

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22248040

研究課題名（和文） アルギニンメチル化酵素 PRMT8 のホスホリパーゼ活性の発見と生物学的意義の解明

研究課題名（英文） Identification of phospholipase activity of PRMT8 and its biological significance

研究代表者

深水 昭吉 (FUKAMIZU AKIYOSHI)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60199172

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（PRMT）ファミリーのうち、PRMT1 は細胞内のアルギニンメチル化の 85% を担っている酵素であり、細胞質と核に存在する。一方 PRMT8 は、PRMT1 と 83% の高いホモロジーを持ち、細胞膜に局在するが、その基質と細胞機能は不明である。本研究では、細胞膜に存在する PRMT8 がリン脂質を基質とする酵素であるかを検討し、細胞機能の解明を試みた。

研究成果の概要（英文）：Among the family of protein arginine methyltransferases, PRMT1 accounts for over 85% of the total arginine methyltransferase activities in cells, and it is localized in the cytoplasm and nucleus. Although PRMT8 that has 83% amino acid homology to PRMT1, its biological significance and substrate remain unclear. In the present study, we tried to examine the enzymatic activity of PRMT8 and its cellular function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2011 年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2012 年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
年度			
年度			
総計	36,000,000	10,800,000	46,800,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：アルギニンメチル化酵素、メチル化アルギニン

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のアルギニン残基のメチル化は、*S*-adenosyl-L-methionine (SAM) をメチル基供与体として、メチル化酵素 (PRMT) がアルギニン側鎖にメチル基を転移する反応であり、多岐に渡る細胞機能を制御するこ

とが報告されている。PRMT8 は PRMT ファミリーの中で N-末端のミリスチル化修飾を介して唯一細胞膜に局在し、その発現組織も脳・神経系に限局されるという特徴を有する。しかしながら、*in vivo* における PRMT8 の標的基質をはじめ、その生物学的

意義に関しては全く未解明である。

申請者らは、GFP に融合させた PRMT8 を神経前駆細胞である PC12 細胞に過剰発現させ、神経成長因子 NGF による形態変化を観察した。興味深いことに、PRMT8 を発現している細胞では、神経細胞の分化過程において、突起進展が顕著に促進されることを見出した。この突起の発達は、細胞面積の大きな変化が求められており、細胞膜構成成分の「量」・「質」の変化、すなわちリン脂質の代謝機構が深く関与していると考えられる。今回見出した PRMT8 による突起進展の促進現象が、リン脂質の加水分解酵素ホスホリパーゼ D (PLD) の過剰発現による神経突起進展の様子に酷似していたことから、両者のアミノ酸配列を比較したところ、驚いたことに PLD の触媒中心である HKD モチーフが PRMT8 にも存在すること、ホスホリパーゼ (PLase) 活性を有していることを見出した (未発表)。神経細胞の突起形成におけるリン脂質代謝の制御機構については、これまでに未だほとんど解明されていないのが現状であり、PRMT8 の二重酵素活性の解明がその分子基盤の理解につながると考えた。

## 2. 研究の目的

申請者らは、PRMT ファミリーの一つ、膜接合型 PRMT8 が、新規のリン脂質分解酵素 PLase 活性を有していることを見出した。本研究では、中枢神経系に特異的に発現する PRMT8 に関して、(1) 新規 PLase 活性の生化学的意義の検証、(2) PRMT8 のもつ二重酵素活性の細胞生物学的意義の検証、(3) これら活性の個体発生や高次中枢機能に対する個体レベルでの機能の解析を計画し、二重酵素活性 (MTase・PLase) の生物学的意義の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) **PRMT8 の新規 PLase 活性の生化学的検証**

(a) バキュロウイルス発現系による PRMT8 の PLase 活性の検証: バキュロウイルス発現系で大量調製した PRMT8 を免疫沈降→イオン交換→ゲル濾過により精製し、夾雑物を除去した系で再度 PLase 活性を検証する。

(b) HKD モチーフ変異体の作製と酵素活性の測定: PLase 活性に必須な HKD モチーフに一箇所ずつ変異を導入し、上記の精製法で調製した各 PRMT8 タンパク質の PLase 活性を測定することで、活性欠失変異体の作製に必要な情報を得る。

## (2) PRMT8 がもつ二重酵素活性の細胞生物学的意義の検証

(a) NGF 刺激依存的な細胞突起伸展における MTase・PLase 活性の意義の検証: PC12 細胞における突起進展及び、細胞形態変化を HCA-Vision ソフトウェアで定量化するとともに、HKD モチーフ変異型 PRMT8 を用いて突起伸展に対する PLase 活性の意義を検証する。

(b) 全身性 PRMT8 ノックアウトマウスの作製: 生体内における PRMT8 の生理機能を検証するため、マウス PRMT8 遺伝子座の両側に loxP 配列を挿入した loxP-PRMT8 マウスを “The European Conditional Mouse Mutagenesis Program” より入手する。また、受精卵にて発現する Ayu-1 プロモーターの制御下にて Cre 組換え酵素を発現する Tg マウス (Ayu-1-Cre TgM) を “Riken NBRC” より導入する。これら 2 種のマウス系統を交配することにより、マウスの発生過程を含む全生存期間における PRMT8 欠損マウスを作製する。

(c) PRMT8 の中枢作用に対する役割の検討: 野生型マウスと PRMT8 ターゲティングマウスに対して、水迷路試験、回避試験、回転棒試験、騒音試験を行い、PRMT8 ノックアウトの運動機能、記憶機能、感覚機

能、情動機能といった中枢機能への影響を評価する。

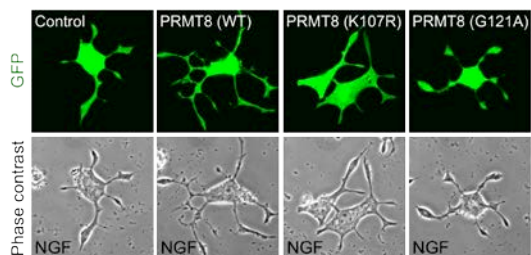
#### 4. 研究成果

##### (1) 新規 PLase 活性の生化学的意義の検証

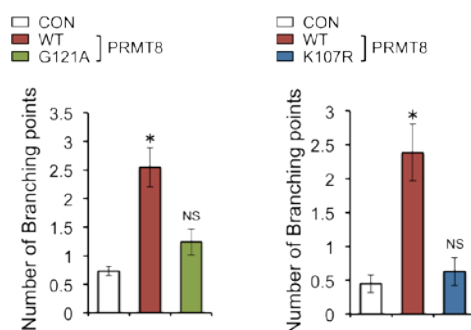
PLase ファミリーである PLD は、ホスファチジルコリン (PC) を基質として、コリンとホスファチジン酸を生成する。まず、バキュロウイルスにおける PRMT8 の発現系を確立した。その系を用い、PRMT8 の精製に成功した。培養細胞から発現誘導を行った HA-PLD2 をコントロールとし、上記の精製 PRMT8 を用いて PC を基質として反応させ、その生成物を質量分析計 (MALDI-QIT-TOF MS) で測定した。その結果、PRMT8 の反応産物において HA-PLD2 とともに分子量 104.30 のピークが認められ、コリン産生を証明できた。以上のことから、PLD 活性を有することが明らかとなった。

##### (2) PRMT8 のもつ二重酵素活性の細胞生物学的意義の検証

PRMT8 依存的な PC12 細胞において、突起長・分岐数等の神経突起に関する定量的な評価を行うため、HCA-Vision ソフトウェアを用いて解析を行った。その結果、PRMT8 は突起進展とともに、分岐を顕著に促進することが明らかになった。さらに、PRMT8 が有する SAM 結合ドメインの中、121 番グリシン残基をアラニン残基に置換し、また HKD モチーフのリジン残基をアルギニン残基に置換した二つの酵素活性を欠損させた変異型と野生型をそれぞれ PC12 細胞にトランスフェクションした。そ



の後、NGF 刺激を加えて 24 時間観察した結果、野生型のみで突起分岐が促進されることが明らかになり、両方の MTase・PLase 活性が必要であることが示唆された。



##### (3) PRMT8 のもつ二重酵素活性の個体発生や高次中枢機能に対する個体レベルでの機能の解析

MTase 活性と PLase 活性の個体機能の解析を行うため、全身性 PRMT8 ノックアウトマウスのヘテロ欠損を作製した。この欠損マウス同士を交配し、ホモ欠損マウスを作製し、現在表現型を解析中である。

#### 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 5 件)

- 1) Nagashima Y., Kako K., Kim JD., Fukamizu A. Enhanced histamine production through the induction of histidine decarboxylase expression by phorbol ester in Jurkat cells. *Mol. Med. Rep.* 6, 944-948 (2012), Doi: 10.3892/mmr.2012.1049, [査読有り]
- 2) Shirakawa, T., Kako, K., Shimada, T., Nagashima, Y., Nakamura, A., Ishida, J., Fukamizu, A. Production of free methylarginines via the proteasome and autophagy pathways in cultured cells. *Mol. Med. Rep.* 4, 615-620 (2011), Doi: 10.3892/mmr.2011.488, [査読有り]

- 3) Takahashi, Y., Daitoku, H., Hirota, K., Tamiya, H., Yokoyama, A., Kako, K., Nagashima, Y., Nakamura, A., Shimada, T., Watanabe, S., Yamagata, K., Yasuda, K., Ishii, N., **Fukamizu, A.** Asymmetric Arginine Dimethylation Determines Life Span in *C. elegans* by Regulating Forkhead Transcription Factor DAF-16. **Cell Metab.** 13, 505-516 (2011), Doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.017, [査読有り]
- 4) Sakamaki, J., Daitoku, H., Ueno, K., Hagiwara, A., Yamagata, K., **Fukamizu, A.** Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death (BAD) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 15, 6085-6090 (2011), Doi: 10.1073/pnas.1015328108, [査読有り]
- 5) Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., **Fukamizu, A.**, Penninger, J., Eichmann, A. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. **Blood** 116, 4025-4033 (2010), Doi: 10.1182/blood-2010-02-270819, [査読有り]

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 永島裕介、加香孝一郎、金 俊達、**深水昭吉**、Jurkat細胞におけるホルボールエステル刺激下でのヒスチジン脱炭酸酵素誘導性ヒスタミンの直接測定、**第85回日本生化学会大会**、福岡国際会議場、2012年12月15日
- 2) 永島裕介、加香孝一郎、金 俊達、**深水昭吉**、Jurkat細胞におけるホルボールエステル刺激下でのヒスチジン脱炭酸酵素誘導性ヒスタミンの直接測定、**第7回日本ケミカルバイオロジー学会年会**、京都大学、2012年06月08日
- 3) **深水昭吉** 1mmの生物が教えてくれる病気と寿命のメカニズム、**第14回山口大学イブニングセミナー2010**、東京・キャンパ

ス・イノベーションセンター、平成23年2月10日

- 4) Shirakawa, T., Kako, K., Nagashima, Y., Nakamura, A., Shimada, T., **Fukamizu, A.** Quantitative analysis of free methylarginines and biosynthesis via protein degradation in cultured cells. **第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会**、神戸ポートアイランド、平成22年12月8日
- 5) Sakamaki, J., Daitoku, H., Ueno, K., Yamagata, K., **Fukamizu, A.** Arginine methylation of BAD counteracts its phosphorylation and inactivation by AKT. **第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会**、神戸ポートアイランド、平成22年12月8日
- 6) **Fukamizu, A.** Decoding of Forkhead Transcription Factors' Function by Arginine Methylation and PKB/Akt-Induced Phosphorylation. **The 1<sup>st</sup> International Symposium on Brain Function and Disorders (SBFD)**、中国・北京、平成22年10月25日
- 7) **Fukamizu, A.** Cross-talk regulation of FOXO transcription factor by arginine methylation and PKB/Akt-induced Phosphorylation. **15<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 13<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine**、ギリシャ・アテネ、平成22年10月9日
- 8) Takahashi, Y., Daitoku, H., Yamagata, K., Hirota, K., Yasuda, K., Ishii, N., **Fukamizu, A.** Arginine methylation controls lifespan in *C. elegans*. **4<sup>th</sup> East Asia C.elegans Meeting**、東京・国立オリンピック記念青少年総合センター、平成22年7月12日
- 9) **Fukamizu, A.** Methylation of arginine decodes protein functions regulated by PKB/Akt-induced phosphorylation. **2010 FASEB Summer Research Conferences**、アメリカ合衆国・アリゾナ、平成22年6月9日

10) Sakamaki, J., Daitoku, H., Ueno, K., Yamagata, K., **Fukamizu, A.** Arginine methylation of BAD counteracts its phosphorylation and inactivation by AKT. *2010 FASEB Summer Research Conferences*, アメリカ合衆国・アリゾナ、平成 22 年 6 月 9 日

11) Takahashi, Y., Daitoku, H., Yamagata, K., Hirota, K., Yasuda, K., Ishii, N., **Fukamizu, A.** Arginine methylation controls lifespan in *C. elegans*. *2010 FASEB Summer Research Conferences*, アメリカ合衆国・アリゾナ、平成 22 年 6 月 9 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深水昭吉 (FUKAMIZU AKIYOSHI)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60199172