核の染色性は認められず、細胞膜を思わせる細胞の輪郭に沿った強い染色を認めた。この染色パターンが中枢神経系のどの細胞種のマーカーと重なるかを検討したところ、活性化ミクログリア/マクロファージのマーカーである CD11b 陽性細胞と一致するという結果が得られた。この損傷モデルは脊髄の血液脳関門の破壊を伴うので、PRMT8 陽性細胞は活性化ミクログリアもしくは骨髄球由来の浸潤マクロファージであると結論付けられた。時系列を追って発現パターンを検討すると、受傷後 1 から 3 日目までは PRMT8 陽性細胞はほとんど観察できないが、7 日目からは顕著に観察できた。さらに生化学的な解析を進める目的で損傷脊髄より抽出したタンパク質を PRMT8 抗体による Western blot で解析したところ、見かけの分子量が 60-62kDa であり健常脳および脊髄で見られる 42kDa の PRMT8 のバンドよりも 20kDa 高分子側にシフトすることがわかった。ミクログリアの不死化細胞株である MG5 細胞を用いた Western blot でも同様の結果が得られることから、ミクログリア細胞に発現する PRMT8 は見かけの分子量がニューロンに発現するものよりも大きくなることがわかった。その原因については現在解析

を進めているところであるが、選択的スプライシングによるバリエーションは検出できないことから、何らかの翻訳後修飾に起因する可能性が高いと考えられる。また前述したように複数の翻訳開始コドンが in frame で存在するため、ニューロンとミクログリアでは同じ配列の mRNA から異なる開始コドンを用いた翻訳、すなわち選択的翻訳開始 (alternative translation initiation) がおこなわれている可能性が示された。

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 1 件)

(和文総説)

蛋白質のアルギニンメチル化によるミクログリア細胞制御機構

森 泰丈、脳 21、16(2) 155-160、2013.

[学会発表] (計 3 件)

[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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 泰丈

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00343252

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：