

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390081

研究課題名（和文） ヒストンコードにおけるアルギニン残基のメチル化修飾制御機構の解明

研究課題名（英文） Arginine methylation in histone code

研究代表者

浦野 健 (URANO TAKESHI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：70293701

研究成果の概要（和文）：ヒストンのアルギニン残基メチル化酵素ファミリーの一つである PRMT4 と結合するタンパク質の一つとしてがん関連転写制御因子 NAC-1 を同定した。その複合体に核内受容体コアクティベータ NCoA-3 が含まれ、450 KDa 程度の分画に存在した。ヒストンのアルギニン残基メチル化酵素 PRMT4 はがん細胞内において、ホルモン受容体およびがん関連転写因子などの情報伝達系を調節しているという新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）：We identified a cancer-related transcriptional regulator protein NAC1 as a binding partner of histone-arginine methyltransferase PRMT4. The 450-kDa complex also contains nuclear receptor coactivator 3 NCoA-3. We revealed that PRMT4 regulates functions of hormone nuclear receptor and cancer-related transcription.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ヒストン、翻訳後修飾、アルギニン残基、メチル基、核内受容体コアクティベータ、がん関連転写制御因子

1. 研究開始当初の背景

アセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化といったヒストン修飾は、クロマチン構造変換機構の一つとして転写、複製、組換え、修復、細胞周期などのイベントに深く関わっていることが、これまでの数多くの知見で示されてきた。ヒストンのメチル化では、

リジン残基とアルギニン残基の2種類が報告されている。特に2000年に動物細胞ではじめてSETドメインを有するタンパク質群がヒストンのリジン残基をメチル化する酵素であることが報告され、その後、転写制御、DNAのメチル化修飾、X染色体の不活性化、ヘテロクロマチン形成など染色体機能制御

とヒストンのリジン残基のメチル化修飾との関連の研究が大きく進展した。一方、ヒストンのアルギニン残基のメチル化修飾と転写制御については、ホルモン依存的な転写のコアクチベーターに結合しその転写をさらに亢進する分子として PRMT4 が同定され、ヒストンのアルギニン残基のメチル化酵素であることが報告された。PRMT5 は、逆に転写を抑制する。がんとの関連では、PRMT5 の発現が白血病などでは亢進しており、NIH3T3 に PRMT5 を強制発現すると足場非依存性となることが報告されている。これまでに PRMT ファミリーは 11 種類同定されている。ヒストン以外にも様々なタンパク質のアルギニン残基をメチル化するため、染色体機能制御にどの程度関わっているのか詳細には検討されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒストンのアルギニン残基のメチル化修飾が、どのような実働分子を標的領域に呼び込み、他の翻訳後修飾とどのように相互作用し、そしてどのように染色体機能を制御するのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

① PRMT タンパク質の細胞周期における時空間的動態解析：

1) GFP 融合タンパク質によるタイムラプス顕微鏡観察

2) 内在性タンパク質の時空間的動態解析

② PRMT と Aurora との結合部位の検討：

1) 強発現系および内在性タンパク質における結合

2) 精製タンパク質における結合

③ PRMT5 および PRMT6 のメチル化活性と構造解析：

④ Aurora-B と PRMT5 および PRMT6、それぞれの基質としての機能制御：

Aurora-B と PRMT5 および PRMT6 との相互作用を基に、互いを基質としてリン酸化あるいはメチル化することによりその機能を制御している可能性がある。相互機能制御について解析する。

1) Aurora による PRMT5 および PRMT6 のリン酸化制御

2) PRMT5 および PRMT6 による Aurora のメチル化制御

⑤ メチル化アルギニンを部位特異的に認識するモノクローナル抗体の作製と解析（坂下）：

すでに作製済みの H3-対称型ジメチル化 R8

以外に、H3-非対称型ジメチル化 R8、H3-対称型ジメチル化 R2、H3-非対称型ジメチル化 R2、H4-対称型ジメチル化 R3、H4-非対称型ジメチル化 R3 を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、細胞内における時空間的検討を行う。

4. 研究成果

1) PRMT5 および PRMT6 の細胞内局在を可視化するためにレトロウイルスを用い GFP 融合タンパク質として導入し、フローサイトメーターを用いたソーティング法によりクローンではなく集団として、安定細胞株を作製し、タイムラプス顕微鏡観察を行った。

2) PRMT5 および PRMT6 の内在性タンパク質の時空間的動態解析を行うため、免疫染色のできるモノクローナル抗体を作成中である。

3) PRMT1~7 をクローニング後 Aurora-B との結合を検討した。

4) PRMT1~7 が Aurora-B をメチル化できるのか、逆に Aurora-B が PRMT1~7 をリン酸化できるのかについてそれぞれの相互制御について解析を行った。

5) H3-R8 および H4-R3 のジメチル化を認識するモノクローナル抗体を作成した。

6) 前年度に作成した H3-R8 および H4-R3 のジメチル化を認識するモノクローナル抗体および市販の H3-R2 のジメチル化を認識するポリクローナル抗体の特異性をヒストンペプチドアレイを用いて検討した。

7) 市販の H3-R2 のジメチル化を認識するポリクローナル抗体は、H3-R2 のジメチル化も認識するが、ヒストン以外の他の RG 配列の R のメチル化も認識した。

8) PRMT1~7 を細胞内で過剰発現させたところ、PRMT6 のみが H3-R2 および H3-R8 をジメチル化した。

9) 大腸菌で発現精製した PRMT6 は、試験管内で H3-R2、H3-R8 および H4-R3 をジメチル化することを確認した。

10) アルギニン残基メチル化酵素ファミリーの一つである PRMT4 と結合するタンパク質を質量解析により同定した。

11) その候補結合タンパク質の一つががん関連転写制御因子 NAC-1 であり、細胞レベルの解析により、実際両者が細胞内で結合することを明らかにした。

12) しかし、NAC-1 タンパク質は、PRMT4 の基質にはならなかった。

13) その複合体に核内受容体コアクティベーター NCoA-3 が含まれることを明らかにした。

14) さらに、細胞溶解液を用いたサイズ分画法によりこれらの複合体は 450 KDa 程度の同じ分画に存在することが判明した。アルギニン残基メチル化酵素 PRMT4 はがん細胞内において、ホルモン

受容体およびがん関連転写因子などの情報伝達系を調節しているという新たな知見を得た。

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 12 件)

1. Hayashi A, Ishida M, Kawaguchi R, Urano T, Murakami Y and Nakayama J-I.: Heterochromatin protein 1 homologue Swi6 acts in concert with Ers1 to regulate RNAi-directed heterochromatin assembly. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 109: 6159-6164, 2012
2. Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Hayashi Y, Enomoto M, Ibi M, Urano T, Yonemura S, Kiyono T, Izawa I and Inagaki M.: Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. **J. Cell Biol.**, 197: 391-405, 2012
3. Buscaino A, White S, Houston D, Simmer F, Alves F, Diyora PT, Urano T, Bayne E, Rappsilber J and Allshire RC.: Raf1 is a DCAF for the Rik1 DDB1-like protein and has separable roles in siRNA generation and chromatin modification. **PLoS Genet.**, 8: e1002499, 2012
4. Matsumoto Y, Zhang Q, Akita K, Nakada H, Hamamura K, Tokuda N, Tsuchida A, Matsubara T, Hori T, Okajima T, Furukawa K, Urano T and Furukawa K: pp-GalNAc-T13 induces high metastatic potential of murine Lewis lung cancer by generating trimeric Tn antigen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 419: 7-13, 2012
5. Nakama M, Kawakami K, Kajitani T, Urano T and Murakami Y.: DNA:RNA hybrid formation mediates RNAi-directed heterochromatin formation. **Genes Cells**, 17: 218-233, 2012
6. Ban R, Nishida T and Urano T.: Mitotic kinase Aurora-B is regulated by SUMO-2/3 conjugation/deconjugation during mitosis. **Genes Cells**, 16: 652-669, 2011
7. Ma N, Matsunaga S, Morimoto A, Sakashita G, Urano T, Uchiyama S and Fukui K.: The nuclear scaffold protein SAF-A is required

for kinetochore-microtubule attachment and contributes to the targeting of Aurora-A to mitotic spindles. **J. Cell Sci.** 124: 394-404, 2011

8. Simmer F, Buscaino A, Kos-Braun IC, Kagansky A, Boukaba A, Urano T, Kerr AR and Allshire RC.: Hairpin RNA induces secondary small interfering RNA synthesis and silencing in trans in fission yeast. **EMBO Rep.** 11: 112-118, 2010

9. Sato M, Harada H, Morito S, Fujita Y, Shimosaki S, Urano T and Nakamura M.: Preparation, characterization and properties of novel covalently surface-functionalized zinc oxide nanoparticles. **Appl. Surf. Sci.** 256: 4497-4501, 2010

10. Ban R, Matsuzaki H, Akashi T, Sakashita G, Taniguchi H, Park S-Y, Tanaka H, Furukawa K and Urano T.: Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases. **J. Biol. Chem.** 284: 28367-28381, 2009

11. Arimura N, Hattori A, Kimura T, Nakamuta SI, Funahashi Y, Hirotsune S, Furuta K, Urano T, Toyoshima YY, Kaibuchi K.: CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity. **J Neurochem.** 111: 380-390, 2009

12. Kagansky A, Folco HD, Almeida R, Pidoux AL, Boukaba A, Simmer F, Urano T, Hamilton GL and Allshire RC.: Synthetic heterochromatin bypasses RNAi and centromeric repeats to establish functional centromeres. **Science** 324:1716-1719, 2009

[学会発表] (計 5 件)

1. Urano T., Biological and spatial regulation of transcriptional regulatory protein NAC-1. Tufts University (招待講演), 2012/03/13, Boston, USA

2. 浦野 健, SUMO化による分裂期キナーゼ Auroraの制御, 第8回SUMO研究会, 2010/11/26, 筑波大学 (筑波)

3. Urano T., The spatial regulation of a transcriptional regulator NAC-1. The 1st International Workshop on Structural Epigenomics (招待講演), 2010/10/01, Riken Yokohama Institute Koryuto Hall (Y

okohama)

4. Urano T., Biological and domain analysis of transcriptional regulatory protein NAC-1. The 6th International Forum on Oxidative Stress and Aging (招待講演), 2010/09/07, Nagoya Congress Center(Nagoya)

5. 浦野 健, 転写制御因子NAC1の細胞内動態と機能解析, 第9回核ダイナミクス研究会, 2010/05/28, ラフォーレ修善寺(静岡)

[産業財産権]

○出願状況(計3件)

1. 名称: 新規モノクローナル抗体、及びそのタグ抗体としての利用

発明者: 浦野 健、辰巳 香澄、関根 浄治

権利者: 島根大学

種類: 国際特許出願

番号: PCT/JP2012/56384

出願年月日: 平成24年3月13日

国内外の別: 国外

2. 名称: 物質相互作用をリアルタイムに可視化する技術

発明者: 岡崎 宏亮、成相 裕子、加藤 太陽、

浦野 健

権利者: 島根大学

種類: 特許出願

番号: 特願 2011-76772

出願年月日: 平成23年3月30日

国内外の別: 国内

3. 名称: 新規モノクローナル抗体、及びそのタグ抗体としての利用

発明者: 浦野 健、辰巳 香澄

権利者: 島根大学

種類: 特許出願

番号: 特願 2011-55953

出願年月日: 平成23年3月14日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦野 健 (URANO TAKESHI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 70293701

(2) 研究分担者

坂下 暁介 (SAKASHITA GYOSUKE)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 00397457

伴 玲子 (BAN REIKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 40509105

(2009~2010)