

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20710153
 研究課題名（和文） アルギニンメチル化酵素群における標的タンパク質の網羅的探索技術の開発
 研究課題名（英文） Construction of a screening method for target proteins of protein arginine methyltransferases
 研究代表者
 堀澤 健一（HORISAWA KENICHI）
 慶應義塾大学・理工学研究科・助教
 研究者番号：70424207

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質の試験管内スクリーニング技術である *in vitro* virus (IVV) 法を応用し、アルギニンメチル化酵素群の標的となる基質タンパク質を、試験管内で網羅的に解析する系の構築を目指した。代表的なアルギニンメチル化酵素である PRMT1 の基質タンパク質の試験管内スクリーニングのモデル系を構築し、種々の検討を行った。その結果、夾雑タンパク質存在下において既知基質タンパク質が 1 度のプルダウン操作により約 11 倍濃縮されることを確認でき、PRMTs 基質タンパク質の試験管内探索のモデル系を確立することができた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to construct an *in vitro* screening system for specific substrates of each PRMT based on an mRNA display technique, named *in vitro* virus (IVV) method. In this study, we performed various kinds of examination for construction of a model screening system for PRMT1 substrates, which is a most studied enzyme in the PRMT family. As a result of the optimization, an *in vitro* methylated model substrate was successfully enriched by 11-fold in a pull-down experiment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

近年、リン酸化に次ぐ重要な翻訳後修飾としてメチル化が注目されている。ゲノムにコードされるメチル基転移酵素は多く、ヒトの場合、全遺伝子の1%に達すると言われ (*Mol. Cell. Proteomics* **2**:525-540, 2003)、メチル化という現象の重要性を物語っている (ただし基質はタンパク質だけでなく DNA、脂質、低分子代謝物なども含む)。タンパク質のメチル化部位は、リジン、アルギニン、ヒスチジンのアミノ基側鎖と、C 末端カルボキシル基の2つに大別される。エピジェネティクスを担うヒストンにおいて、N 末端部位のリジンのメチル化は、所謂ヒストンコードとして遺伝子発現を制御している。それ故「タンパク質メチル化=リジンのメチル化」との印象が強いが、最近アルギニンのメチル化が、別の大きな役割を果たしていることが明らかになってきた。一例として、研究協力者の末松誠 (慶應義塾大学・医学部) らは、ガス状メディエーター分子である CO が、細胞内代謝のリモデリングと同時に、大規模なタンパク質のアルギニンメチル化を起こすことを発見した (私信)。このことは、細胞内の物質代謝ネットワークにおけるアルギニンメチル化の広範な役割を示唆している。

アルギニン残基へのメチル基転移反応は、アルギニンメチル化酵素群 (PRMTs) により特異的に制御される。現在、哺乳類では8種類の PRMT (PRMT1~8) が発見されており、いずれも S-adenosylmethionine (AdoMet) をメチル基のドナーとして、標的タンパク質をメチル化する (PRMT2 は配列相同性により同定されたが、活性は未確認)。また PRMTs はメチル化様式の違いから、タイプ1と2に分類される。タイプ1 (PRMT1、3、4、6および8) はモノメチル化 (MMA) の後、非対称ジメチル化 (aDMA) を触媒するが、タイプ2 (PRMT5 および7) は対称ジメチル化 (sDMA) を行う (*Mol. Cell* **18**:263-272, 2005)。PRMTs は RNA プロセッシング、シグナル伝達、転写制御、DNA 修復など、様々な細胞内プロセスの制御に関与する多様なタンパク質を基質としている (*Trends Biochem. Sci.* **32**:146-152,

2007)。また病態生理学的にも、癌や心臓血管疾患と言った重篤な疾患に関連することが示唆されており、生体内で多くの役割を担っていることは想像に難くない。それらアルギニンメチル化の細胞内プロセスにおける役割を包括的に解析し、システム生物学研究に適用し得るデータを得、さらには疾患の原因解明・治療法の確立に結びつけるためには、PRMT 基質タンパク質の網羅的な同定および認識モチーフの決定が必須である。しかしながら、PRMTs の基質特異性は、PRMT1、3 および6 の三酵素が、グリシンとアルギニンに富む GAR モチーフを認識することが知られるほかは、ほとんど解明されていない。したがって、現状では配列からの標的タンパク質の類推は不可能である。また、メチル化の網羅的解析を可能にする有望な技術もまだ存在しておらず、新たな方法論が求められていた。

2. 研究の目的

本提案では、申請者らが開発したタンパク質の機能スクリーニング技術、*in vitro virus* (IVV) 法 (*Nucleic Acids Res.* **31**:e78, 2003) を用いて、試験管内での PRMTs ターゲットの探索を試みることを最終的な目標とした。IVV 法は、タンパク質とそれをコードする RNA が連結した分子 (IVV) を試験管内で作製する技術であり、タンパク質部分で機能による選択を、核酸部分で増幅と簡便な同定を可能にする。実際に、タンパク質間相互作用 (*Nucleic Acids Res.* **32**:e169, 2004; *Genome Res.* **15**:710-717, 2005) や、タンパク質-DNA 間相互作用 (*Nucleic Acids Res.* **34**:e27, 2006) など、種々のタンパク質の機能スクリーニングに活用され成果を挙げた。また最近、相互作用解析だけではなく、プロテアーゼの基質の探索など、より高度なタンパク質機能解析にも適応できることが報告されている (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:14294-14299, 2007)。本提案では IVV ライブラリーに対し、各 PRMT による試験管内メチル基転移反応を行った後、メチル化アルギニン残基を認識する抗体を用いた選択を行うことで、各々の PRMT 基質タンパ

ク質を網羅的に同定することを目指した。

本研究の意義として、以下のような項目が挙げられた。(1) PRMTs 基質タンパク質を網羅的に同定し、タンパク質間相互作用ネットワーク (インタラクトーム)、細胞内物質代謝 (メタボローム) の情報と対応させることで、生体内でのメチル化の役割を包括的に解明する、システム生物学的情報基盤を整備することができる。(2) 末松らのプロテオミクス解析により、CO 刺激によるいくつかのメチル化標的タンパク質は判明しているが、対応する PRMT など、多くの部分が謎のままである。そこで、本研究と末松らの解析結果を組み合わせることで、代謝モデリング現象で働く PRMT 酵素群の同定と役割の解明が期待できる。このことは、メチル化を介した代謝の制御という、医療・創薬の新たな分野を開拓できる可能性がある。(3) 本研究を通し、IVV 分子の酵素による修飾反応、抗体を用いた修飾 IVV の選択などの条件検討を行い、IVV 法を用いた翻訳後修飾ターゲットの探索技術を一般的手法として確立することができれば、リン酸化、ユビキチン化や SUMO 化など、他の翻訳後修飾にも適応することが期待できる。(4) アルギニンメチル化の包括的な理解自体が未踏分野であり、その解明は、疾患の理解や創薬に向けて大きく貢献することができる。

3. 研究の方法

本研究では、PRMTs 基質の網羅的解明という最終目標を実現するため、*in vitro* における新規解析技術を構築する必要があった。構築を試みたスクリーニング系は、**図 1** に示すように、IVV 法と *in vitro* メチル化反応を組み合わせた手法である。IVV 法に関しては、研

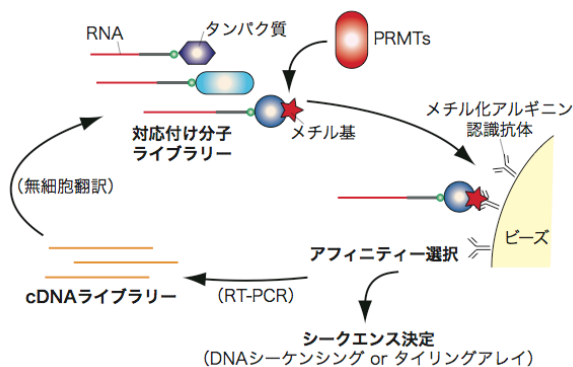


図 1 IVV 法によるスクリーニング系

究代表者らのこれまでの研究により十分に実用的な技術として確立されていたため、それ以外の部分、連結分子の *in vitro* メチル化、およびそのアフィニティーキャプチャーに関して様々な条件検討を行なった。モデルとして、メチル化酵素には最も詳細な解析が行われている PRMT1、および基質には既知の PRMT1 標的タンパク質である Mre11、Sam68、Fibrillarlin を採用し、検証を行った。

4. 研究成果

まず酵素活性を有する PRMT1 タンパク質を *in vitro* で大量に調整する必要があったため、大腸菌および哺乳動物細胞である CHO-S 細胞において、種々のタグを付加したコンストラクトを作製し、発現、精製および酵素活性の検討を行った。その結果、His タグを N 末端に付加したコンストラクトが、大腸菌、哺乳動物細胞のいずれで発現した場合にも比較的高い酵素活性を *in vitro* において有することが判った。

次に IVV 法に使用する小麦胚芽由来の無細胞翻訳系により発現したモデル基質タンパク質が、作製した PRMT1 により試験管内で効率的にメチル化されるかを検討した。RI 標識した AdoMet によるメチル化の確認では、いずれのモデルタンパク質も試験管内メチル化を受けることが確認出来たが、IVV 法のアフィニティーキャプチャーで使用する計画の抗メチル化アルギニン認識抗体を用いた Western blotting では、Fibrillarlin のみメチル化が確認された。この原因は *in vitro* における PRMT1 のメチル化効率が放射線標識実験で見積もられたものよりも低い可能性 (ほとんどの研究では放射線によるメチル化活性測定を行っている)、また用いた抗体の力価が比較的低い可能性 (ただしこの抗体は免疫沈降での使用実績がある) が考えられた。

IVV 法では特異的に回収されたタンパク質を核酸の増幅 (RT-PCR) で確認するため、一般的にタンパク質レベルでの検出法よりも高感度である。そこで、スクリーニング系の確立とモデルタンパク質の試験管内メチル化の確認を行うため、既知標的である Mre11 で mRNA-タンパク質連結分子を作製し、夾雑タンパク質 (GST) の連結分子共有下において、特異的な回収が可能であるかを検証した。

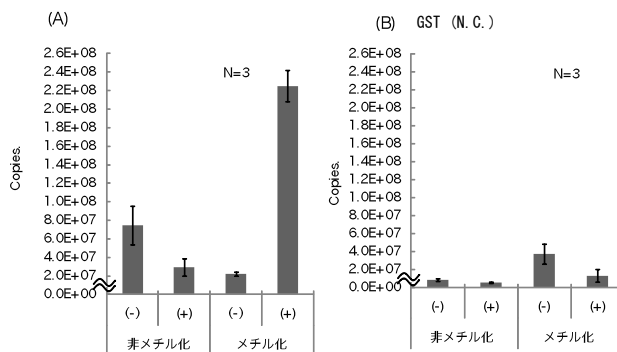


図2 IWV法によるモデルスクリーニング系

結合や酵素反応、洗浄などの種々の条件検討の結果、図2に示すように、メチル化処理されたMre11が夾雑タンパク質に対して、およそ11倍、抗体により特異的に選択されることが確認された。これにより、本計画で構築を目指すスクリーニング系はPRMT1に関して実現可能であることが示された。

しかしながら、今回の結果から示された標的の選択効率、不十分ではないがあまり高いとも言えない。より効率的な試験管内スクリーニングの実現のためには、更にメチル化効率の向上や、アフィニティー選択効率の改善といった条件検討が必要である。また、本結果はPRMT1をモデルとした場合の結果であり、他のPRMTsへの応用、更にはアルギニンメチル化の網羅的解析の実現のためには、各々の酵素における反応の条件検討も必要となると考えられる。

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1件)

1. Horisawa K, Imai T, Okano H, Yanagawa H. (2009) 3'-Untranslated region of doublecortin mRNA is a binding target of the Musashi1 RNA-binding protein. *FEBS Lett.* **583**, 2429-2434. (査読：有)

[学会発表] (計1件)

1. 佐保山友加里、堀澤健一、高野直治、山本雄広、末松誠、土居信英、柳川弘志(2009) *In vitro virus*法によるアルギニンメチル化酵素標的タンパク質の網羅的探索法の開発、第32回日本分子生物学会年会(2009年12月12日、横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.keio.ac.jp/labs/hyana/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀澤 健一 (HORISAWA KENICHI)
慶應義塾大学・理工学研究科・助教
研究者番号：70424207

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし