

## 生命恒常性の維持におけるタンパク質アルギニンメチル化の役割

富山大学和漢医薬学総合研究所 研究開発部門 複雑系解析分野

金 俊達

### はじめに

生体内のタンパク質は、細胞内外の環境変化に応答して、リン酸化やアセチル化、メチル化などの様々な翻訳後修飾を受けることで、分子機能の変化や動的ネットワークの形成を引き起こし、環境適応や恒常性の維持を可能にしている。多細胞生物のメチル基転移酵素は、ゲノム遺伝子の 1% 前後にコードされていると考えられており、約 200 個程度が想定されていることから、複雑な生命現象において生体分子のメチル化は重要であると考えられる。哺乳類におけるメチル化アルギニン誘導体は、50 年以上も前に同定・単離されていたものの、タンパク質アルギニンメチル化の生理学的役割については未だ不明な点が多い。現在、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (protein arginine methyltransferase, PRMT) の同定や、メチル化を検出する解析技術の進歩により、ヒストン及び非ヒストンタンパク質におけるアルギニン残基のメチル化が転写制御や RNA プロセッシング、DNA 修復、シグナル伝達、エピゲノム制御など、細胞機能を制御して多岐に渡る生命現象に関与していることが明らかになりつつある。本稿では哺乳類の PRMT や、生体における PRMT を介したアルギニンメチル化の役割について紹介する。

### 1. アルギニンメチル化の触媒反応

タンパク質アルギニンメチル化酵素 (PRMT) は、酵母からヒトまで高度に保存されており、PRMT が *S*-アデノシルメチオニン (*S*-adenosyl-L-methionine, SAM) をメチル基供与体として、アルギニン側鎖の  $\delta$ -グアノジノ基に存在する  $\omega$ -窒素原子にメチル基が転移される反応を触媒する<sup>1)</sup>。哺乳類においては活性が報告された 9 種類の PRMTs が存在しており、酵素活性に必要な 4 つの特徴的なモチーフ (モチーフ I や post I, モチーフ II, モチーフ III) や THW ループ配列が保存されている<sup>2)</sup> (図 1)。

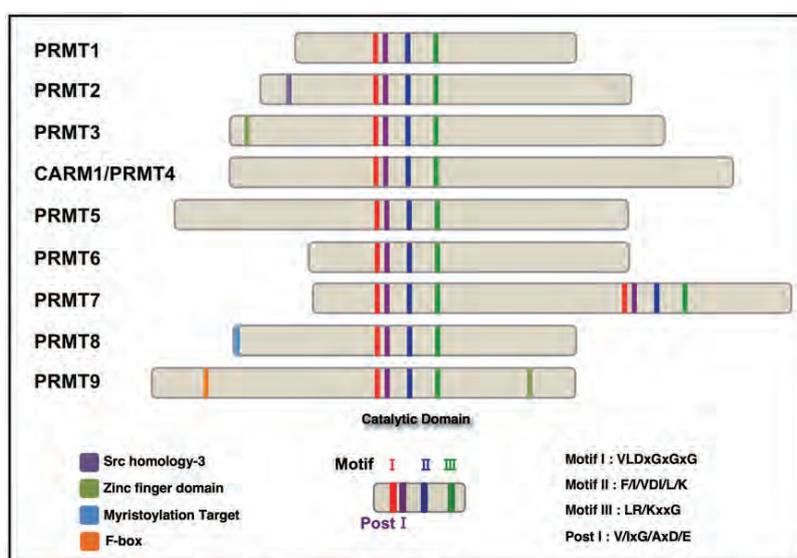


図1. タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (PRMTs) の構造

PRMTは、メチル基転移様式の違いからモノメチル化を経て、非対称型 (Type I)、または対称型 (Type II) にジメチル化する、2つのメチル化触媒様式に大別される (図2)。また、モノメチル化反応のみを触媒する Type III の PRMT も存在する。現在までに、非対称型の反応は PRMT1 および PRMT 3, PRMT 4, PRMT 6, PRMT 8 が触媒し、対称型ジメチル化は PRMT5 や PRMT7, PRMT9 の酵素がその役割を果たす。さらに、PRMT7 は基質によってモノメチル化反応のみを触媒する場合があります、Type III 酵素としても知られている<sup>3)</sup>。

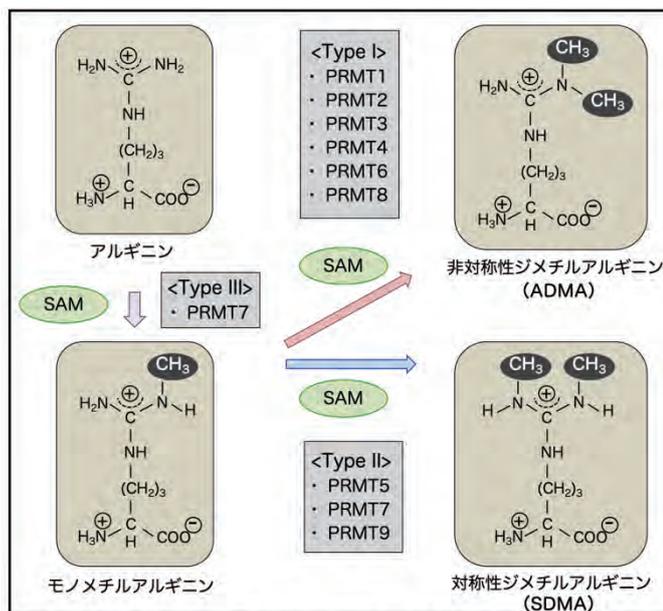


図2. PRMTによるアルギニン残基のメチル化反応

## 2. PRMTの標的配列

PRMTの基質となるタンパク質は、核内因子や細胞質タンパク質など、多彩なターゲットが知られている。その中でも、RNA結合タンパク質によく見られるアルギニンとグリシンの繰り返し配列 (RG および RGG, RGR) 等がメチル化基質としての嗜好性が高く、*in vitro*の反応系では高度にメチル化される<sup>4)</sup>。一方、ヒストンのようにアルギニンとグリシンの繰り返し配列を持たないタンパク質も数多くメチル化されることが明らかにされており、標的配列のルールについては、未だはっきりとした結論は得られていない。近年、RxR (xは任意のアミノ酸) も基質になり得ることが証明されており、幅広い基質特異性を有している。フォークヘッド転写因子・FOXO1は、インスリンや増殖因子によって活性化されるPKB/Aktによってリン酸化されることで核内から細胞質へ移行など重要な制御を受けている。このPKB/Aktによってリン酸化されるセリン残基またはスレオニン残基の配列がRxRxxS/Tであり、このコンセンサス配列中のRxRにPRMT1によってジメチル基が付加され、リン酸化が阻害されることが判明し<sup>5)</sup>、細胞生理機能にとって重要なPKB/Aktシグナルとアルギニンメチル化がクロストークする初めての例となっている。

## 3. アルギニンメチル化と細胞機能

### (1) 転写共役因子とアルギニンメチル化

転写共役因子 EWS (Ewing sarcoma) は、核内でCBP (CREB binding protein)と協調して転写因子 HNF4の活性を上昇させる<sup>6)</sup>。EWSの分子内にはアルギニンとグリシンの繰り返し配列が保存されており、PRMT1によってメチル化されたEWSは、その局在を核から細胞質に変化させることで機能が抑制される<sup>7)</sup>。また、PRMT1はRGGドメインを持つコアク

チベーター PGC-1 $\alpha$ をメチル化し、この反応が ER 依存的な PGC-1 $\alpha$ の転写活性化に必須であることが明らかになっている<sup>8)</sup>。さらには、転写共役因子 CBP/p300 が CARM1/PRMT4 によってメチル化され、それが転写制御に重要な役割を果たすことが知られている。CARM1/PRMT4 による p300 のアルギニンメチル化は、核内受容体アンドロゲンレセプター (AR) 依存的な転写を正に制御するのに対し、CREB (cAMP response element-binding protein) 依存的な転写は負に制御することで、アルギニンメチル化が転写共役因子による転写 On/Off のスイッチになる<sup>9),10)</sup>。一方、コリプレッサーである RIP140 (receptor interacting protein 140) はメチル化修飾を受けることで、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC と相互作用の減弱が生じることや、核から細胞質への局在変化が誘導されることによってリプレッサーとしての機能が抑制される<sup>11)</sup>。このように PRMT を介した転写共役因子のアルギニンメチル化は、遺伝子発現制御の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

## (2) エピゲノム制御とアルギニンメチル化

アルギニンメチル化が関与するエピゲノム制御としては、ヒストン修飾の研究が進展しており、PRMTs によるヒストンのメチル化 (writer) と、そのメチル化状態を転写装置に伝達するアダプター因子 (reader) が明確になっている。PRMT1 による H4R3 の非対称型のジメチル化がアセチル化を促進する<sup>12)</sup>。また、PRMT2 による H3R8, CARM1/PRMT4 が H3R17 を、PRMT6 は H4R3 をジメチル化して転写を活性化する<sup>13),14),15)</sup>。一方、PRMT5 による H3R2, H3R8 と H4R3 の対称型のジメチル化や、PRMT6 による H3R2 の非対称型のジメチル化は、転写抑制に関与するヒストンのアルギニンメチル化である。しかし、ヒストンの非対称型と対称型のジメチル化がどのように転写調節を行なっているか分子機序の全容は明らかではない。上記の writer として PRMT1 や CARM1/PRMT4 が H4R3 および H3R17 をジメチル化して転写を活性化するが、ジメチル化の目印を認識するものがあるのかは長く不明であった。2010 年、Yang らによって Tudor ドメインを有する TDRD3 がヒストンのアルギニンメチル化を認識するタンパク質である可能性が示された<sup>16)</sup>。これらの発見によって、エピゲノム制御に関するアルギニンメチル化の新しい関与の議論が始まっている。

## (3) DNA 損傷応答とアルギニンメチル化

様々なストレスによって DNA は損傷を受けており、細胞内には様々な形で DNA の損傷を修復する仕組みが備わっている。ストレスを受けた細胞では、p53 タンパク質が DNA 障害ストレスに応答し、転写因子として DNA 修復や細胞周期停止、アポトーシス関連遺伝子の発現を制御する<sup>17)</sup>。p53 タンパク質は PRMT5 によってメチル化され、アポトーシス誘導能を抑制すると報告がある一方、PRMT5 による p53 タンパク質のメチル化は標的遺伝子の一つである p21 タンパク質の発現を上昇させることで、細胞周期停止能を活性化させる<sup>18)</sup>。これは PRMT5 を介した p53 タンパク質のメチル化がアポトーシス誘導と細胞周期停止の機能におけるスイッチの役割を有することとして考えられる。また、相同組換え修復と非相

同末端結合修復反応の両方に関与する DNA 修復酵素 MRE1 の修復活性には PRMT1 によるメチル化が重要な役割を果たすことが明らかになっている<sup>19)</sup>。これに加え、塩基除去修復に関わる DNA ポリメラーゼβが PRMT1 及び PRMT6 によってアルギニンメチル化され、塩基除去修復を正に制御する<sup>20),21)</sup>。

#### 4. アルギニンメチル基転移酵素の生物学的意義

哺乳類の PRMT については、現在 PRMT1 から PRMT8 まで遺伝子欠損マウスが作製され、多くの研究成果により PRMT を介したタンパク質アルギニンメチル化の生物学的意義が明らかになりつつある<sup>3)</sup>。ADMA や SDMA を触媒する主要な酵素である PRMT1 や PRMT5 の遺伝子欠損マウスは胚性致死を示しており<sup>22),23)</sup>、生命の発生段階からアルギニンメチル化が重要な翻訳後修飾であることが示唆されているもののアルギニンメチル化の生体機能の研究は長年滞っていた。このような中、細胞内の 85% のアルギニンメチル化反応に寄与すると考えられている PRMT1 は、世界に先駆けて組織特異的な PRMT1 KO マウスを作製・解析され、心筋細胞での PRMT1 遺伝子の欠損は若年性拡張性心不全が発症して生後 2 ヶ月までに死亡すること、また神経細胞での欠損は髄鞘形成不全によって正常な脳の発達ができなくなり生後 10 日前後に死亡することや、血管内皮細胞の欠損では胎生 14 日から致死になることが明らかになっている<sup>24),25),26)</sup>。

PRMT1 と最も高いアミノ酸の相同性 (83%) をもつ PRMT8 は、翻訳中 N-末端の脂肪酸修飾を介して唯一細胞膜に局在し、その発現組織は脳神経系に限局されるという特徴を有する<sup>27)</sup>。PRMT8 KO マウスは、小脳神経細胞であるプルキンエ細胞の樹状突起発達や運動機能に顕著な異常を示し、神経細胞の発達や、脳機能の制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった<sup>28)</sup>。全ての PRMTs は、メチル

基供与体 SAM と結合する「GxGxG モチーフ」を持ち、グリシンをアラニンに置換する点変異によって、その活性を失うことが知られている<sup>29)</sup>。一方、リン脂質ホスファチジルコリンを分解するホスホリパーゼ D (PLD) ファミリーは、「HKD モチーフ」を活性中心とし、リジンがアルギニンに置換すると不活性になる<sup>30)</sup>。興味深いことに、PRMT8 には、「GxGxG モチーフ」と「HKD モチーフ」が重複して保存されており (図 3)、PRMT1 と同様の基質特異性を持つアルギニンメチル化酵素であることに加え<sup>31)</sup>、リン脂質分解酵素活性を有する

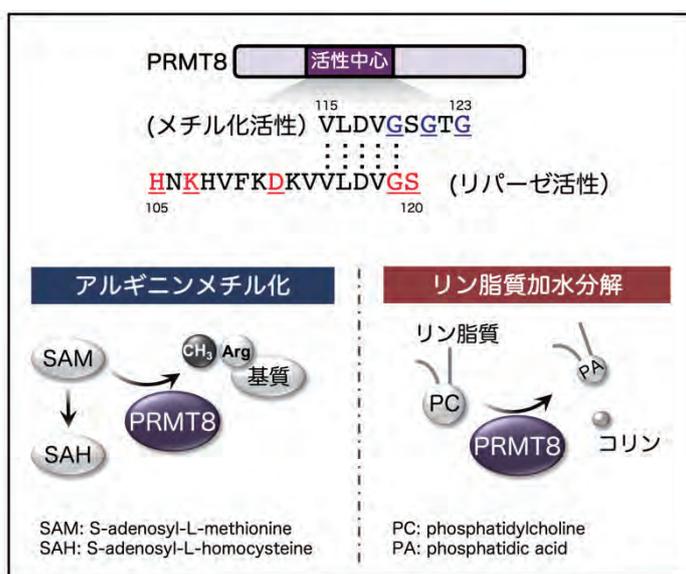


図3. PRMT8のメチル化活性とリパーゼ活性

ことで、細胞膜の主要なリン脂質であるホスファチジルコリンから、ホスファチジン酸とコリンを産生し、樹状突起の発達や神経伝達物質の代謝を介して運動機能を制御する<sup>28)</sup>。

## 5. 非対称型ジメチルアルギニン (ADMA) の生理学的役割

メチル化されたタンパク質は、分解に伴って対称型ジメチルアルギニン (SDMA) と非対称型ジメチルアルギニン (ADMA) のメチル化アルギニン誘導体として血中を循環し、尿中で排出される。中でも ADMA は、血管の弛緩作用に働く一酸化窒素 (NO) の内皮型産生酵素 (endothelial NO synthase, eNOS) の阻害分子として内皮細胞の機能障害や血管収縮を誘導することが知られている (図 4)。内皮細胞は、酸素や栄養素を全身へ循環させる血管の形成とその働きに必須であり、発生・発達中の哺乳類では内皮細胞が起点となって血管新生を進展させていく。血管内皮細胞の機能をつかさどる分子の一つとして、血管内皮型 eNOS が重要な働きをしていることが知られており、血管内皮細胞から分泌された NO は平滑筋を弛緩させ、これによって血圧や血流が調節される。一方、メチル化タンパク質の分解によって遊離する ADMA が eNOS に対して強力な阻害作用を示す<sup>32)</sup>。さらに、血管内皮細胞の NO 産生の低下は、血管壁の炎症性増殖性変化を誘導や単球の血管壁への侵入を許し、血管内皮機能の障害が生じることによって炎症性疾患病変が発生する<sup>33)</sup>。従って、メチルアルギニン産生の仕組みの理解は、体内における血圧制御機構や、その破綻による疾患発症の分子機序として創薬のターゲットの可能性を秘めてことから臨床的重要性を有する。

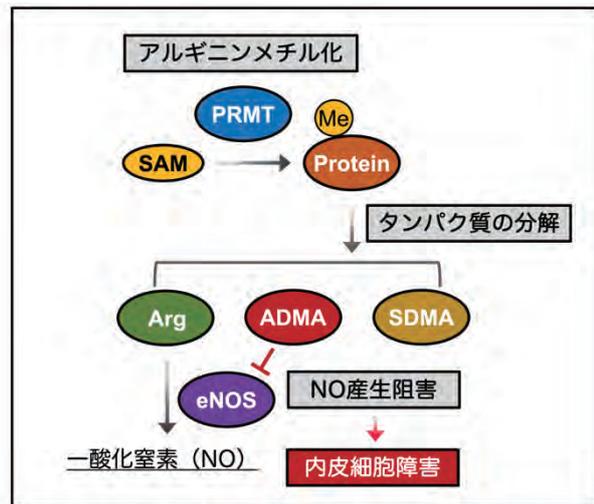


図4. 非対称型ジメチルアルギニンと内皮細胞の障害

おわりに

細胞内では、リン酸化が最もメジャーなタンパク質の翻訳後修飾である一方、アルギニンメチル化がそれに次ぐ修飾反応であることが報告された<sup>34)</sup>。ヒストンを中心とするリジン残基のメチル化酵素の研究と比べるとその進展はゆっくりではあるが、PRMTs を介したアルギニンメチル化の細胞生物学的機能は、ヒストンおよび多くの非ヒストンタンパク質が PRMT の基質として明らかとなり、一定の理解が進んでいる。PRMT の新規基質に関する報告は日々更新されており、現在不明である PRMT10 と PRMT11 の酵素活性や基質特異性も同定されていくであろう。今後も PRMT 遺伝子の組織特異的なノックマウスや、CRISPR/Cas9 システムなどのゲノム編集技術を利用したマウスの作製や、個体機能の解析を通して、PRMT を介したアルギニンメチル化の役割解明に進展することが期待される。

## 文献

- 1) Paik, W.K., Paik, D.C., & Kim, S., *Trends Biochem. Sci.*, 32, 146-152, 2007.
- 2) Bedford, M.T. & Richard, S., *Mol. Cell*, 18, 263-272, 2005.
- 3) Blanc, R.S. & Richard, S., *Mol. Cell*, 65, 8-24, 2017.
- 4) Najbauer, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 15, 10501-10509, 1993.
- 5) Yamagata, K., et al., *Mol. Cell*, 32, 221-231, 2008
- 6) Araya, N., et al., *J. Biol. Chem.*, 14, 5427-5432, 2003.
- 7) Araya, N., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 8, 653-660, 2005.
- 8) Teyssier, C., et al., *Genes Dev.*, 19, 1446-1473, 2005.
- 9) Xu, W., et al., *Science*, 21, 2507-2511, 2001.
- 10) Chevillard-Briet, M., et al., *EMBO J.*, 21, 5457-5466, 2002.
- 11) Huq, M.D.M., et al., *EMBO J.*, 25, 5094-55104, 2006.
- 12) Li, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 287, 40641-40651, 2012.
- 13) Blyth, S.A., et al., *Dev. Cell*, 19, 220-231, 2010.
- 14) Neault, M., et al., *Nucleic Acids Res.*, 19, 9513-9521, 2012.
- 15) Ma, H., et al., *Curr. Biol.*, 11, 1981-1985, 2001.
- 16) Yang, Y., et al., *Mol. Cell*, 40, 1016-1023, 2010.
- 17) Toledo, F. & Wahl, G.M., *Nat. Rev. Cancer*, 6, 909-923, 2006.
- 18) Jansson, M., et al., *Nat. Cell Biol.*, 10, 1431-1439, 2008.
- 19) Boisvert, F-M., et al., *Mol. Cell Proteomics*, 2, 1319-1330, 2003.
- 20) El-Andaloussi, N., et al., *FASEB J.*, 21, 26-34, 2007.
- 21) El-Andaloussi, N., et al., *Mol. Cell*, 22, 51-62, 2006.
- 22) Pawlak, M.R., et al., *Mol. Cell. Biol.*, 20, 4859-4869, 2000.
- 23) Tee, W.W., et al., *Gens Dev.*, 24, 2772-2777, 2010.
- 24) Hashimoto, M., et al., *J. Biol. Chem.*, 295, 2237-2245, 2016.
- 25) Ishimaru, T., et al., *J. Biochem.*, 161, 255-258, 2017.
- 26) Murata, K., et al., *iScience*, 26, 200-213, 2018.
- 27) Lee, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 280, 32890-32896, 2005.
- 28) Kim, J.D., et al., *Sci. Adv.*, 1, e1500615, 2015.
- 29) Kaga, R.M., et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 310, 417-427, 1994.
- 30) Xie, Z., et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 24962-24969, 2000.
- 31) Kim, J.D., et al., *Int. J. Mol. Med.*, 22, 309-315, 2008.
- 32) Karbach, S., et al., *Curr. Pharm. Des.*, 20, 3579-3594, 2014.
- 33) Ueda, S., et al., *J. Nephrol.*, 23, 377-386, 2010.
- 34) Larsen, S.C., et al., *Sci. Signal.*, 9: rs9., 23, 2016.