

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

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：23116004

研究課題名(和文) 転写環境の構築とアミノ酸代謝のクロストーク制御

研究課題名(英文) Crosstalk of transcriptional status and amino acid metabolism

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 144,480,000円

研究成果の概要(和文)：メチル化反応のメチル基供与体であるS-アデノシルメチオニン(SAM)は、メチオニン代謝回路で産生される。本研究は、メチオニン代謝と転写環境のメチル化修飾のクロストークを解明することを目的とした。まず生体内のメチオニンやSAMを高感度に検出する測定系を確立した。またモデル動物として線虫を用いることで、食餌中のメチオニンがSAMに代謝されてヒストンのメチル化に影響することや、SAMを大量に消費するリン脂質合成酵素の1つが、寿命の調節に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The intercellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine (SAM) is produced in the methionine cycle. In this study, we investigated the crosstalk between methionine metabolism and methylation levels in the transcriptional environment. We first established the highly sensitive measurement system for detecting cellular methionine and SAM. In addition, by using *C. elegans* as a model organism, we revealed that food-derived methionine affects methylation levels of histones by being converted into SAM and one of phospholipid synthases that consumes a large amount of SAM is involved in lifespan regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：メチル化 S-アデノシルメチオニン 線虫

1. 研究開始当初の背景

摂食の有無や食餌中の栄養成分は、代謝シグナルとして内分泌経路、細胞内情報伝達経路を介して受容され、リン酸化やアセチル化、メチル化などの翻訳後修飾としてタンパク質に刻印される。とりわけヒストンや転写制御因子の翻訳後修飾による機能調節は、転写環境をダイナミックに変化させることで、生体恒常性の維持に寄与している。我々はこれまで、転写因子 FOXO1 がリン酸化、アセチル化、ユビキチン化、メチル化などの多重修飾によって多層的に制御されていることを見出してきたが (PNAS 2003, 2004, 2005, 2011; Mol. Cell 2008; Cell Metab.2011)、一方で修飾酵素側の活性調節メカニズムについては不明な点が多く残されていた。こうした背景の下、我々は酵素による基質の修飾反応には、両者の量的関係に加えて、反応に関わる修飾基供与体や補酵素の存在が必須であること、またそれらの生成量は細胞内の普遍的な代謝反応経路によって規定されていることに着目した。すなわち、リン酸化反応における ATP やアセチル化反応のアセチル CoA、脱メチル化反応における α -ケトグルタル酸のように、修飾反応のコファクターの多くが、糖やアミノ酸からの代謝物であるという一面を持っており (下図)、この概念は当時、世界的にも注目され始めていた。

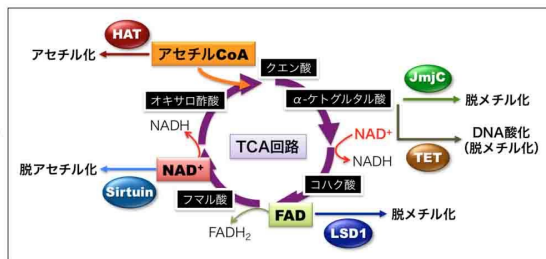


図1 代謝と転写修飾酵素のネットワーク

2. 研究の目的

本計画研究で我々は、代謝と転写環境をつなぐ分子の1つとして、メチル化修飾反応のメチル基供与体である SAM に着目する(図2)。

SAM は生体内において、必須アミノ酸であるメチオニンと ATP から SAM 合成酵素 (線虫では SAMS [SAM synthase]) を介して生成されることから、「食餌・栄養の摂取」や「メチオニン代謝サイクル」が SAM 量を規定する律速段階であると予想される。この可能性を最もシンプルな多細胞モデル動物である線虫 *C. elegans* を用いて検証するとともに、SAM 量の変動がメチル化修飾を介して転写環境、さらには個体機能に与える影響についても解析を進める。このように本計画研究では、SAM を起点として代謝反応と転写環境を一体として捉えることで、メチオニン代謝と転写環境構築のクロストーク制御機構の解明を目指す。

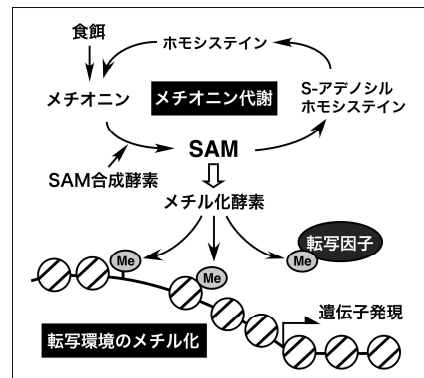


図2 メチオニン代謝と転写環境のメチル化制御

3. 研究の方法

(1) メチオニンおよび SAM の定量法

本研究では体長 1 mm の線虫を実験材料に用いるため、生体サンプル中に存在する代謝産物の定量には高感度の測定システムの確立が必須である。そこでメチオニンの検出には、蛍光標識ラベル法を用いた。一方で SAM は蛍光標識ラベル法が適用できなかったこと、また非常に不安定な物質であることなどから、グラファイトカラムを用いた LC-MS/MS により定量する系を確立した。

(2) 合成培地を用いた食餌成分のメチル化への影響の検討

線虫は通常、大腸菌を餌に用いるが、この方法では食餌成分の変化が線虫個体内の代謝物量やタンパク質修飾に与える影響を解析することができない。そこで我々はまず、糖・アミノ酸・脂肪・核酸・ビタミン類で構成された合成培地での線虫飼育法を確立し、必須アミノ酸であるメチオニンの含有量の変化がメチル化に与える影響を検討した。

(3) 線虫の RNAi スクリーニング

sams-1 遺伝子の発現調節に関わる転写因子、または生体内 SAM 量を規定する主要な SAM 消費タンパク質（メチル基転移酵素）を探索するために、Ahringer 博士らが作製した RNAi ライブラリーを用いた。なお同ライブラリーは線虫全遺伝子の 87%までしかカバーしていないため、その他の遺伝子の中で、アミノ酸配列から転写因子もしくはメチル基転移酵素と予測された約 100 の遺伝子を新たにクローニングし、RNAi ライブラリーに加えた。

4. 研究成果

(1) メチオニン(Met)および S-アデノシルメチオニン(SAM)定量系の確立

従来 Met 分析の検出には、他のアミノ酸同様ニンヒドリンによる発色が用いられてきたが、線虫体内の微量な Met を検出するには感度が低いという問題があった。そこでニンヒドリンに比べ、1,000 倍以上の感度を有する蛍光検出系の確立を試み、6-aminoquinolyl carbamyl (AQC) 基で蛍光標識することにより、線虫抽出物中の AQC-Met を HPLC にて分離・検出することに成功した。なお当該ピークは、MALDI-QIT-TOF/MS にて分子量を確認し、Met を検出できていることを確認している。

SAM は Met 同様 -アミノ基を有することから、最初に AQC 化を試みたが、HPLC クロマトグラム上にピークが検出されず、質量分析でも AQC-SAM の分子量に対応するイオンは検出されなかった。そこで新たにグラフィット

コラムを用いた LC-MS/MS による直接分析を試みた。SAM の熱不安定性を考慮し、サンプルや標準品のハンドリングは常に 10 以下で行うよう留意した。また化学的性質が SAM と全く同等の α -SAM (SAM のメチル基の水素原子を重水素に置換した安定同位体) を定量の際の内部標準に採用することで、分析の定量性を担保した。さらに、SAM 自体のイオンの検出感度では、細胞や線虫に微量に存在する SAM を検出するには不十分だったため、multiple reaction monitoring を行った。その結果、フラグメントイオンとして生じるアデニンイオンが高感度に検出されたことから、この方法をもって SAM の定量系とした。

(2) SAM 生合成系と食餌中 Met のメチル化修飾への影響

sams-1 遺伝子を RNAi した線虫体内の SAM 量を定量した結果、コントロールに比べて顕著な減少が認められた。この結果は *sams-1* が線虫の SAM 量を規定する律速酵素であることを示すと同時に、*sams-1* 遺伝子の転写調節が SAM 合成と密接に相関することを示唆している。そこで我々は、*sams-1* の発現を制御する転写因子を探索するため、*sams-1* のプロモーター配列を GFP に連結したレポーター遺伝子を線虫に導入し、約 600 の転写因子 RNAi ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。その結果、*sams-1* 遺伝子の発現を制御する 2 つの転写因子を同定した。

Met を制限した合成培地で線虫を 1 週間飼育したところ、線虫体内の SAM 量は Met 含有培地と比較して約 70%減少した。この条件下で飼育した線虫からヒストンを抽出し、WB にてリジン残基のメチル化を検出したところ、H3K9me3 では有意な変化は見られなかったのに対し、H3K4me3 および H3K36me3 でメチル化の減弱が認められた。一方、Met 制限培地に SAM を添加することで、H3 のリジンメチル化レベルは Met 含有培地と同程度まで回復した。これらの結果は、食餌中の Met

が生体内の SAM 量を規定し、転写活性化のマークである H3K4 および K36 のメチル化レベルと正に相関することを示唆している。

(3) SAM 消費経路の探索

生体内の SAM 量は、SAM 合成系のみならず、SAM 消費系とのバランスによって規定されると考えられる。そこで我々は、線虫において最も多く SAM を消費するメチル基転移酵素を、RNAi スクリーニング法で探索した。約 200 のメチル基転移酵素ライブラリーのすべてをノックダウンして線虫体内の SAM 量を測定した結果、エタノールアミンをメチル化する酵素のひとつである *pmt-1* が、SAM を最も多く消費する因子として同定された。*pmt-1* はフォスファチジルコリン (PC) の生合成経路の律速酵素であり、PC は細胞膜の主な構成成分であることから、生体内の SAM 量は細胞膜のダイナミックな挙動 (分裂や運動、小胞形成など) と相関する可能性が考えられた。

pmt-1 が実際に線虫体内の SAM の主要な消費酵素であるのかを検証するため、*pmt-1* 遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) 線虫を樹立し、SAM 量を測定した。その結果、予想通り *pmt-1* の過剰発現によって、野生型に比べて SAM 量が約 20% 低下していた。

SAM 合成系が低下した *sams-1* 欠失変異体では、寿命が延長することが知られている。この分子機序として SAM 量の減少が考えられているが、未だ証明はされていない。我々は *pmt-1*Tg 線虫で SAM 量の減少が認められたことから、寿命を測定した結果、*pmt-1*Tg 線虫で有意な寿命の延長が認められた。また *pmt-1* Tg を *sams-1* 欠失変異体と掛け合わせた系統では、さらなる寿命の延長が見られなかったことから、2 つの遺伝子は同一経路上にあること、すなわち生体内 SAM 量の減少が寿命延長の一因であることが示唆された。

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 10 件)

Kaneko Y, Daitoku H, Komeno C, and Fukamizu A. CTF18 interacts with replication protein A in response to replication stress. *Mol. Med. Rep.* 14, 367-372 (2016) 査読有 doi: 10.3892/mmr.2016.5262.

Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, Nomura N, Kako K, Kobayashi A, Shimizu T, and Fukamizu A. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. *J. Cell Sci.* 129, 2382-2393 (2016) 査読有 pii: jcs.183723.

Toma-Fukai S, Kim JD, Park KE, Kuwabara N, Shimizu N, Krayukuhina E, Uchiyama S, Fukamizu A, and Shimizu T. Novel helical assembly in arginine methyltransferase 8. *J. Mol. Biol.* 428, 1197-1208 (2016) 査読有 doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.007.

Hashimoto M, Murata K, Ishida J, Kanou A, Kasuya Y, and Fukamizu A. Severe hypomyelination and developmental defects are caused in mice lacking protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 291, 2237-2245 (2016) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M115.684514.

Kim JD, Park KE, Ishida J, Kako K, Hamada J, Kani S, Takeuchi M, Namiki K, Fukui H, Fukuhara S, Hibi M, Kobayashi M, Kanaho Y, Kasuya Y, Mochizuki N, and Fukamizu A. PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. *Science Adv.* 1, e1500615 (2015) 査読有 doi: 10.1126/sciadv.1500615.

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.* 58, 1042-1048 (2014) 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.053.

Park KE, Kim JD, Nagashima Y, Kako K, Daitoku H, Matsui M, Park GG, and Fukamizu A. Detection of choline and phosphatidic acid (PA) catalyzed by Phospholipase D (PLD) using MALDI-QIT-TOF/MS with 9-aminoacridine matrix. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 981-988 (2014) 査読有 doi: 10.1080/09168451.2014.910102.

Tamiya H, Hirota K, Takahashi Y, Daitoku H, Kaneko Y, Sakuta G, Iizuka K, Watanabe S, Ishii N, and Fukamizu A. Conserved SAMS function in regulating egg-laying in *C. elegans*. *J. Recept. Signal Transduct.* 33, 56-62 (2013) 査読有 doi: 10.3109/10799893.2012.756896.

Nagashima Y, Kako K, Kim JD, and 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) 査読有 doi: 10.3892/mmr.2012.1049.

Ozcan L, Wong CC, Li G, Xu T, Pajvani U, Park SK, Wronska A, Chen BX, Marks AR, Fukamizu A, Backs J, Singer HA, Yates JR 3rd, Accili D, and Tabas I. Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity. *Cell Metab.* 15, 739-751 (2012) 査読有 doi: 10.1016/j.cmet.2012.03.002.

[学会発表](関連する招待講演)(計32件)
深水昭吉、アルギニンメチル化酵素の特性解析 -PRMT1とPRMT8-、第33回染色体ワークショップ・第14回核ダイナミクス研究会合同開催、平成28年1月12日、松島一の坊、宮城県仙台市
深水昭吉、メチル化細胞生物学：小さな修飾、大きな作用、Advans研究会2015、平成27年12月12日、ホテルグランドパレス、東京都千代田区
深水昭吉、代謝調節と遺伝子発現に關す

る研究、CVMW2015、平成27年12月11日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市
深水昭吉、メチル化の医科学：小さな修飾、大きな作用、Research PlaNet2015、平成27年6月20日、梅田スカイビルタワーウエスト、大阪府大阪市

深水昭吉、Methylation related to transcription and metabolism. 第37回日本基礎老化学会大会、平成26年6月27日、あいち健康プラザ、愛知県知多郡

深水昭吉、転写代謝システム：遺伝子発現とエネルギー分子のクロストーク、第88回日本内分泌学会学術総会、平成26年4月25日、ホテルニューオータニ東京、東京都千代田区

深水昭吉、エピゲノムと代謝、第87回日本内分泌学会学術総会、平成26年4月24日、福岡国際会議場、福岡県福岡市

深水昭吉、糖代謝とエピゲノム：リン酸化とメチル化の新展開、第15回分子内分分泌代謝学セミナー、平成26年2月17日、ホテル東京ガーデンパレス、東京都文京区

深水昭吉、メチル化反応と代謝機能の新しい接点、第19回アンジオテンシンカンファレンス、平成26年2月1日、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市

深水昭吉、Interface of methylation and metabolites. 第2回 IRG (inflammation and regeneration) Meeting、平成26年1月17日、品川プリンスホテル、東京都港区

Fukamizu A. Crosstalk between Transcription and Metabolism. THE 4D NUCLEOME 2014、平成25年12月17日、安芸グランドホテル、広島県廿日市市

深水昭吉、メチル化の作用点と機能、第32回染色体ワークショップ・第13回核ダイナミクス研究会合同開催、平成25年12月17日、安芸グランドホテル、広島県廿日市市

深水昭吉、エピゲノムによる生体機能調節、第18回日本心血管内分分泌代謝学会学術総会、平成25年11月22日、横浜市開港記念会館、神奈川県横浜市

Fukamizu A. メチル化制御と遺伝子発現、第12回RCGMフロンティア国際シンポジウム、平成25年10月31日、埼玉医科大学日高キャンパス、埼玉県日高市

深水昭吉、メチオニン代謝と細胞機能のネットワーク、第383回東北医学会例会シンポジウム、平成25年11月19日、東北大学良陵会館、宮城県仙台市

Fukamizu A. Stress responses and arginine methylation in *C. elegans*. International Symposium on Cellular Responses to Stress、平成25年4月3日、北京大学医学部、北京市、中国

深水昭吉、加香孝一郎、アルギニンメチル化の化学特性とシグナル機能、蛋白研セミナー「シグナル伝達と解析技術のあらたな潮流」、平成25年3月5日、大阪大学蛋白

- 質研究所、大阪府吹田市
深水昭吉、A role for SAM synthetase in methionine cycle of *C. elegans*. 第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 15 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市
Fukamizu A. Arginine methylation and lifespan control in *C. elegans*. AACL-2012 : Korea-Japan Joint Conference on Aging, Metabolism and Neurobiology. 平成 24 年 11 月 23 日、ソウル市立大学、ソウル市、韓国
深水昭吉、メチル化を介した転写と代謝のクロストーク制御、第 8 回 KAMOGAWA Cardiovascular Conference、平成 24 年 11 月 16 日、京都ブライトンホテル、京都府京都市
- ②① 深水昭吉、メチル化サイクルと代謝調節、糖尿病研究センターセミナー、平成 24 年 10 月 29 日、国立国際医療研究センター、東京都新宿区
- ②② 深水昭吉、メチル化を介した転写と代謝のクロストーク、病態代謝・血管医学セミナー、平成 24 年 10 月 25 日、熊本大学、熊本県熊本市
- ②③ 深水昭吉、代謝と寿命を結ぶメチル化制御、第 30 回内分泌代謝学サマーセミナー、平成 24 年 7 月 13 日、福一、群馬県渋川市
- ②④ 深水昭吉、Methionine metabolism and arginine methylation. 第 33 回内藤カンファレンス、平成 24 年 6 月 28 日、シャトレゼガトーキングダムサッポロ、北海道札幌市
- ②⑤ 深水昭吉、インスリンシグナルによる転写調節と寿命の分子遺伝学、第 12 回日本抗加齢医学会総会、平成 24 年 6 月 23 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ②⑥ Fukamizu A. Lifespan controlled by arginine methylation in *C. elegans*. The 12th Asian Conference on Transcription 平成 24 年 6 月 8 日、済州島、韓国
- ②⑦ 深水昭吉、エピゲノムマーク・アルギニンメチル化の機能的役割、第 76 回日本生化学会中部支部例会、平成 24 年 5 月 26 日、自然科学研究機構 / 岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市
- ②⑧ 深水昭吉、エピゲノムとメタボリックシンドローム、第 85 回日本内分泌学会学術総会、平成 24 年 4 月 20 日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
- ②⑨ 深水昭吉、転写と代謝のクロストーク機能、第 21 回群馬遺伝子診療研究会、平成 24 年 2 月 28 日、群馬大学医学部、群馬県前橋市
- ③⑩ 深水昭吉、Regulation of Lifespan in *C. elegans* by Asymmetric Arginine Dimethylation of Forkhead Transcription Factor DAF-16. 34 回日本分子生物学会年会ワークショップ、平成 23 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ③⑪ 深水昭吉、転写と代謝のクロストーク、34 回日本分子生物学会年会バイオテクノロジー

- ジーセミナー、平成 23 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ③⑫ 深水昭吉、アルギニンメチル化-リン酸化による寿命制御、第 84 回日本生化学会大会、平成 23 年 9 月 22 日、国立京都国際会館、京都府京都市

〔図書〕(計 6 件)

- 大徳浩照、深水昭吉 メディカルビュー社、アンチエイジング医学の基礎と臨床 第 3 版、2015、52-53
金俊達、深水昭吉 羊土社、知る・見る・活かす! シグナリング研究 2015、2015、1543-1547
波田一誠、深水昭吉 羊土社、老化・寿命のサイエンス、2013、129-133
深水昭吉他、メディカルサイエンスインターナショナル、遺伝情報の発現制御 - 転写機構からエピジェネティクスまで、2012、429
高橋悠太、大徳浩照、深水昭吉 羊土社、世代を超えて伝わる代謝エピジェネティクス、2011、2236-2240
坂巻純一、深水昭吉 医師薬出版、転写因子修飾の新しい展開、2011、617-622

〔その他〕

- ホームページ等
研究室ホームページ
<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp>

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
- (2) 研究分担者
高橋 秀和 (TAKAHASHI, Hidekazu)
山口大学・医学系研究科・講師
研究者番号：90450402
- (3) 連携研究者
大徳 浩照 (DAITOKU, Hiroaki)
筑波大学・生命環境系・講師
研究者番号：30361314
- 廣田 恵子 (HIROTA, Keiko)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：00375370