

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23116007

研究課題名（和文）代謝とクロストークする転写環境形成因子の構造科学的な解明

研究課題名（英文）Structural analysis of the transcription environment factors that engage in crosstalk with metabolic pathways

研究代表者

清水 敏之（Shimizu, Toshiyuki）

東京大学・薬学研究科（研究院）・教授

研究者番号：30273858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 73,140,000 円

研究成果の概要（和文）：アルギニンのメチル化はPRMTによって触媒される翻訳後修飾である。PRMT8はPRMTファミリーの中で最も普遍的なPRMT1に相同性が高いがその機能は不明な点が多い。またPRMT7は他のPRMTと比べると特徴的なドメイン構成をしている。我々は両者の分子機構を理解するために、構造科学的な研究を行った。PRMT8はらせん状の超構造をとっていた。この高次構造が活性に重要な役割を果たしていることを示した。一方、PRMT7は単量体でコアダメインの二量体のような構造をとっていた。SAHはN末ドメインにしか結合しておらず、C末ドメインはSAH結合サイトがブロックされていた。

研究成果の概要（英文）：Arginine methylation is a post-translational modification catalyzed by the protein arginine methyltransferase (PRMT) family. PRMT1, the predominant member, is responsible for most of the arginine methylation in the cell, is ubiquitously expressed. In contrast, much less is known about its closely related family member, PRMT8. PRMT7 has a unique domain structure consisting two tandem core domains.

We determine the structures of PRMT8 and PRMT7. PRMT8 forms novel helical assembly in the crystal. The mutant protein disrupting the helical assembly exhibits a different cellular localization and reduced the methyltransferase activity, suggesting that the higher oligomerization state is necessary for the proper function of PRMT8. The N and C-terminal core domain of PRMT7 formed the hetero core-dimer like structure. SAH was observed only in the N-terminal catalytic domain. The obtained structural feature suggests that C-terminal core domain lacks the function of the methyltransferase activity.

研究分野：構造生物学

キーワード：アルギニンメチル化 PRMT 翻訳後修飾 SAM X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

アルギニンメチル化酵素 (protein arginine methyltransferase; PRMT) は、蛋白質のアルギニン残基をメチル化する酵素である。この酵素ファミリーは哺乳動物で広く保存されており、主に核内で働き、シグナル伝達、mRNA のスプライシング、転写制御、DNA 修復、蛋白質の転移など幅広い生命現象に関与する。アルギニンのメチル化は主要な翻訳修飾として転写制御、mRNA スプライシング、DNA 修復、シグナル伝達等アルギニンメチル化を行う酵素が (PRMT) であり、哺乳類には 9 種類存在する

PRMT の活性はメチル化様式により 3 タイプに分類され、アルギニン残基に一つメチル基を転移してモノメチルアルギニンを生じた後、タイプ I では非対称ジメチルアルギニンを、タイプ II では対称ジメチルアルギニンを生じる。タイプ III はモノメチルアルギニンのみを生じる (図 1)。PRMT はコアダメインと呼ばれる保存されたドメインを一般には分子内に一つ持つ (図 2)。タイプ I PRMT ではコアダメインが二量体 (コアダimer 構造) を形成することが活性に重要である。PRMT7 は他の PRMT と比べユニークな特徴を備え、一般には一つ分子内に存在するコアダメインを、PRMT7 は二つタンデムに持つ特徴的なドメイン構成をとる。また現在のところ PRMT7 は唯一タイプ III 活性を示す PRMT である。

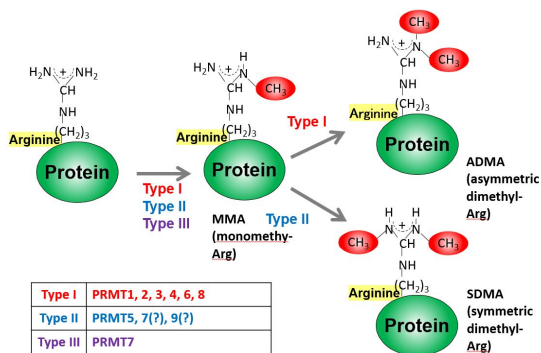


図 1 PRMT によるメチル化様式

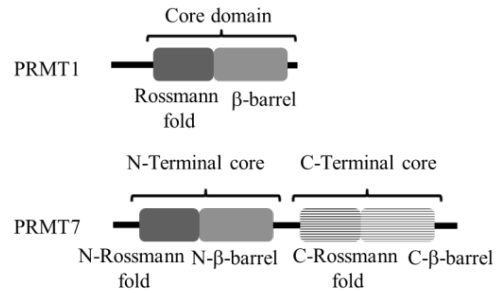


図 2 PRMT1 と PRMT7 のドメイン構成

2. 研究の目的

我々は PRMT ファミリーの結晶構造決定を行い、基質認識、メチル化活性制御機構、酵素活性機構の原子レベルでの解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) タンパク質の発現・精製・結晶化

線虫由来の PRMT7 およびヒト由来の PRMT8 を研究対象に選び大腸菌による大量発現系、精製系を検討した。PRMT7 は全長、PRMT8 は N 末の 67 アミノ酸を欠失させた形で大腸菌に形質転換させ大量発現に成功し複数のカラムクロマトグラフィーを用いて精製を行った。

結晶化を行うには溶液の温度、pH、沈殿剤の濃度や種類など広範囲に渡る条件を検討する必要がある。このため研究科にすでに設置してある結晶化ロボットを用いて迅速に条件を検索した。

(2) 構造決定

PRMT7

得られた  $P3_1$ ,  $P4_32_12$  の異なる 2 晶系の結晶を用いて、大型放射光施設 Photon Factory BL 5A, Spring-8 BL 44XU において X 線回折実験を行い、データセットを取得した。新規構造のため、既知 PRMT をモデルとした分子置換による構造決定には至らなかったが、 $P4_32_12$  結晶重原子置換体を用いた SAD 法により位相を決定、 $Ce$ PRMT7 の 3 次元構造決定に成功した。 $P4_32_12$  結晶における  $Ce$ PRMT7 構造をモデルに

分子置換法を行うことで、 $P3_1$  結晶においてもその3次元構造決定に成功した。

#### PRMT8

ヒト PRMT8 について 3 Å の分解能で構造を決定した。結晶は空間群  $C222_1$  に属し、格子定数は  $a=200.9, b=132.0, c=295.7$   $\beta=106.5$  であった。位相は配列相溶性が高い PRMT1 をサーチモデルとし、分子置換法によって決めた。

#### 4. 研究成果

##### (1) PRMT7 の構造科学的研究

本研究では線虫由来 CePRMT7 に注目しX線結晶解析によって立体構造を決定し構造科学的研究を行った。CePRMT7 の単量体構造は、分子内に二つタンデムに存在するコアダメインが会合してコアダイマー構造をとる新規構造であった(図3)。コアダメイン同士の相互作用は既存の PRMT と似るが、その相対的配置は新規であった。各ドメインのトポロジーも多少の差異はあるが、既知の PRMT と似ていた。SAH は N 末端側活性部位にのみ見られ、C 末端側活性部位は PRMT に高度に保存される二つのループに占められていた。N 末端側活性部位の変異体を作成し AdoMet 結合実験を行った結果、変異体の AdoMet 結合能は大きく低下し、CePRMT7 のコファクター結合部位が N 末端側コアダメインのみであろうことを示した。また、CePRMT7 のアルギニン結合ポケットの大きさを PRMT1、5 と比較し、CePRMT7 のポケットが最小であることを示した。一般に PRMT はコアダイマー構造中に 2 つの活性部位を持つ。基質のアルギニンが片方の活性部位でメチル化を受け、その後コアダイマーから離れることなく、もう片方の活性部位でさらなるメチル化を受ける機構が提唱されている。しかしながら、PRMT7 では C 末端コアダメインが不活性であり、このようなジメチル化を受ける可能性は低いと考えられる。さらに、N 末端コアダメインの狭い

アルギニン結合ポケットには、ジメチルアルギニンが結合できる空間がなく、結果としてモノメチルアルギニンのみが生成すると推測される。



PRMT7の構造

図3

##### (2) PRMT8 の構造科学的研究

PRMT8 は最も一般的な PRMT1 と 81% の相溶性がある。PRMT-8 の基質は長い間不明であったが、筑波大の深水博士のグループはその基質の一つが脂質であることを証明した。PRMT1 との相溶性から予想されていたように PRMT8 は PRMT1 とほぼ同一のドメイン構成をとっており、2 量体の構造もほぼ同一であったが、会合の状態は大きく変わっており、らせん状の 8 量体構造をとっていた(図4)。これまでの研究から PRMT1 は溶液中で二量体以上の多量体を形成して働くと考えられているが、既に報告されているラット PRMT1 の結晶構造は二量体の構造であった。これまで多量体の PRMT 構造は酵母 PRMT1 (配列の identity~50%) で報告されているのみである。しかも酵母 PRMT1 は六量体であり、会合状態は PRMT8 と全く異なっている。結晶中で観察された会合状態が溶液中でも維持していることを示すため、ゲルろ過クロマトグラフィー、超遠心分析、多角度光散乱検出器(MALS)を組み合わせた小角散乱を行った。その結果、いずれの測定法においても PRMT8 は溶液中において 8 量体で存在していることを示すことができた。

次にこの会合状態が PRMT8 の機能に影響を

及ぼすかどうかを検討するため、会合に重要な役割を果たすと考えられるアミノ酸に変異をいれて8量体をとることができないような変異体を作成し、PRMT活性および細胞内での局在を観察した。その結果、活性は顕著に減弱し、本来脂質修飾のため膜に局在するタンパク質であるPRMT8は細胞質に分布するようになった(図5)。これらのことは高次の会合状態が正常な機能発現に必須であることを意味する。

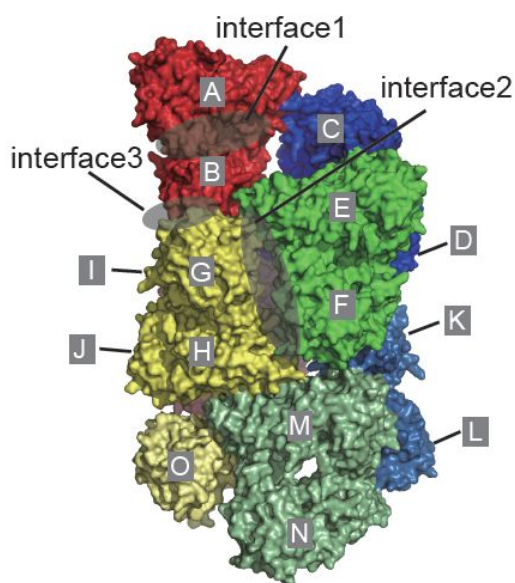


図4 らせん状に会合したPRMT8

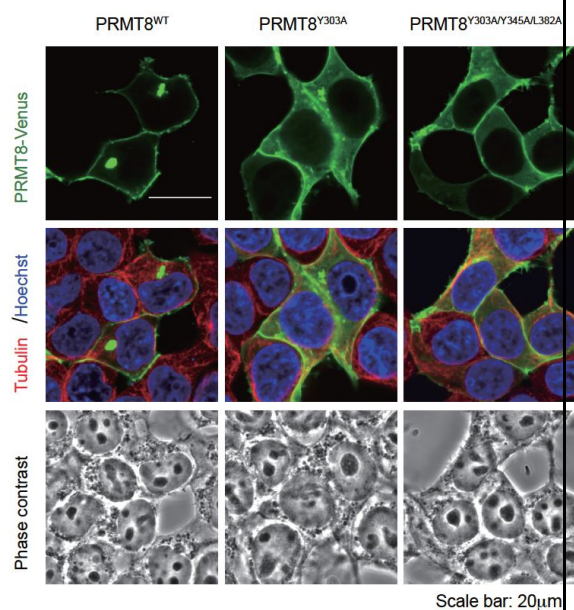


図5 高次構造をとることができない

## PRMT8 変異体の細胞内局在

### 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 5 件)

1. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner.

Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, Nomura N, Kako K, Kobayashi A, Shimizu T, Fukamizu A.

*J Cell Sci.* in press

2. Toma-Fukai S, Kim JD, Park KE, Kuwabara N, Shimizu N, Krayukhina E, Uchiyama S, Fukamizu A, and Shimizu T: Novel helical assembly in arginine methyltransferase 8.

*J. Mol. Biol.* 428, 1197-208 (2016)

3. Sakurai S., Ohto U. and Shimizu T: Crystal structure of human Roquin-2 and its complex with constitutive decay element RNA

*Acta Crystallogr.* **F71**, 1048-1054 (2015)

4. Hasegawa M, Toma-Fukai S, Kim JD, Fukamizu A, and Shimizu T: Protein arginine methyltransferase 7 has a novel homodimer-like structure formed by tandem repeats

*FEBS Lett.* 588, 1942-1948 (2014)

5. Structural basis for vitamin D receptor agonism by novel nonsteroidal ligands

Asano, L., Ito, I., Kuwabara, N., Waku, T., Yanagisawa, J., Miyachi, H. and Shimizu, T.

*FEBS Lett.* 587, 957-963 (2013)

[学会発表](計 5 件)

1. 藤間祥子, Jun-Dal Kim, Kyung-Eui Park, 清水伸隆, 桑原直之, Elena Krayukhina, 内山進, 深水昭吉, 清水敏之

hPRMT8 の結晶-溶液構造相関解析をもとに  
した機能解明

平成 27 年度結晶学会年会

2. 櫻井駿也、大戸梅治、清水敏之

mRNA 分解に關与するタンパク質 Roquin-2 と  
RNA 複合体の X 線結晶構造解析

平成 27 年度結晶学会年会

3. 長谷川森雄, 藤間 深井祥子, 金俊達, 深  
水昭吉, 清水敏之

線虫由来タンパク質アルギニンメチル基転  
移酵素 7 の結晶構造解析

平成 26 年度結晶学会年会

4. 藤間祥子,

翻訳後修飾蛋白質 PRMT8 の PX-SAXS 相関解  
析をもとにした機能解明

第3回タンパク質 X 線溶液散乱講習会(2014)

5. Sachiko Toma-Fukai, Jun-Dal Kim,  
Kyoung-Eui Park, Kuwabara Naoyuki,  
Akiyoshi Fukamizu, Toshiyuki Shimizu

Crystal structure of human protein arginine  
methyltransferase8

Asian Crystallographic Association 2012

〔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  
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
清水 敏之 (SHIMIZU, Toshiyuki)  
東京大学・大学院薬学系研究科・教授  
研究者番号：30273858

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
藤間祥子 (TOMA, Sachiko)  
東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：40363535

仲島由佳 (NAKAJIMA, Yuka)  
筑波大学・生命環境系・助教  
研究者番号：40399499