

## 61. アルギニンメチル化が担うミトコンドリア制御と心機能

深水 昭吉

\*筑波大学 生命領域学際研究 (TARA) センター

Key words : アルギニンメチル化, PRMT1, 心臓機能, ミトコンドリア

### 緒言

現在、循環器疾患は我が国の主な死因のひとつであり、中でも心不全は、未だ根本的な治療法は確立されておらず、罹患数は増え続けており、経済的にも社会の大きな負担となっている。近年、心臓におけるタンパク質のエピジェネティックな変化と、心臓の機能低下との関連が注目されつつあるが詳細は不明である。

アルギニンメチル基転移酵素 PRMT1 は、タンパク質のアルギニン残基をメチル化する主要な酵素であり、2段階のメチル化反応を経て、非対称性ジメチルアルギニンを産生する。これまでに *in vitro* において、PRMT1 はヒストンや転写因子、RNA 結合タンパク、リン酸化酵素をメチル化することで、転写やスプライシング、シグナル伝達を制御すると考えられている [1]。一方、*in vivo* で PRMT1 が多くの組織に発現していることが知られているが、全身 *Prmt1* 欠損マウスが胎生致死を示すことから [2]、各組織における機能はこれまで不明であった。我々は 生体内での PRMT1 の機能を解明するため、組織特異的 *Prmt1* 欠損マウスを作出し、神経幹細胞特異的 *Prmt1* 欠損マウスの解析から PRMT1 がオリゴデンドロサイトの分化成熟過程を制御すること [3]、また、内皮細胞特異的 *Prmt1* 欠損マウスの解析から PRMT1 が発生段階の正常な血管網構築に必須であること [4] を明らかにしてきた。

最近、PRMT1 について、線虫を用いたメチル化基質のスクリーニングにより、新規の候補タンパク質を同定したところ、ミトコンドリアに局在し、ATP 合成やミトコンドリアストレス応答を担うタンパク質が得られた [5]。ミトコンドリアはエネルギー産生を担う細胞内小器官であり、その機能異常は、心臓や脳などのエネルギーを多く消費する臓器の障害へと繋がる。これまでに、*prmt-1* 欠損線虫では ATP 産生能が著しく低下し、また、線虫メタボローム解析からも *prmt-1* の欠損により代謝が全体的に低下するという現象を見出している (未発表)。興味深いことに、心疾患時に心臓の PRMT1 の発現が上昇することが報告されているが [6]、心臓における PRMT1 の役割、また、ミトコンドリア機能に対する生理的意義については不明であり、アルギニンメチル化によるミトコンドリア機能のエピジェネティックな制御メカニズムは解明されていない。そこで、本研究は、『PRMT1 によるアルギニンメチル化が担うミトコンドリア制御を解明し、心機能に関する新たな分子機構の確立を目指す』ことを目的とした。

### 方法

#### 1. 心臓組織での PRMT1 発現細胞種の確認

C57BL/6J マウス新生仔の心臓から、心筋細胞と、非心筋細胞を単離し、抗 PRMT1 抗体を用いて、ウェスタンブロットティングを行った。

#### 2. 心筋細胞特異的 *Prmt1* 欠損マウスの作製

PRMT1 のメチル化酵素活性に重要なエクソン 4 および 5 の両側に loxP 配列を挿入したマウス (PRMT1<sup>lox</sup> マウス) と、心筋細胞特異的に Cre 酵素を発現するマウス (Myh6-Cre マウス) を交配することで、心筋細胞特異的 *Prmt1* 欠損マウス (*Prmt1*-CKO) を作出した。

### 3. *Prmt1*-CKO マウスの表現型解析

得られた *Prmt1*-CKO マウスに関して、生後の生存率、および、心エコー解析による心臓機能評価を行うとともに、生後 2、4、6 週にて採材し、心重量の測定や心臓の組織解析、また、心臓から RNA を抽出して心筋傷害マーカーである BNP の発現変化を定量的 RT-PCR 法にて検討した。

### 4. *Prmt1* マウス心臓の網羅的遺伝子発現解析

*Prmt1*-CKO マウス心臓より RNA を抽出し、5500xl SOLiD system (Life technologies, Thermo Fisher Scientific 社) を用いて次世代シーケンス (RNA-seq) 解析を行った。

## 結果および考察

### 1. 心臓組織での PRMT1 発現細胞種の確認

PRMT1 を発現する細胞の種類を調べるために、マウス心臓より心筋細胞と、非心筋細胞を単離し、PRMT1 のタンパク質発現を検討した結果、PRMT1 は心筋細胞と、非心筋細胞の両者に発現していることが判明した。

### 2. 心筋細胞特異的 PRMT1 欠損マウスの作製

全身で *Prmt1* を欠損するマウスは早期に胎生致死となる [2]。そこで、心筋細胞における PRMT1 の機能を解明するため、心筋特異的 *Prmt1* 欠損マウス (*Prmt1*-CKO) を作製した (図 1)。

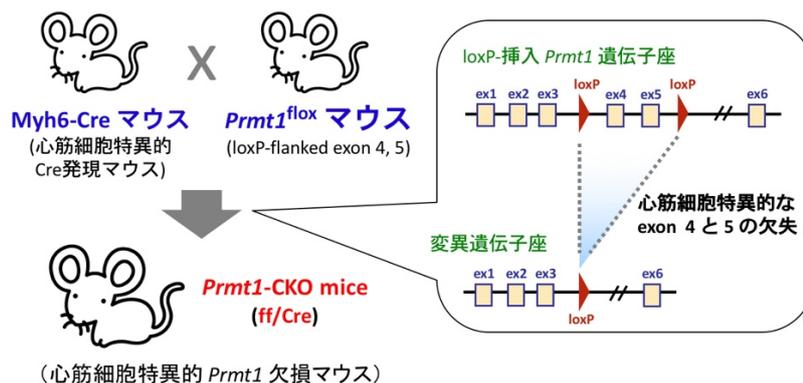


図 1. 心筋細胞特異的 *Prmt1* 欠損マウスの作製

*Prmt1* 遺伝子のエクソン 4 および 5 の両側に loxP 配列を挿入したマウス (*Prmt1<sup>fllox</sup>* マウス) と、心筋細胞特異的に Cre 酵素を発現するマウス (*Myh6-Cre* マウス) を交配し、心筋細胞特異的 *Prmt1* 欠損マウス (*Prmt1*-CKO) を作出した。

### 3. *Prmt1*-CKO マウスは若齢で心不全を呈する

*Prmt1*-CKO マウスは、出生後 8 週間以内に死亡することが判明した。また 6 週齢のマウスでは心重量の増加、顕著な心室内腔の拡大と繊維化が認められた。心収縮能は 4 週齢の時点で有意に低下しており、心臓での BNP の発現上昇が認められたことなどから、*Prmt1*-CKO マウスは若齢期に心不全を呈することが明らかとなった (次頁 図 2)。これらの結果は、心筋細胞の PRMT1 が心機能の維持に必須であることを示している。

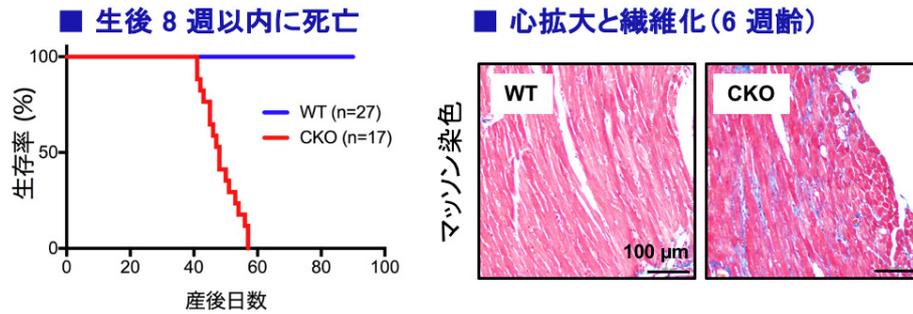


図2. *Prmt1*-CKO マウスの表現型解析

*Prmt1*-CKO マウスは、出産後8週間以内に死亡し、心臓の線維化が進展するなど、若齢より心不全を発症した。

#### 4. *Prmt1*-CKO マウス心臓の網羅的遺伝子発現解析

次に、*Prmt1*-CKO マウスにおける心不全のメカニズムを探るために、網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq 解析) を行った。その結果、*Prmt1*-CKO マウス心臓において、β酸化、酸化的リン酸化、TCA サイクルなどの、ミトコンドリア機能に関連する遺伝子の発現が広範囲に低下していることが判明した (図3)。さらに、心臓の電子顕微鏡観察を行ったところ、*Prmt1*-CKO マウス心臓で異常な形態を示すミトコンドリアが観察された。

#### ■ CKO心臓の遺伝子発現解析

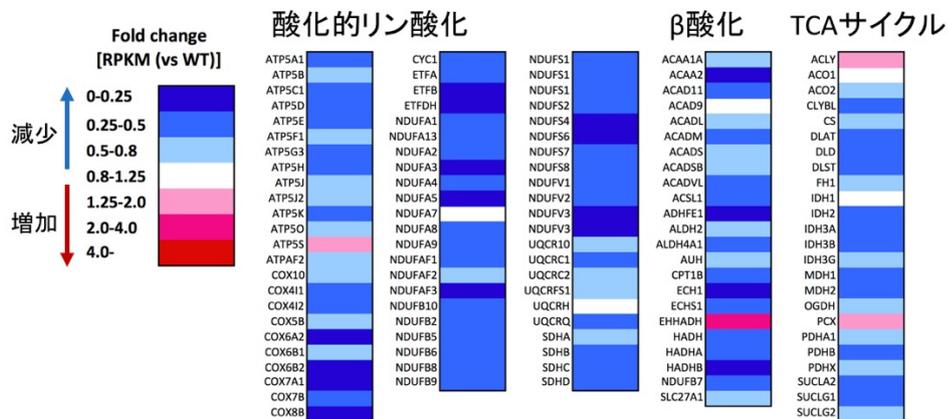


図3. *Prmt1*-CKO マウス心臓におけるミトコンドリア機能関連遺伝子の発現低下

*Prmt1*-CKO マウス心臓を用いた RNA-seq 解析より、*Prmt1*-CKO マウス心臓にて、β酸化、酸化的リン酸化、TCA サイクルなどの、ミトコンドリア機能に関連する遺伝子の発現が広範囲に低下していた。

本研究により、これまで未解明であった心臓におけるアルギニンメチル化の機能に関して、心筋特異的 *Prmt1* 欠損マウスを用いることにより、心筋細胞の PRMT1 はミトコンドリア機能関連遺伝子の発現を正に制御することで、心機能の維持、および、生後の生存に必須であることを明らかとした。

本研究の成果は、iScience 誌 (Cell Press 社) に公表した [7]。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、筑波大学生命領域学際研究センターの石田純治である。

## 文 献

- 1) Yang Y, Bedford MT. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Jan 13(1):37-50. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23235912 DOI: 10.1038/nrc3409
- 2) Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, Roshon MJ, Ruley HE. Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol Cell Biol*. 2000 Jul;20(13):4859-69. PMID: 10818593 DOI: 10.1128/MCB.20.13.4859-69.2000
- 3) Hashimoto M, Murata K, Ishida J, Kanou A, Kasuya Y, 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*. 2016 Jan 29;291(5):2237-45. Epub 2015 Dec 4. PMID: 26347322 DOI: 10.1074/jbc.M115.684514
- 4) Ishimaru T, Ishida J, Kim JD, Mizukami H, Hara K, Hashimoto M, Yagami KI, Sugiyama F, Fukamizu A. Angiodysplasia in embryo lacking protein arginine methyltransferase 1 in vascular endothelial cells. *J Biochem*. 2017 Mar 1;161(3):255-258. PMID: 28003433 DOI: 10.1093/jb/mvw095
- 5) Sha L, Daitoku H, Araoi S, Kaneko Y, Takahashi Y, Kako K, Fukamizu A. Asymmetric Arginine Dimethylation Modulates Mitochondrial Energy Metabolism and Homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol*. 2017 Mar 1;37(6). pii: e00504-16. PMID: 28003503 DOI: 10.1128/MCB.00504-16
- 6) Chen X, Niroomand F, Liu Z, Zankl A, Katus HA, Jahn L, Tiefenbacher CP. Expression of nitric oxide related enzymes in coronary heart disease. *Basic Res Cardiol*. 2006 Jul;101(4):346-53. PMID: 16705470 DOI: 10.1007/s00395-006-0592-5
- 7) Murata K, Lu W, Hashimoto M, Ono N, Muratani M, Nishikata K, Kim JD, Ebihara S, Ishida J, Fukamizu A. PRMT1 Deficiency in Mouse Juvenile Heart Induces Dilated Cardiomyopathy and Reveals Cryptic Alternative Splicing Products. *iScience*. 2018 Oct 26;8:200-13. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30321814 DOI: 10.1016/j.isci.2018.09.023