

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07238

研究課題名(和文)アルギニンメチル基転移酵素PRMT5の異常活性による発がん機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of tumorigenesis by abnormal activity of arginine methyltransferase PRMT5

研究代表者

市川 朝永 (Ichikawa, Tomonaga)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80586230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、がん抑制遺伝子NDRG2がPP2Aと複合体を形成し、様々な因子を脱リン酸化調節することによって情報伝達系を負に制御することを突き止めた。NDRG2は多くの腫瘍で発現低下し、情報伝達系の異常亢進およびがんの発症進展への関与していた。NDRG2/PP2A複合体の網羅的な基質同定を行い、PRMT5を同定した。NDRG2発現低下がん細胞ではPRMT5は高リン酸化が維持され、正常細胞とは異なる局在とアルギニンメチル化標的タンパク質群を新たに見いだした。そこで本研究はNDRG2発現低下に伴うPRMT5異常活性が惹起するアルギニンメチル化異常を網羅的に解析し、腫瘍発生機構の解明を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NDRG2/PP2Aの脱リン酸化基質候補としてアルギニンメチル基酵素群であるPRMT5を新規に同定した。正常細胞ではPRMT5は核に偏在し、ヒストン等をアルギニンメチル化し遺伝子発現制御を行なっている。一方で、NDRG2欠損がんでは細胞質に主に局在し、異なった基質をアルギニンメチル化し腫瘍発症進展に関与している。これらの見地を基盤としたPRMT5機構解析は、NDRG2欠損がん・白血病に選択的に効果のある阻害剤開発に繋がる。さらに、NDRG2は全がんの約42-85%で高頻度に遺伝子発現低下が認められ、適応範囲は非常に広く社会的にも医療的にも貢献ができると考えている。

研究成果の概要(英文)：We found that the tumor suppressor gene NDRG2 induces the dephosphorylation of various signaling factors through the recruitment of PP2A, resulting in negatively the suppression of the signal transduction pathways. Our previous studies demonstrated that the expression of NDRG2 was significantly down-regulated in many type of tumors, leading to the progression of tumor development through the aberrant activation of the signal transduction pathways. We identified a novel NDRG2/PP2A-binding protein PRMT5 by Comprehensive analysis. The highly phosphorylated PRMT5 in NDRG2 deficient tumor was localized mainly in the cytoplasm, and modulated arginine methylation of cytoplasmic proteins. Therefore, the purpose of this study is to comprehensively analyze the abnormal arginine methylation caused by PRMT5 activity through the decrease of NDRG2 expression, and to elucidate the mechanism of tumorigenesis.

研究分野：腫瘍学

キーワード：PRMT5 HSP90 NDRG2 ATL

1. 研究開始当初の背景

N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) はストレスによって過剰活性化された各種情報伝達系を負に制御するストレス応答因子として知られているが、その分子機構は不明であった。当研究室では、NDRG2 が脱リン酸化酵素 PP2A と複合体を形成し、情報伝達因子群を脱リン酸化し情報伝達系を負に制御していることを同定した。また、NDRG2 欠損がんでは PP2A 脱リン酸化機構の低下に伴う高リン酸化による PTEN 不活化ならびに NIK 活性化が下流の PI3K/AKT および NF- κ B 情報伝達系の異常亢進を惹起し、がんの発症・悪性化に関与していることを明らかにした。

以上の結果から NDRG2 欠損がんにおいて多くの重要なタンパク質群のリン酸化修飾異常があることが示唆されたため、NDRG2 に結合しリン酸化修飾が変動するタンパク質群を質量分析計 (nano-LS/MS) および 2DICAL 法 (国立がんセンター研究所尾野雅哉博士との共同研究) を用いて網羅的な解析を行った。その結果、NDRG2 により特異的にリン酸化修飾を受けるタンパク質群を数多く発見し、その中にアルギニンメチル基転移酵素である Arginine methyltransferase 5 (PRMT5) を同定した。

タンパク質翻訳後修飾の一つであるアルギニンメチル化修飾は、様々な生命現象に広く関わっており、PRMT5 はタイプ II に属し、アルギニン残基のモノメチル化、対称性ジメチル化に関わっている。正常細胞では核内に主として局在し、ヒストンアルギニンメチル化による遺伝子発現抑制調節をしている。多くの腫瘍組織では発現亢進または細胞質への局在変化が報告されており、正常細胞とがん細胞ではアルギニンメチル化される基質群が大幅に異なることが示唆されている。がん細胞における PRMT5 の局在変化の機構やそれに伴う基質群の変化およびその機能制御・がん化への関与についてこれまで詳細に検討されていない。

2. 研究の目的

全がんの 30% 以上に見られる NDRG2 欠損がんにおける PRMT5 局在、酵素活性、その対象基質の変化および機能について、正常細胞と NDRG2 欠損がん細胞の比較により PRMT5 結合タンパク質群と結合によるアルギニンメチル化修飾を網羅的に同定し、がん発症機構への関連性を詳細に検討する。

3. 研究の方法

1) PRMT5 によるアルギニンメチル化基質同定および機能解析

タグ付き PRMT5 を細胞株に導入し、タグ抗体で免疫沈降して PRMT5 結合およびアルギニンメチル化タンパク質群を網羅的に同定して比較検討する。PRMT5 発現低下細胞株、発がんに関与する細胞質基質のアルギニンメチル化部位の変異 (Arginine (R) \rightarrow Alanine (A) または Lysine (K)) ベクターを導入した変異株を作製して、基質の翻訳後修飾、情報伝達系および細胞表現系を検討する。

2) NDRG2 発現低下による PRMT5 局在および酵素活性の検討

正常細胞 (NDRG2 発現) および腫瘍細胞 (NDRG2 欠損) における内在性またはトランスフェクションしたタグ付き PRMT5 の免疫沈降産物を nano-LC/MS 法を用いてリン酸化部位を同定する。PRMT5 のリン酸化部位の変異 (脱リン酸化 Alanine (A) 置換、リン酸化 Aspartic acid (D) 置換) ベクターを作製して細胞株に導入し、PRMT5 の基質のアルギニンメチル化、情報伝達系および細胞表現系を検討する。

免疫不全マウスの皮下に NDRG2 欠損がん細胞株 (mock、shPRMT5) を移植し、腫瘍形成能を検討する。

4. 研究成果

1) PRMT5 によるアルギニンメチル化基質同定および機能解析

PRMT5結合タンパク質として分子シャペロンHeat Shock Protein 90A (HSP90A)を同定した。PRMT5はNDRG2欠損がん細胞において細胞質に局在し、HSP90Aのアルギニン残基(Arg345、386)をメチル化していた。アルギニンメチル化されたHSP90Aはシャペロン活性を亢進させ、情報伝達系および腫瘍形成に重要なタンパク質であるAKT、NEMO、CDK4/6等(クライアントタンパク質)の安定化および活性化に寄与していた。PRMT5酵素活性低下変異体およびHSP90Aのアルギニン残基をアラニン(Ala)置換したHSP90A変異体を導入すると、PRMT5とHSP90Aの結合が低下し、HSP90Aのアルギニンメチル化が抑制されていた。HSP90Aアルギニンメチル化が減少することでHSP90Aシャペロン活性を制御する補助因子(co-chaperone)であるAHA1とp23がHSP90Aとの結合を消失させ、HSP90Aシャペロン活性が低下していた。さらに、クライアントタンパク質群がプロテオソーム依存的に分解され、細胞増殖抑制、カスパーゼ3活性亢進によるapoptosisを誘導した。

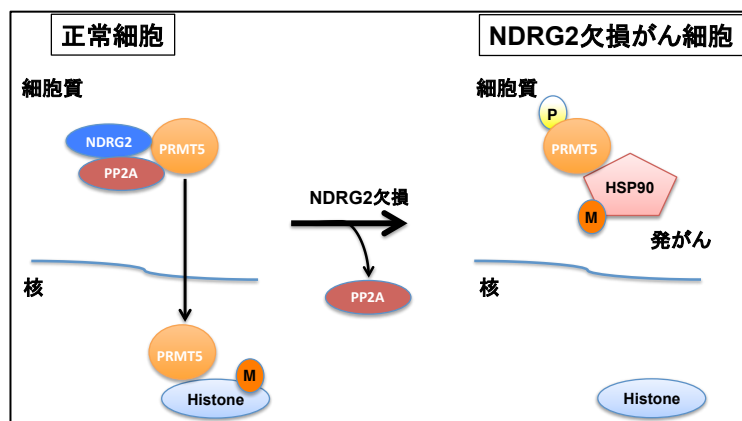
2) NDRG2発現低下によるPRMT5局在および酵素活性の検討

質量分析の結果からNDRG2発現低下がん細胞でPRMT5はSer335が高リン酸化されていた。セリン残基をアラニン(Ala)置換したPRMT5変異体を細胞株に導入すると、HSP90Aとの結合能が低下していた。それに伴い、HSP90Aアルギニンメチル化やシャペロン活性が抑制され、クライアントタンパク質分解、細胞増殖抑制およびapoptosisを誘導した。NDRG2を過剰発現させるとPP2AによってPRMT5のSer335リン酸化は消失し、PRMT5は細胞質から核に局在は変じ、アルギニンメチル化される基質も変化した。

免疫不全マウスの皮下にNDRG2発現低下細胞のmockおよびshPRMT5安定株を移植して腫瘍形成能を検討すると、shPRMT5で有意に腫瘍形成が低下し、腫瘍内ではapoptosisが誘導されていた。

NDRG2発現正常細胞ではNDRG2/PP2A複合体によりPRMT5は脱リン酸化され、核に局在し、ヒストンのアルギニンメチル化に参与していた。NDRG2発現低下がん細胞ではPP2Aによる脱リン酸化機構が破綻し、PRMT5が高リン酸化していた。PRMT5は核から細胞質に局在し、HSP90Aと結合してアルギニンメチル化を誘導した。アルギニンメチル化されたHSP90Aはシャペロン活性が亢進し、クライアントタンパク質群を活性化・安定化させ細胞増殖、アポトーシス抑制や腫瘍形成に参与していた(図)。

NDRG2欠損特異的な細胞質局在PRMT5/HSP90Aはがん発症・進展に参与し、正常細胞に作用しない、がん特異的な治療標的になる可能性を示唆した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ichikawa T, Shanab O, Nakahata S, Shimosaki S, Manachai N, Ono M, Iha H, Shimoda K, Morishita K.	4. 巻 1867
2. 論文標題 Novel PRMT5-mediated arginine methylations of HSP90A are essential for maintenance of HSP90A function in NDRG2low ATL and various cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res	6. 最初と最後の頁 118615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2019.118615	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 Chilmi S, Nakahata S, Fauzi YR, Ichikawa T, Tani C, Suwanruengsri M, Yamaguchi R, Matsuura T, Kurosawa G, Morishita K.	4. 巻 112
2. 論文標題 Development of anti-human CADM1 monoclonal antibodies as a potential therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 496-503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-02939-1	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 Ichikawa T, Nakahata S, Fujii M, Iha H, Shimoda K, Morishita K.	4. 巻 1865
2. 論文標題 The regulation of NDRG2 expression during ATLL development after HTLV-1 infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis	6. 最初と最後の頁 2633-2646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbadis.2019.07.001	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 該当する
1. 著者名 Sarkar B, Nishikata I, Nakahata S, Ichikawa T, Shiraga T, Saha HR, Fujii M, Tanaka Y, Shimoda K, Morishita K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Degradation of p47 by autophagy contributes to CADM1 overexpression in ATLL cells through the activation of NF- B.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39424-7	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 Suekane A, Saito Y, Nakahata S, Ichikawa T, Ogoh H, Tsujikawa K, Morishita K.	4. 巻 9
2. 論文標題 CGRP-CRLR/RAMP1 signal is important for stress-induced hematopoiesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36796-0	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 Nakamura Y, Nakahata S, Kondo Y, Izumi A, Yamamoto K, Ichikawa T, Tamura T, Noumi K, Yamashita Y, Morishita K.	4. 巻 509
2. 論文標題 Overexpression of absent in melanoma 2 in oral squamous cell carcinoma contributes to tumor progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.12.066	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

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa
2. 発表標題 Novel tumor suppressor gene NDRG2 deficiency promotes metabolic disorders and liver cancer development.
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa
2. 発表標題 The activation of protein arginine methyltransferase PRMT5 promotes tumor development through Arginine methylation of HSP90A.
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa
2. 発表標題 PRMT5 inhibition is synthetic lethal with loss of NDRG2 through the suppression of HSP90A in ATL.
3. 学会等名 第81回日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa
2. 発表標題 Analysis of the molecular mechanism of metabolism and tumorigenesis through the loss of tumor suppressor gene NDRG2.
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa
2. 発表標題 The inhibition of EZH2 suppresses ATL development through the up-regulation of novel tumor suppressor gene NDRG2.
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川朝永
2. 発表標題 がん抑制遺伝子NDRG2発現低下によるJak/STAT情報伝達系活性化機構.
3. 学会等名 第6回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川朝永
2. 発表標題 新規がん抑制遺伝子NDRG2欠損マウスにおける脂質代謝異常および腫瘍形成機構の解析.
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム「2018年度成果発表会」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa, Shingo Nakahata, Kazuhiro Morishita.
2. 発表標題 Overexpression of EZH2 confers ATL development through the suppression of tumor suppressor gene NDRG2.
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa, Obeid Shanab, Shingo Nakahata, Masaya Ono, Hidekatsu Iha, and Kazuhiro Morishita.
2. 発表標題 Arginine methylation of HSP90A by protein arginine methyltransferase PRMT5 promotes development of adult T-cell leukemia.
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川朝永、Obeid Shanab、中畑新吾、尾野雅哉、伊波英克、中武彩子、阪本訓代、森下和広.
2. 発表標題 アルギニンメチル化転移酵素PRMT5異常活性によるATL発症機構の解析.
3. 学会等名 第5回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa, Shingo Nakahata, and Kazuhiro Morishita.
2. 発表標題 EZH2 overexpression in ATL promotes epigenetic silencing of tumor suppressor gene NDRG2.
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 市川朝永	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊 細胞	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------