

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25252062

研究課題名(和文) アルギニンメチル化酵素と栄養補給路の機能的ネットワークの解明

研究課題名(英文) Functional roles of arginine methylation on vascular networks for nutritional supply

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) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：内皮細胞は、酸素や栄養素などを全身へ循環させる補給路(=血管)として、また、血管作動性物質を産生し血管の活動を調節しているが、内皮細胞を制御する作用分子とネットワーク機能はほとんど理解されていない。我々は、タンパク質アルギニンメチル化反応を担う酵素・PRMT1が、培養内皮細胞の管腔形成を制御する可能性を見出した。本研究では、内皮細胞特異的PRMT1欠損マウスを開発し、血管内皮細胞のPRMT1が、胎仔期の血管形成を制御すること、胎仔の生存に必須であることなど、発生段階における栄養補給路でのPRMT1の重要性を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is important in embryonic development, and endothelial cells play a critical role in these processes. Protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) is involved in multiple cellular functions including proliferation and differentiation, and is expressed in vascular endothelial cells, which are responsible for angiogenesis during embryonic development. Since homozygous mutation of the Prmt1 gene results in early embryonic lethality in mice, little has been known about its physiological importance. In the present study, we found that the endothelial cell-specific PRMT1 deficient mice (PRMT1-ECKO) died within embryonic day 15. Macroscopic observation showed that the temporal arteries were poorly perfused with blood as compared with controls. Whole mount in vivo 3D imaging revealed the dilated and segmentalized luminal structures in PRMT1-ECKO fetuses. Our findings clearly provide evidence that PRMT1 is essential for normal vascular formation during embryogenesis.

研究分野：生化学 分子生物学

キーワード：栄養 血管 PRMT1 内皮細胞特異的ノックアウトマウス イメージング 透明化 二光子顕微鏡 代謝

1. 研究開始当初の背景

内皮細胞は、酸素や栄養素(糖、脂質やアミノ酸等)を全身へ循環させる補給路(=血管)の形成とその働きに必須である。例えば、発生・発達中には、内皮細胞が起点となって血管を新生・進展させていく。血管は、成熟しながら母胎間の栄養素を含めた物質交換に大きな役割を果たすと共に、神経網に密着して伴走しながらその形成を促進している。一方、内皮細胞は、血管内腔を一層に覆うことでバリアーとして作用するだけでなく、アルギニンから合成される一酸化窒素(NO)などの血管作動性物質を産生することで、血管の活動性を調節している。しかし、細胞増殖と血管新生の医学的相互作用の解明は進んでいるものの、栄養補給路における内皮細胞を制御する作用分子とネットワーク機能はほとんど理解されていない。

Protein Arginine methyltransferase (PRMT)はタンパク質中のアルギニン残基にメチル基を転移する酵素である。哺乳類のPRMTは、11個の遺伝子ファミリーから構成され、発現の時期・組織や基質が異なる固有の特異性を持ち、シグナル伝達や転写制御など多岐に渡る細胞機能を制御する。さらに、メチル化タンパク質の分解によって遊離する非対称型メチルアルギニン(ADMA)が内皮細胞に対して強い障害作用を示す。PRMT1は、ファミリーの中でも最初に同定され、生体内の85%のアルギニンメチル化反応を触媒する。しかし、PRMT1欠損マウスが胎生6.5日で早期致死になるため、生体機能の研究は10年以上全く進展していなかった。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、非ヒストンタンパク質のアルギニン残基に潜在する『メチル化コード』がPRMT1によって作動することを発見し(Mol. Cell 2008, PNAS 2011, Cell Metab. 2011)、寿命やストレス応答における修飾制御の重要性を証明してきた。さらに、内皮細胞のPRMT1をノックダウン法によって発現抑制すると、管腔形成が著しく促進するという重要な現象を見出してきた。現在、PRMTのヒストンを介する癌細胞でのエピジェネティクスの分子機序は明らかにされつつあるものの、内皮細胞機能に対する生理的意義については不明である。そこで本研究は、PRMTと栄養補給路の機能的ネットワークの解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の2点に焦点を絞り『アルギニンメチル化酵素と栄養補給路の機能的ネットワークの解明』を目指した。

(1) 内皮細胞特異的 PRMT1 ノックアウトマウスの樹立

PRMT1 遺伝子を loxP 配列で挟んだマウスと血管内皮細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウスとを交配することで、内皮細胞

特異的 PRMT1 欠損マウスを作出した。

内皮 PRMT1 欠損による生存率や形態への影響を評価した。

(2) マウスの組織血管の可視化による血管構造のイメージング解析

組織透明化試薬と2光子顕微鏡を用いた3次元での構造評価システムを構築した。

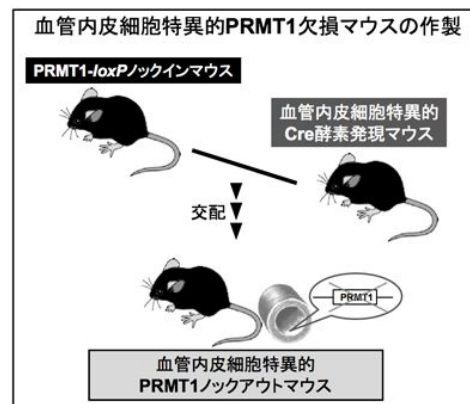
空間的な広がりをもつ血管の高次構造に対する内皮 PRMT1 欠損の影響を観察した。

4. 研究成果

(1) 内皮細胞特異的 PRMT1 ノックアウトマウスの樹立

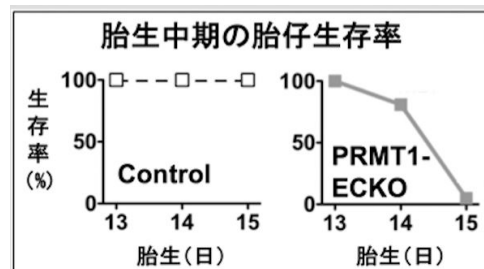
内皮 PRMT1 欠損マウスの作出:

・PRMT1 の全身性欠損は早期胎生致死を示す。そこで、栄養補給路での PRMT1 の機能を解明するため、内皮細胞特異的に PRMT1 を欠損するマウスを作製することとした。PRMT1 遺伝子の活性ドメインを loxP 配列で挟み込んだマウス (PRMT1-loxP マウス) を作製し、内皮細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス (内皮細胞特異的プロモーター (Tie2)-Cre マウス) と交配することで、血管内皮 PRMT1 欠損 (PRMT1-ECKO) マウスを作出した (下図)。

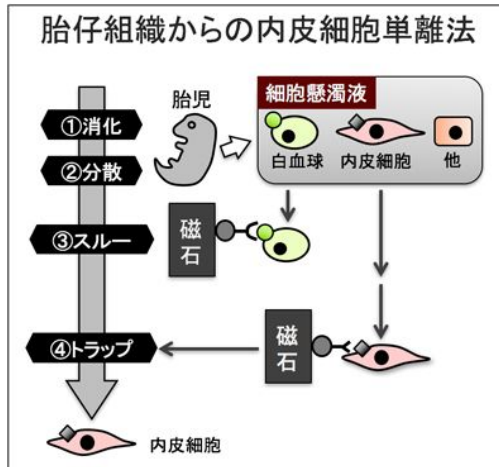


内皮 PRMT1 欠損による生存率や形態への影響評価:

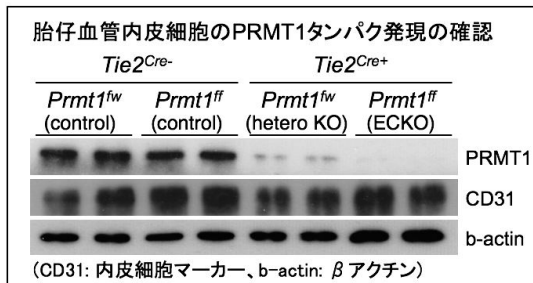
・産仔の尾部ゲノムを用いた遺伝子型解析から、PRMT1-ECKO マウスは産仔として得られないことが明らかとなった。そこで、PRMT1-ECKO マウスの胎生致死の可能性を考え、発生過程の胎仔の遺伝子型解析を行った結果、PRMT1-ECKO マウスは胎生15日目までに致死となることが判明した (下図)。



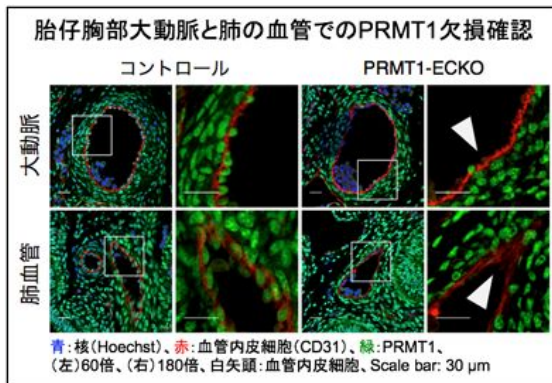
・PRMT1-ECKO 胎仔で、実際に血管内皮細胞の PRMT1 が欠損しているのかについて、磁気ビーズシステムを用いた胎仔の血管内皮細胞



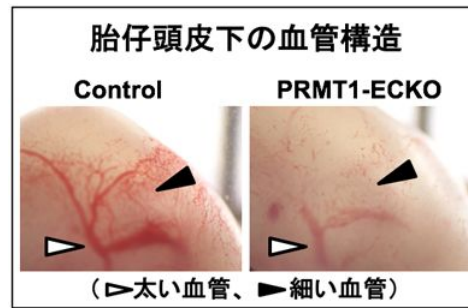
単離法を確立し(上図)、胎生 14 日目の胎仔から内皮細胞を回収、PRMT1 タンパク質の検出することで確認した(下図)。また、胎仔



の大動脈と肺血管の組織切片を作製し、組織免疫染色法で内皮細胞と PRMT1 を共染色したところ、PRMT1-ECKO マウスの内皮細胞(赤色)では、コントロールで主に核で緑色に染色されていた PRMT1 のシグナルが消失しており、血管内皮細胞特異的に PRMT1 が欠損されていることを確認した(下図)。



・胎生 14 日目では、胎仔で血管の分岐が活発に起こり、血管のネットワークが急速に発達する。そこで、妊娠 14 日目の頭皮下の血管形成に対する内皮 PRMT1 欠損の影響を検討した。コントロール群では、浅側頭動脈を含めた太い血管が明瞭に観察され、また、細かい血管が微細なネットワークを形成していたのに対し(右上図: 左パネル)、PRMT1-ECKO マウスでは太い血管が不明瞭であり、細かい血管が殆ど観察できなかった(右上図: 右パネル)。

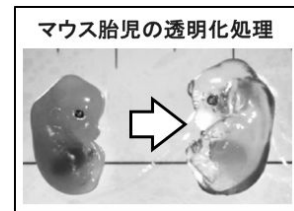


(2) マウスの組織血管の可視化による血管構造のイメージング解析

組織透明化試薬と2光子顕微鏡を用いた3次元での構造評価システムの構築:

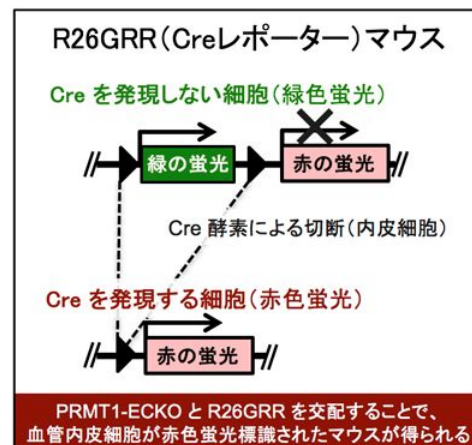
・血管の形態評価には、血管の大きさや形、分岐や伸長の程度などを検討し総合的に判断する必要がある。そのため本研究では、従来の組織切片を用いた評価に加え、「2光子顕微鏡」と「Scale A2 による組織透明化技術」

(右図)を用いた胎仔血管の3次元的な形態評価法を確立した。その際、胎仔血管のみを可視化するため、Cre レポーターマウス



ス(R26GRR マウス、Hasegawa *et al.* Exp Anim.2013、筑波大学生命科学動物資源センター 八神健一特任教授、杉山文博教授より供与)を活用した。

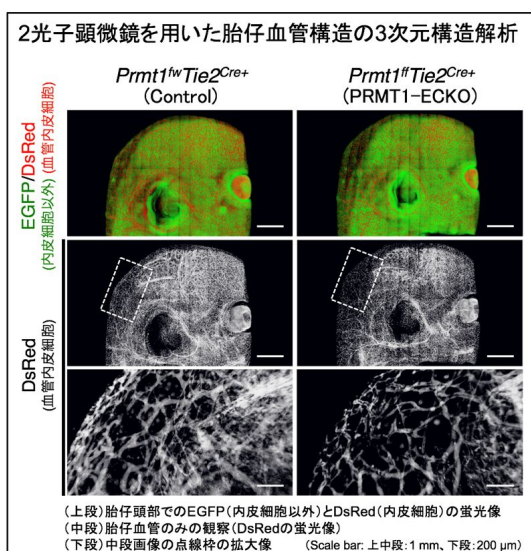
・R26GRR マウスでは、Cre 酵素による組換えが起きていない細胞では緑色の蛍光を、組換えが起こった細胞では赤色の蛍光を呈する(下図)。そこで、R26GRR マウスと PRMT1-ECKO マウスを交配し、胎仔血管を赤色蛍光で標識、2光子顕微鏡で3次元的に可視化することで、胎仔血管の詳細なネットワーク構造を観察した。



空間的な広がりをもつ血管の高次構造に対する内皮 PRMT1 欠損の影響の観察

・PRMT1-ECKO/R26GRR マウスの胎仔サンプル

を2光子顕微鏡で観察したところ、胎仔血管を深部まで観察することが出来、緑色の蛍光と赤色の蛍光が重なり合わず完全に分かれていることが示された(下図:上段)。そこで、胎仔頭部皮下の血管網を拡大観察したところ、PRMT1-ECKO マウスの胎仔では、コントロール胎仔と比較して、血管の網目構造が荒くなり、血管が分断されたような構造をとっている可能性が示された(下図:下段)。そこで、血管の長さや分岐を評価するために、画像解析ソフトウェア(AngioTool および WimTube)を用いた定量解析の結果、PRMT1-ECKO 胎仔の血管網では、血管の本数や面積、総延長の低下に加えて、血管の接合点の数が有意に減少していることが示され、PRMT1-ECKO マウスでは血管の分岐に異常が



あり、血管形成が低下していることが明らかになった。

本研究は、PRMT と栄養補給路の機能的ネットワークについて、胎生期に PRMT1 の発現が高い血管内皮細胞特異的に PRMT1 を欠損するマウスを樹立、解析した。R26GRR マウスを用いたターゲット細胞の蛍光標識技術、Scale A2 による組織透明化技術、そして、2光子顕微鏡を用いた観察技術を組み合わせることによって、血管内皮細胞の PRMT1 が、マウス胎仔期の血管網の構築を制御して胎仔の生存に必須であり、発生段階における栄養補給路での PRMT1 の重要性が初めて明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Ishimaru, T., Ishida, J., Kim, J.D., Mizukami, H., Hara, K., Hashimoto, M., Yagami, K.I., Sugiyama, F., and Fukamizu, A. Angiodysplasia in embryo lacking protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vascular endothelial cells. *J. Biochem.* 161, 255-258 (2017) 査読有り

2. Sha L, Daitoku H, Araoi S, Kaneko Y, Takahashi Y, Kako K, and Fukamizu A. Asymmetric arginine dimethylation modulates mitochondrial energy metabolism and homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* pii: MCB.00504-16 (2017) 査読有り

3. Hirota K, Shigekawa C, Araoi S, Sha L, Inagawa T, Kanou A, Kako K, Daitoku H, and Fukamizu A. Simultaneous ablation of prmt-1 and prmt-5 abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in *Caenorhabditis elegans*. *J. BioChem.* doi: 10.1093/jb/mvw101. (2017) 査読有り

4. Kanou A, Kako K, Hirota K, and Fukamizu A. PRMT-5 converts monomethylarginines into symmetrical dimethylarginines in *Caenorhabditis elegans*. *J. BioChem.* 161, 231-235 (2017) 査読有り

5. Egashira, Y., Takase, M., Watanabe, S., Ishida, J., Fukamizu A., Kaneko, R., Yanagawa, Y., and Takamori, S. Unique pH dynamics in GABAergic synaptic vesicles illuminates the mechanism and kinetics of GABA loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 10702-10707 (2016) 査読有り

6. Daitoku H, Kaneko Y, Yoshimochi K, Matsumoto K, Araoi S, Sakamaki J, Takahashi Y, and Fukamizu A. Non-transcriptional function of FOXO1/DAF-16 contributes to translesion DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 36, 2755-2766 (2016) 査読有り

7. Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, Nomura N, Kako K., Kobayashi A, Shimizu T, and Fukamizu A. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. *J. Cell Sci.* 129, 2382-2393 (2016) 査読有り

8. Hashimoto M, Murata K, Ishida J., Kanou A, Kasuya Y, and Fukamizu A. Severe hypomyelination and developmental defects are caused in mice lacking protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 291, 2237-2245 (2016) 査読有り

9. Murata, K., Ishida, J., Ishimaru, T., Mizukami, H., Hamada, J., Saito, C., and Fukamizu A. Lactation is a Risk Factor of Postpartum Heart Failure in Mice with Cardiomyocyte-specific Apelin Receptor (APJ) Overexpression. *J. Biol. Chem.* 291,

11241-11251 (2016) 査読有り

10. Kim JD, Park KE, Ishida J, Kako K, Hamada J, Kani S, Takeuchi M, Namiki K, Fukui H, Fukuhara S, Hibi M, Kobayashi M, Kanaho Y, Kasuya Y, Mochizuki N, and Fukamizu A. PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. Science Adv. 1, e1500615 (2015) 査読有り

〔学会発表〕(計 16 件)

(研究代表者の招待講演)

深水 昭吉、アルギニンメチル化酵素の特性解析 -PRMT1 と PRMT8-、第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会合同開催、平成 28 年 1 月 12 日、宮城県 仙台市

深水 昭吉、メチル化細胞生物学：小さな修飾、大きな作用、Advans 研究会 2015、平成 27 年 12 月 12 日、東京都 千代田区

深水 昭吉、代謝調節と遺伝子発現に関する研究、CVMW2015、平成 27 年 12 月 11 日、兵庫県 神戸市

深水 昭吉、メチル化の医科学：小さな修飾、大きな作用、Research PlaNet2015、平成 27 年 6 月 20 日、大阪府 大阪市

深水 昭吉、Methylation related to transcription and metabolism. 第 37 回日本基礎老化学会大会、平成 26 年 6 月 27 日、愛知県 知多郡

深水 昭吉、転写代謝システム：遺伝子発現とエネルギー分子のクロストーク、第 88 回日本内分泌学会学術総会、平成 26 年 4 月 25 日、東京都 千代田区

深水 昭吉、エピゲノムと代謝、第 87 回日本内分泌学会学術総会、平成 26 年 4 月 24 日、福岡県 福岡市

深水 昭吉、糖代謝とエピゲノム：リン酸化とメチル化の新展開、第 15 回分子内分泌代謝学セミナー、平成 26 年 2 月 17 日、東京都 文京区

深水 昭吉、メチル化反応と代謝機能の新しい接点、第 19 回アンジオテンシンカンファレンス、平成 26 年 2 月 1 日、大阪府 豊中市

深水 昭吉、Interface of methylation and metabolites. 第 2 回 IRG (inflammation and regeneration) Meeting、平成 26 年 1 月 17 日、東京都 港区

Fukamizu A. Crosstalk between Transcription and Metabolism. THE 4D NUCLEOME 2014、平成 25 年 12 月 17 日、広島県 廿日市市

深水 昭吉、メチル化の作用点と機能、第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会合同開催、平成 25 年 12 月 17 日、広島県 廿日市市

深水 昭吉、エピゲノムによる生体機能調節、第 18 回日本心血管内分泌代謝学会学

術総会、平成 25 年 11 月 22 日、神奈川県 横浜市

Fukamizu A. メチル化制御と遺伝子発現、第 12 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム、平成 25 年 10 月 31 日、埼玉県 日高市

深水 昭吉、メチオニン代謝と細胞機能のネットワーク、第 383 回東北医学会例会シンポジウム、平成 25 年 11 月 19 日、宮城県 仙台市

Fukamizu A. Stress responses and arginine methylation in *C. elegans*. International Symposium on Cellular Responses to Stress, 平成 25 年 4 月 3 日、北京市 (中国)

〔図書〕(計 6 件)

深水 昭吉 基礎老化研究、生物学的メチル化を介した寿命と老化、2017、(41) 19-21

石田 純治、水上 早瀬、権 哲源、深水 昭吉 循環器系の表現型解析 実験医学別冊、マウス表現型解析スタンダード、2016、177-183

廣田 恵子、深水 昭吉 羊土社、実験医学増刊 遺伝子制御の新たな主役 栄養シグナル、2016、2568-2573

大徳 浩照、深水 昭吉 メディカルビュー社、アンチエイジング医学の基礎と臨床、2015、52-53

金 俊達、深水 昭吉 羊土社、知る・見る・活かす！シグナリング研究 2015、1543-1547

波田 一誠、深水 昭吉 羊土社、老化・寿命のサイエンス、2013、3301-3305

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ：

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

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

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

石田 純治 (ISHIDA, Junji)

筑波大学・生命領域学際研究センター・講師

研究者番号： 30323257

加香 孝一郎 (KAKO, Koichiro)
筑波大学・生命環境系・講師
研究者番号： 60311594

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

杉山 文博 (SUGIYAMA, Fumihiro)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号： 90226481

粕谷 善俊 (KASUYA, Yoshitoshi)
千葉大学・医学系研究科・准教授
研究者番号： 70221877

(4)研究協力者

無し