

線虫を用いたスクリーニングによる タンパク質対称型アルギニンジメチル化酵素の同定に関する研究

筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻

学籍番号 201430291

狩野明彦

研究指導教員 深水昭吉教授

背景

タンパク質はリジン、アルギニン、ヒスチジン残基にメチル化修飾を受ける。タンパク質メチル化は多様な生物種で報告されていることから、基礎的な生命現象に関与すると考えられている。そこで、生体内でタンパク質メチル化修飾を担う主要な酵素を探索した。

たとえば、タンパク質のリジン残基はモノメチル化、ジメチル化、トリメチル化という三種類のメチル化修飾を受ける。多様な基質のなかでも、リジンメチル化修飾が転写の活性化と不活性化の両方の制御をすると示されていることから、ヒストンが重要とされている。

一方、タンパク質のアルギニン残基はモノメチルアルギニン(MMA)、非対称型ジメチルアルギニン(ADMA)、対称型ジメチルアルギニン(SDMA)の三種類のメチル化修飾を受ける。この反応を触媒する酵素はタンパク質アルギニンメチル基転移酵素(PRMT)ファミリーと名付けられており、これまでに、*in vitro*の研究から PRMT1 は ADMA 化を、PRMT5 は SDMA 化を行うことが分かっている。また、*prmt1* 遺伝子もしくは *prmt5* 遺伝子を欠損したマウスが胎生致死を示すことから、この二つのメチル化酵素がタンパク質アルギニンメチル化に関して最も重要であると考えられてきた。しかし、生物個体内でアルギニンメチル化酵素活性の評価はこれまでに、線虫の PRMT-1 のみで行われている。

加えて、ヒスチジンメチル化修飾は、比較的古くから知られている翻訳後修飾であり、ミオシン軽鎖タンパク質やアクチンなどに存在すると報告されている。近年、出芽酵母において HPM1 という酵素がリボソームタンパク質 RPL3 のヒスチジン残基をメチル化することが示された。しかし、他のヒスチジンメチル化される基質は、その責任酵素が未解明である。

結果

本研究では、線虫のメチル基転移酵素をノックダウンすることで新たなタンパク質メチル基転移酵素の取得を目指した。線虫は、dsRNA を食べさせることで遺伝子の発現を抑制できる。加えて、線虫は遺伝子の機能を個体レベルで評価できることから、ノックダウンスクリーニングに適切な実験材料であると言える。

タンパク質中のメチルアミノ酸を定量することで、メチル基転移酵素活性の評価する計画を立てた。しかし、アミノ酸は水溶性が高く、単純な逆相カラムを用いた分析が困難である。そこで逆逆相のカラムと LC-MS/MS を利用し分析した。そして、モノメチルリジン、ジメチルリジン、トリメチルリジン、MMA、ADMA、SDMA、メチルヒスチジンを同時に定量する系を構築した。

230 遺伝子をノックダウンスクリーニングに付し、メチル基転移酵素活性を評価した。その結果、ADMA が減少した遺伝子として Y113G7B.17、SDMA が減少した遺伝子として C34E10.5 を見出した。これらの配列はそれぞれ *prmt-1* 遺伝子と *prmt-5* 遺伝子をコードしていた。リジン側鎖およびヒスチジン側鎖に対するメチル基転移酵素は得られなかった。

ノックダウンスクリーニングの結果が非特異的な現象ではないことを確認するため、*prmt-1* 遺伝子と *prmt-5* 遺伝子の欠損変異体線虫のメチルアミノ酸を定量した。その結果、*prmt-1* 遺伝子欠損変異体線虫では ADMA の消失と MMA の減少が見られた。また、*prmt-5* 遺伝子欠損変異体線虫では SDMA が消失したが、MMA は野生型線虫と同程度検出された。当研究室の先行研究では、PRMT-1 が線虫個体内でほぼ全ての ADMA 化を行っていることが示されている。また、他のグループによる *in vitro* の実験から、PRMT-1 と PRMT-5 が、それぞれ基質のアルギニン側鎖を MMA 化し、そして ADMA 化もしくは SDMA 化することが示されていた。しかし、本研究で初めて、線虫の個体内において PRMT-1 がタンパク質の ADMA 化だけでなく、MMA 化を担っていることが示唆された。一方で、PRMT-5 は生体内で全ての SDMA 化を行っているが、MMA 化には寄与していないことも新たに分かった。

考察

多様なタンパク質が、リジン、アルギニン、ヒスチジンの側鎖にメチル化修飾を受け、活性を制御される。しかし、生体内におけるメチル化酵素の寄与は必ずしも明らかではない。

私はメチル基転移酵素ノックダウンスクリーニングを行った。メチル基転移酵素 RNAi ライブラリーの拡充と内訳の推定、および LC-MS/MS を用いたスクリーニングの結果、PRMT-1 と PRMT-5 がそれぞれ主要な ADMA 化、SDMA 化酵素であることを見出した。一方、本手法では主要なタンパク質リジンメチル基転移酵素とタンパク質ヒスチジンメチル基転移酵素は取得できなかった。リジン、ヒスチジンに対するメチル基転移酵素はヒストン、リボソーム、ミトコンドリアなど、限定した基質におけるメチル化アミノ酸の減少の評価を行えば、取得できるかもしれない。

つづいて、*prmt-1* 遺伝子と *prmt-5* 遺伝子を欠損した変異体線虫と野生型線虫のメチルアミノ酸を比較することで、PRMT-1 が ADMA 化だけでなく、MMA 化に大きな寄与をしていること、一方、PRMT-5 は SDMA 化の量だけを制御していることを新たに示した。PRMT-1、PRMT-5 以外に主要なアルギニンメチル化酵素が存在するかどうかは今後の課題である。