

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04355

研究課題名(和文)核内特異的な解糖系酵素群のアルギニンメチル化修飾の糖代謝制御における意義

研究課題名(英文) Nuclear-specific arginine methylation of glycolytic enzymes regulates energy metabolism

研究代表者

山本 雄広 (YAMAMOTO, Takehiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：50383774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、がん細胞を中心とした代謝リモデリング制御に関する研究の多くは、HIF-1 $\alpha$ やc-Mycなどストレス誘導性転写因子による解糖系酵素遺伝子群の発現上昇によって説明されてきたが、近年代謝酵素群自身の翻訳後修飾に起因した酵素活性変化による代謝制御機構が多数報告されている。本研究では解糖系酵素の核内特異的メチル化修飾に着目し、その制御メカニズムについて研究を行なった。その結果、アルギニンメチル化酵素PRMT1の自己メチル化を介した核移行が解糖系酵素群のメチル化修飾に必須であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In cancer cells, the expression of glycolytic enzymes is regulated by stress-responsive transcriptional factors (e.g., HIF-1 $\alpha$  and c-Myc). Recent studies demonstrated that post-translational modifications of metabolic enzymes also regulate metabolic reprogramming. Our previous study showed that arginine methylation of glycolytic enzymes is spatially regulated in the nucleus. In this study, we clarified the mechanism of nuclear-specific arginine methylation of enzymes. Furthermore, we found that auto-methylation of PRMT1, which is a responsible methyltransferase for glycolytic enzymes influenced the nuclear translocation of PRMT1, resulted in nuclear-specific methylation of glycolytic enzymes.

研究分野：代謝生化学

キーワード：解糖系 メチル化 PRMT1 核移行

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞における解糖系優位な代謝はワールブルグ効果と呼ばれ、従来 HIF-1 $\alpha$  や c-Myc などの転写因子の活性化による解糖系酵素遺伝子群の発現上昇によって説明されてきた。しかしながら最近の研究から、解糖系酵素群が多様な翻訳後修飾を受けることで活性が制御される仕組みが次第に明らかになってきた。そのなか我々は解糖系の律速段階を制御する酵素 PFKFB3 および PKM2 がアルギニンメチル化修飾を受けることを明らかにした。メチル化修飾は解糖系を亢進させる作用があることがわかったが、これら解糖系酵素のメチル化修飾は取り込んだグルコースの代謝経路を切り替える「スイッチ」として作用することが分かった。

研究開始当初においてアルギニン残基の脱メチル化酵素・および機構の分子実態の解析を行っていたところ、注目すべき実験結果を得た。我々が同定した複数種の解糖系酵素のメチル化修飾は、すべて同一のアルギニンメチル化酵素 PRMT1 によって行なわれていることであり、なおかつ核内でそのメチル化レベルが高いという点である。さらに興味深いことに、我々が同定した酵素のメチル化動態は PRMT1 の核内での発現量と相関することを見出した。さらに我々が作製した解糖系酵素群のメチル化部位特異的抗体を用いた解析からは、複数種のがん細胞株およびマウス腹腔マクロファージにおいてこれらの酵素のメチル化型はほぼ核のみに存在することから、申請者は解糖系酵素のメチル化修飾は個別に制御されるわけではなく、PRMT1 の核移行の度合いによって overall に制御されている可能性があるとして着想した。

最近の当該分野の研究動向からも、核内における異常な高メチル化状態と疾患との関係が注目されつつある。臨床検体においても悪性度の高いがんではアルギニンメチル化酵素 PRMT1 および 6 の核局在の頻度が高いことや、自己免疫疾患に起因するリウマチや多発性硬化症の患者では血清中におけるメチオニン代謝異常およびシトルリン化酵素 PADI4 の核内での異常蓄積が認められる。これらの事実は核内における修飾動態の適切な制御の重要性を強く示唆するものである。

核内に限局した糖代謝酵素のメチル化修飾制御機構の存在は、我々による報告が初めての例であり、修飾酵素自体の局在に起因する翻訳後修飾動態の違いは、局所におけるメチオニン代謝制御と局所でのメチル化制御といういわゆる代謝物質の『地産地消』の分子実態の一部であると考えられ、本研究による研究成果はこれらの問題点にも多くの新たな示唆をもたらすものと期待される。

## 2. 研究の目的

上述のようにアルギニンメチル化酵素

PRMT1 の核-細胞質のシャトリングは様々な細胞種において認められ、核内における解糖系酵素群のメチル化の同時制御を司ることから、この酵素の局在機構および活性調節機構を詳しく理解することは、将来的にこのような局在機構を人為的に制御することで、がん細胞の兵糧攻めや、糖代謝のリモデリングが細胞分化の鍵と考えられているマクロファージで、糖代謝酵素のメチル化を操作することで代謝動態の異なるサブタイプ間での形質転換技術に応用できる可能性を秘めていると考えられる。本研究では、PRMT1 の核移行メカニズムの解明を通じて、核内における解糖系酵素のメチル化修飾がどのように制御されるかを理解し、PRMT1 の移行メカニズムを逆手に取ることで細胞内のエネルギー代謝を人為的に制御できる技術を確認することを目的とする。

本研究では核内における糖代謝律速酵素のメチル化修飾はアルギニンメチル化酵素 PRMT1 の核移行メカニズムが重要であると考え、(1) PRMT1 の修飾部位・修飾部位の同定、(2) PRMT1 の核内発現量とグルコース代謝調節の相関、(3) 人為的に PRMT1 の核内発現量を制御した場合の細胞機能制御(増殖・形質)の実証実験を *in vivo* モデルで検討、の3点を中心に遂行する。

## 3. 研究の方法

本研究においては、以下の手法で研究を遂行した。

(1) PRMT1 のメチル化部位を同定するために放射性ラベルの $[^3\text{H}]$ -SAM を用いた *in vitro* methylation によって同定した。各種 PRMT1 の変異体はすべて N 末 GST タグを付加し、大腸菌株 BL21 に発現させ、GST アフニティカラムにて精製した。

(2) 細胞内局在を可視化するために N 末に GFP を付加した PRMT1 との融合遺伝子を作成した。各種培養細胞への導入にはレンチウイルスベクターを用いて行ない、ピューロマイシンで選択することで安定発現株を樹立した。

(3) 研究代表者が所有している、PKM2 メチル化部位特異的ポリクローナル抗体はウエスタンブロットには使用できるものの、免疫染色には不適なものであった。よって、免疫染色にも利用可能な抗体を得るために抗メチル PKM2 のモノクローナル抗体を作成した(抗体作成は細胞工学研究所に依頼)。

(4) ゼノグラフト実験は大腸がん細胞株 HCT116 細胞を Scid マウスに接種後、約 2 週間後から SAM (S-adenosylmethionine) を腹腔注射し、腫瘍径を測定することでおこなった。

(5) 培養用特殊培地 (メチオニン・コリン不含培地) は細胞科学研究所 (仙台市) に依頼し調製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PRMT1 の自己メチル化部位の同定

脱メチル化剤処理により PRMT1 の核内発現量が低下したことから PRMT1 の核-細胞質のシャトリングにはメチル化を介したイベントが関与すると疑われた。そこで *in vitro* methylation 解析をおこなったところ、PRMT1 は自己メチル化を受けることを見いだした。さらに自己修飾部位を調べたところ、PRMT1 の C 末端である、350 番目および 352 番目のアルギニン残基が少なくともメチル化を受ける事が明らかになった。

##### (2) メチオニン代謝が PRMT1 の核-細胞質のシャトリングに重要である

PRMT1 の核移行を人為的に操作できるか、検討するため、N 末端に GFP を付加した GFP-PRMT 融合遺伝子を構築し、このコンストラクトの安定発現株を樹立し、このような実験系を用いて、人為的に PRMT1 の自己メチル化レベルを変化させた時に PRMT1 の核移行を生細胞内で観察できるかを検討した。その結果、SAM 合成の元になる、含硫代謝物であるメチオニンおよびコリンを欠乏させた培地で細胞培養したところ、培養開始数時間で PRMT1v1 バリエントでは核移行できるが、v2 バリエントの細胞内局在はメチオニン濃度に関して非感受性であった。尚、この現象は培地の組成に応じて可逆的であり、培養条件によって、人為的に核内の解糖系酵素のメチル化レベルを変化させることが可能になった。

##### (3) PRMT1 の核移行と腫瘍増殖能の関連

PRMT1 は核内に移行後、PFKFB3 や PKM2 のメチル化を制御する。我々の研究から、メチル化修飾の有無は糖代謝経路のスイッチングに作用することが明らかになった。そこで、人為的に腫瘍内のメチル化レベルを変化させた際に腫瘍の増殖にどのような影響を及ぼすかを調べた。

免疫不全マウスに大腸がん細胞株 HCT116 を接種し皮下腫瘍を作らせたマウス腹腔中に、解糖系酵素のメチル化亢進を意図して、SAM (S-adenosylmethionine) を定期的に注射し、腫瘍の大きさを記録した。その結果予想に反して SAM 注射群において腫瘍の有意な

増殖が認められた。摘出した腫瘍からタンパク質を抽出し、それぞれの修飾レベルを調べたところ、SAM 投与群の腫瘍では PFKFB3 および PKM2 のメチル化レベルが低下していたとともにメチル化酵素 PRMT の核内発現量も相対的に低下していた。これは投与された SAM によって PRMT1 の自己メチル化が進み、核から細胞質へ移行したことに因るものと理解している。

##### (4) メチル化 PKM2 モノクローナル抗体の作製と核内のメチル化状態のモニタリング

我々は解糖系酵素 PKM2 のメチル化レベルを調べる際、メチル化部位特異的ポリクローナル抗体を使用していたが、ウェスタンブロット解析には使えるが、立体構造が認識できないため、免疫沈降、免疫組織染色には利用できなかった。そこで我々は PKM2 メチル化型特異的モノクローナル抗体の作製を行った。その結果良好なクローンを取得することができ、免疫組織染色にも適用可能な良好な抗体を得た。これは今後、組織や細胞内におけるエネルギー状態を推定する上で有用なツールとして有用となるものと考えている。

##### (5) PKM2 の活性制御因子である PIN1 によるメチル化制御

PKM2 は PRMT1 によってメチル化修飾を受ける事が我々の実験系より明らかになっているが、両者の発現量が高い細胞質ではメチル化レベルは核内に比べ極めて低い。我々は細胞質と核内では PKM2 若しくは PRMT1 の立体構造自体に差異があるのではないかと着想した。

PKM2 はプロリン異性化酵素 PIN1 と相互作用することが以前から他の研究グループによって示されているが、相互作用によって酵素活性にどのような影響を及ぼすかはいまだ不明である。よって、PIN1 による PKM2 のメチル化制御機構に注力した。まず、CRISPR/Cas9 システムを用いて乳がん細胞株 MDA-MB-231 および脳腫瘍細胞株 U87-MG の PIN1 ノックアウト細胞を作成した。これらの細胞では PKM2 は高メチル化状態であった。次に *in vitro* で PKM2-PIN1 複合体を作らせた後に *in vitro* methylation を行なったところ、PKM2 は PIN1 との相互作用によってメチル化修飾が阻害されることが明らかになった。細胞質では PKM2 もメチル化責任酵素 PRMT1 も高発現しているが、PKM2 のメチル化修飾が核内特異的であるのは、細胞質における PKM2-PIN1 複合体の存在が細胞質におけるメチル化修飾を防いでいるものと考えられる。

## 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 10 件)

- (1) Shiota M, Naya M, Yamamoto T, Hishiki T, Tani T, Takahashi H, Kubo A, Koike D, Itoh M, Ohmura M, Kabe Y, Sugiura Y, Hiraoka N, Morikawa T, Takubo K, Suina K, Nagashima H, Sampetean O, Nagano O, Saya H, Yamazoe S, Watanabe H, Suematsu M. (2018) Gold-nanofève surface-enhanced Raman spectroscopy visualizes hypotaurine as a robust anti-oxidant consumed in cancer survival. *Nature Communications*. (査読有) Vol.9: 1561. doi: 10.1038/s41467-018-03899-1
- (2) Nurkanto A, Jeelani G, Yamamoto T, Naito Y, Hishiki T, Mori M, Suematsu M, Shiomi K, Hashimoto T, Nozaki T. (2018) Characterization and validation of *Entamoeba histolytica* pantothenate kinase as a novel anti-amebic drug target. *International Journal of Parasitology: Drugs and Drug resistance*. (査読有) Vol.8, 125-136. Doi:10.1016/j.ijpddr.2018.02.004
- (3) 山本雄広、伊藤真衣、大津 陽、末松 誠 (2017)「メチオニン代謝 -がん細胞における制御機構とその役割」*実験医学* (査読なし)、Vol.35 Nov.10(増刊) p52-59
- (4) Miyazawa H, Yamaguchi Y, Sugiura Y, Honda K, Kondo K, Matsuda F, Yamamoto T, Suematsu M, and Miura M. (2017) Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching. *Development* (査読有) Vol.144, 63-73. Doi: 10.1242/dev.138545
- (5) 山本雄広、末松 誠 (2016)「ガスシグナルを介した翻訳後修飾によるがん細胞の代謝制御」*The LUNG* (査読なし) Vol.24, No.2, p80-86
- (6) 山本雄広、末松 誠 (2016)「メチオニン代謝に起因するメチル化修飾を介した、がん細胞のエネルギー代謝制御機構」*生化学* (査読あり) Vol.88, No.3, p397-401
- (7) Kabe Y, Yamamoto T, Kajimura M, Sugiura Y, Koike I, Ohmura M, Nakamura T, Tokumoto Y, Tsugawa H, Handa H, Kobayashi T, and Suematsu M. (2016) Cystathionine beta-synthase and PGRMC1 as CO sensors. *Free Radical Biology &*

*Medicine*. (査読有) Vol. 99, 333-344. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.025

- (8) Suematsu M, Nakamura T, Tokumoto Y, Yamamoto T, Kajimura M, Kabe Y. (2016) CO-CBS-H2S axis: From vascular mediator to cancer regulator. *Microcirculation*. (査読有) Vol.23, 183-90. doi: 10.1111/micc.12253.
- (9) Nishime C, Kawai K, Yamamoto T, Katano I, Monnai M, Goda N, Mizushima T, Suemizu H, Nakamura M, Murata M, Suematsu M, and Wakui M. (2015) Innate Response to Human Cancer Cells with or without IL-2 Receptor Common  $\gamma$ -Chain Function in NOD Background Mice Lacking Adaptive Immunity. *Journal of Immunology*. (査読有) Vol. 195, 1883-1890. doi: 10.4049/jimmunol.1402103.
- (10) Ohmura M, Hishiki T, Yamamoto T, Nakanishi T, Kubo A, Tsuchihashi K, Tamada M, Toue S, Kabe Y, Saya H, and Suematsu M. (2015) Impacts of CD44 knockdown in cancer cells on tumor and host metabolic systems revealed by quantitative imaging mass spectrometry. *Nitric Oxide*. (査読有) Vol. 46, 102-113. doi: 10.1016/j.niox.2014.11.005.

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) 山本雄広、伊藤真衣、高野直治、石渡恭子、倉堀智一、末松 誠「翻訳後修飾を介した解糖系酵素 PKM2 の核移行メカニズムの解析」第 40 回日本分子生物学会(生命科学系合同学会 ConBio2017) 2017 年 12 月 7 日 ポートアイランド、兵庫県神戸市
- (2) 山本雄広、伊藤真衣、大津陽、長坂美咲、石渡恭子、高野直治、末松 誠「アルギニンメチル化酵素 PRMT1 の核移行メカニズムの解明」第 39 回日本分子生物学会 2016 年 12 月 2 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- (3) 山本雄広、伊藤真衣、大津陽、石渡恭子、高野直治、末松 誠「アルギニンメチル化酵素 PRMT1 の細胞内局在機構の解明」第 89 回日本生化学会 2016 年 9 月 27 日 仙台国際センター、宮城県仙台市
- (4) 山本雄広「メチオニン代謝に起因するがん細胞の糖代謝制御機構」第 32 回臨牀フリーラジカル会議、2016 年 1 月 29 日、京都・烟河、京都府亀岡市
- (5) 山本雄広、伊藤真衣、石渡恭子、高野直治、内藤善子、菱木貴子、末松 誠「ア

ルギニンメチル化を介したマクロファージの解糖系制御機構の解明」第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同学会(BMB2015)2015年12月1-4日、神戸市

(6) **Yamamoto T.**, Itoh M, Ishiwata K, Takano N, Suematsu M 「Metabolic crosstalk between organelles during macrophage polarization」第4回マトリョーシカ型生物学研究会、2015年9/30-10/2月、筑波大学、茨城県つくば市

(7) **Yamamoto T.**, Takano N, Ishiwata K, Suematsu M 「Carbon monoxide regulates directional biotransformation of glucose via protein arginine methylation」第10回 World Congress for Microcirculation (世界微小循環学会)、2015年9月27日、国立京都国際会館、京都市

(8) **山本雄広**、高野直治、石渡恭子、伊藤真衣、末松 誠 「メチオニン代謝に起因するがん細胞の解糖系の制御機構」第3回がん代謝研究会、2015年7月16-17、金沢市

(9) **山本雄広** 「アルギニンメチル化を介したがん細胞のエネルギー代謝制御機構」東北大学医学部酸素医学コアセンター特別セミナー、2015年5月28、東北大学医学部、仙台市

〔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  
<http://www.gasbiology.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 雄広 (YAMAMOTO, Takehiro)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師  
研究者番号：50383774