

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07131

研究課題名(和文)アルギニンメチル化が担う胎児期の血管形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Role of arginine methylation mediated by arginine methyltransferase 1 on angiogenesis during fetal development

研究代表者

石田 純治 (Ishida, Junji)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・講師

研究者番号：30323257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質アルギニンメチル基転移酵素1 (PRMT1)は、増殖や分化を含む複数の細胞機能に関与しています。また、PRMT1は胚発生中の血管新生に重要な血管内皮細胞(EC)で発現していますが、その役割は不明です。本研究では、内皮特異的にPRMT1を欠損したマウス(Prmt1-ECKO)を樹立したところ、本マウスでは血管の構造が脆弱で、胎生15日までに致死となることが判明し、内皮PRMT1が胚の正常な血管形成に必須であることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管の障害は、様々な疾患の減となる。血管内皮細胞は、全ての血管に存在し、全身の臓器の形成や機能調節に不可欠である。近年、新たな血管制御のメカニズムとして、タンパク質の翻訳後修飾が注目されつつあるが、内皮細胞機能との関連は解明されていない。本研究では、アルギニン残基のメチル化を担う酵素PRMT1に着目して、内皮細胞でPRMT1をもたないマウスを作製したところ、胎児は早期に死亡し、血管網が脆弱であることが判明した。本研究成果は、タンパク質の翻訳修飾を制御することで、血管のメンテナンスや疾患の予防に繋がる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) is involved in multiple cellular functions including differentiation and proliferation. PRMT1 is expressed in vascular endothelial cells (ECs), which are responsible for angiogenesis during embryonic development, but its role has remained elusive. In this study, we generated endothelial-specific prmt1-knockout (Prmt1-ECKO) mice, and found that they died before embryonic day 15. In these embryos, the superficial temporal arteries were poorly perfused with blood, and wholemount 3D imaging revealed dilated and segmentalized luminal structures in Prmt1-ECKO fetuses. Our findings provide evidence that PRMT1 is important for embryonic vascular formation.

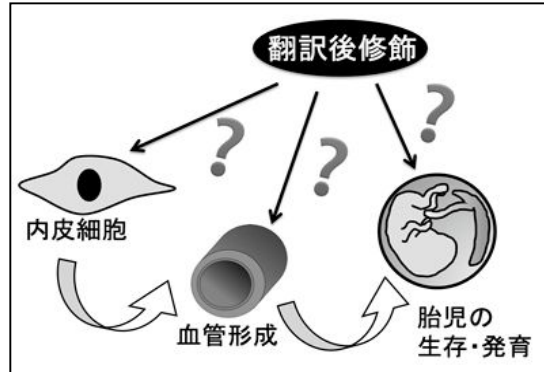
研究分野：生化学、発生工学

キーワード：アルギニンメチル化 PRMT1 血管内皮細胞 組織特異的ノックアウトマウス in vivoイメージング 血管形成異常 胎生致死 翻訳後修飾

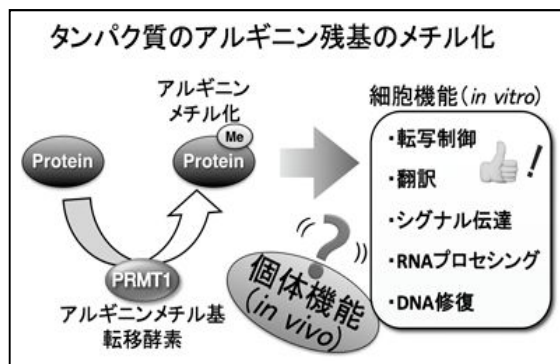
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 1. 研究開始当初の背景

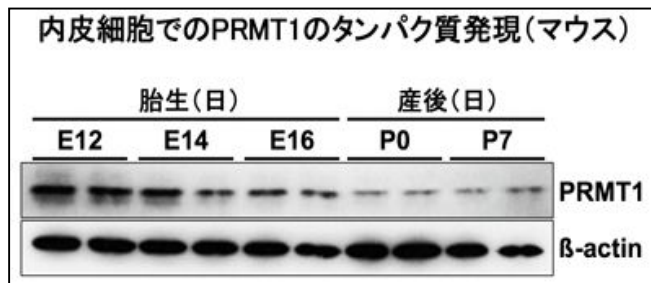
正常な血管は、胎児の生存と発育、また、成体での組織の働きに必須であり、酸素や栄養素を全身に循環させる血管の構造と機能に、血管内皮細胞は極めて重要である。血管は、内皮細胞が起点となって形成され、平滑筋細胞など周りの細胞と相互作用しながら成熟する。この複雑な血管形成のプロセスについて、これまで血管増殖因子とその受容体を介したシグナル伝達と標的である転写因子に関して精力的に研究が行われてきた。一方で、アセチル化やリン酸化、メチル化などタンパク質の翻訳後修飾が生体イベントのバランス決定に深く関わっていることが判明しつつある。しかし、翻訳後修飾による血管形成の制御については未だ不明であり、その分子基盤については特定されていない(右図)。



翻訳後修飾のひとつであるタンパク質のアルギニンメチル化は、メチル化酵素ファミリー (PRMTs) が S-adenosyl-L-methionine (SAM) をメチル基供与体として、アルギニン側鎖にメチル基を転移する反応であり、ほ乳類の PRMTs (11 種類) のうち、PRMT1 は細胞内の 85% のアルギニンメチル化反応を担う主要な PRMT である。近年、PRMT1 が転写制御やシグナル伝達など多岐にわたる機能を制御していることが、主に "in vitro" で示されつつある(下図)。しかし、PRMT1 の遺伝子欠損マウスは胎生 6.5 日で致死となることが報告され (Mol. Cell. Biol., 2000)、この 15 年間、"in vivo" での PRMT1 の役割は不明であった。ごく最近、我々は、PRMT1 を神経系で欠失する組織特異的 PRMT1 欠損マウスを世界に先駆けて開発し、PRMT1 が中枢神経系の構造と機能に極めて重要であることを明らかとした (J. Biol. Chem., 2016)。PRMT1 は、血管組織を含む全身の臓器にも発現しており多彩な生体内作用を有することが予想されているが、その機能解明は始まったばかりである。



我々は、アルギニンのメチル化が血管を含む他の組織でも重要な役割を担う可能性を考え、マウス胎仔からの血管内皮細胞の単離・回収法を確立し、PRMT1 の発現を血管形成が活発な胎生中期から出生後まで確認したところ、PRMT1 のタンパク質発現は胎生期に強く、出生後に減弱することを見出した(下図)。このことは胎生期での内皮 PRMT1 の重要性を示しているが、全身の PRMT1 欠損マウスは胎生早期の 6.5 日で致死となるため (Mol. Cell. Biol., 2000)、胎生中期での内皮 PRMT1 の解析は不可能であった。



## 2. 研究の目的

本研究では、内皮細胞特異的な PRMT1 欠損マウスの開発と、血管の高次構造の可視化を可能とする組織透明化 in vivo 3D イメージング技術とを組み合わせ、血管形成におけるアルギニンのメチル化が担う役割とその分子基盤の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

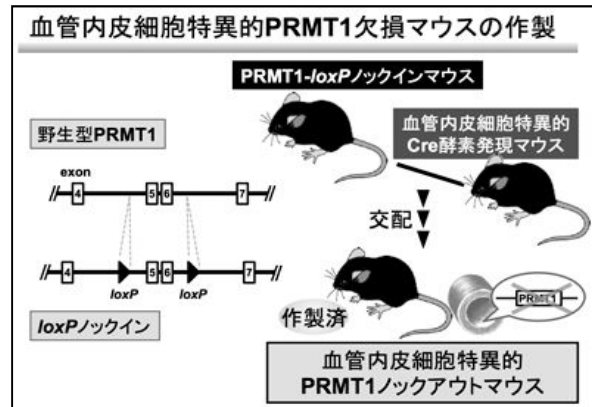
本研究では、以下の3点に焦点を絞り『アルギニンメチル化が担う胎児期の血管形成メカニズムの解明』を目指した。

- (1) 内皮細胞特異的 PRMT1 欠損マウスの作製
- (2) 内皮 PRMT1 欠損胎仔の血管構造の評価
- (3) PRMT1 欠損による内皮細胞の機能の検討

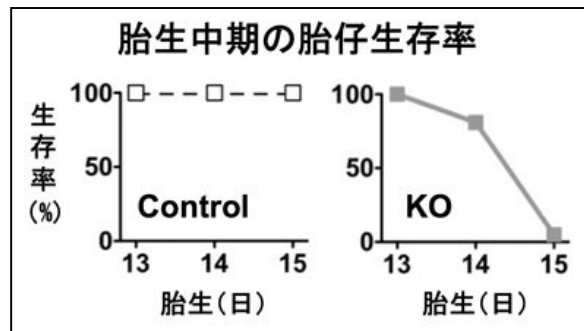
### 4. 研究成果

- (1) 内皮細胞特異的 PRMT1 欠損マウスの作製:

PRMT1 遺伝子座において、PRMT1 の酵素活性に重要なエクソン 5、および、6 の領域の両側に、loxP 配列を挿入したマウスと、血管内皮細胞のマーカである Tie2 遺伝子のプロモーター制御下で、血管内皮細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス (Tie2-Cre) を導入した。それら 2 系統間での交配により、内皮細胞特異的 PRMT1 欠損マウス (P1-ECKO マウス) を樹立した (右図)。

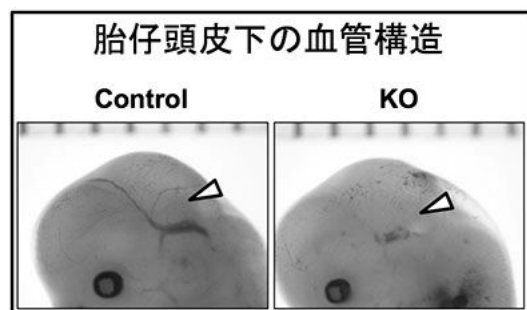


得られた P1-ECKO マウス系統を用いて、系統内での交配を行い、内皮細胞特異的 PRMT1 欠損マウス (両アレルで flox 配列を有し、加えて Tie2-Cre 遺伝子を有するマウス: P1-ECKO マウス) の作出を試みた。出産当日の新生仔について、遺伝子型検定を行ったところ、内皮 PRMT1 を欠損した P1-ECKOP 産仔は得られなかった。そこで、P1-ECKO マウスが胎生致死である可能性を考え、次に、胎生中期 (胎生 13-15 日) での胎仔の生存率と遺伝子型を検討することとした。その結果、内皮 PRMT1 を欠損しないコントロールマウス胎仔は、全ての個体が胎生 15 日の時点で生存していた (下図、Control)。一方で、内皮 PRMT1 を欠損した P1-ECKO 胎仔は、胎生 14 日目で死亡する胎仔を認め、胎生の 15 日では殆どの P1-ECKO 胎仔が死亡することが判明した (右図、KO)。

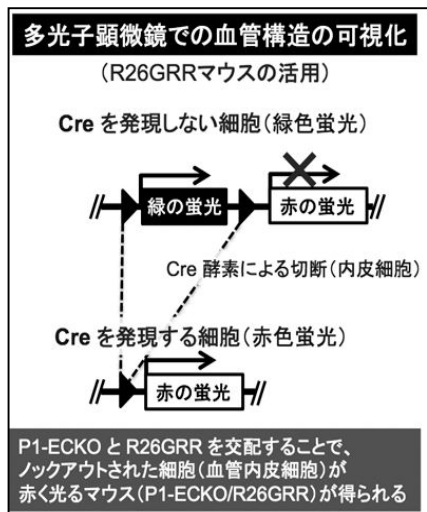


- (2) 内皮 PRMT1 欠損胎仔の血管構造の評価 (イメージング系の確立と観察):

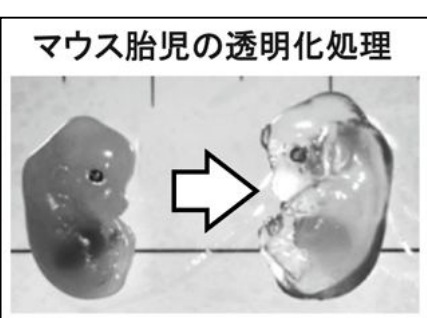
P1-ECKO マウス胎仔の死亡原因について検討するため、P1-ECKO が死亡し始める胎生 14 日における血管の構造を実体顕微鏡で評価した。P1-ECKO 胎仔では、ほとんどの個体で血管からの出血や組織の浮腫を呈することが判明した、加えて、胎仔の頭部表皮の血管の走行を観察したところ、Control 胎仔では、太い血管の分岐と延伸を認め、それら太い血管の間では、細かい血管網が発達していることが確認できた (右図、Control: 矢頭)。それに対して、P1-ECKO 胎仔では、太い血管が観察されたものの、頭部全体へは延びておらず、また、細かい血管については、血管網が不鮮明で希薄で、Control と比較して不鮮明であった。これら所見から、P1-ECKO 胎仔の血管網は充分に発達していないことが判明した (右図、KO: 矢頭)。



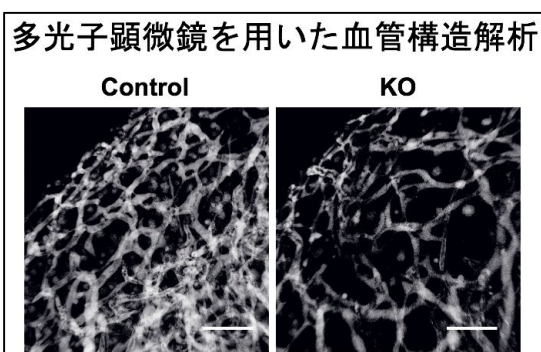
そこで次に、P1-ECKO 胎仔の血管構造について、より詳細に観察するため、多光子顕微鏡を用いた血管構造の *in vivo* 3D イメージングの解析系を構築することとした。血管内皮細胞を可視化するために、Cre 酵素の活性がある細胞（組換えが起こった細胞）のみが赤色蛍光を発するレポーターマウス R26GRR 系統（Exp. Anim., 2013、筑波大学生命科学動物資源センターより供与）と、樹立した P1-ECKO マウス系統を交配を行うことで、ノックアウトされた細胞（内皮細胞）のみが赤色蛍光を発する P1-ECKO/R26GRR マウスを作成した（右図）。



また、多光子顕微鏡を用いて組織の深部までの血管の詳細な構造を観察するため、作出された P1-ECKO/R26GRR 胎仔に対して透明化処理を行った。透明化試薬 “Scale” を用いた条件検討を進め、胎仔に対する透明化の最適化を行った。その結果、表皮や内部の臓器を含む、胎仔全身の透明化を可能とする条件を確立した（右図）。

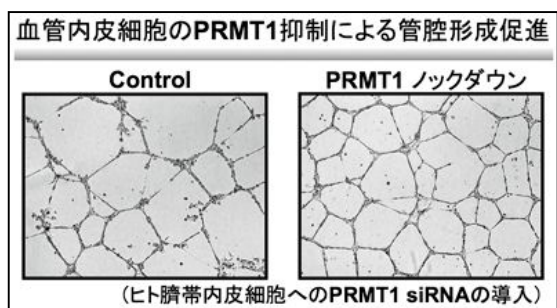


P1-ECKO/R26GRR マウスを用い、胎仔死亡を認める胚発生中期の胎生 14 日目を中心に透明化処理を行い、二光子顕微鏡を用いて血管構造を観察した。明視野での解析から血管構造に異常を認めた頭部の血管網について、内皮細胞の赤色蛍光を指標に詳細に解析したところ、P1-ECKO 胎仔では、血管網が脆弱であり、拡張や分節化された管腔構造が認められることを明らかにした（右図：KO、浅側頭動脈周辺）。さらに、画像解析ソフトによる血管構造の定量解析により、P1-ECKO 胎仔では、血管面積や血管の長さ、また、血管の分岐数がコントロール胎仔と比較して有意に減少していることが判明した。



(3) PRMT1 欠損による内皮細胞の機能の検討：

ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて、PRMT1 をノックダウンした際の内皮細胞の変化を観察した。PRMT1 のノックダウンにより、HUVEC の管腔構造の形成が亢進することが示され、内皮細胞の PRMT1 が細胞の集合や分岐に関与する可能性が示された（右図）。



本研究では、アルギニンメチル化の中心的な酵素である PRMT1 に焦点を当て、PRMT1 がマウスの血管内皮細胞で実際に発現することを初めて示すとともに、内皮細胞特異的な PRMT1 の欠損戦略で、全身欠損でみられた着床後の胎生致死を回避し、内皮 PRMT1 が胎生中期の正常な血管網の構築や胎仔の生存に必須であることを解明している。これらの知見は、循環制御の要である血管組織での PRMT1 を介するアルギニンメチル化の重要性を世界で初めて示した成果である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Noguchi Kazuyuki, Ishida Junji, Kim Jun-Dal, Muromachi Naoto, Kako Koichiro, Mizukami Hayase, Lu Weizhe, Ishimaru Tomohiro, Kawasaki Shohei, Kaneko Shuzo, Usui Joichi, Ohtsu Hiroshi, Yamagata Kunihiro, Fukamizu Akiyoshi	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 Proceedings of the National Academy of Sciences	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 Otani K., Tokudome T., Kamiya CA., Mao Y., Nishimura H., Hasegawa T., Arai Y., Kaneko M., Shioi G., Ishida J., Fukamizu A., Osaki T., Nagai-Okatani C., Minamino N., Ensho T., Hino J., Murata S., Takegami M., Nishimura K., Kishimoto I., Miyazato M., Harada-Shiba M., Yoshimatsu J., Nakao K., Ikeda T., Kangawa K.	4. 巻 141
2. 論文標題 Deficiency of Cardiac Natriuretic Peptide Signaling Promotes Peripartum Cardiomyopathy-Like Remodeling in the Mouse Heart	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 571 ~ 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039761	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 該当する
1. 著者名 Nagano Katsumasa, Kwon Chulwon, Ishida Junji, Hashimoto Tatsuo, Kim Jun-Dal, Kishikawa Nana, Murao Mei, Kimura Kenjiro, Kasuya Yoshitoshi, Kimura Sadao, Chen Yi-Ching, Tsuchimochi Hirotsugu, Shirai Mikiyasu, Pearson James T, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 166
2. 論文標題 Cooperative action of APJ and 1A-adrenergic receptor in vascular smooth muscle cells induces vasoconstriction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 383 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz071	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 該当する
1. 著者名 Murata Kazuya, Lu Weizhe, Hashimoto Misuzu, Ono Natsumi, Muratani Masafumi, Nishikata Kana, Kim Jun-Dal, Ebihara Shizufumi, Ishida Junji, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 PRMT1 Deficiency in Mouse Juvenile Heart Induces Dilated Cardiomyopathy and Reveals Cryptic Alternative Splicing Products	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 200 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2018.09.023	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Freyer Laina, Hsu Chih-Wei, Nowotschin Sonja, Pauli Andrea, Ishida Junji, Kuba Keiji, Fukamizu Akiyoshi, Schier Alexander F., Hoodless Pamela A., Dickinson Mary E., Hadjantonakis Anna-Katerina	4. 巻 20
2. 論文標題 Loss of Apela Peptide in Mice Causes Low Penetrance Embryonic Lethality and Defects in Early Mesodermal Derivatives	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 2116 ~ 2130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.08.014	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 該当する

1. 著者名 Sato Teruki, Sato Chitose, Kadowaki Ayumi, Watanabe Hiroyuki, Ho Lena, Ishida Junji, Yamaguchi Tomokazu, Kimura Akinori, Fukamizu Akiyoshi, Penninger Josef M., Reversade Bruno, Ito Hiroshi, Imai Yumiko, Kuba Keiji	4. 巻 113
2. 論文標題 ELABELA-APJ axis protects from pressure overload heart failure and angiotensin II-induced cardiac damage	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cardiovasc. Res.	6. 最初と最後の頁 760 ~ 769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvx061	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 Ishimaru Tomohiro, Ishida Junji, Kim Jun-Dal, Mizukami Hayase, Hara Kanako, Hashimoto Misuzu, Yagami Ken-ichi, Sugiyama Fumihito, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 161
2. 論文標題 Angiodysplasia in embryo lacking protein arginine methyltransferase 1 in vascular endothelial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 255 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvw095	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 Kawasaki Shohei, Kako Koichiro, Nagashima Yusuke, Kanou Akihiko, Ishida Junji, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 161
2. 論文標題 Hydralazine is involved in methylhistamine metabolism by inhibiting monoamine oxidase B in pregnancy-associated hypertensive mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 155 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvw090	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14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 石田 純治、深水 昭吉
2. 発表標題 妊娠における胎仔サイズの解析
3. 学会等名 サイズ生物学ワークショップ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chulwon Kwon, Junji Ishida, Akiyoshi Fukamizu
2. 発表標題 1A-adrenergic receptor suppresses cardiac hypertrophy in pregnancy-associated hypertensive mice
3. 学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Weizhe Lu, Kazuya Murata, Hayase Mizukami, Jun-Dal Kim, Junji Ishida, Akiyoshi Fukamizu
2. 発表標題 Gene Expression Landscape of Heart Failure Mice model caused by Cardiac Specific PRMT1 Deficiency
3. 学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 純治、中島 実咲、金 俊達、陸 偉哲、深水 昭吉
2. 発表標題 遺伝子発現プロファイリングによる妊娠高血圧胎仔IUGR病態の理解
3. 学会等名 第39回 日本妊娠高血圧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 純治、野口 和之、水上 早瀬、陸 偉哲、権 哲源、加香 孝一郎、金 俊達、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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水上 早瀬、金 俊達、中島 実咲、石田 純治、深水 昭吉
2. 発表標題 PRMT1のスプライシング制御が代謝に与える影響
3. 学会等名 第12回 炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 純治、深水 昭吉
2. 発表標題 マウスモデルを活用した妊娠時疾患のメカニズム研究
3. 学会等名 第53回 高血圧関連疾患モデル学会（招待講演）
4. 発表年 2017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 第90回 日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Weizhe Lu, Kazuya Murata, Jundal Kim, Junji Ishida, Akiyoshi Fukamizu
2. 発表標題 A Global Characterization of Transcription and Translation in Cardiac PRMT1-deficient Mice by RNA-Seq and Ribosome Profiling
3. 学会等名 第90回 日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中島実咲、謝玉瑩、石田純治、深水昭吉
2. 発表標題 妊娠高血圧病態である母体溶血に対する薬剤効果の検討
3. 学会等名 第90回 日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水上 早瀬、金 俊達、石田 純治、深水 昭吉
2. 発表標題 PRMT1スプライスバリエント欠損が個体機能へ及ぼす影響
3. 学会等名 第90回 日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 権哲源、永野克将、石田純治、深水昭吉
2. 発表標題 APJと 1A-ARによる協調的血管収縮の解析
3. 学会等名 Molecular Cardiovascular Metabolic Conference 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中島美咲、謝玉瑩、石田純治、深水昭吉
2. 発表標題 妊娠高血圧マウスへの降圧剤投与による病態改善効果の検討
3. 学会等名 平成29年度 生化学会関東支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Weizhe LU, Kazuya MURATA, Jun-Dal KIM, Junji ISHIDA, Akiyoshi FUKAMIZU
2. 発表標題 Ribosome Profiling for the Analysis of Translation in Cardiac PRMT1-Deficient Mice
3. 学会等名 平成29年度 生化学会関東支部例会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	金 俊達	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教	
	(Kim Jun-Dal)		
	(90570036)	(12102)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	加香 孝一郎 (Kako Koichiro) (60311594)	筑波大学・生命環境系・講師  (12102)	