

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2012
 課題番号：21510222
 研究課題名（和文）メチル化アルギニンを介した母胎間ケミカルコミュニケーションの解析
 研究課題名（英文）Analyses of methylarginines on the chemical communication between fetus and mother.
 研究代表者
 加香 孝一郎（KAKO KOICHIRO）
 筑波大学・生命環境系・講師
 研究者番号：60311594

研究成果の概要（和文）：

本研究では、

- 1) タンパク質アルギニンメチル化のさらなる生理的意義と、メチル化アルギニンの生成に至る素過程の解明
- 2) 妊娠期の胎児⇄胎盤⇄母体間のメチル化アルギニンとその関連物質の動態分析の2点に絞って解析を進めた結果、転写因子DAF-16のアルギニンメチル化が線虫の寿命制御に関与することや、メチル化アルギニンの細胞内生成機構を明らかにし、母胎間のケミカルコミュニケーション分子の同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we focused on two points;

- 1) Further analyses of the protein arginine methylation and the elucidation of intracellular processes of methyl arginine production.
 - 2) Feto-placental-maternal pharmacokinetic monitoring of methyl arginines and related amines.
- In conclusion, we showed that the arginine methylation of DAF-16 regulates life-span of *C. elegans* and free-methylarginines were generated through both ubiquitin-proteasome system and autophagosome system, and succeeded in identifications of several amines involved in the feto-maternal chemical communications.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物有機化学、ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：アルギニンメチル化、アミン、高感度定量分析法、ケミカルコミュニケーション、生理活性アミン

1. 研究開始当初の背景

我々は研究開始までに、タンパク質の翻訳後修飾、中でもアルギニン残基のメチル化を触媒するタンパク質アルギニンメチル基転

移酵素 PRMT1 が、
 (1) 原癌遺伝子産物 EWS をメチル化し、その細胞内局在を核から細胞質に移行させること
 (2) 糖代謝制御や細胞分化などに関与する転

写調節因子 FOXO1 の機能を抑制するリン酸化修飾が、PRMT1 によるアルギニン残基のメチル化によって阻害されることを明らかにしていた。

その一方で、

(3) 妊娠高血圧マウス (PAH マウス) において、血管弛緩因子である一酸化窒素 NO の合成酵素 (NOS) の内因性阻害剤である非対称ジメチルアルギニン (ADMA) の血中レベルが上昇傾向にあること

(4) ある種のアミンの濃度が、妊娠後期に著しく上昇していることを見出していた。

これらのことから、タンパク質のアルギニンメチル化は、生体機能に広範な役割を果たす翻訳後修飾であるとともに、これらメチル化タンパク質の分解産物もまた、循環器疾患の新たな危険因子として機能する事が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、

(1) タンパク質アルギニンメチル化のさらなる生理的意義、及びメチル化アルギニンの合成に至る素過程の解明

(2) 妊娠期における胎児⇄胎盤⇄母体 (母胎間) のメチル化アルギニン及びその関連物質による母胎間のケミカルコミュニケーションの全貌を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PRMT の発現制御によるタンパク質中メチル化アルギニンの産生量の分析

培養細胞やモデル生物である線虫に対して PRMT の発現を制御した際のタンパク質のメチル化状態を、アミノ基特異的に導入される蛍光基 6-aminoquinolyl carbamyl (AQC) 基でタンパク質の加水分解物を標識し、HPLC 分析を行った。

(2) メチル化アルギニンを遊離する細胞内タンパク質分解経路の特定

アルギニンメチル化タンパク質の分解が、ユビキチン-プロテアソーム系またはオートファジー系のどちらに担われているのか、それぞれの経路特異的な阻害剤を用いることにより細胞内の遊離メチル化アルギニンを定量した。

(3) 生理活性アミンの高感度分離系の確立

従来の ODS 系の逆相カラムに加え、さらにナフチルエチル基導入型カラムを組み合わせる事により、メチル化アルギニンのみならず、アミン全般に対して特異的かつ鋭敏に UPLC を用いた分離・検出を行い、定量した。

(4) PAH 妊娠後期の母体と胎児で特異的に上昇する新規アミンの探索と動態解析 :

上記(4)で確立した方法を用いて、病態に応答して変動するアミンを探索し、その分子量を MALDI-QIT-TOF/MS により決定・構造を ¹H-NMR により同定した。さらに合成酵素の遺伝子破壊マウスの使用や、市販のアミン標準品の個体への投与により、動態を解析した。

4. 研究成果

(1) 線虫のアルギニンメチル化酵素 PRMT-1 の酵素活性の証明と転写因子 DAF-16 を介した

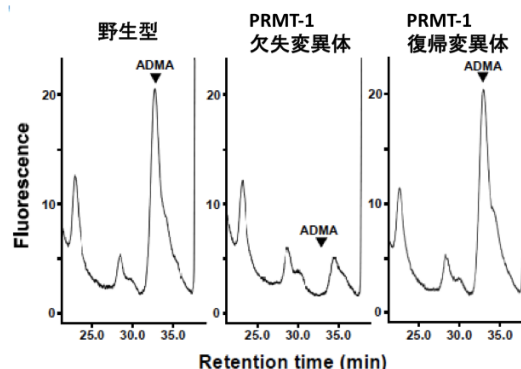


図1 線虫 PRMT-1 による ADMA 形成の証明
た寿命制御機構の解明

分子量が同一であるため判別が困難であった ADMA と対称型ジメチルアルギニン (SDMA) について MALDI-QIT-TOF/MS を用いて同定する技術を確認し、線虫 PRMT-1 がドミナントな Type I PRMT (ADMA を形成するジメチル化酵素) であることをタンパク質水解物のアミノ酸分析により証明した (図 1)。また PRMT-1 が、寿命に関連する転写制御因子 DAF-16 の AKT によるリン酸化を抑制することで、線虫の寿命を制御していることを明らかにした (論文 4 参照)

(2) 遊離メチル化アルギニンの細胞内生成機構の解明

タンパク質分解経路特異的な阻害剤を用いて、(1)で確立したメチル化アルギニンの高感度分析系により、細胞内の遊離メチル化アルギニンの測定を行った。その結果ユビキチン-プロテアソーム系及びオートファジー系の両方を介してメチル化タンパク質の分解→遊離メチルアルギニンの生成に至ることを明らかにした (論文 5 参照)。

(3) ヒスタミン合成酵素の発現誘導による細胞内ヒスタミン合成促進の証明

細胞内に存在するアミノ酸やアミン類を、より鋭敏かつ特異的に検出・定量化する手法を確立した。そこで生理活性アミンの例として、ホルボールエステルで合成酵素の発現誘導を行った Jurkat 細胞において、上記手法を用いてヒスタミンが細胞内で過剰に生成さ

れる事を生化学的に証明した（論文1参照）。
 (4) PAH妊娠後期の母体と胎児で特異的に上昇するアミンの同定

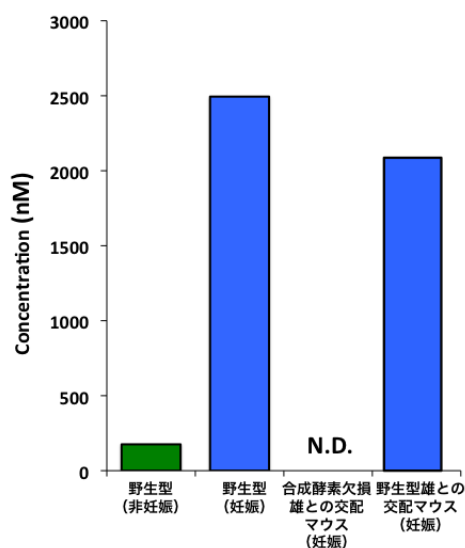


図2 母体血中における胎児由来アミン X の増加

既に研究開始時点で、マウス妊娠後期の母体血漿中に上昇する物質としてその存在が検出されていたアミン X の構造を決定した。さらにアミン X の合成酵素遺伝子破壊マウスを用いた結果から、
 ①野生型雄と交配したアミン X は胎児で合成され、母体循環系に流入すること（図2、未発表データ）
 ②PAH マウスの一部の症状に、アミン X が関与している可能性があることを明らかにした。

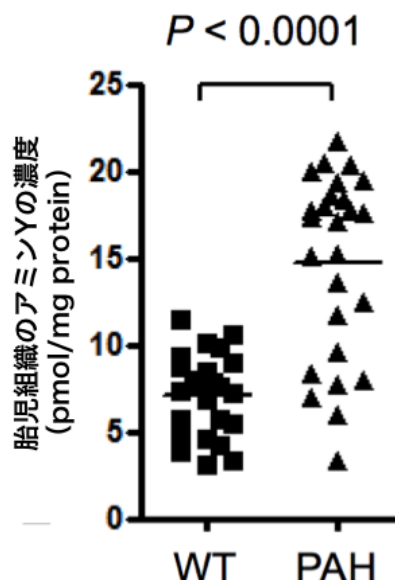


図3 胎児組織における母体由来アミン Y の増加

さらに、上記(3)の手法を改良し、
 ③野生型に比べ PAH マウスの母体血漿並びに胎児で特異的に2倍程度上昇する第2のアミンとしてアミン Y を同定した（図3、未

発表データ）

④市販のアミン Y 標品を母体に飲水投与することで、胎児組織中のアミン Y が増加することを明らかにした。

これらの結果は、アミン X が胎児→母体に、またアミン Y が母体→胎児に移行し、それぞれ母体-胎児間のコミュニケーション分子として妊娠期間の恒常性維持や妊娠時疾患の発症メカニズムに関与している事が示唆された。

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6件）

- 1) Nagashima, Y., Kako, K., Kim, J.D., Fukamizu A. Enhanced histamine production through the induction of histidine decarboxylase by phorbol ester in Jurkat cells. *Mol. Med. Rep.* 6, 944-948 (2012)（査読有）
DOI: 10.3892/mmr.2012.1049.
- 2) 加香孝一郎、深水昭吉. M η -置換アルギニン残基を含むペプチド性タンパク質アルギニンメチル化酵素阻害剤. *Chemical Biology*, 4, 10-11 (2011)（査読無）
URL: <http://www.tmd.ac.jp/jcb/>
- 3) Nakajima, Y., Akaogi, K., Suzuki, T., Osakabe, A., Yamaguchi, C., Sunahara, N., Ishida, J., Kako, K., Ogawa, S., Fujimura, T., Homma, Y., Fukamizu, A., Murayama, A., Kimura, K., Inoue, S., Yanagisawa, J. Estrogen regulates prostate tumor growth through a nonclassical pathway that includes the transcription factors ER β and KLF5. *Science Signal.* 4, ra22 (2011)（査読有）
DOI: 10.1126/scisignal.2001551.
- 4) Takahashi, Y., Daitoku, H., Hirota, K., Tamiya, H., Yokoyama, A., Kako, K., Nagashima, Y., Nakamura, A., Shimada, T., Watanabe, S., Yamagata, K., Yasuda, K., Ishii, N., Fukamizu, A. Asymmetric arginine dimethylation determines lifespan in *C. elegans* by regulating forkhead transcription factor DAF-16. *Cell Metab.* 13, 615-620 (2011)（査読有）
DOI: 10.1016/j.cmet.2011.03.017.
- 5) Shirakawa, T., Kako, K., Shimada, T., Nagashima, Y., Nakamura, A., Ishida, J., Fukamizu, A. Production of free methylarginines via the proteasome and autophagy pathways in cultured cells. *Mol. Med. Rep.* 4, 615-620 (2011)（査読有）
DOI: 10.3892/mmr.2011.488.
- 6) 加香孝一郎、深水昭吉. メチル化アルギニンを介したエピジェネティックな血圧

制御. 細胞工学, 28, 541-547 (2009) (査読無)

URL:<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784879624970.html>

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 加香孝一郎、深水昭吉. アルギニンメチル化の化学特性とシグナル機能. 蛋白研セミナー『シグナル伝達と解析技術のあらたな潮流』、大阪、2013年3月5日
- 2) 飯塚慧、廣田恵子、小島真梨子、大徳浩照、加香孝一郎、深水昭吉. メチル基供与体 *S*-adenosyl-L-methionine の量的変化がヒストンメチル化に与える影響. 転写代謝システム 若手ワークショップ@鬼怒川、栃木県日光市鬼怒川温泉、2013年1月25日
- 3) 永島裕介、加香孝一郎、金俊達、深水昭吉. Jurkat細胞におけるホルポールエステル刺激下でのヒスチジン脱炭酸酵素誘導性ヒスタミンの直接測定. 第85回日本生化学会大会、福岡、2012年12月14日
- 4) 加香孝一郎、中村あゆみ、石田純治、永島裕介、嶋田崇史、深水昭吉. 官能基に着目した妊娠高血圧マウス胎仔で増減するアミン類の探索法. 第16回活性アミンワークショップ、札幌、2012年8月24日
- 5) 永島裕介、加香孝一郎、金俊達、深水昭吉. Jurkat細胞におけるホルポールエステル刺激下でのヒスチジン脱炭酸酵素誘導性ヒスタミンの直接測定. 第7回日本ケミカルバイオロジー学会年会、京都、2012年6月8日
- 6) 加香孝一郎、中村あゆみ、石田純治、永島裕介、嶋田崇史、深水昭吉. 官能基に着目した妊娠高血圧マウス胎仔で増減する生体低分子の探索法. 第7回日本ケミカルバイオロジー学会年会、京都、2012年6月8日
- 7) 中村あゆみ、加香孝一郎、石田純治、永島裕介、嶋田崇史、深水昭吉. 官能基に着目した生体低分子の探索法. 転写代謝システム・転写研究会共催「若手ワークショップ@湯河原、神奈川県足柄下郡湯河原町、2012年2月9日
- 8) 横山敦子、高橋悠太、大徳浩照、廣田恵子、田宮寛子、加香孝一郎、永島裕介、中村あゆみ、嶋田崇史、渡辺哲史、山形一行、安田佳代、石井直明、深水昭吉. アルギニンメチル化酵素PRMT-1は転写因子DAF-16の機能制御を介して線虫の寿命を決定する. 第34回日本分子生生物学会年会、横浜、2011年12月14日
- 9) 中村あゆみ、加香孝一郎、石田純治、永島裕介、嶋田崇史、深水昭吉. 「官能基」に着目した生体低分子の探索法. 第34回日本分子生生物学会年会、横浜、2011年12月13日

10) 加香孝一郎. 内因性NOS阻害因子・ADMAの生成機構の解明. 日本薬学会第131年会、静岡、2011年3月30日

11) 白川拓真、加香孝一郎、永島裕介、中村あゆみ、嶋田崇、深水昭吉. 培養細胞における遊離メチルアルギニンの定量と生成機序の解析. 第33回日本分子生物学会年会、神戸、2010年12月8日

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ URL :

<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加香 孝一郎 (KAKO KOICHIRO)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号 : 60311594

(2) 研究分担者

石田 純治 (ISHIDA JUNJI)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号 : 30323257