

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15087

研究課題名(和文)細胞内リン脂質代謝のイメージング

研究課題名(英文)Imaging of intracellular phospholipid metabolism

研究代表者

深水 昭吉 (Fukamizu, Akiyoshi)

筑波大学・生命領域学際研究センター・教授

研究者番号：60199172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)の代謝は、神経伝達物質の産生や免疫機能、脂肪の代謝による脳や肝臓の働きに深く関わっている。PCは、小胞体と細胞膜で「メチル化反応」を介してホスファチジリエタノールアミン(PE)から生合成される。PC代謝が環境に応じてダイナミックに変化することが考えられるが、細胞内でPC合成をモニターする手法は未だ存在しない。本研究では、抗生物質であるDuramycinがPEと結合するもののメチル基が付加されたPCとは結合しないことを見出した。この結合様式に基づき、生細胞内で蛍光タンパク質融合型Duramycinは、「PC合成」の可視化のプローブとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylcholine (PC) is the most abundant phospholipid in the plasma membrane. In mammals, PC metabolism is regulated by a balance of synthesis and hydrolysis, which plays an important role in neurotransmitter synthesis, immune system and lipid metabolism. PC is synthesized de novo by methylation of phosphatidylethanolamine (PE) in the endoplasmic reticulum or the plasma membrane. Although it is known that PC metabolism is involved in various biological processes, there is no method for monitoring PC synthesis in cells. In this study, we showed that a 19 mer polypeptide duramycin binds to PE, but not to PC containing three methyl groups. This result expects that duramycin capable of binding to PE is used as a probe for imaging of methylation-mediated PC synthesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：ホスファチジリエタノールアミン(PE) モノメチルPE (MMPE) ジメチルPE(DMPE) ホスファチジルコリン
メチル化 Duramycin

1. 研究開始当初の背景

細胞では、核酸やタンパク質がメチル化を受けるとして生理機能が調節され、生命活動を維持している。当研究室では、生体内メチル化の重要性について研究を進めてきた(*J. Biol. Chem.* 2005、*Mol. Cell* 2008、*Int. J. Mol. Med.* 2008、*Cell Metab.* 2011、*PNAS* 2011、*J. Recept. Signal Transduct.* 2011、*FEBS Lett.* 2014)。ごく最近では、PC 分解反応における触媒酵素の活性測定法や神経細胞で働く新規分解酵素の発見とその機能的役割を報告した(*Biosci. Biotech. Biochem.* 2014、*Science Adv.* 2015)。

細胞膜の主要リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)は、分解と合成を繰り返しながら(=PC代謝)膜構造の維持や脂質のメッセンジャーとして機能し、アセチルコリンなどの生理活性物質の材料にもなる。1980年代、メチル化酵素の同定によって、PC産生経路の一つとして、ホスファチジルエタノールアミン(PE)を基質とする段階的メチル化反応を介したPC生合成系が明らかになった(図1)。PC恒常性に関する研究は、細胞機能と直結する重要な一つ分野であるが、細胞内でのPEメチル化(=PC合成)を可視化する実験手法が未だ存在しないため、研究が遅れている。

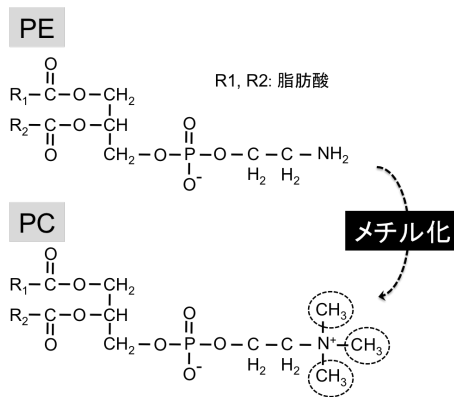


図1. PEメチル化によるPCの生合成

最近、放線菌が分泌するペプチド Duramycin (19 アミノ酸の抗生物質) が PE に特異的に結合する結果に加え、PC とは結合を示さないことが報告された(Hou et al., *ChemBioChem.* 2015)。そこで、申請者は、上記の報告に基づき、本ペプチドと PE の結合にはメチル基が負に作用していると考え、 「Duramycin がメチル化を介した PC 合成のマーカー」であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、抗生物質である Duramycin

と PE の結合様式に基づき、生細胞内で蛍光タンパク質融合型 Duramycin をプローブとして、「PC 合成」のイメージングを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、生細胞内で「PEメチル化反応」の可視化を目指し、生化学・細胞生物学・バイオイメージングの3つのアプローチから包括的に解明に取り組む。特に、次の2点に焦点を絞り、生細胞内で「PEメチル化」のモニター法を確立する。

メチル基付加によるPEとDuramycinの結合の検討

生細胞におけるPEメチル化のモニタリング

4. 研究成果

メチル基付加による PE と Duramycin の結合の検討

Duramycin の遺伝子を導入した Green Fluorescent Protein (GFP) 発現ベクター (Clontech社) を構築し(図2) 過剰発現させた哺乳類細胞から共免疫沈降法を用いて精製した Duramycin-GFP が PE と特異的に結合し、蛍光タンパクは両者の相互作用に影響がないことを確認した(図3)。

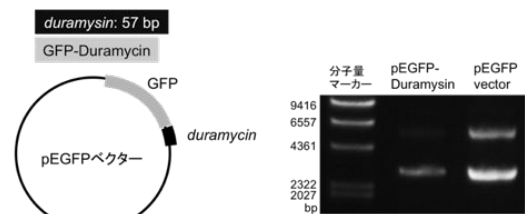


図2. GFP融合Duramycin ベクターの構築

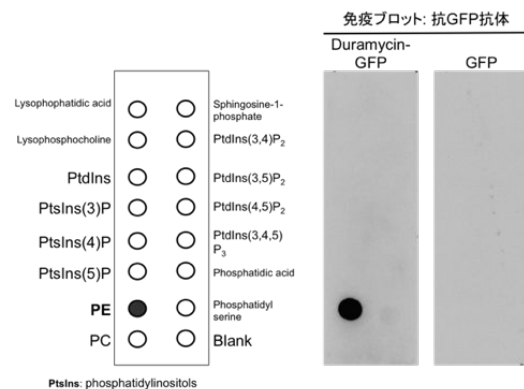


図3. Duramycin-GFP のPE特異的結合

PEは、多段階メチル化反応によってモノメチルPE (MMPE)、ジメチルPE(DMPE)を経てトリメチルPE(=PC)に合成される。申請者は、PE及び、メチル化PEについては、精製リン脂質分子としてAvanti社(米国)から購入し、各分子は、質量分析法(MALDI-QIT-TOF MS)を用いて純度及び分子量の確認を行った(未発表)。

次に、PEやMMPE、DMPEおよびPCの精製を行い、ドットプロットアッセイによる生化学的解析の結果、DuramycinはPEやMMPEと結合するものの、DMPEやPCとは結合しない結果から(図4)、DuramycinとPEの相互作用にメチル基の付加は負に作用することを見出した。

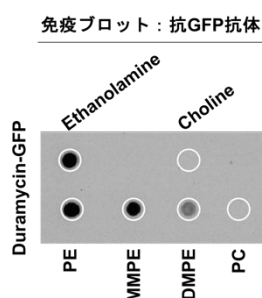


図4. メチル基依存的なDuramycinとPE結合の解離

生細胞におけるPEメチル化のモニタリング

哺乳類細胞のPEメチル化反応は、PEMTによって触媒される。申請者は、免疫沈降法を用いて精製可能なヒトPEMT-HAベクターを作製済みである。PEMT-HAタンパク質との反応によるPEメチル化産物を用いてDuramycinとの結合を検討するため、GFP-Duramycinと共発現させることで、本研究の目的であった、生細胞内における「PEメチル化=PC合成」の可視化の解析を進めてきたが、現在まで完了はしていない。

PEは、血液凝固作用に重要な分子として機能やタンパク質分解機構の一つであるオートファジーの制御因子と結合し、細胞内タンパク質の品質管理に必須の分子としても報告されており、リン脂質と生命現象に関する研究分野において注目を集めている。さらに、神経細胞の機能制御において、PEメチル化によるPC合成の重要性が指摘されている。しかし、脳組織の神経細胞におけるメチル化酵素や制御機構は不明であるなど、生体内のリン脂質制御については、未だ不明な点が多く存在している。我々は新規のPC加水分解酵素を発見(*Science Adv.* 2015)し、脳内のPC代謝の重要性を明らかにしつつある。従って、生細胞内でPC代謝のモニターができれば、生命現象におけるPC代謝の役割の解明が飛

躍的に発展する可能性がある。

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3件)

(全て査読有り)

1) Araoi S, Daitoku H, Yokoyama A, Kako K, Hirota K, **Fukamizu A**, The GATA transcription factor ELT-2 modulates both the expression and methyltransferase activity of PRMT-1 in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* 163, 433-440 (2018)

2) Yokoyama W, Hirota K, Wan H, Sumi N, Miyata M, Araoi S, Nomura N, Kako K, **Fukamizu A**, rRNA adenine methylation requires T07A9.8 gene as *rram-1* in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* 163, 465-474 (2018)

3) Hirota K, Shigekawa C, Araoi S, Sha L, Inagawa T, Kanou A, Kako K, Daitoku H, **Fukamizu A**, Simultaneous ablation of *prmt-1* and *prmt-5* abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* 161, 521-527 (2017)

[学会発表](計5件)

1) 金 俊達、水上 早瀬、加香孝一郎、石田 純治、**深水 昭吉**：一酵素・二活性(PRMT8)が制御する脳機能と生理的意義の解明、生命科学系学会合同年次大会、平成29年12月8日、神戸国際会議場、(兵庫県・神戸)

2) 水上 早瀬、金 俊達、石田 純治、**深水 昭吉**：PRMT1 スプライスバリエント欠損が個体機能へ及ぼす影響、生命科学系学会合同年次大会、平成29年12月8日、神戸国際会議場、(兵庫県・神戸)

3) 形田恵理子、廣田恵子、角直亮、石原誠司、小島真梨子、加香孝一郎、**深水 昭吉**：線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いたメチル化酵素・PMT-1のS-adenosylmethioine代謝への影響、第39回日本分子生物学会年会、平成29年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

4) Jun-Dal Kim, **Akiyoshi Fukamizu**: Roles of PRMT8 with dual catalytic activity in the brain. International meeting of the federation of Korean microbiological

societies、平成29年11月2日～3日、KINTEX、
(Korea・Gyeonggi-do)

5) Jun-Dal KIM, Junji Ishida, **Akiyoshi Fukamizu**: PRMT8 as a phospholipase is required for Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination、International meeting of the federation of Korean microbiological societies、平成28年11月3日～4日、KINTEX、(Korea・Gyeonggi-do)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

深水 昭吉 (FUKAMIZU, Akiyoshi)
筑波大学・生命領域学際研究センター・教授
研究者番号：60199172

(3)連携研究者

金 俊達 (KIM, Jundal)
筑波大学・生命領域学際研究センター・助教
研究者番号：90570036