

## 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 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658283

研究課題名（和文） 微小多細胞生物を用いた寿命機構の生化学的研究

研究課題名（英文） Biochemical studies on longevity using multicellular microorganism

研究代表者

深水 昭吉 (FUKAMIZU AKIYOSHI)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60199172

研究成果の概要（和文）：

体長 1 mm の線虫は、遺伝学を駆使できる多細胞モデル生物として優れており、細胞死や寿命等と遺伝子機能の関わりを調べるために活用されている。一方、*in vitro* のタンパク質合成系や質量分析等の解析技術が革新的に進歩しており、タンパク質機能の変化を生化学的に捉えることが重要である。本研究では、従来の遺伝学的手法と組み合わせ、線虫を生体材料とした生化学的アプローチから、タンパク質の翻訳後修飾の一つであるアルギニン残基の非対称的なジメチル化反応の寿命機構の解明に取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：

*Caenorhabditis elegans*, about 1 mm-long round worms, is a model organism with genetic advantages and used for the studies on cell death and longevity. On the other hand, as the technologies such as *in vitro* protein synthesis and Mass spectrometry are innovatively advanced, it becomes important to understand the biochemical functions of proteins. In the present study, combined with genetics and biochemistry, we tried to examine the reactions of protein arginine methylation related to longevity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：線虫、アルギニンメチル化反応、細胞機能

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、アルギニンメチル化の生命機能に興味を持ち、哺乳類のメチル基転移酵素 1 (PRMT1) がフォークヘッド転写因子・Foxo1 を活性化することを証明した (*Mol. Cell* 2008)。しかし、PRMT1 が血管

発生に関与するため、遺伝子欠損マウスは早期胎生致死 (*Mol Cell Biol*, 2000) になり、個体機能の解明が行き詰まっている。そこで、申請者は、血管は持たないが、基本的な生物構造を有する線虫を用いることで、アルギニン残基の非対称的なジメチル化反

応が解析可能になるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

PRMT1 と相同性を持つ遺伝子機能について線虫では報告されていないため、ゲノムデータベースから約 65%の相同性を有するクローンを単離し、PRMT-1 と命名した。また、本遺伝子の null mutant を CGC (線虫ゲノムセンター) より入手し、backcross によって系統を確立した。

線虫の寿命は、インスリンシグナルの低下によって Foxo1 の ortholog である daf-16 を介して延長されることが遺伝学的に証明されている。そこで本研究は、従来の遺伝学的手法と組み合わせ、線虫を生体材料とした生化学的アプローチから、アルギニン残基の非対称的なジメチル化反応の寿命機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種変異体を用いた遺伝学的解析

○ N2 (野生型), *prmt-1(ok2710)*, *daf-2(e1370)*, *daf-2(e1370);prmt-1(ok2710)*, *daf-2(e1370);daf-16(mu86)*を用い、以下のパラメーターを測定:

- ・寿命測定 (各1ヶ月~2ヶ月)
- ・25°C、22.5°C (semi-permissive temperature) 下での dauer formation の検討

### (2) 各種変異体を用いた生化学的解析

○ 各 *prmt* 変異体と野生型の線虫個体から全タンパク質を抽出:

- ・酸加水分解後に陽イオン交換カートリッジを用いて分画
- ・6-aminoquinoryl 基でアミノ基を標識して HPLC で分離し、標準試薬 (MMA、ADMA、SDMA) の保持時間に溶出した各ピークを分取
- ・MALDI-QIT-TOF/MS (当該研究センターに設置済み) にて MS<sup>n</sup> 解析を行い、各メチル化アルギニンを正確に同定

○ N2 (野生型), *daf-2(e1368)*, *daf-2(e1368);daf-16(mu86)*, *daf-2(e1368);prmt-1(ok2710)*を用い、以下のパラメーターを測定:

- ・*daf-16*標的遺伝子 (*sod-3*, *mtl-1*) の mRNA 量を Real time PCR で検討
- ・脂質染色 (Sudan Black 染色) による脂質代謝の変動に関する検討
- ・ADMA 測定、N2 と *daf-2(e1368)*との比較

## 4. 研究成果

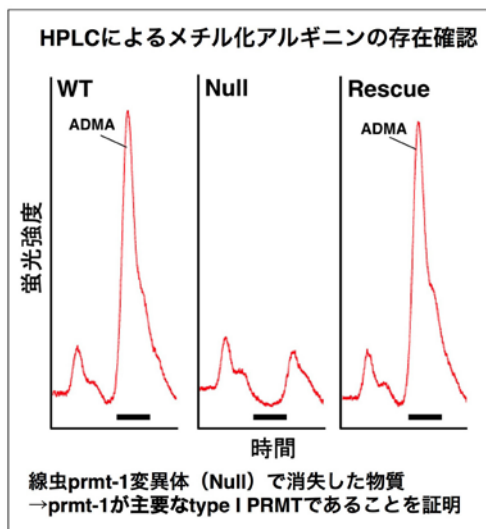
### (1) 各種変異体を用いた遺伝学的解析

N2 (野生型)、*prmt-1(ok2710)*、*daf-2(e1370)*、*daf-2(e1370); prmt-1(ok2710)*、*daf-2(e1368)*、及び *daf-2(e1368); prmt-1(ok2710)*を用い、定法に従って寿命を測定した。*daf-2(e1370)*変異体はキナーゼドメイン中に点変異を有し、リガンドドメイン中に点変異を有する *daf-2(e1368)*変異体よりも強い表現型を示す。このことから、*daf-2(e1370)*変異体は *daf-2(e1368)*変異体よりも、下流因子のリン酸化やシグナル伝達が減弱しているとされている。そこで、*daf-2(e1370); prmt-1(ok2710)* と *daf-2(e1368); prmt-1(ok2710)*の二重変異体を作製した。寿命測定を行った結果、*prmt-1* の欠損は、*daf-2(e1368)*変異体の寿命を短縮させるのに対し、*daf-2(e1370)*の寿命を短縮させなかった。これらの結果から、*daf-2(e1368)*変異体では PRMT-1 が関与する DAF-2 から DAF-16 へのシグナル経路が寿命制御に重要であることが示唆された。一方、*daf-2(e1370)*変異体では、PRMT-1 の作用を含むシグナル経路が既にシャットダウンされていることが予想された。

### (2) 各種変異体を用いた生化学的解析

N2 (野生型)、*prmt-1(ok2710)*、*daf-2(e1368)*、*daf-2(e1368); prmt-1(ok2710)*、及び *daf-2(e1368);daf-16(mu86)*を用い、以下の

パラメーターを測定した。メチル化アルギニン測定した結果、*prmt-1* 変異体において ADMA が検出されなかったことから、PRMT-1 が線虫体内における主要な ADMA 産生酵素であることが明らかになった。野生型と *daf-2* 変異体において、その差はなかった。



寿命測定では、*prmt-1* 変異体は野生型に比べて有意に寿命が短縮した。また、その *prmt-1* の欠損は *daf-2(e1368)* 変異体の寿命も短縮させたが、*daf-16* 欠損変異体の寿命は短縮させなかったことから、PRMT-1 は DAF-16 の上流において、線虫の寿命を制御していることが明らかになった。一方、脂肪蓄積の検討を検討した結果、*daf-2* 変異体における脂肪蓄積が、*prmt-1* の欠損によって抑制された。また、DAF-16 標的遺伝子 (*sod-3*, *mtl-1*) の mRNA 量の検討では、*prmt-1* 欠損変異体において、DAF-16 標的遺伝子の発現量が野生型に比べ減弱していた。以上の結果から、PRMT-1 が DAF-16 の転写活性化能の亢進を介して、線虫の寿命、脂肪蓄積を制御していることが示唆された。

##### 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 4 件)

- 1) Tamiya, H., Hirota, K., Takahashi, Y., Daitoku, H., Kaneko, Y., Sakuta, G., Iizuka, K., Watanabe, S., Ishii, N., and Fukamizu A. Conserved SAMS function in regulating egg-laying in *C. elegans*. **J. Recept. Signal Transduc.** 33, 56-62 (2013), Doi: 10.3109/10799893.2012.756896, [査読有り]
- 2) Nagashima Y., Kako K., Kim JD., and Fukamizu A. Enhanced histamine production through the induction of histidine decarboxylase expression by phorbol ester in Jurkat cells. **Mol. Med. Rep.** 6, 944-948 (2012), Doi: 10.3892/mmr.2012.1049, [査読有り]
- 3) Shirakawa, T., Kako, K., Shimada, T., Nagashima, Y., Nakamura, A., Ishida, J., and Fukamizu, A. Production of free methylarginines via the proteasome and autophagy pathways in cultured cells. **Mol. Med. Rep.** 4, 615-620 (2011), Doi: 10.3892/mmr.2011.488, [査読有り]
- 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., and Fukamizu, A. Asymmetric Arginine Dimethylation Determines Life Span in *C. elegans* by Regulating Forkhead Transcription Factor DAF-16. **Cell Metab.** 13, 505-516 (2011), Doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.017, [査読有り]

[学会発表] (計 7 件)

- 1) Tamiya, H., Hirota, K., Takahashi, Y., Daitoku, H., Ishii, N., and Fukamizu, A. : S-adenosylmethionine synthetase SAMS-1 regulates brood size in *C. elegans*. 18<sup>th</sup> International *C.elegans* Meeting, University of California, アメリカ、平成 23 年 6 月 22 日
- 2) 田宮寛子、廣田恵子、高橋悠太、大徳浩照、石井直明、深水昭吉 : 線虫

*S-adenosylmethionine synthetase-1* の産卵数制御機構の解析 第 34 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日

3) 永島裕介、加香孝一郎、金 俊達、深水昭吉 : Jurkat 細胞におけるホルボ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、京都大学、2012 年 06 月 08 日

4) Sakuta, G., Tamiya, H., Hirota, K., Takahashi, Y., Daitoku, H., Kaneko, Y., Iizuka, K., and **Fukamizu, A.** : The promoter region of *sams-1* gene plays an important role in determining brood size regulation. 5<sup>th</sup> East Asia *C. elegans* Meeting、Chientan Youth Activity Center、台湾、平成 24 年 6 月 28 日

5) 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 回活性アミンに関するワークショップ、北海道医療大学、2012 年 8 月 24 日

6) Sakuta, G., Takahashi, Y., Hirota, K., Daitoku, H. and **Fukamizu, A.** : Regulation of *S-adenosylmethionine synthetase-1* gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*、第 35 回日本分子生物学会、福岡国際会議場、2012 年 12 月 11 日

7) 永島裕介、加香孝一郎、金 俊達、深水昭吉 : Jurkat 細胞におけるホルボ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、福岡国際会議場、2012 年 12 月 15 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深水昭吉 (FUKAMIZU AKIYOSHI)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号 : 60199172