

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293066

研究課題名(和文) 対称性ジメチル化修飾による免疫細胞シグナルと発生・疾患制御

研究課題名(英文) Post-translational modification by symmetric arginine dimethylation in immune regulation and diseases

研究代表者

古賀 貴子 (Koga, Takako)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：90451905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質アルギニン残基を対称的に二度メチル化する酵素の一つ、PRMT5の生体レベルでの機能や意義を明らかにした。破骨細胞特異的にPRMT5遺伝子を欠損するマウスは、骨吸収の増加による骨量低下を示した。しかし、PRMT5欠損マウスから採取した骨髄細胞からのin vitroでの破骨細胞分化には大きな影響を与えないことが分かった。つまり、PRMT5を欠損する破骨細胞で何らかの標的タンパク質のメチル化の障害が、他の骨代謝関連細胞に大きく影響する可能性を見出した。また、T細胞系列で遺伝子欠損を起こすマウスでは、胸腺のNKT細胞の数、および末梢のCD4、CD8の数が顕著に減少していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Protein arginine methylation is a post-translational modification which contributes to a wide range of biological processes such as transcriptional control and mRNA splicing. Mice lacking PRMT5 specifically in osteoclasts showed an decreased bone mass due to an increased bone resorption. In addition, T cell-specific deletion of the Prmt5 gene led to a marked reduction in gamma chain family cytokine signaling and a severe loss of thymic iNKT cells and a decreased number of peripheral CD4+ and CD8+ T cells. PRMT5 induces the symmetric dimethylation of Sm proteins which promote the splicing of the Il2rg pre-mRNA, critically contributing to the expression of gamma chain. These findings demonstrate that arginine methylation plays a key role in the regulation of gamma chain family cytokine signaling strength by facilitating the expression of signal-transducing components.

研究分野：骨免疫学

キーワード：破骨細胞 免疫系細胞 タンパク質翻訳後修飾 生体恒常性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質のアルギニン残基を対称性にジメチル化する酵素として PRMT1 が同定され、2000 年代になって、PRMT1 による可逆的なタンパク質ジメチル化が細胞外刺激にตอบสนองしてシグナル伝達を担う動的な翻訳後修飾であることが続々と報告されるようになってきた (Cuthbert *et al.*, *Cell* 2004; Wang *et al.*, *Science* 2004; Shi *et al.*, *Cell* 2004; Tsukada *et al.*, *Nature* 2006)。

PRMT ファミリーは、基質に対するメチル化転移の様式の違いから I 型と II 型の 2 つの PRMT に分類される。I 型 PRMT (PRMT1,3,4,6,8) はアルギニン残基を非対称性に 2 回メチル化してジメチルアルギニン (aDMA) に変換するのに対し、II 型 PRMT (PRMT5,7,9) は対称性ジメチルアルギニン (sDMA) に変換する。これらのうち、PRMT1 に関する研究は国内外で精力的に進み、ヒストンのアルギニンをメチル化して転写活性化に寄与することが明らかにされた後、多数の非ヒストンタンパク質も基質として同定されるようになり、IFN シグナル、エストロゲンシグナル、酸化ストレスシグナル等の制御に関与することが分かってきた (Boisvert *et al.*, *Mol. Cell Proteomics*, 2003)。最近では線虫を用いた研究から、PRMT1 がインスリン/IGF-I シグナル経路を調節し、寿命をコントロールすることが判明した (Takahashi *et al.*, *Cell Metab.* 13, 2011)。一方、PRMT5 の基質や複合体も同定され始め、I 型とは対照的に、転写抑制に寄与することが分かってきた。しかし、個体レベルでのアルギニンメチル化の意義を証明する研究は始まったばかりである。現在までに PRMT1、2、3、4、5 のノックアウトマウスが作成された。PRMT2、3 の各欠損マウスはほぼ正常に生育するが、PRMT1 欠損マウスは胎生初期に致死、PRMT4 欠損マウスは胎生後期～出生後に致死であり、胸腺の発達等に必須であることが分かっている。PRMT5 も胚盤胞、始原生殖細胞で必須となるため (Tee, W *et al.*, *Genes Dev.* 2010)、いずれも発生後の生体レベルにおける機能解明のためにはコンディショナルノックアウトマウスの作成が待たれる状況である。

最近、PRMT5 が DNA のメチル化に関与し、サイレンシングやゲノムインプリンティングに関わること、さらには、山中因子による体細胞のリプログラミングに関与することが報告されて (Nagamatsu *et al.*, *J Biol. Chem.* 2011)、世界的にも最先端の学術領域に関わる因子として認識されてきている。

疾患への関与としては、PRMT4 の発現が前立腺癌や乳癌で上昇していることが見出された。また、アルギニンメチル化タンパク質の代謝産物である遊離 aDMA の産生亢進は、NOS 阻害活性を持つことが以前より知られており、最近では、高血圧、糖尿病、脂質異常症、メタボリックシンドローム等の生活

習慣病や、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性末梢血管症等の循環器系疾患リスクの予測バイオマーカーとして期待され始めている。一方、sDMA も血漿中に検出され、その値は腎機能と相関することが分かっているが、aDMA のような生理作用は知れていない。このように、II 型 PRMT/対称性ジメチル化の意義・制御法を理解することは、疾患・病態を理解するための新しい一面を提供し、画期的な臨床応用開発に繋がる可能性を秘めている。

## 2. 研究の目的

タンパク質の特定のアルギニン残基は、Protein arginin methyltransferase (PRMT) によって不可逆的にジメチル化される。I 型 PRMT はアルギニン残基を非対称性に、II 型 PRMT は対称性にジメチル化し、その効果は全く異なる可能性が示唆され始めている。はたしてこの翻訳後修飾は、生命の発生や恒常性維持のための細胞内シグナル伝達として、どのように寄与しているのか？本研究は II 型 PRMT に属する PRMT5 のコンディショナルノックアウトマウスを用いた対称性ジメチル化タンパク質の網羅解析、DNA メチル化エピジェネティック解析/網羅的発現解析を通して、対称性ジメチル化タンパクの生体レベルにおける意義を (免疫系の発生と恒常性維持を題材に) 解明する。また、対称性ジメチル化アルギニン (sDMA) と疾患とのリンクを探索し、医・生物学に新たな概念を提唱することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) II 型 PRMT5 コンディショナルノックアウトマウス (cKO) の免疫系制御に着目した解析

申請者が新たに作成した PRMT5 の全身性欠損マウスは発生初期に死亡し、PRMT5 は細胞の生存の根幹に必須の役割を果たす可能性が考えられた。しかし、破骨細胞特異的 PRMT5 欠損マウスでは、PRMT5 の欠損は破骨細胞の生存や増殖に欠陥をもたらさず、骨吸収の亢進をもたらした。つまり、個体発生以後は、PRMT5 は様々な組織で特有の役割を果たす可能性が示唆された。そこで、PRMT5 欠損による胎生致死を回避して、polyI:C 投与によるインターフェロン産生にตอบสนองして誘導的に PRMT5 を欠損するマウスを作成したところ、重度の貧血を呈し、polyI:C 投与後 2 週間後に死亡することを明らかにしている (PRMT5:Mx-1Cre マウス)。このマウスを用いて下記の実験を実施する。

細胞ポピュレーション異常の原因が、各組織のストロマ側の異常または胚中心形成などの構造的欠陥に依存するか、あるいは造血幹細胞側の Cell autonomous な欠陥か否かを明らかにするために、組織学的解析を行う。また、PRMT5:Mx-1Cre マウス由来の造血幹細胞を野生型マウス

に移植し、脾コロニー形成アッセイや competitive repopulation assay を実施し、幹細胞の多分化能・自己複製能を検討する。各々の細胞分化過程に異常が認められた際には、どの分化段階で異常を来すのかを FACS 解析や *in vitro* 共培養系（ストロマ細胞株 OP9 との共培養による B 細胞分化、OP9-DL1 との共培養による T 細胞分化）により明らかにする。貧血との関連としては、それが造血能の問題か、赤血球自体の異常（生存・アポトーシス等）か、自己免疫性溶血性貧血など免疫系異常に起因するものなのかを解明する。

#### (2) 標的組織特異的 PRMT5 欠損マウスの作成と機能解析

上記実験計画により、PRMT5 欠損によって異常をもたらされる細胞種を明らかにした後、その細胞特異的な PRMT5 欠損マウスを作成する。具体的には、Cell autonomous な異常であった場合、Mbl-Cre を用いた B 細胞特異的欠損マウス、Lck-Cre や CD4-Cre、CD8-Cre を用いた T 細胞系列特異的欠損マウス、Lys-M Cre を用いたミエロイド系列特異的欠損マウス、CD11b-Cre を用いた単球・マクロファージ特異的欠損マウス、CD11c-Cre を用いた樹状細胞特異的欠損マウス等を作成し、上記 1) の実験を実施し、各々の細胞分化における PRMT5 の機能を解析する。

#### (3) 対称性ジメチル化タンパク質(sDMA)のプロテオーム解析(sDMA-Proteome 解析) II 型 PRMT による対称性ジメチル化タンパク質(sDMA)の網羅的同定を行う。どの組織・細胞を検体として用いるかに関しては、研究計画 1) によって明らかにされる PRMT5 の寄与を考慮し、決定する。プロテオーム解析は下記の観点から実施する。

標的組織・細胞における対称性ジメチル化タンパク質の同定。マウスの新鮮組織・細胞の総タンパク質から、抗 sDMA 抗体カラムを用いて対称性ジメチル化タンパク質を回収・精製し、質量分析を実施して同定する。

各種細胞シグナルに依存した対称性ジメチル化シグナル伝達分子の同定。研究計画 1) で PRMT5 を重要とする細胞種が明らかになるので、各種細胞の分化・活性化刺激、BCR 刺激、TCR 刺激、サイトカイン刺激による経時的な対称性ジメチル化タンパク質を網羅解析する。

いずれも、AB SCIEX 社製 Triple TOF™ と iTRAQ 法を用いるので、同時に相対定量解析が可能となる。また、サンプル調整の際、メチル化阻害剤で処理したタンパク質を対照に用いることでアーティファクトを除去する。さらに、PRMT5:Mx-1 Cre マウスや、研究計画 (1-2) で作製する細胞特異的 PRMT5 欠損

マウス由来の細胞を用いることによって、対称性ジメチル化修飾の PRMT5 依存性を特定する。細胞内のアルギニンジメチル化タンパク質の多くは、ヒストンや RNA-または DNA-結合タンパク質である可能性が予想される。上記実験計画では細胞内シグナル伝達に焦点を絞るため、総タンパク質を細胞質画または膜画分に分画前処理したものをを用いることで、sDMA-Proteome によるシグナル解析の最適化を図る。

#### (4) 対称性ジメチル化による細胞シグナル伝達の解析 その 2

上記実験計画 3) で同定した因子について、*in vitro* メチレーションアッセイを実施し、対称性ジメチル化修飾の有無を検証する。その後、当該因子のメチル化部位に変異を入れた変異体を作成し、レトロウィルスベクターを用いた gain of function 実験を行い、免疫系細胞の分化・機能等に対する効果を評価する。メチル化変異体が標的細胞のシグナル伝達に明らかな影響を示すことが明らかとなった場合、その分子の非メチル化変異体のノックインマウスの作成や当該分子遺伝子欠損マウスの作成を通して、loss-of-function 実験を行い、生体レベルでの意義を明らかにしていく。

#### 4. 研究成果

タンパク質アルギニン残基を対称的に二度メチル化する酵素の一つ、PRMT5 の生体レベルでの機能や意義をあきらかにした。

PRMT5 遺伝子を欠損すると、受精卵の段階で細胞は死に至る。そのため、PRMT5 遺伝子を様々な細胞、特に骨組織の恒常性維持に関わる破骨細胞や骨芽細胞、免疫系細胞などで欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成した。破骨細胞特異的に発現する Ctsk 遺伝子下流で Cre リコンビナーゼタンパク質を発現する Ctsk-Cre による破骨細胞特異的 PRMT5 欠損マウスは、骨吸収の増加による骨量低下を示した。しかし、PRMT5 欠損マウスから採取した骨髄細胞からの *in vitro* での破骨細胞分化には大きな影響を与えないことが分かった。つまり、PRMT5 を欠損する破骨細胞で何らかの標的タンパク質のメチル化の障害が、骨代謝に大きく関与する可能性を見出した。また、T 細胞系列で遺伝子欠損を起こすマウスでは、胸腺の NKT 細胞の数、および末梢の CD4、CD8 の数が減少していることを見出した。また、PRMT5 欠損のために受精卵段階で致死になることをバイパスして、出生後に PRMT5 遺伝子を欠損させることの可能なマウスでは、骨髄中の顆粒球などのミエロイド系の細胞の分化が著しく減少することを見出した。

また、タンパク質アルギニンメチル化は、転写のコントロールや mRNA のスプライシングなどの様々な生物学的プロセスに寄与することが知られている。T細胞が分化・活性化する際には、その細胞内シグナル伝達に IL2rg 遺伝子にコードされるサイトカイン受容体共通γ-chainが使われるが、γ-chain の発現に関わる制御メカニズムはほとんどわかっていなかった。申請者は PRMT5 がインバリアントナチュラルキラーT細胞(iNKT)、CD4陽性、CD8陽性T細胞の維持に必須の役割を果たすことを明らかにした。PRMT5 遺伝子をT細胞特異的に欠損すると、γ-chain を介したサイトカインシグナルが顕著に減少して、胸腺のiNKT細胞は顕著に欠失し、さらにCD4陽性細胞、CD8陽性細胞が減少することが明らかになった。PRMT5 は mRNA のスプライシングに関わる Sm タンパク質をメチル化して、IL2rg 遺伝子の未熟 mRNA のスプライシングを促進させる働きを持っていたため、欠損細胞では、γ-chain の発現が減少することが明らかとなった。以上より、PRMT5 によるタンパク質のアルギニンメチル化修飾が、γ-chain という細胞内シグナル伝達のコンポーネントの発現レベルを制御することによって細胞内シグナル伝達に関与することが明らかとなった。

以上の結果を 骨代謝における PRMT5 の役割、および 免疫系細胞の分化における PRMT5 の役割、の2つの論文に分けて、投稿準備中である。

#### 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 2 件)

古賀貴子、イムノグロブリンによる骨粗鬆症—新たな骨粗鬆症バイオマーカーの可能性、整形外科学、査読なし、印刷中、2017

古賀貴子、免疫系分子による骨代謝調節、骨粗鬆症治療、査読なし、1巻、p39-46、2017

〔学会発表〕(計 3 件)

岡松伸明、坂井信裕、古賀貴子、木内祐二、小口勝司、高見正道、抗 RANKL 抗体が妊娠マウスに与える影響、第90回日本薬理学会年会、2017年3月15日、長崎

古賀貴子 イムノグロブリンによる破骨細胞分化制御 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 (招待講演、シンポジ

ウム「骨代謝研究と骨粗鬆症研究の展開」)2016年8月13日、福岡

岡松伸明、古賀貴子、稲垣克記、小口勝司、高見正道、破骨細胞の分化を制御する新規遺伝子の解明 第2回日本骨免疫学会、2016年7月6日、沖縄

〔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

古賀 貴子 (KOGA, Takako)  
昭和大学・歯学部・講師  
研究者番号：90451905

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )