

博士論文

Protein arginine methyltransferase 1 の *S*-ニトロシル化  
を介したアルギニンジメチル化修飾抑制による  
DDX3 機能と転写への影響

令和6年3月

谷口 理香子

岡山大学大学院  
医歯薬学総合研究科  
博士課程  
生体制御科学専攻

# 目次

略語一覧 .....	4
使用薬物一覧 .....	6
使用抗体一覧 .....	9
第1章 序論 .....	10
第2章 本論 .....	14
2-1 実験方法 .....	14
2-1-1 細胞培養 .....	14
2-1-2 NO 供与体の調製 .....	14
2-1-3 ビオチンスイッチアッセイ .....	15
2-1-4 PRMT1 システインをセリンに置換したプラスミドの作製 .....	18
2-1-5 トランスフェクション .....	20
2-1-6 ADMA 化修飾の検出 .....	20
2-1-7 ウェスタン・ブロッティング .....	21
2-1-8 BioID .....	23
2-1-9 銀染色 .....	27
2-1-10 液体クロマトグラフィー・質量分析法 (LC-MS/MS) .....	28
2-1-11 データ解析 .....	29
2-1-12 免疫沈降法 (DDX3 と PRMT1 の相互作用, DDX3 の ADMA 化の検出) ....	32
2-1-13 ヘリカーゼアッセイ .....	33
2-1-14 STAT1 の検出 .....	37
2-1-15 RNA sequencing 解析 .....	37
2-1-16 統計処理 .....	39
2-2 実験結果 .....	40

2-2-1 PRMT1 の S-ニトロシル化.....	40
2-2-2 PRMT1 の SNO 化部位同定 .....	42
2-2-3 PRMT1 の SNO 化による酵素活性への影響.....	44
2-2-4 BioID による PRMT1 基質の探索 .....	47
2-2-5 PRMT1 による DDX3 の ADMA 化と NO ドナーによる影響 .....	54
2-2-6 NO ドナーによる DDX3 酵素活性への影響.....	56
2-2-7 NO ドナーによる DDX3 基質のタンパク質レベルへの影響 .....	58
2-2-8 NO ドナーと PRMT1 阻害による転写への影響 .....	60
2-3 考察 .....	64
第3章 本研究のまとめと展望.....	78
引用文献 .....	81
参考文献 .....	88
謝辞.....	89

## 略語一覽

ALS	amyotrophic lateral sclerosis
ADMA	asymmetric dimethyl arginine
ANOVA	analysis of variance
APS	ammonium peroxydisulfate
ATP	adenosine triphosphate
BioID	proximity-dependent biotin identification
BSA	bovine serum albumin
C	cysteine
D	aspartic acid
DDX3	DEAD-box helicase 3 X-linked
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N, N-dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
dsRNA	double-stranded RNA
E	glutamic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol bis (2-aminoethyl Ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FUS	fused in sarcoma
GSH	glutathione
GSNO	S-nitrosoglutathione
HCl	hydrochloric acid
HPDP	N-[6-(Biotinamide) hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio) propionamide

HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
K	lysine
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry
MMTS	<i>S</i> -methyl methanethiosulfonate
mRNA	messenger RNA
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PRMT1	protein Arginine Methyltransferase 1
PVDF	polyvinylidene difluoride
R	arginine
RIPA	radioimmunoprecipitation
RNA	ribonucleic acid
S	serine
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
SNO	<i>S</i> -nitrosylation
SNOC	<i>S</i> -nitrosocysteine
ssRNA	single-stranded RNA
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
TBE	Tris-borate-EDTA
TBS-T	Tris-buffered saline tween 20
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween 20	polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate

## 使用薬物一覧

2-mercaptoethanol	Merck
2-propanol	富士フイルム和光純薬
30 (w/v) % acrylamide-bis (19:1)	BIO-RAD
30 (w/v) % acrylamide-bis mixed solution (37:5:1)	ナカライテスク
acetone	富士フイルム和光純薬
agarose S	ニッポンジーン
ampicillin sodium	富士フイルム和光純薬
APS	富士フイルム和光純薬
ATP	Sigma Aldrich
Bacto™ agar	BD (Becton, Dickinson)
Bacto™ tryptone	BD (Becton, Dickinson)
Bacto™ yeast extract	BD (Becton, Dickinson)
BCA protein assay kit	TaKaRa Bio Inc
β-glycerophosphate	富士フイルム和光
EZ-link HPDP-biotin	Thermo Fisher Scientific
bromophenol blue	富士フイルム和光純薬
BSA	ナカライテスク
Can Get Signal immunoreaction enhancer solution	TOYOBO
chloroform	富士フイルム和光純薬
cOmplete protease inhibitor cocktail tablets	Roche
complete quick DH5α	TOYOBO
DMEM	富士フイルム和光純薬
DMEM/Ham's F-12	富士フイルム和光純薬

DMSO	富士フイルム和光純薬
DMF	富士フイルム和光純薬
Dpn I	日本ジェネティクス
EDTA · 4Na	Dojindo
EGTA buffer 0.5M, pH 8.0	バイオメディカルサイエンス
ethanol	富士フイルム和光純薬
ethidium bromide	Amresco
FavorPrep gel/PCR purification kit	チヨダサイエンス
FBS	Gibco
glutathione (reduced form)	富士フイルム和光純薬
glycine	富士フイルム和光純薬
HCl	富士フイルム和光純薬
ImmunoStar LD	富士フイルム和光純薬
KCl	富士フイルム和光純薬
L-cysteine	富士フイルム和光純薬
L (+)-ascorbic acid sodium salt	富士フイルム和光純薬
ligation convenience kit	日本ジーン
Lipofectamine 3000 reagent	Thermo Fisher Scientific
methanol	富士フイルム和光純薬
Mlu I	New England Biolab
MMTS	富士フイルム和光純薬
MS023 (type I PRMT inhibitor)	Selleck
MS 用銀染色キット	アプロサイエンス
NaCl	富士フイルム和光純薬

NaOH	富士フイルム和光純薬
neocuproine	Sigma-Aldrich
NP-40	Sigma-Aldrich
NOC-18	Dojindo
Opti-MEM	GIBCO
PEI max	Polyscience
penicillin-streptomycin solution	Sigma-Aldrich
Pierce anti-HA magnetic beads	Thermo Fisher Scientific
Pierce NeutrAvidin agarose	Thermo Fisher Scientific
polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate	富士フイルム和光純薬
protein G sepharose 4 fast flow	GE Health Life Science
PrimeSTAR GXL DNA polymerase	TaKaRa Bio Inc
Puromycin dihydrochloride	富士フイルム和光純薬
Immobilon-P PVDF membrane	Merck
recombinant RNase inhibitor	TaKaRa Bio Inc
Sac II	New England Biolab
SDS	富士フイルム和光純薬
skim milk	雪印乳業
sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich
sodium nitrite	Sigma-Aldrich
sodium orthovanadate	富士フイルム和光
streptavidin agarose	Invitrogen
TaKaRa Ex premier DNA polymerase dye plus	TaKaRa Bio Inc
TEMED	富士フイルム和光純薬
Triton X-100	Sigma-Aldrich
trypsin-EDTA • 4Na solution	富士フイルム和光純薬

## 使用抗体一覧

抗体	メーカー	製品番号	希釈条件
PRMT1 rabbit Polyclonal antibody	Proteintech	11279-1-AP	1:10000, 5 (w/v) % BSA
Anti-dimethyl-arginine Antibody, asymmetric (ASYM24) (rabbit)	Sigma Aldrich	07-414	1:20000, 5 (w/v) % BSA
asymmetric dimethyl arginine motif [adme-R] MultiMub Rabbit mAb mix	Cell Signaling Technology	13522s	1:2500, Can Get Signal solution
asymmetric dimethyl-Histone H4R3 rabbit pAb	ABclonal	A7261	1:5000, 5 (w/v) % BSA
Histone H4 Rabbit pAb	ABclonal	A1131	1:5000, 5 (w/v) % BSA
FLAG (M2)-HRP Monoclonal antibody	Sigma Aldrich	A8592-2MG	1:50000, 5 (w/v) % skim milk
HA tag Polyclonal antibody (rabbit)	Proteintech	51064-2-AP	1:10000, 5 (w/v) % BSA 2 µg (Co-IP)
HA-Tag (6E2) Mouse mAb	Cell Signaling Technology	2367S	1:10000, 5 (w/v) % BSA
HA Tag Monoclonal antibody (mouse)	Proteintech	66006-2-Ig	3 µg (IP)
Normal mouse IgG	Santa Cruz	Sc-2025	3 µg (IP)
Normal rabbit IgG	富士フイルム和光純薬	148-09551	2 µg (Co-IP)
High sensitivity streptavidin-HRP	Pierce	21134	1:10000, 5 (w/v) % BSA
STAT1 antibody (rabbit)	NOVUS Biologicals	NB100-56314SS	1:500, 5 (w/v) % BSA
β-Actin (13E5) Rabbit mAb (HRP Conjugate)	Cell Signaling Technology	5125S	1:50000, 5 (w/v) % skim milk
Anti-Mouse IgG, HRP-Linked F (ab') <sub>2</sub> Fragment Sheep	Cytiva	NA9310	1:50000, 5 (w/v) % skim milk, BSA, Can Get Signal solution
Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked F (ab') <sub>2</sub> Fragment Donkey	Cytiva	NA9340	1:50000, 5 (w/v) % skim milk, BSA, Can Get Signal solution

# 第1章 序論

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は生体内で L-アルギニンから NO 合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) によって生成されるガス状分子である。NO は低濃度では血管拡張や神経伝達などの生理機能を担うが、神経興奮や炎症反応などによる過剰量の長期曝露条件下では病態発症を招くことが知られている<sup>1</sup>。NO の作用メカニズムの一つとして、タンパク質システインチオール基を可逆的に修飾する S-ニトロシル化 (S-nitrosylation: SNO 化) 修飾が知られている。タンパク質 SNO 化は酵素活性や局在を変化させるなどの機能を担っており、がんや神経変性疾患などの病態形成との関与が報告されている (図 1)<sup>2-13</sup>。当研究室ではこれまでに、protein disulfide isomerase (PDI), DNA methyltransferase 3B (DNMT3B), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), macrophage migration inhibitory factor (MIF), ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1 (UBE2D1) などの SNO 化タンパク質を同定し、病態との関連を報告してきた<sup>6,7,9,11,13</sup>。なお、phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN) の SNO 化は 1-10  $\mu\text{M}$  といった低濃度の NO ドナー処理でみられ、生理的な NO 濃度では細胞生存に働くことが報告されている<sup>8</sup>。これまでに LC-MS/MS などを用いた SNO 化基質の網羅的探索が行なわれ<sup>14</sup>、例えば SH-SY5Y 細胞における網羅的探索から 1443 種の SNO 化基質が同定された<sup>15</sup>。しかし、個々のタンパク質 SNO 化による影響は不明なものが多い。その中で、翻訳後修飾酵素である protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) に着目した。PRMT1 によるアルギニンメチル化は生体内で主要な翻訳後修飾であり、メチル化が基質の機能制御に関わること、さらに PRMT1 が筋委縮性側索硬化症 (ALS) などの病態に関与すること、PRMT1 の酵素活性を制御する因子がほとんど明らかでないことから、PRMT1 の SNO 化による酵素活性への影響を明らかにする意義があると考えた。

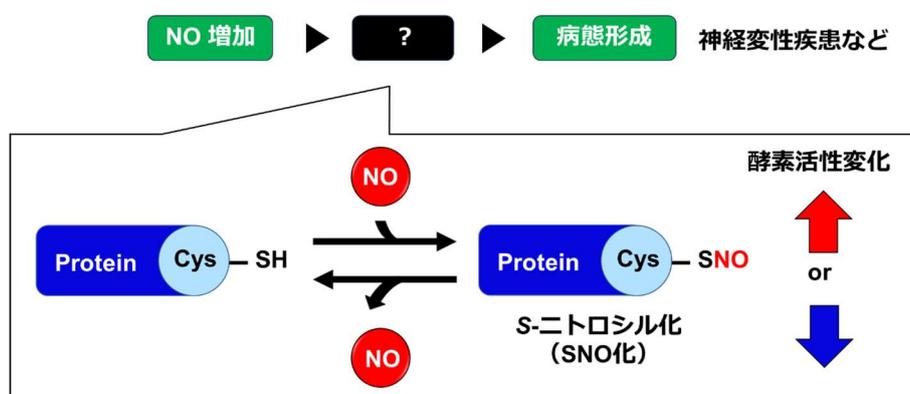
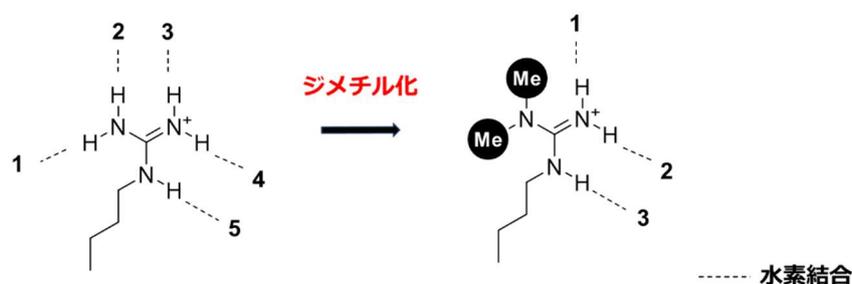


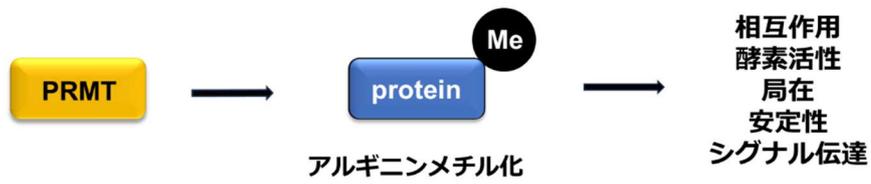
図 1 NO の作用機序

アルギニンメチル化はタンパク質の約 0.5-2.0%に見られる主要な翻訳後修飾である<sup>16</sup>。アルギニンはタンパク質の表面に多く存在して水素結合の形成に関与し、メチル化されることで水素結合の形成が抑制される(図 2A)<sup>17-19</sup>。一方で、メチル化修飾により疎水性が増大し、疎水性相互作用が形成される<sup>18</sup>。以上から、アルギニンのメチル化はタンパク質間やタンパク質-核酸間の相互作用に寄与する。PRMT は、タンパク質アルギニンのメチル化を介して、相互作用、酵素活性、局在、安定性、シグナル伝達を変化させ、種々のタンパク質の機能制御に関与している(図 2B)<sup>20-24</sup>。例えば PRMT はタンパク質のアルギニンメチル化を介して、転写、シグナル伝達、細胞生存、DNA 損傷応答、RNA プロセッシング、輸送、炎症反応などを制御する<sup>25</sup>。PRMT は現在 9 種存在することが知られており、以下 3 つのサブタイプに属する。モノメチル化に加えて非対称性ジメチル (Asymmetric dimethyl arginine: ADMA) 化を担う Type I (PRMT1, 2, 3, 4, 6, 8 が属する)、モノメチル化と対称性ジメチル化を担う Type II (PRMT5, 9 が属する)、モノメチル化のみを担う Type III (PRMT7 が属する) である(図 2C)。また、アルギニン脱メチル化酵素として JMJD6 が報告されている<sup>26</sup>。PRMT1 は Type I に属し、細胞内の全アルギニンメチル化の約 85%を担う主要な酵素である<sup>27,28</sup>。PRMT1 は広く組織に発現し、そのノックアウトによって胎生致死がもたらされる<sup>25</sup>。また、PRMT1 は脳の発達に重要であることが報告されている<sup>29,30</sup>。PRMT1 の基質にはヒストン H4 のアルギニン (R) 3 が含まれ、転写調節に関与している<sup>31,32</sup>。また PRMT1 の基質として、多くの RNA 結合タンパク質が単離同定され、スプライシング、転写、翻訳など、RNA 代謝に関わっていることが明らかにされてきた<sup>31,33,34</sup>。さらに、PRMT1 は ALS などの病態との関与が示唆されている<sup>21</sup>。PRMT1 による基質アルギニンメチル化が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を介した酸化ストレスを介して増加することが報告されているが、PRMT1 の酵素活性を制御する因子についてはほとんど不明である<sup>35</sup>。

A



B



C

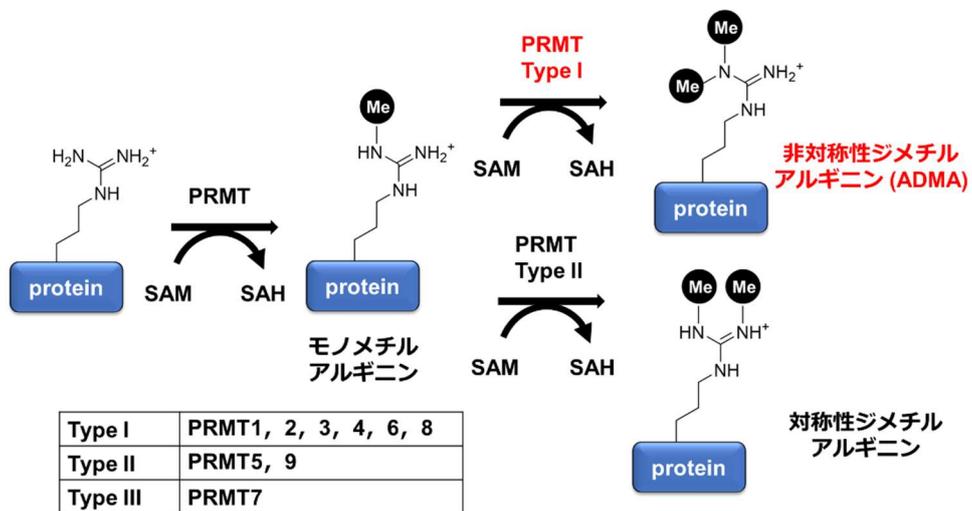


図2 アルギニンメチル化と PRMT の機能

- (A) アルギニンメチル化と水素結合
- (B) PRMT によるタンパク質メチル化における役割
- (C) PRMT のサブタイプによるメチル化様式の違い

また、BioID による PRMT1 基質の探索を行い、DEAD-box helicase 3X-linked (DDX3) に着目して PRMT1 の SNO 化による RNA 代謝への影響を検証した。BioID は、大腸菌ビオチンリガーゼである BirA が PRMT1 近傍のタンパク質をビオチン化することを利用して基質を検出する手法であり、免疫沈降法と比較してより多くの基質を探索できることから、PRMT1 の機能を広く解析できると考えた。BioID から、PRMT1 基質候補には RNA 代謝に関わるタンパク質が多く存在することが分かった。DDX3 に着目した理由は、RNA 代謝に広く関わる因子であること、PRMT1 による ADMA 化の DDX3 機能への影響がほとんど不明であったこと、さらに ALS との関連が報告されていたことである<sup>36</sup>。DDX3 は、ATP 依存性 RNA ヘリカーゼであり、転写、スプライシング、RNA の輸送、翻訳など、RNA 代謝の多くの経路に関与している<sup>36-39</sup>。DDX3 のノックダウンは翻訳全体には影響しないが、mRNA は 5'UTR に 2 次構造を有すると翻訳が抑制されることが知られており、DDX3 が 2 次構造を解くことで翻訳の抑制を解除することが知られている (図 3)<sup>36</sup>。また、DDX3 は細胞周期調節、ストレス顆粒形成やインフラマソーム活性化などのストレス応答、抗アポトーシス活性などにも関与している<sup>37,40-42</sup>。これまでに DDX3 におけるメチル化の役割はほとんどわかっていない。また、PRMT1 がヒストンや DDX3 など転写制御に関与する基質を有することから、PRMT1 の SNO 化が転写に影響する可能性が考えられた<sup>31,32,37</sup>。

以上の背景から、本研究では SNO 化による PRMT1 の機能制御を介した RNA 代謝と転写への影響を解明することを目的に取り組んだ。

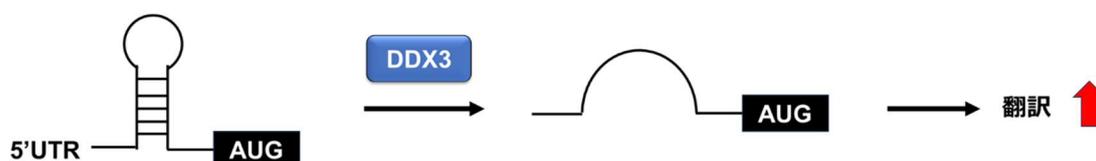


図 3 DDX3 による翻訳抑制の解除

## 第2章 本論

### 2-1 実験方法

#### 2-1-1 細胞培養

ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞, ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞は, 56°Cで 30 分間非働化処理した 10 (v/v) % FBS および 1 (w/v) % penicillin-streptomycin を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red 培地において, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°Cの条件下で培養した. ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞は, 56°C, 30 分間非働化処理した 10 (v/v) % FBS および 1 (w/v) % penicillin-streptomycin を含む D-MEM/Ham's F-12 with L-Glutamine and Phenol Red 培地を用いて 5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C の条件下で培養した.

#### 2-1-2 NO 供与体の調製

NO ドナーは以下の組成で用時調製した. 光によって分解されるため, 調製は暗所で行った.

- 100 mM *S*-nitrosocysteine (SNOC) (図 4)

NaNO<sub>2</sub> 2 mg

L-cysteine 3.5 mg

滅菌水 232 μL

3 N HCl 58 μL

SNOC の各濃度への希釈は 100 mM HEPES-NaOH (pH 7.7) を用いて行った. 各実験のネガティブコントロールには, 半年以上放置して NO 放出能を失った SNOC (old SNOC) を用いた.

- 100 mM *S*-nitrosglutathione (GSNO) (図 4)

NaNO<sub>2</sub> 2 mg

glutathione (GSH, reduced form) 8.9 mg

滅菌水 232 μL

3 N HCl 58 μL

GSNO の各濃度への希釈は 100 mM HEPES-NaOH (pH 7.7) を用いて行った. 各実験のネガティブコントロールには,  $\text{NaNO}_2$  を加えずに調製したもの (GSH) を用いた.

• 10 mM NOC-18 (3406913, Dojindo) (図 4)

NOC-18 1.6 mg

滅菌水 1000  $\mu\text{L}$

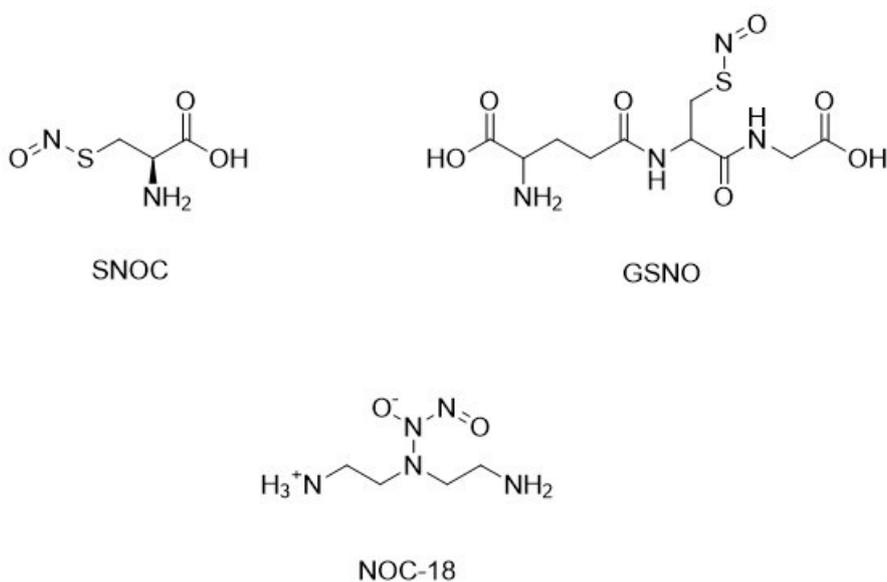


図 4 NO ドナーの構造

### 2-1-3 ビオチンスイッチアッセイ

PRMT1 の SNO 化を検出するために, SNO 化特異的検出法であるビオチンスイッチアッセイを用いた (図 5) <sup>43</sup>.

#### (1) 試薬調製

• Radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

150 mM NaCl  
0.1 (w/v) % sodium dodecyl sulfate (SDS)  
1 (v/v) % Triton X-100  
0.5 (w/v) % Sodium deoxycholate  
1×cOmplete protease inhibitor cocktail tablets (11836145001, Roche)

• HEN Buffer

250 mM HEPES-NaOH (pH 7.7)  
1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)  
0.1 mM neocuproine

• HENS Buffer

HEN buffer containing 1 (w/v) % sodium dodecyl sulfate (SDS)

• Blocking buffer

9 volumes of HEN buffer plus 1 volume 25 (w/v) % SDS  
15 mM or 25 mM methyl methanethiosulfonate (MMTS)  
2 M dimethylformamide (DMF)

内在性 PRMT1 の SNO 化検出には 25 mM MMTS, 過剰発現系の SNO 化検出には 15 mM MMTS を用いた.

• Neutralization buffer

20 mM HEPES-NaOH (pH 7.7)  
100 mM NaCl  
1 mM EDTA  
0.5 (v/v) % Triton X-100

• Neutralization buffer + NaCl

20 mM HEPES-NaOH (pH 7.7)  
600 mM NaCl  
1 mM EDTA  
0.5 (v/v) % Triton X-100

## (2) SNO 化タンパク質の検出

10 cm dish に SH-SY5Y 細胞, もしくは 6 cm dish に HEK293T 細胞を播種し, 80%の密度の細胞に NO 供与体を処理した. 内在性 SNO 化 PRMT1 の検出には, SNOC もしくは GSNO を 0-200  $\mu\text{M}$  処理し, SNOC は 10 分間, GSNO は 5 分間,  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で反応させた. 過剰発現系の SNO 化検出では, 200  $\mu\text{M}$  の SNOC を 30 分間  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で反応させた. 次に, RIPA buffer を用いて 2-1-7-(1)(2)の手順で細胞を溶解し, BCA アッセイを用いてタンパク質定量を行った. 各サンプルの細胞抽出液 800  $\mu\text{g}$  を全量 800  $\mu\text{L}$  となるように RIPA buffer で希釈し, 15 mL チューブにいれた.

次に SNO 化されていないチオール基を保護して, ビオチンとの反応を防ぐために blocking buffer を各サンプルに 3.2 mL ずつ加えて,  $50^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた. この操作は遮光で実施し, 3 分毎に転倒混和とボルテックスミキサーで十分に攪拌した.

次に,  $-20^\circ\text{C}$  で冷却した 8 mL のアセトンを加えて,  $-20^\circ\text{C}$ , 30 分間遮光条件下で静置した. その後,  $4^\circ\text{C}$ ,  $2,000\times\text{g}$  で 5 分間遠心した (アセトン沈殿). 上清を取り除き, 70 (v/v) % のアセトンを加えて  $4^\circ\text{C}$ ,  $2,000\times\text{g}$  で 5 分間遠心する工程を 2 回繰り返した. 上清を取り除き, 沈殿したペレットを 10 分間乾燥させた後, HENS buffer を 200  $\mu\text{L}$  加えてペレットを溶解し, 1.5 mL チューブに移した.

このチューブに, SNO 化システインの還元のために 0.625 M アスコルビン酸ナトリウム水溶液を 5.6  $\mu\text{L}$  添加し, さらにチオール基のビオチン化のために 1 mM HPDP-biotin 溶液を 66  $\mu\text{L}$  添加して室温で 1 時間反応させた. 沈殿物を取り除くために各サンプルを  $4^\circ\text{C}$ ,  $20,400\times\text{g}$  で 10 分間遠心し, 上清を新しい 1.5 mL チューブに移した.

その後,  $-20^\circ\text{C}$  で冷却したアセトンを 540  $\mu\text{L}$  加えて  $-20^\circ\text{C}$  で 30 分間静置し,  $4^\circ\text{C}$ ,  $2,000\times\text{g}$  で 5 分間遠心した. 余剰のアセトンを除き, 70 (v/v) %アセトン 1 mL でペレットを洗浄し,  $4^\circ\text{C}$ ,  $2,000\times\text{g}$  で 5 分間遠心した. 上清を除いてペレットを 10 分間乾燥させ, 450  $\mu\text{L}$  の HENS buffer でペレットを溶解し, 18  $\mu\text{L}$  の溶液を input として別の 1.5 mL チューブに移した.

残りの溶液に Neutralization buffer を 800  $\mu\text{L}$  加えて転倒混和し, NeutrAvidin agarose (29201, Thermo Fisher Scientific) を 50  $\mu\text{L}$  加えた. その後, ローテーターを用いて  $4^\circ\text{C}$  で一晩緩やかに攪拌することで, ビオチン化タンパク質をビーズへ結合させた. 翌日, 各サンプルを卓上遠心機で遠心した後に上清を除去し, Neutralization buffer + NaCl を 800  $\mu\text{L}$  加えて 5 回転倒混和し, 再び遠心して 1 分間静置し上清を取り除いた. この操作を 5 回繰り返すこと, さらに Neutralization buffer を用いて同様の操作を 2 回繰り返すこと, ビーズに結合していない余

剰タンパク質を除いた。

上清を除いたサンプルに 2×SDS-PAGE sample buffer（組成は 2-1-7 を参照）を 28 μL, input サンプルに 4×SDS-PAGE sample buffer を 6 μL 加えて 100°C で 5 分間加熱し、2-1-7 に記載している手順に従ってウエスタン・ブロッティングに供した。

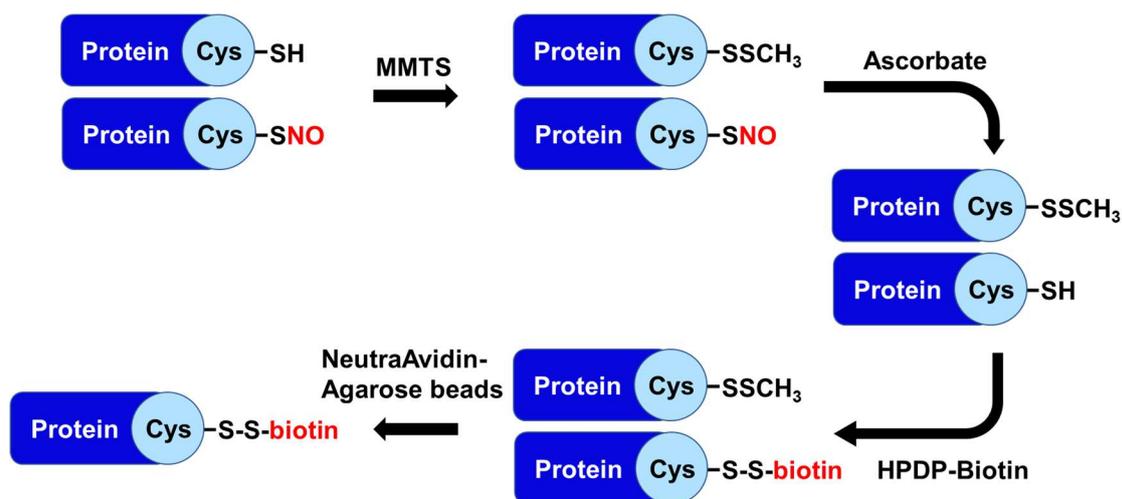


図 5 ビオチンスイッチアッセイの概要

#### 2-1-4 PRMT1 システインをセリンに置換したプラスミドの作製

##### (1) 変異の導入（システインをセリンに置換するための PCR）

FLAG タグ標識された PRMT1 プラスミド（pCMV6 を母体とする．Human, RC224239, Origene）を鋳型に、以下に示すプライマーと PrimeSTAR GXL polymerase（R050A, TaKaRa Bio Inc）を使用して、以下に示す反応条件で PCR を行った。

##### ・プライマー配列

PRMT1 C119S Forward: 5'-TCG AGA GCT CGA GTA TCT CTG ATT ATG CG-3'

PRMT1 C119S Reverse: 5'-TAC TCG AGC TCT CGA TCC CGA TGA CCT TG-3'

PRMT1 C226S Forward: 5'-ACA TGA GTT CCA TCA AAG ATG TGG CCA T-3'

PRMT1 C226S Reverse: 5'-TGA TGG AAC TCA TGT CGA AGC CAT ACA C-3'

• 組成

5×PrimeSTAR GXL Buffer 10  $\mu$ L  
dNTP mixture 4  $\mu$ L  
10  $\mu$ M プライマー (Forward/Reverse) 各 1  $\mu$ L  
PRMT1 プラスミド 50 ng  
Prime STAR GXL DNA polymerase 1  $\mu$ L  
滅菌水 up to 50  $\mu$ L

• PCR 反応条件

[1] 94°C 5 分間  
[2] 94°C 30 秒間  
[3] 50 °C 15 秒間  
[4] 68°C 10 分間  
[2]から[4]までを 14 サイクル  
[5] 68°C 7 分間  
[6] 4°C  $\infty$

PCR 反応終了後、PCR 産物に Dpn I を 1  $\mu$ L 加え、37°C で 1 時間反応させた。

(2) PRMT1 変異体の DNA 精製

250  $\mu$ L の以下に示す組成の TE buffer を加えた。

• TE buffer

10 M Tris-HCl  
1 mM EDTA (pH8.0)

さらに 30  $\mu$ L の 3 M CH<sub>3</sub>COONa, 300  $\mu$ L のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加えてボルテックスミキサーで十分に攪拌し、12,000 rpm, 4°C, 1 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。次にエタノールを 1 mL 加えて 4°C, 15,000 rpm, 15 分間の条件で遠心し、上清を取り除いて、4 分間風乾し、10  $\mu$ L の TE buffer を加えてよくピペッティングした。

### (3) 形質転換

作製したプラスミド DNA を 10  $\mu$ L の大腸菌 DH-5 $\alpha$  に全量加え、LB/kanamycin プレートに播種して一晩培養した。大腸菌からのプラスミド DNA の精製は、FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN) を用いて行った。各コロニーを 50  $\mu$ g/mL の kanamycin を含む 3 mL の LB 培地に植菌し、一晩振とう培養した菌液より精製した。プラスミド DNA の配列は GENEWIZ from Azenta life sciences に委託し、確認した。

#### 2-1-5 トランスフェクション

6 cm dish に HEK293T 細胞を翌日 60%の密度になるように播種し、37°Cで一晩培養した後、PEI max (24765-2, Polyscience) を用いてトランスフェクションを行った。4  $\mu$ g 分のプラスミド DNA 溶液をそれぞれ用意し、これに Opti-MEM を 250  $\mu$ L 加えた。ここに PEI max 10  $\mu$ L を含んだ Opti-MEM 250  $\mu$ L を加えて混和し、20 分間室温で静置した後、全量を細胞に均一に滴下した。37°Cで 24 時間培養して当該タンパク質を強制発現させた。

#### 2-1-6 ADMA 化修飾の検出

##### (1) タンパク質全体の ADMA 化修飾の検出

3.5 cm dish に HeLa 細胞を播種し、翌日 50%の密度の細胞に 0-200  $\mu$ M の NOC-18 (Dojindo) を処理し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 48 時間反応させた。SNOC と GSNO は半減期がそれぞれ数分、数時間と短いため、半減期が 21 時間と長い NOC-18 を使用した。また、Type I PRMT 阻害薬として MS023 (S8112, Selleck) を用いた (図 6)。NOC-18 を処理した 48 時間後に、RIPA buffer を用いて 2-1-7 に従って細胞を溶解し、各サンプルのタンパク質量が 10  $\mu$ g となるようにウエスタン・ブロッティングに供した。

##### (2) ヒストン抽出とヒストン H4R3me2a の検出

3.5 cm dish に HEK293T 細胞を播種し、翌日 50%の密度の細胞に 0-200  $\mu$ M の NOC-18 または 10  $\mu$ M の MS023 を処理し、48 時間 CO<sub>2</sub> インキュベータ内で反応させた。以下の組成の TEB buffer を 200  $\mu$ L 添加して細胞を剥離し、全量を 1.5 mL チューブに移し、4°C で 10 分間、ローテーターを用いて攪拌した。その後、4°C、2,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除いた。残ったペレットに TEB を 100  $\mu$ L 添加し、4°C、2,000 rpm で 10 分間遠心して上清

を除くことで洗浄した。次に 0.2 N の HCl を 70  $\mu$ L 添加して懸濁し、4°C でローテーターを用いて一晩攪拌した。翌日 4°C, 2,000 rpm で 10 分間遠心して上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。2 M の NaOH を 7  $\mu$ L 混和し、BCA 法でタンパク質定量を行った。各サンプルに 4 $\times$ SDS-PAGE sample buffer (組成は 2-1-7 を参照) を全体量の 1/4 量になるように加えて、100°C で 5 分間加熱した。各サンプルのタンパク質量が、ヒストン H4R3me2a の検出には 5  $\mu$ g, total ヒストン H4 の検出には 10  $\mu$ g となるように 2-1-7 の手順に従ってウエスタン・ブロットティングに供した。

• TEB buffer in PBS

0.5 (v/v) % Triton X-100

0.02 (w/v) % NaN<sub>3</sub>

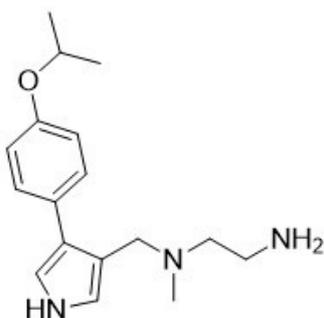


図 6 MS023

## 2-1-7 ウエスタン・ブロットティング

### (1) 細胞抽出液の調製

RIPA buffer などの細胞溶解液を用いて細胞を溶解した。4°C で 5 分間静置した後、細胞抽出液を 1.5 mL チューブに移し、RIPA buffer で溶解した場合のみ粘性がなくなるまで氷上でソニケーションに供した。その後、4°C, 15,000 rpm の条件で 10 分間遠心し、上清を別の 1.5 mL チューブに移した。細胞抽出液に 4 $\times$ SDS-PAGE sample buffer を全体量の 1/4 量となるように添加し、100°C で 5 分間加熱した。

## (2) BCA によるタンパク質定量

TaKaRa BCA Protein Assay kit (T9300A, TaKaRa Bio Inc) を使用してタンパク質定量を行った。Working solution として、BCA reagent A : BCA reagent B = 100 : 1 の比率で混合して調製した。検量線作成用に 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  の BSA 水溶液および濃度未知の細胞抽出液を用意した。マイクロプレートの各ウェルに、それぞれ Working solution を 200  $\mu\text{L}$ , 検量線または細胞抽出液を 10  $\mu\text{L}$  加えて混合した。37°C で 30 分間反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて 540 nm における各サンプルの吸光度を測定した。BSA 検出値で検量線を作成し、細胞抽出液のタンパク質濃度を算出した。

## (3) 試薬調製

### • 4×SDS-PAGE sample buffer

250 mM Tris-HCl (pH 6.8)

20 (v/v) % 2-mercaptoethanol

40 (v/v) % glycerol

8 (w/v) % SDS

0.02 (w/v) % bromophenol blue

### • SDS-PAGE running buffer

25 mM Tris

192 mM glycine

1 (w/v) % SDS

### • Transfer buffer

25 mM Tris

192 mM glycine

20 (v/v) % methanol

### • TBS-T

137 mM NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

0.1 (v/v) % Tween 20

#### (4) ウェスタン・ブロッティング

タンパク質サンプルは SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。泳動用緩衝液として SDS-PAGE Running buffer を用い、100 V で 30 分間電気泳動し、続いて 120V で 60 分間電気泳動した。次に PVDF メンブレン (ゲルポアサイズ 0.45  $\mu\text{m}$ ) へのタンパク質の転写を、100V, 60 分間の条件で、transfer buffer 中に行った。次に 5 (w/v) % skim milk もしくは 5 (w/v) % BSA in TBS-T の組成の blocking buffer を用いて、室温で 30 分間振とうした。その後、転写されたメンブレンを抗体一覧に記載している条件で一次抗体に 4°C で一晚浸し、翌日 TBS-T buffer を用いて 5 分間×3 回洗浄した。2 次抗体を室温で 1 時間反応させた後、再度 TBS-T で 5 分間×3 回洗浄した。化学発光試薬イムノスターLD (290-69904, 富士フイルム和光純薬) を PVDF メンブレンに添加し、ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) または ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ software を用いて、目的タンパク質のバンドを検出した。

#### 2-1-8 BioID

PRMT1 基質の探索のために BioID を行った (図 7) <sup>44</sup>。

##### (1) PRMT1-BirA プラスミドの作製

##### (1)-1 BirA 配列の増幅

Thermo Fisher Scientific にて人工合成された BirA 配列を鋳型に以下の配列の primer 及び、組成と PCR 条件で、BirA 配列を増幅した。

• Primer:

Forward: 5'-CCC ACG CGT GGA TCC AAG GAC AAC ACC-3'

Reverse: 5'-GGG CCG CGG CTA TGC GTA ATC CGG TAC-3'

• 組成

2×EX Premier DNA polymerase Dye plus (RR371, TaKaRa Bio Inc) 2.5  $\mu\text{L}$

10  $\mu\text{M}$  Primer (forward/riverse) 0.5  $\mu\text{L}$

DNA (pEBMulti-puro BirA-HA) 50 ng

滅菌水 up to 50  $\mu\text{L}$

・ PCR 反応条件

[1] 94°C 5 分間

[2] 98°C 10 秒間

[3] 56°C 15 秒間

[4] 68°C 2 分間

[2]から[4]を 30 サイクル繰り返す

[5] 68°C 7 分間

[6] 4°C ∞

PCR 産物を 1.5 mL チューブに移し, 250  $\mu$ L の TE buffer を加えた. さらに 3 M CH<sub>3</sub>COONa を 30  $\mu$ L 加えたのち, 300  $\mu$ L のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加えてボルテックスミクスチャーで混合した. 室温で 10,000 rpm, 1 分間遠心し, 上清を新しい 1.5 mL チューブに移した. さらに 100 (v/v) % EtOH を 1 mL 加えて, 15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心して上清をすべて取り除いた. 5 分間風乾し, 滅菌水 20.5  $\mu$ L で溶解した.

(1)-2 制限酵素カット

以下の組成で試薬[1]と[2]をそれぞれ調製し, 37°C で 2 時間反応させた.

[1] BirA フラグメント

10×CutSmart (New England BioLabs) 2.5  $\mu$ L

Mlu I-HA (New England BioLabs) 1  $\mu$ L

Sac II (New England BioLabs) 1  $\mu$ L

PCR 産物 (BirA) 20.5  $\mu$ L

[2] PRMT1 プラスミドベクター

10×CutSmart (New England BioLabs) 2.5  $\mu$ L

Mlu I-HA (New England BioLabs) 1  $\mu$ L

Sac II (New England BioLabs) 1  $\mu$ L

PRMT1 プラスミド (Human, RC224239, Origene) 1  $\mu$ g

滅菌水 up to 25  $\mu$ L

### (1)-3 BirA フラグメントと PRMT1 プラスミドの精製

制限酵素カットを施したサンプルをゲル電気泳動に供した。1 (w/v) % agarose gel (0.5×TAE を含む) にサンプルを全量供し、1×TAE buffer で 20 分間電気泳動した。1×ethidium bromide 溶液に 20 分間ゲルを浸して Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad) で検出した。PRMT1 プラスミドは約 5000 bp, BirA フラグメントは 1000 bp ほどの位置に検出される。バンドがある位置でゲルを切り抜き、細かく砕いて 1.5 mL チューブに移した。DNA 抽出は GEL/PCR purification kit (FAGCK-001-1, FAVORGEN) を用いてメーカーが推奨するプロトコルに準じて行った。FADH buffer 600  $\mu$ L を加えて 50°C のヒートブロックで溶解し、カラムに移した。室温で 10,000 rpm, 30 秒間遠心し、カラムに DNA を吸着させた。次に 600  $\mu$ L の wash buffer を加え、室温で 10,000 rpm, 30 秒間遠心してカラムを洗浄し、さらに室温で 10,000 rpm, 1 分間遠心して余分な試薬を除いた。カラムに 1.5 mL チューブをつけて、30  $\mu$ L の elution buffer を加えて 1 分間静置し、その後、室温で 10,000 rpm, 1 分間遠心した。

- 1×TAE buffer

- 40 mM Tris

- 40 mM 酢酸

- 1 mM EDTA (pH8.0)

### (1)-4 PRMT1 プラスミドと BirA フラグメントのライゲーション反応

以下の組成で試薬を調製し、16°C で一晩反応させた。

- 2×ligation Mix (319-05961, NIPPON GENE) 2.5  $\mu$ L

- BirA フラグメント ((1)-2-[1]) 1.25  $\mu$ L

- PRMT1 ベクター ((1)-2-[2]) 1.25  $\mu$ L

フラグメントとベクターの DNA 量の比率は約 4:1 となるように、NanoVue Plus with Printer (GE ヘルスケア) で DNA 濃度を測定して計算し、合計 2.5  $\mu$ L となるように調製した。

### (1)-5 PRMT1-BirA プラスミドの精製

作製したプラスミド DNA を全量、10  $\mu$ L の大腸菌 DH-5 $\alpha$  に加え、LB/kanamycin プレート

に播種して一晩培養した。大腸菌からのプラスミド DNA の精製は、FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN) を用いて行った。各コロニーを 50 µg/mL の kanamycin を含む 3 mL の LB 培地に植菌し、一晩振とう培養した菌液より精製した。プラスミド DNA の配列は GENEWIZ from Azenta life sciences に委託し、確認した。

## (2) BioID

6 cm dish に HEK293T 細胞を翌日 50% の密度となるように播種して一晩培養し、PRMT1-BirA プラスミドをトランスフェクションした。その際、Lipofectamine 3000 を用いて下記の [1] と [2] を混ぜて 20 分間静置し、細胞に全量添加した。トランスフェクション 6 時間後に培地を交換した。

[1]

Lipofectamine 3000 reagent 15 µL

Opti-MEM 250 µL

[2]

Opti-MEM 250 µL

PRMT1-BirA プラスミド 5 µg

P3000 reagent 5 µL

トランスフェクションから 24 時間後に 50 µM のビオチンを添加し、トランスフェクション開始から 48 時間後に以下の手順で細胞抽出液を回収した。まず 1×PBS で 2 回細胞を洗い、その後、以下の組成の Lysis buffer 500 µL で細胞を溶解した。氷上で 10 分間静置した後、1.5 mL チューブに移し、1 分間ソニケーションに供した。次に、125 µL の 10 (v/v) % Triton X-100 を加えて終濃度 2 (v/v) % にし、30 秒間ソニケーションに供した。さらに 125 µL の 50 mM Tris-HCl (pH7.4) を加えて 30 秒間ソニケーションに供した。次に、16,000×g、4°C の条件で 10 分間遠心し、上清を回収してそのうちの 50 µL を input にした。残りの上清に 100 µL の NeutrAvidin agarose を添加し、4°C で一晩、ローテーターを用いて反応させ、ビーズにビオチン化タンパク質を結合させた。翌日、卓上遠心機を用いて上清を除いた。次に 500 µL の Lysis buffer を加えて 10 回転倒混和し、卓上遠心機を用いてビーズを沈降させて上清を除いた。この操作を 5 回繰り返してビーズを洗浄した。2-1-10 の LC-MS/MS による PRMT1 基質探索や、BirA 発現確認と基質ビオチン化確認のために 2-1-7 のウエスタン・ブロッティ

ングや 2-1-9 銀染色に供した.

• Lysis buffer

50 mM Tris-HCl (pH7.4)

0.5 M NaCl

0.4 (w/v) % SDS

5 mM EDTA (pH8.0)

1 mM DTT

1×Protease inhibitor

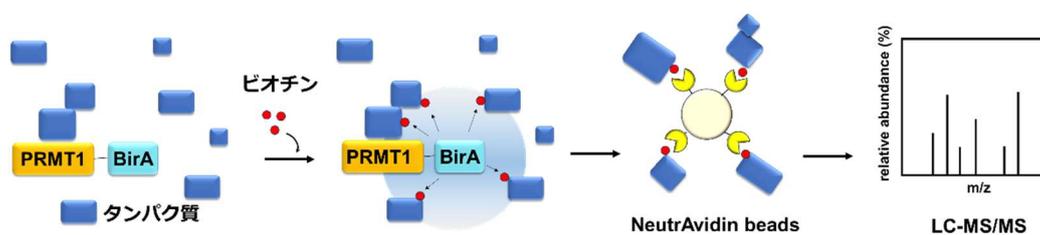


図 7 BioID の概要

## 2-1-9 銀染色

### (1) 試薬調製

• 固定液

エタノール 15 mL

酢酸 5 mL

滅菌水 up to 50 mL

• 増感液

増感液 (50×) 1 mL

エタノール 15 mL

滅菌水 up to 50 mL

・ 現像液

現像試薬 1.25 g

現像原液 1 mL

滅菌水 up to 50 mL

(2) 銀染色

銀染色は MS 用銀染色キット (SP4020, アプロサイエンス) を使用してメーカーが推奨するプロトコルに従って行った。2-1-7 ウェスタン・ブロッティングの手順に従って電気泳動した後、50 倍希釈した前処理液 50 mL にゲルを浸して 2 分間穏やかに振とうした。次にゲルを固定液に浸し、15 分間穏やかに振とうする工程を 2 回行った。次にゲルを増感液に浸し、30 分間穏やかに振とうした。続いて、ゲルを 50 mL の滅菌水に浸し、5 分間振とうして液を捨てた。この工程を 3 回繰り返した。次に 50 倍に希釈した染色液 50 mL にゲルを浸し、穏やかに 20 分間振とうした。その後、ゲルを 50 mL の滅菌水に浸し、1 分間穏やかに振とうしたのち、新しい滅菌水に交換して再度 1 分間振とうした。次にゲルを現像液に 1 分間浸して振とうした。現像液を捨てて、50 倍希釈した停止液にゲルを浸して 10 分間振とうした。最後にゲルを 50 mL の滅菌水に浸し、10 分間振とうしたのち、再度滅菌水を交換して 10 分間振とうした。銀染色したゲルのバンドは、Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad) で検出した。

**2-1-10 液体クロマトグラフィー・質量分析法 (LC-MS/MS)**

2-1-8 でビーズを洗浄した後、ビーズサンプルに少量の Lysis buffer を添加した状態で、理化学研究所 環境資源科学研究センター 生命分子解析ユニット 堂前 直 先生に送付し、解析していただいた<sup>45</sup>。具体的には以下の操作を依頼した。ビーズの上清を除き、2 mM ビオチンを含む SDS-PAGE sample buffer をビーズに加え、SDS-PAGE に供した。running ゲルに達した段階で、単一のバンドを切り出し、trypsin を 37°C で 12 時間反応させてタンパク質をペプチド断片に切断した。消化したペプチド混合物に 1 (v/v) %ギ酸を添加してペプチド溶液を酸性化した。ナノスプレーカラム (NTCC-360/75-3-105, Nikkyo Technos, Co., Ltd.) と Q Exactive HF-XHybrid Quadrupole-Orbitrap 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を組み合わせて質量分析した。移動相として solvent A: 0.1 (v/v) % formic acid in water, solvent B: 0.1 (v/v) % formic acid in 80 (v/v) % acetonitrile を用いた。Proteome Discoverer 3.0 (Thermo Scientific) と Mascot 2.8 (Matrix Science) を組み合わせて LC-MS/MS データを解析し、タンパク質の同

定と定量を行った。

## 2-1-11 データ解析

### (1) ベン図の作製

1349種のビオチン標識されたタンパク質のうち、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の遺伝子シンボルを持つ 1109種のタンパク質と、データベース Harmonizome 3.0 (<https://maayanlab.cloud/Harmonizome/>)<sup>46</sup>の Pathway Commons Protein-Protein Interactions に記載されている 2064種の PRMT1 基質と比較した。BioVenn (<http://www.biovenn.nl/>) を用いて、ベン図を作成して比較した<sup>47</sup>。

### (2) Gene Ontology 解析 (GO 解析)

GO 解析は、Metascape ver.3.5.20230501 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)<sup>48</sup> を用い、biological process の GO データセットを用いて行った。BioID において fold change が 2 以上だった基質候補の上位 500 種を解析に供した。GO 解析の結果は、上位 10 種の GO タームについて Prism を用いて可視化した。

### (3) Gene set enrichment analysis (GSEA)

#### (3)-1 gmt ファイルの作製

GEO database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) から PRMT1 ノックダウンもしくは阻害薬を細胞に処理した条件で RNA sequencing を行ったデータを探し、GSE122435 と GSE158625 のデータをダウンロードした。それらのデータについて、PRMT1 ノックダウンまたは阻害薬処理時の TPM (transcripts per million) に 1 を加えた値 (TPM+1) をコントロールの TPM+1 で割ることで、遺伝子の発現変化における fold change を算出した。次に、fold change が 2 以上の発現増加、または 0.5 以下の発現低下した遺伝子を抽出して下記の例のように excel に gene symbol のリストを記載し、text ファイルに変換後、gmt ファイルに変換した。

• gmt ファイルの記載例

MV4-11_fold $\geq$ 2	THP-1-fold $\geq$ 2	MV4-11_fold $\leq$ 0.5
Gene 1	Gene A	Gene a
Gene 2	Gene B	Gene b
.	.	.
.	.	.
.	.	.

(3)-2 gct ファイルの作製

SH-SY5Y 細胞に NO ドナーを処理して行った RNA sequencing のデータを用いた (DRA017247) (2-1-15 の項参照) . 下記の例のように excel でコントロール (GSH 処理) と GSNO 処理時の transcripts per million (TPM) に+1 した値を縦にそれぞれ羅列した. 1 行目 1 列目の「#1.2」, 3 行目 2 列目の「Description」と以降の「na」は GSEA に供するために記入することが決まっている. 2 列目の数値は, 左から遺伝子の総数, サンプルの種類の数 (この場合はコントロールと GSNO 処理) で, 最後に「1」(解析に供する

• gct ファイルの記載例

#1.2					
26443	4				
NAME	Description	Control 1	Control 2	GSNO 1	GSNO 2
Gene A	na	TPM+1	TPM+1	TPM+1	TPM+1
Gene B	na	TPM+1	TPM+1	TPM+1	TPM+1

(3)-3 cls ファイルの作製

gct ファイルを説明する役割をもつ cls ファイルを作成した. 下記の例のように text ファイルに記入した. #の後に続く数字は左から, シーケンスに供したサンプルの合計数, サンプルの種類の数 (この場合はコントロールと GSNO 処理) で, 最後に「1」(解析に供する

ために記入する必要がある)を記入した。2段目でサンプルの種類の詳細をコントロール群とGSNO処理群に分けて命名した。3段目で、gctファイルで記入した縦の遺伝子群がどの種類に当てはまるのか(コントロールかGSNOなのか), gctファイルに記入した順に左から割り振った。最後にclsファイルに変換した。

- ・clsファイルの記載例

```
#4 2 1
# GSH GSNO
GSH GSH GSNO GSNO
```

### (3)-4 GSEA

GSEA 4.3.2 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>)をダウンロードして用いた。作成した(1)-(3)のファイルをアップロードし、下記の条件で解析した。

Chip platform	ftp.broadinstitute.org://pub/gsea/msigdb/human/annotations/ Human_Gene_Symbol_with_Remapping_MSigDB.v2023.2.Hs.chip
Metric for ranking genes	Log2-Ratio-of-classes

GSEA ではまず NO ドナー処理で発現増加したのから低下したのまで順番に並べられた。次にPRMT1ノックダウンや阻害薬処理で発現が増加または減少した遺伝子が、先ほど順番に並べた NO ドナー処理によって発現変動した遺伝子のどこに位置するかを調べ、偏りがあるかどうか検定された(図8)。

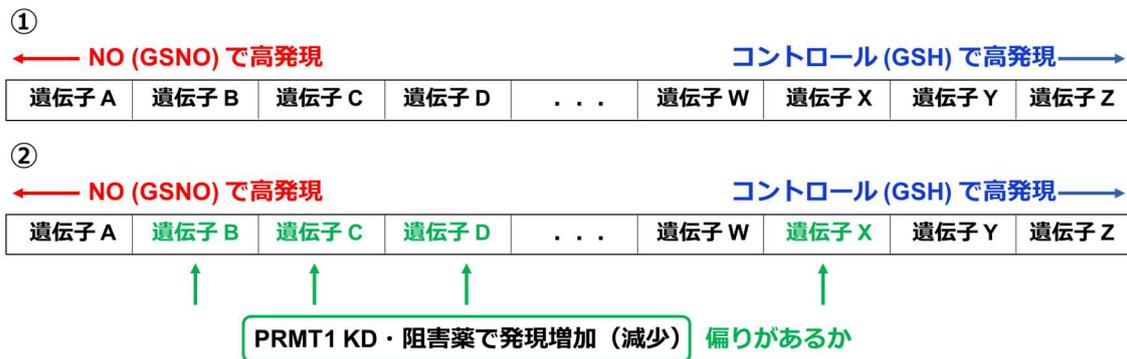


図 8 本研究における GSEA の原理の概要図

#### (4) promoter motif analysis

Homer の promoter motif analysis (<http://homer.ucsd.edu/homer/motif/>) を用いて、該当遺伝子のプロモーター配列を基に、一致する転写因子の配列を解析した。GSEA において、GSNO 処理と PRMT1 ノックダウン (MV4-11 細胞) でともに発現が増加した遺伝子を羅列したリストを text ファイルにし、アップロードして解析に供した。

#### 2-1-12 免疫沈降法 (DDX3 と PRMT1 の相互作用, DDX3 の ADMA 化の検出)

10 cm dish に HEK293T 細胞を翌日 60% の密度になるように播種して CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晩培養させた。翌日、FLAG タグ標識された PRMT1 と HA タグ標識された DDX3 を、相互作用を確認する場合 (Co-IP) には 1:1 の割合、asymmetric dimethyl arginine (ADMA) 化レベルを検証する場合 (IP) には 1:2 の割合で、2-1-5 に従って PEI MAX を用いて下記の組成で [1] と [2] を混ぜてトランスフェクションした。なお、DDX3 プラスミドは長崎大学 高度感染症研究センター ウイルス宿主相互作用研究分野 有海 康雄 准教授からご恵与いただき、検討に用いた<sup>49,50</sup>。

[1]

Opti-MEM 625 μL

PEI max 25 μL

[2]

Opti-MEM 625  $\mu$ L

DNA: PRMT1, DDX3: 5  $\mu$ g, 5  $\mu$ g (Co-IP), PRMT1, DDX3: 6  $\mu$ g, 3  $\mu$ g (IP)

相互作用を検出する共免疫沈降法の場合 (Co-IP) は, 下記に示す免疫沈降バッファー, ADMA 化レベルを解析するための免疫沈降の場合 (IP) は RIPA バッファーを用いて, 2-1-7-(1)に従って細胞抽出液を調製した. 全細胞溶解液 500  $\mu$ L (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) を 2  $\mu$ g (Co-IP) もしくは 3  $\mu$ g (IP) の抗 HA 抗体または IgG と, 4°Cで一晩, ローテーターを用いて穏やかに反応させた. 翌日 50  $\mu$ L の Protein G Sepharose 4 Fast Flow beads (17061801, Cytiva) を加えて 2 時間, 4°C でローテーターを用いて反応させ, ビーズと抗体を結合させた. 反応後, 各サンプルを卓上遠心機で 10 秒間ほど遠心した後に上清を除去し, 免疫沈降バッファー (Co-IP) または RIPA buffer (IP) を 800  $\mu$ L 加えて 5 回転倒混和し, 再び遠心して 1 分間静置して上清を除いた. この操作を 5 回繰り返す, ビーズに結合していない余剰タンパク質を除いた. その後, 2-1-7に従ってウエスタン・ブロッティングに供した.

・免疫沈降バッファー

50 mM Tris HCl (pH 7.5)

150 mM NaCl

1 (w/v) % NP-40

5 mM EDTA (pH8.0)

### 2-1-13 ヘリカーゼアッセイ

ヘリカーゼアッセイは先行論文を参考に, 以下のように行った (図 9) <sup>51,52</sup>.

#### (1) 試薬の調製

・ NP-40 lysis buffer

20 mM HEPES-NaOH (pH7.5)

10 mM EGTA (pH8.0)

40 mM  $\beta$ -glycerophosphate

1 (w/v) % NP-40

2.5 mM MgCl<sub>2</sub>

2 mM orthovanadate

2 mM NaF  
1 mM DTT

• Helicase assay buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)  
1 mM DTT  
0.2 mg/mL BSA  
4 mM ATP  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
200 nM RNA  
1 μM competitor  
50 units RNase inhibitor  
滅菌水 up to 50 μl

• 10×反応停止液

50 mM EDTA (pH 8.0)  
40 (w/v) % glycerol  
0.02 (w/v) % BPB

• 20 (w/v) % acrylamide gel

30 (w/v) % acrylamide-bis (19:1) 6.7 mL  
10×TBE 1 mL  
滅菌水 2.3 mL  
APS 50 μL  
TEMED 5 μL

(2) DDX3 のトランスフェクションと細胞溶解液の調製

10 cm dish に  $25 \times 10^5$  個の HEK293T 細胞を播種して 37°C で一晩、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で静置した。翌日、HA-DDX3 プラスミドを Lipofectamine 3000 を用いて下記の組成でトランスフェクションした。

[1]

Opiti-MEM 187.5 μL

Lipofectamine 3000 11.25  $\mu$ L

[2]

Opti-MEM 187.5  $\mu$ L

P3000 7.5  $\mu$ L

DNA 3  $\mu$ g (HA-DDX3 もしくは pCMV10 (コントロールの空ベクター))

[1]と[2]を混ぜて 20 分静置したのちに、全量を細胞に滴下した。6 時間後に培地を新しい培地と交換し、100  $\mu$ M の NOC-18 または 10  $\mu$ M の MS023 を細胞に処理した。試薬を処理してから 48 時間後に NP-40 lysis buffer を用いて 2-1-7 に従って細胞を可溶化し、タンパク質定量した。

(3) ビーズの平衡化

pierce anti-HA magnetic beads (88836, Thermo Fisher science) を 20  $\mu$ L/sample となるように 1.5 mL チューブにいれた。そこに 700  $\mu$ L の NP-40 lysis buffer を添加して転倒混和し、DynaMag Spin Magnet (Thermo Fisher science) を用いてビーズを磁石に吸着させて上清を取り除いた。この操作を 3 回繰り返した。

(4) DDX3 の免疫沈降による精製

500  $\mu$ g のライゼートを NP-40 lysis buffer で 700  $\mu$ L の容量に調製し、4°C で一晩、ローテーターを用いて穏やかに攪拌した。翌日、DynaMag Spin Magnet を用いてビーズを磁石に吸着させて上清を取り除き、700  $\mu$ L の RIPA buffer を各サンプルに添加して 10 回ほど転倒混和し、DynaMag Spin Magnet を用いて上清を取り除いた。この操作を再度繰り返した後に、TBS-T buffer を用いて上記のビーズ洗浄操作を 2 回繰り返した。最後に 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) と 10 mM MgCl<sub>2</sub> の組成の buffer を用いて上記のビーズ洗浄操作を 1 回し、上清を完全に取り除いた。

(5) ヘリカーゼアッセイ

操作は遮光条件下で行った。RNA の配列は先行論文を参考にし、下記に記載した 18 mer 5'-6FAM と 36 mer をアニーリングによって 2 本鎖にした RNA を日本バイオサービスから

購入して使用した.

18 mer 5'-6FAM: 5'- CCC AAG AAC CCA AGG AAC-3'

36 mer: 5'-ACC AGC UUU GUU CCU UGG GUU CUU GGG AGC AGC AGG-3'

Competitor: 18 mer: 5'- CCC AAG AAC CCA AGG AAC-3'

DDX3 と反応させたビーズが入った 1.5 mL チューブに 50  $\mu$ L ずつ helicase assay buffer を加え, タッピングして攪拌した. ヒートブロックを用いて 37 °C で 30 分間反応させ, その間, 3 分間おきにタッピングしてビーズを拡散した. 30 分後, 各サンプルの上清 45  $\mu$ L を別のチューブに移し, 反応停止液を 4.5  $\mu$ L 加えて, 反応を停止させた. 残ったビーズは上清を完全に取り除いた後, 2 $\times$ SDS-PAGE sample buffer を 35  $\mu$ L 加え, そのうち 20  $\mu$ L をウエスタン・ブロッキングに供した. 反応停止液を加えたサンプルは 20 (w/v) % acrylamide gel を用いて, ゲル電気泳動に供した. 泳動条件は以下の通りである.

・泳動条件

4°C

[1]120V 30 分間

[2]175V 30 分間

[3]250V 1 時間

電気泳動終了後, Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad) を用いてフルオレセインの蛍光を SYBR Green のフィルターで検出した.

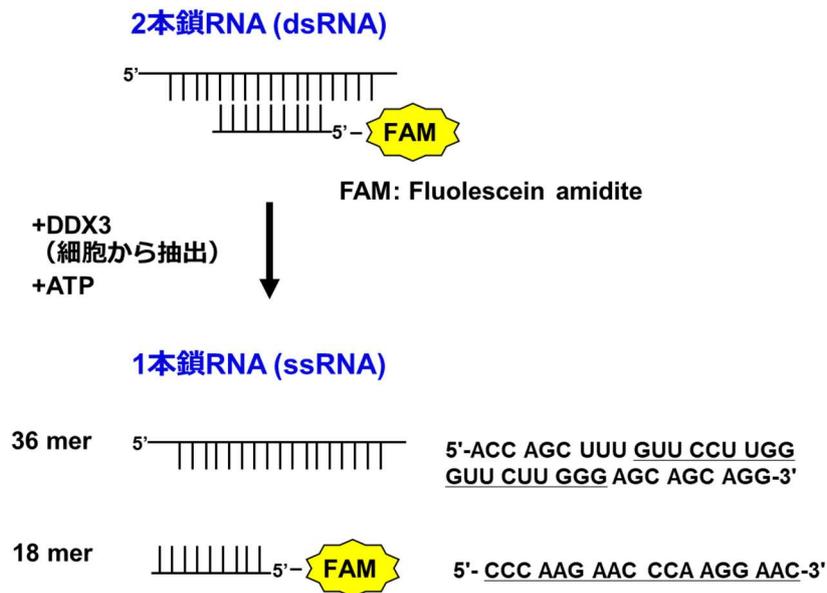


図9 ヘリカーゼアッセイの概略図

#### 2-1-14 STAT1 の検出

STAT1 の検出は以下のように行った。12 well plate に  $1.5 \times 10^5$  個の HEK293T 細胞を播種し、一晩  $37^\circ\text{C}$  の  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で培養した。翌日、 $100 \mu\text{M}$  の NOC-18 または  $10 \mu\text{M}$  の MS023 を細胞に処理し、72 時間後に NP-40 lysis buffer を用いて 2-1-7 に従って細胞抽出液を回収し、タンパク質定量を行い、ウエスタン・ブロッティングに供した。

#### 2-1-15 RNA sequencing 解析

この RNA sequencing データは DNA Data Bank of Japan に登録されている (DRA017247)。操作は以下のように行った。

##### (1) Total RNA の抽出

3.5 cm dish に SH-SY5Y 細胞を播種し、翌日、 $200 \mu\text{M}$  の GSNO とコントロールの GSH を

処理し、48 時間後に以下のように回収した。1 mL の PBS で細胞を洗浄し、上清を取り除いた。1 mL の trypsin を添加し、37°C で 150 秒間インキュベートした。次に、3 mL の培地を加えて 15 mL チューブに移した。20°C、15,000×g で 20 秒間遠心し、上清を取り除いた。1 mL の PBS を添加して細胞を洗浄し、1.5 mL チューブに移して 20°C、15,000×g で 20 秒間遠心する操作を 2 回繰り返した。

RNA sequencing 解析は山口大学 大学研究推進機構 総合科学実験センターに委託して行った。具体的には以下の操作を依頼した。各サンプルの total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。得られた total RNA 濃度を nano drop ONE (Thermo Fisher Scientific) で測定した。

## (2) RNA-sequencing ライブラリー作製

### (2)-1 poly (A) RNA の抽出と断片化

Total RNA 100 ng を用い、NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) と NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) を用いて poly (A) RNA の抽出と断片化を行った。プロトコルは、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina Instruction Manual に従った。断片化は、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) の NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer と NEBNext Random Primers を加えて、94°C で 15 分間行った。

### (2)-2 逆転写およびアダプター結合

断片化した poly (A) RNA に NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) の NEBNext First Strand Synthesis Enzyme Mix を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。その後、NEBNext Adaptor (NEB) を用いてアダプターを付加した。

### (2)-3 cDNA 増幅およびバーコード配列付加

作製した cDNA を以下の条件に従って、PCR (BioRad C1000 Touch) で増幅し、ライブラリーを作製した。作製したライブラリーの濃度を Qubit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

・ PCR 条件

[1] 98 °C 30 秒間

[2] 98 °C 10 秒間

[3] 65 °C 75 秒間

[2]と[3]を 11 サイクル繰り返す

[4] 65 °C 5 分間

[5] 4 °C ∞

(3) Illumina NovaSeq 6000 解析

NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit V1.5 (100cycles) を用いて, cDNA 領域 100 bp 及びインデックス配列のシーケンスを行った.

(4) RNA-Sequencing 解析

データ解析には CLC Genomics Workbench 20.0.4 (GWB) を使用した. Illumina NovaSeq 6000 から出力された BCL ファイルを bcl2fastq v2.20.0.402 tool を用いて fastq ファイルに変換した. 変換した fastq ファイルを GWB にインポートしたのち, GWB の Trim reads 2.4 ツールでリードのトリミングを行った. 発現解析のために, トリミング処理後のリードを GWB の RNA-Seq Analysis 2.21 ツールを用いてリファレンス配列へのマッピングとタグカウントを行った.

**2-1-16 統計処理**

実験結果は平均値±標準誤差で示した. 統計解析は GraphPad Prism 8 を使用した. one-way ANOVA により検定し, 事後検定として Bonferroni 法または Dunnett 法を用いた. なお, 統計的有意差は \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  で示した.

## 2-2 実験結果

### 2-2-1 PRMT1 の S-ニトロシル化

まずビオチンスイッチアッセイを用いて、PRMT1 が SNO 化されるか否か検討した。PRMT1 の SNO 化が報告されたのは、神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた網羅的探索であったこと、また将来展望として神経変性疾患への影響を検討する計画であることから、SH-SY5Y 細胞を用いて検討した<sup>15</sup>。生理的かつ汎用される NO ドナーである、*S*-nitrosocysteine (SNOC) と *S*-nitrosoglutathione (GSNO) の 2 種類をそれぞれ、0, 50, 100, 200  $\mu$ M 処理し、ビオチンスイッチアッセイに供した。NO ドナーの作用様式として、NO の放出とトランスニトロシル化 (基質のチオール基に NO を受け渡す) が知られている<sup>53</sup>。また、生理的な NO の濃度は数 pM から数  $\mu$ M オーダーとする報告があり<sup>54,55</sup>、先行論文では過剰な NO 産生量として 100-200  $\mu$ M の NO ドナーが使用されていることから<sup>56,57</sup>、最大濃度を 200  $\mu$ M として処理した。また NO ドナーは NO を徐々に放出するため、細胞内での NO 濃度が処理濃度より低いことが報告されていることから<sup>58,59</sup>、200  $\mu$ M の NO ドナー処理による検討は、生体内で産生しうる NO 濃度とかけ離れてはいないと考えられた。検討の結果、内在性の PRMT1 は NO ドナー処理濃度依存的に SNO 化されることが分かった (図 10 A-D)。

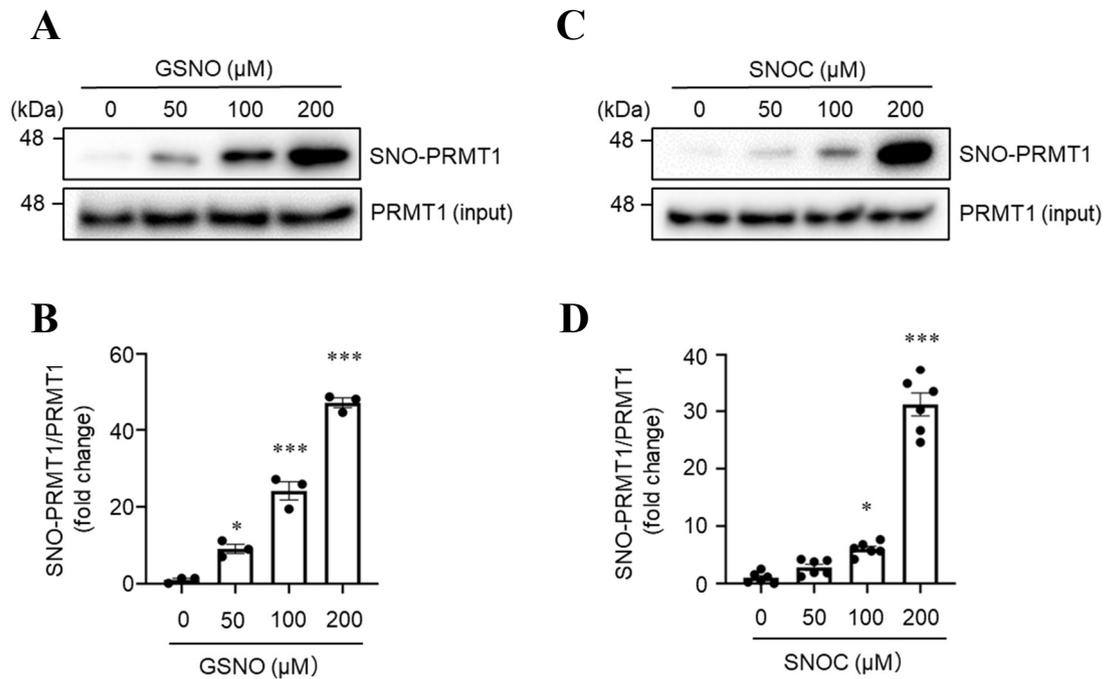


図 10 PRMT1 の SNO 化

(A) SH-SY5Y 細胞に 50, 100, 200 μM の GSNO, またはコントロールとして 200 μM の GSH を 5 分間処理した. その細胞溶解物をビオチンスイッチアッセイとウエスタン・ブロッキングに供し, 抗 PRMT1 抗体で検出した.

(B) (A) の SNO-PRMT1 を定量化し, input の PRMT1 で標準化した. One-way ANOVA with Dunnett's test. Values are expressed as mean ± SEM. n = 3, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001.

(C) SH-SY5Y 細胞に 50, 100, 200 μM の SNOC を 10 分間処理した. コントロールとして 200 μM old SNOC を用いた. その細胞溶解物をビオチンスイッチアッセイとウエスタン・ブロッキングに供し, 抗 PRMT1 抗体で検出した. old SNOC は SNOC 調製から半年以上経過し, NO 放出能を失ったものである.

(D) (C) の SNO-PRMT1 を定量化し, input の PRMT1 で標準化した. One-way ANOVA with Dunnett's test. Values are expressed as mean ± SEM. n = 6, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001.

## 2-2-2 PRMT1 の SNO 化部位同定

PRMT1 にはシステインが 11 個存在する。細胞外から近接できる部位にあるシステインが SNO 化されると考えられ、候補となるタンパク質表面に存在するシステインは 7 個ある。PRMT1 を SNO 化基質として同定した SH-SY5Y 細胞における LC-MS/MS では C250 と C360 が SNO 化部位として報告されている<sup>15</sup>。一方で、過去の知見では、C119 にあたる rat の C101 に、システインとの反応性が高い 4-hydroxynonenal や maleimide が結合するという異なる主張が報告されている<sup>60,61</sup>。また、LC-MS/MS での PRMT1 のカバー率は 49%であり、C119 を含むペプチドは検出されていない可能性が考えられた。そこで PRMT1 の構造モデルを用いて SNO 化されるシステインの候補を精査したところ、システイン 119 (C119) は、メチル基供与体である *S*-adenosylmethionine (SAM) の代謝物である *S*-adenosylhomocysteine (SAH) の結合部位近傍に位置していることが分かった。さらに、SAM や基質の結合に関与し、アミノ酸を置換すると不活性変異体となるグリシン 98, グルタミン酸 162, グルタミン酸 171 に立体的に近くに位置していたことから、酵素活性に影響する可能性があるかと予想し、C250 と C360 よりもむしろ C119 が最も有力な候補と考えて着目した (図 11 A)<sup>62-66</sup>。なお、3 次元構造は protein data bank から得ており (PDB6NT2)、データベース上に SAM との相互作用を示す構造がなかったため、SAH に着目した。そこで、システインをセリンに置換した変異体である C119S を作製した。また、C119 と同様にタンパク質表面に露出しているが、C119 とは立体的に離れた位置にある C226 について同様に変異体を作製した (図 11 B)。これらの変異体を過剰発現させるために、プラスミドの発現効率がよい HEK293T 細胞を用いた。HEK293T 細胞に、PRMT1 の野生型 (WT) と C119S, C226S をそれぞれトランスフェクションし、24 時間後に 200  $\mu$ M の SNOC を 30 分間処理してビオチンスイッチアッセイに供した。その結果、PRMT1 WT でみられていた SNO 化が、C119S ではほとんど見られなくなった (図 11 C, D)。一方で、C226S では有意な SNO 化の減少は見られなかった。以上から、C119 が主要な SNO 化部位であることが示唆された。

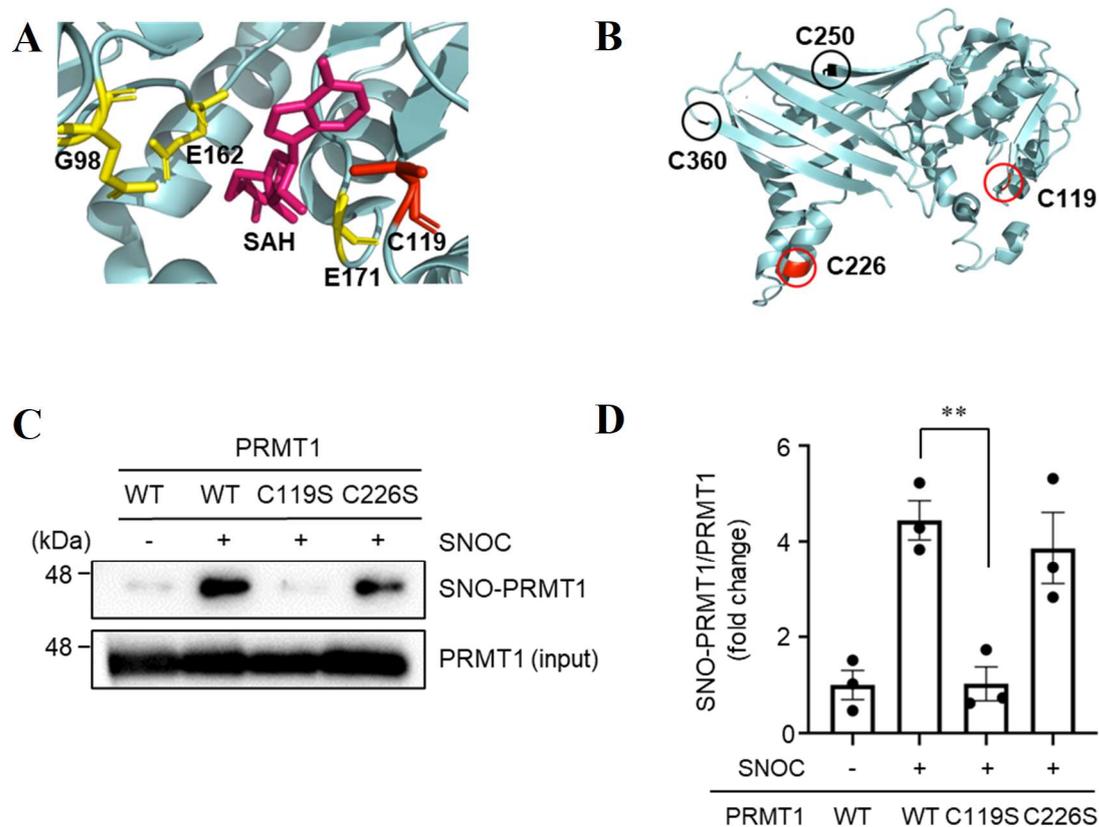


図 11 PRMT1 の SNO 化部位の同定

(A) PRMT1 の構造 (PDB 6NT2) は pyMOL ver. 2.5.5 を用いて再構築した. 赤は C119, ピンクは *S*-adenosylhomocysteine (SAH), 黄は不活性変異体となるアミノ酸を示す.

(B) 赤は C119 と C226 の位置, 黒は C250 と C360 の位置を示している. PRMT1 の構造 (PDB 6NT2) は pyMOL ver. 2.5.5 を用いて再構築した.

(C) HEK293T 細胞に各種 PRMT1 をトランスフェクションし, 24 時間後に 200  $\mu$ M の SNOC または old SNOC を 30 分間処理した. その細胞抽出液をビオチンスイッチアッセイとウエスタン・ブロッティングに供し, 抗 PRMT1 抗体で検出した.

(D) (C) の SNO-PRMT1 を定量化し, input の PRMT1 で標準化した. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $n = 3$ , \*\* $p < 0.01$  vs PRMT1 WT (SNOC+).

### 2-2-3 PRMT1 の SNO 化による酵素活性への影響

C119 が SAH の結合部位や酵素活性に関与するアミノ酸の近傍に位置することから、PRMT1 の SNO 化が酵素活性に影響を及ぼす可能性が予想された。そこで、NO ドナーによる酵素活性の影響を検討した。PRMT1 はタンパク質のアルギニンを非対称性にジメチル (asymmetric dimethyl arginine: ADMA) 化する酵素であることから、NO ドナーによる ADMA 化レベルへの影響を検討した。なお、PRMT1 はモノメチル化と ADMA 化の両方を担う酵素であるが、ADMA 化がより Type I に特異的な修飾であること、さらに PRMT1 のノックダウンにより ADMA 化レベルの減少とモノメチル化レベルの増加がみられるという報告があったことから、ADMA 化レベルが PRMT1 の活性をより反映する修飾様式だと考えて着目した<sup>67</sup>。メチル化が安定な修飾であることから、PRMT1 の SNO 化による影響を見るために NO ドナーで 48 時間処理した。SNOC や GSNO は半減期がそれぞれ数分間、数時間と短いため、NO 供与体であり半減期が 21 時間と長い NOC-18 を用いた<sup>68,69</sup>。PRMT1 の SNO 化の検討で用いた SH-SY5Y 細胞は NO ドナーによる細胞毒性に感受性が高く、200  $\mu$ M NOC-18 の 48 時間処理では検討に必要なライゼート量を安定して回収できなかったこと、また複数の細胞で NO ドナーによる ADMA 化への影響を検討することを考え、タンパク質全体の ADMA 化レベルの検討に HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞でも PRMT1 が発現していることを Human Protein Atlas で確認した (第 4 章 考察の表 3)。HeLa 細胞を用いてタンパク質全体の ADMA 化レベルに及ぼす NO の影響を検討したところ、NO ドナー処理濃度依存的な ADMA 化レベルの減少がみられた (図 12A, B)。なお、Type I PRMT 阻害薬の MS023 処理でも同様に ADMA 化レベルの減少がみられることを確かめた<sup>67</sup>。また上記のように 200  $\mu$ M の NOC-18 に対する感受性の高さから、SH-SY5Y 細胞を用いた検討は図 12C に示す 1 例のみ行ったため統計検定は行えないが、SH-SY5Y 細胞でも同様に NO ドナー処理濃度依存的に ADMA 化レベルが減少する傾向があることを確認した (図 12C)。

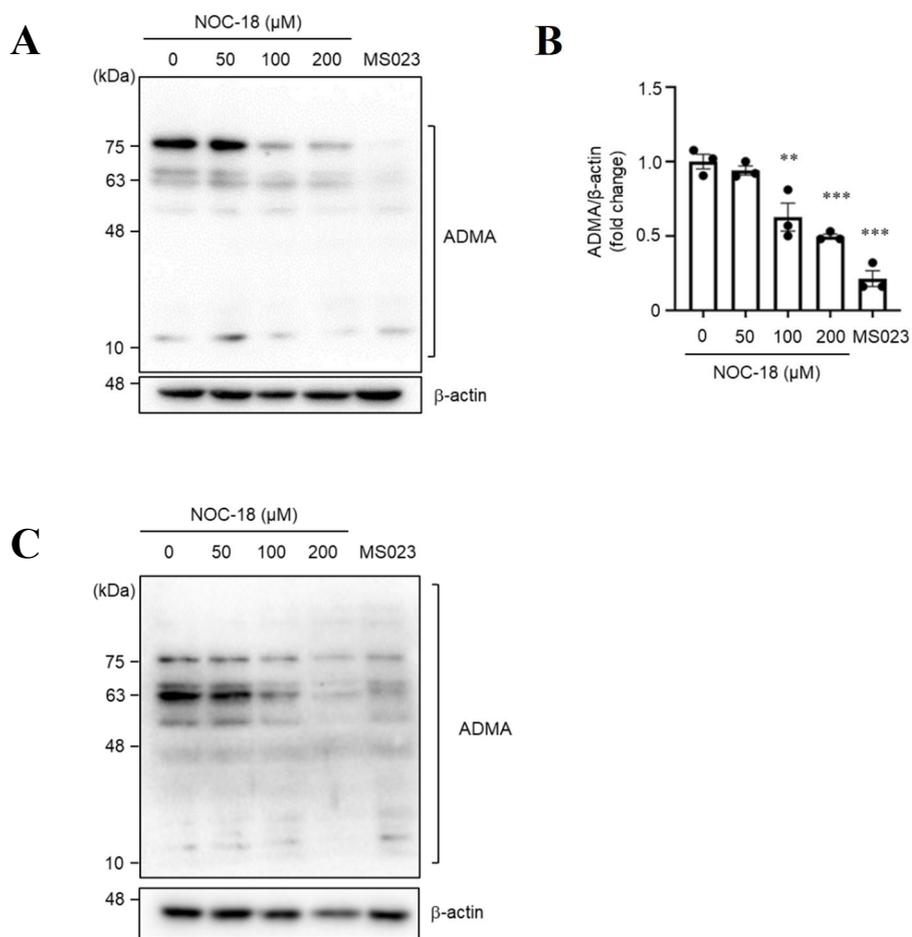


図 12 NO ドナーによる ADMA 化レベルへの影響

(A) HeLa 細胞に 0, 50, 100, 200 μM の NOC-18 もしくは 10 μM の MS023 を 48 時間処理し、細胞抽出液をウェスタン・ブロッティングに供し、抗 ADMA 抗体 (Anti-dimethyl-arginine Antibody, asymmetric (ASYM24)), もしくは抗 β-actin 抗体で検出した。

(B) (A) の ADMA (メンブレン全体) を定量化し、β-actin で標準化した。One-way ANOVA with Dunnett's test. Values are expressed as mean ± SEM. n = 3, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

(C) SH-SY5Y 細胞に 0, 50, 100, 200 μM の NOC-18 もしくは 10 μM の MS023 を 48 時間処理し、細胞抽出液をウェスタン・ブロッティングに供し、抗 ADMA 抗体 (ASYM24), もしくは抗 β-actin 抗体で検出した。

そこで次に、PRMT1 の基質であるヒストン H4R3 の ADMA 化レベルへの NO の影響を検討した。主にヒストン H4R3 の ADMA 化を担う酵素は PRMT1 であると報告されている<sup>67</sup>。HEK293T 細胞に NOC-18 を 48 時間処理して、ヒストン抽出を行い、ウエスタン・ブロッティングに供した。その結果、NO ドナー処理濃度依存的なヒストン H4R3 の ADMA 化レベルの減少がみられた (図 13 A, B)。以上から、PRMT1 は SNO 化を介して酵素活性が抑制されることが示唆された。

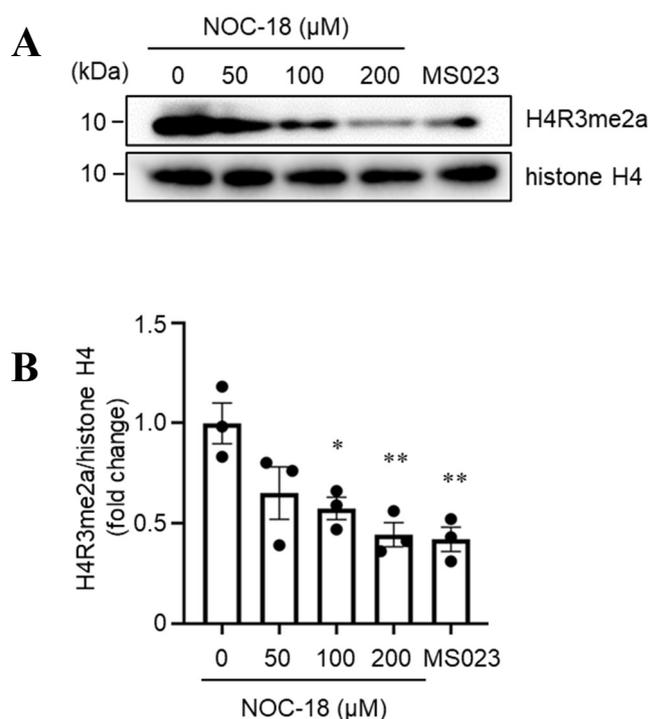


図 13 NO ドナーによる H4R3 の ADMA 化レベルへの影響

(A) HEK293T 細胞に、0, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$  の NOC-18 を 48 時間処理し、ヒストン抽出して、ウエスタン・ブロッティングに供し、抗 H4R3me2a 抗体もしくは抗 histone H4 抗体で検出した。

(B) (A) の H4R3me2a レベルを定量化し、histone H4 で標準化した。One-way ANOVA with Dunnett's test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $n = 3$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

#### 2-2-4 BioID による PRMT1 基質の探索

NO ドナーによって PRMT1 が SNO 化され、酵素活性が抑制されることが示唆されたことから、PRMT1 の SNO 化による活性制御が、病態に及ぼす影響を解明することを目的に BioID を用いて基質の探索を行った。BioID による PRMT1 基質の網羅的探索を行い PRMT1 近傍のタンパク質の機能を知ることで、PRMT1 の機能を解析することが出来るため、より適切な基質を選定することができると考えた。BioID は PRMT1 近傍のタンパク質をビオチン化して標識し、LC-MS/MS を用いて基質を検出することができるため、免疫沈降法と比較してより多くの基質を探索できることから、PRMT1 の機能を広く解析できると考えた。また、これまでに BioID を用いて PRMT グローバルな機能を考察する論文はあったものの、PRMT1 だけに着目した論文はなかったため実施した<sup>70</sup>。BioID は、大腸菌ビオチンリガーゼである BirA が目的タンパク質近傍に存在する基質のリジンのアミノ基にビオチンを付加することにより、基質を検出する。そこでまず、BirA 配列を挿入した PRMT1 をトランスフェクション効率が高い HEK293T 細胞に発現させた。トランスフェクションの 24 時間後に 50  $\mu$ M のビオチンを添加し、24 時間後に細胞抽出液を回収してビオチン化されたタンパク質を NeutrAvidin agarose で濃縮した。まずタンパク質がビオチン化されているか確かめるために、ビーズで濃縮したビオチン化基質をウエスタン・ブロッティングに供した。検討の際、PRMT1-BirA をトランスフェクションしないサンプル、ビオチンを添加しないサンプルをコントロールとして用意した。streptavidin 抗体を用いてビオチン化された基質を検出した結果、PRMT1-BirA を過剰発現し、ビオチンを添加したサンプルでは、バンドがラダー状に検出されたのに対して、ビオチンを添加していないサンプルや PRMT1-BirA をトランスフェクションしていないサンプルではほとんどバンドが検出されなかった (図 14A)。また、銀染色に供したところ PRMT1-BirA の発現によってバンドがラダー状に検出されたが、コントロールでも薄くバンドが検出された (図 14B) 次に、PRMT1-BirA をトランスフェクションしたサンプルと、コントロールとして PRMT1-BirA プラスミドをトランスフェクションしていないサンプルの 2 サンプルを LC-MS/MS に供して、fold change を算出した。その結果、fold change が 2 以上であったビオチン標識されたタンパク質を 1349 種、メチル化が検出されたタンパク質を 38 種単離し、1349 種のビオチン標識されたタンパク質のうち、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の遺伝子シンボルを持つ 1109 種のタンパク質について、データベース Harmonizome 3.0 に収載されている 2064 種の PRMT1 基質と一致するの比較した (図 15A)。BioVenn を用いて、ベン図を作成して比較した。興味深いことに、解析で得られた基質候補の約半数である 580 種がデータベースに含まれてい

た。また、残りの 529 種はデータベースに含まれていない新規の基質候補であると考えられた。次に fold change が 2 以上のビオチン化された基質候補のうち、上位 500 種を Gene Ontology (GO) 解析に供し、PRMT1 の基質候補がどのような機能を持つか調べた。その結果、上位から翻訳、細胞分裂、リボヌクレオタンパク質複合体形成、mRNA 代謝経路が該当した (図 15B)。これまでに PRMT1 は基質として RNA 結合タンパク質を多く持つことが知られている。さらに BioID で同定した基質候補に広義の RNA 代謝に関わる基質が多く含まれていたことから、RNA 代謝が PRMT1 における重要な機能の一つであることが示唆された。

BioID では PRMT1 のメチル化基質ではないタンパク質もビオチン化されて単離される。よって、今回 LC-MS/MS によって算出された fold change は、より多くビオチン化されたタンパク質の指標であり、PRMT1 近傍に位置している、または相互作用している可能性は高いが、PRMT1 のメチル化基質かは明らかでない。タンパク質アルギニンメチル化の割合は 0.5-2%と報告されており、1349 種という数字は 2%を上回っているため、メチル化基質ではないものが含まれていると考えられる<sup>16</sup>。そのため、基質選定の際には、メチル化が LC-MS/MS で検出されているものを選択することや、fold change やペプチドカバー率が低いものを排除することが必要である。また、基質候補が PRMT1 と相互作用するか、さらにメチル化されるかを検討する必要がある。そこで、1349 種の中から fold change の大きさを重視して基質の選定を行うのではなく、メチル化が検出された 38 種の中から基質を選定し (表 1)、RNA 代謝に関わる基質候補の中でも、ALS との関連が示唆されている Dead box helicase 3X-linked (DDX3) に着目した<sup>36</sup>。メチル化による DDX3 機能への影響はほとんど明らかでなく、一方で RNA 代謝や ALS との関与が報告されていたことから、NO と RNA 代謝との関連を明らかにできると考えた<sup>71</sup>。なお、DDX3 の fold change は約 16 であり、順位は上から 477 番目で、カバー率は 44%であった。LC-MS/MS の結果、DDX3 のアミノ酸 82-93 配列では、ジメチル基が付加したペプチドが検出され、アルギニン 88 (R88) がジメチル化されることが示唆された (図 16A, B)。また、アミノ酸 604-622 の配列では、メチル基あるいはジメチル基が付加したペプチドが検出され、アルギニン 617 (R617) がメチル化の標的であることが示唆された (図 16A, C, D)。以上から、DDX3 の R88 と R617 がジメチル化されることが明らかとなった。

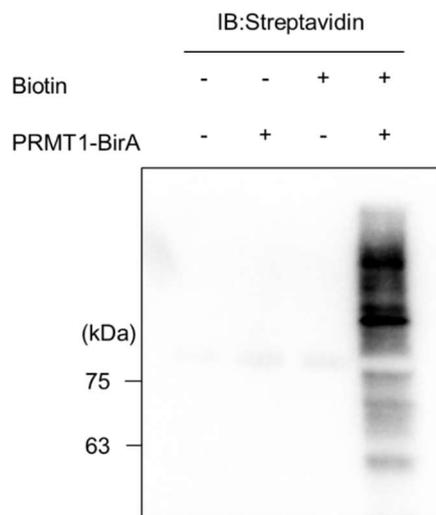
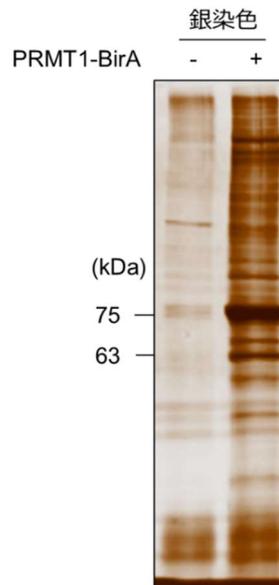
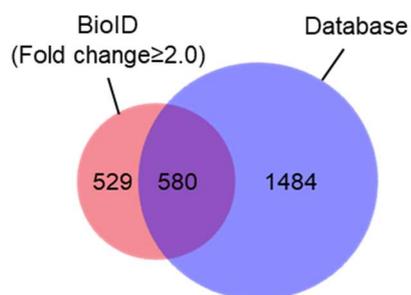
**A****B**

図 14 BirA によるビオチン化標識の確認

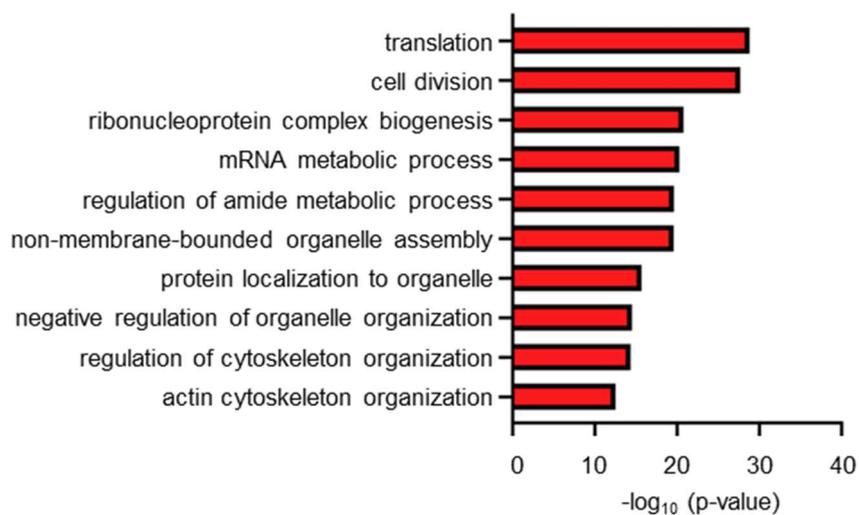
(A) HEK293T 細胞に PRMT1-BirA を過剰発現させ、24 時間後に 50  $\mu$ M のビオチンを添加した。PRMT1-BirA をトランスフェクションしないサンプルと、トランスフェクションしたがビオチンを添加しないサンプルをコントロールとして用意している。その 24 時間後に細胞抽出液を回収し、NeutrAvidin agarose でビオチン標識タンパク質を濃縮し、ウエスタン・ブロッティングに供して、streptavidin 抗体で検出した。

(B) HEK293T 細胞に PRMT1-BirA を過剰発現させ、24 時間後に 50  $\mu$ M のビオチンを添加した。その 24 時間後に細胞抽出液を回収し、NeutrAvidin agarose でビオチン標識タンパク質を濃縮し、ウエスタン・ブロッティングに供して、銀染色を行った。

**A**



**B**



**図 15 PRMT1 基質の探索**

(A) BioID で fold change が 2 以上であった基質候補のうち、NCBI gene symbol を有する 1109 種のタンパク質について、データベース Harmonizome に収載されている PRMT1 基質と一致するか比較した。BioVenn を用いて、ベン図を作成して比較した。

(B) fold change が 2 以上のビオチン化された基質のうち、上位 500 種を GO 解析に供し、PRMT1 の基質候補がどのような機能を持つか調べた。GO 解析には、Metascape ver.3.5.20230501 を用いた。

表 1 BioiD においてメチル化が検出されたタンパク質  
赤色のハイライトは RNA 代謝に関するタンパク質を示す.

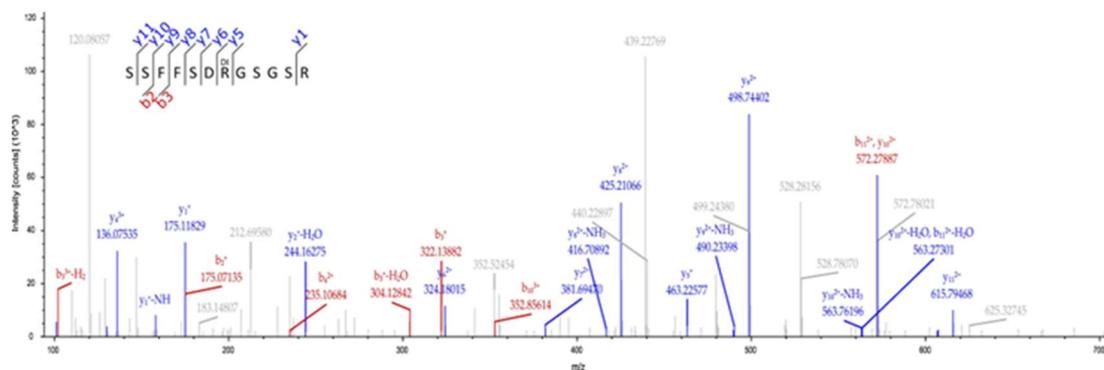
accession number	protein
AAI40893.1	EIF4G1 protein
EAW78207.1	splicing factor, arginine/serine-rich 10
KAI2599083.1	DEAD-box helicase 3 X-linked
NP_114032.2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
EAW73126.1	zinc finger protein 326
AAH22458.2	Protein arginine methyltransferase 8
AAB50657.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
NP_112740.1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
NP_001120666.1	CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein
AAH71727.1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
AAD51932.1	RNA-binding protein isoform G3BP-2a
KAI2578287.1	FUS RNA binding protein
XP_011528297.1	RNA-binding protein EWS
NP_005773.3	THO complex subunit 4
NP_061856.1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1
AAB20835.2	collagen type VI alpha 1(VI) chain
KAI4041190.1	HAUS augmin like complex subunit 8
NP_004095.4	fatty acid synthase
NP_001029757.1	actin, alpha cardiac muscle 1
AAP97151.1	D-myo-inositol-3-phosphate synthase
AAC52035.1	beta-tubulin
AAH11656.1	CDC27 protein
BAG53005.1	unnamed protein product
BAG62811.1	unnamed protein product
AAD23857.1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit
EAW50164.1	hCG2040259
NP_000217.2	keratin, type I cytoskeletal 9
BAA22050.1	heat shock protein beta
BAG54029.1	unnamed protein product
XP_016858111.1	integrin alpha-10 isoform X1
XP_024302523.1	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1
NP_001353772.1	folliculin-interacting protein 2
AAC50139.1	acetyl-CoA carboxylase
APD78599.1	glutaryl-CoA dehydrogenase
EAW51205.1	coronin 6
BAG61435.1	unnamed protein product
AYA44277.1	envelope protein
BAD97082.1	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')

RNA代謝に関する

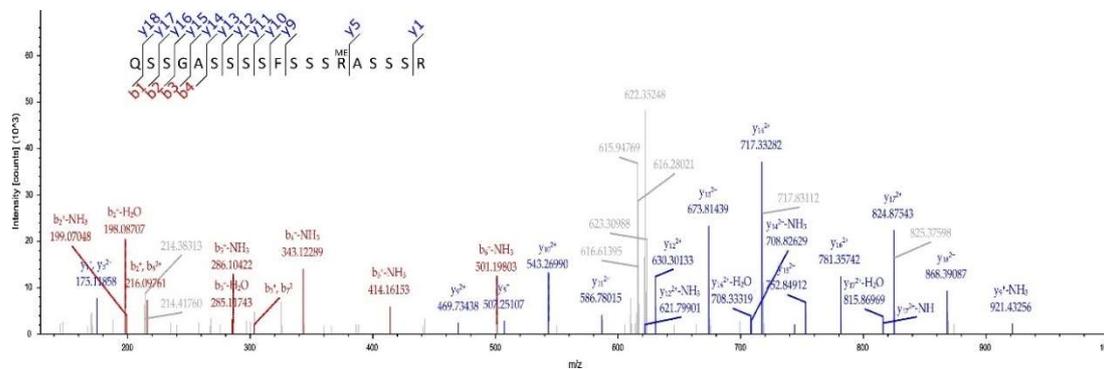
**A**

No.	Position	Peptide sequence	Modification site	Methylation
1	82-93	SSFFSD <b>R</b> GSGSR	R88	dimethylation
2	604-622	QSSGASSSS <b>F</b> SS <b>R</b> ASSSR	R617	methylation · dimethylation

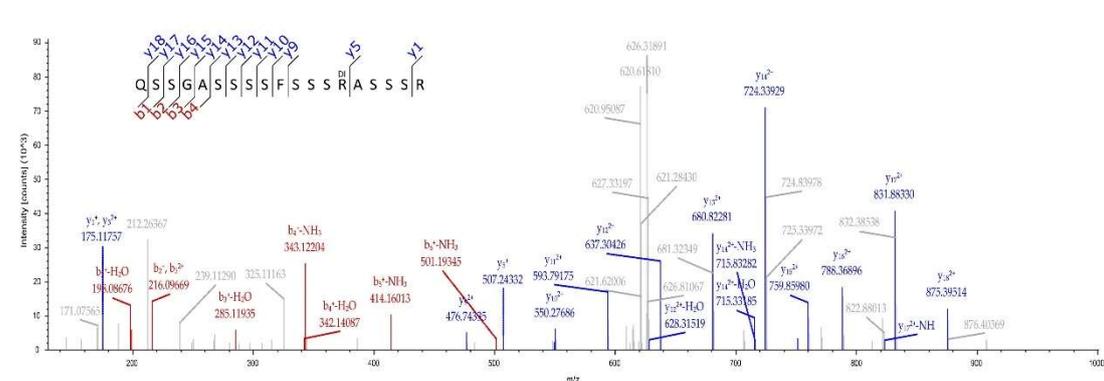
**B**



**C**



**D**



## 図 16 BioID による DDX3 アルギニンメチル化部位同定

(A) LC-MS/MS で検出された DDX3 のアルギニンメチル化部位の表.

(B) アミノ酸 82-93 配列でのペプチドの MS/MS スペクトル. R88 にジメチル基が付加したペプチドが検出された. アミノ酸配列中の DI はジメチル化を示す.

(C) アミノ酸 604-622 配列でのペプチドの MS/MS スペクトル. R617 にメチル基が付加したペプチドが検出された. アミノ酸配列中の ME はメチル化を示す.

(D) アミノ酸 604-622 配列でのペプチドの MS/MS スペクトル. R617 にメチル基が付加したペプチドが検出された. アミノ酸配列中の DI はジメチル化を示す.

## 2-2-5 PRMT1 による DDX3 の ADMA 化と NO ドナーによる影響

PRMT1 と DDX3 が相互作用するか確認するために、共免疫沈降法に供した。HEK293T 細胞に、FLAG タグ標識された PRMT1 と HA タグ標識された DDX3 を共発現した。トランスフェクション 24 時間後に細胞を回収し、抗 HA 抗体で免疫沈降し、ウエスタン・ブロッティングに供して、抗 FLAG 抗体で検出した。その結果、PRMT1 は DDX3 と相互作用することが分かった (図 17)。次に、DDX3 が asymmetric dimethyl arginine (ADMA) 化されるか検討した。HEK293T 細胞に PRMT1 と DDX3 を共発現させ、抗 HA 抗体で免疫沈降し、抗 ADMA 抗体で検出した。その結果、DDX3 は ADMA 化されることが分かった。さらに、DDX3 の ADMA 化レベルへの PRMT1 の SNO 化の影響を検討するために、NO ドナーとして 200  $\mu$ M の NOC-18 を 48 時間処理したところ DDX3 の ADMA 化レベルが有意に減少した (図 18A, B)。また Type I PRMT の阻害薬である MS023 処理によっても DDX3 の ADMA 化レベルが減少することを確かめている。以上の結果から、DDX3 は PRMT1 によって ADMA 化され、NO ドナー処理によって ADMA 化が抑制されることが明らかとなった。

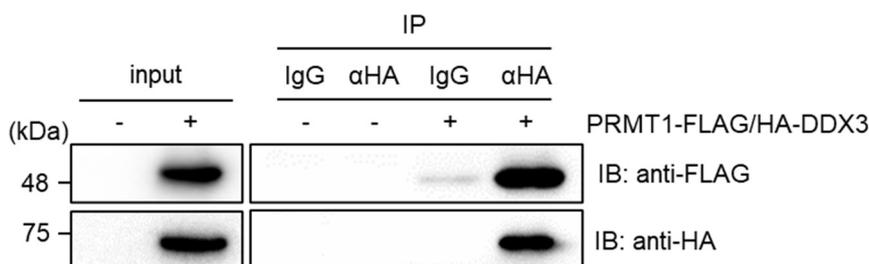


図 17 PRMT1 と DDX3 の相互作用の検討

HEK293T 細胞に、FLAG タグ標識された PRMT1 と HA タグ標識された DDX3 を共発現した。トランスフェクション 24 時間後に細胞を回収し、抗 HA 抗体 (HA tag Polyclonal antibody (rabbit)) もしくは IgG (normal rabbit IgG) で免疫沈降し、ウエスタン・ブロッティングに供して、抗 FLAG 抗体もしくは抗 HA 抗体 (HA-Tag (6E2) Mouse mAb) で検出した。

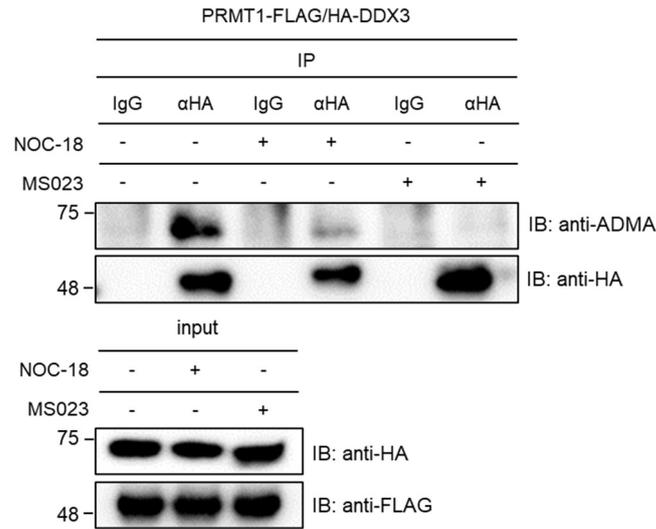
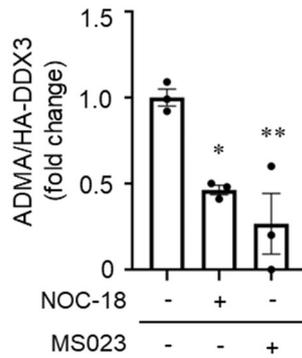
**A****B**

図 18 DDX3 の ADMA 化の検出

(A) HEK293T 細胞に PRMT1 と DDX3 を共発現させ、6 時間後に 200  $\mu$ M の NOC-18 もしくは 10  $\mu$ M の MS023 を処理して 48 時間後に細胞抽出液を回収した。HA 抗体 (HA Tag Monoclonal antibody (mouse)) もしくは IgG (normal mouse IgG) で免疫沈降し、ウェスタン・ブロッティングに供して、抗 ADMA 抗体 (asymmetric dimethyl arginine motif [adme-R] MultiMub Rabbit mAb mix), 抗 HA 抗体 (HA tag Polyclonal antibody (rabbit)), 抗 FLAG 抗体で検出した。

(B) (A) の ADMA 化レベルを定量化し、免疫沈降した DDX3 で標準化した。One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. n = 3, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs コントロール (NOC-18-, MS023-).

## 2-2-6 NO ドナーによる DDX3 酵素活性への影響

DDX3 が ATP 依存性 RNA ヘリカーゼであることから、ヘリカーゼアッセイを行い DDX3 ヘリカーゼ活性への NO の影響を検討した。ヘリカーゼアッセイでは DDX3 が 2 本鎖 RNA (dsRNA) を 1 本鎖 RNA (ssRNA) に解く現象を、ゲル電気泳動で検出した。PRMT1 の SNO 化による影響を検討するために、DDX3 は NO ドナー処理を行った細胞から抽出した。HEK293T 細胞に HA タグ標識された DDX3 をトランスフェクションし、その 6 時間後に 100  $\mu$ M の NOC-18 を処理し、48 時間後に細胞抽出液を回収した。また ADMA 化レベルの減少状態を模倣するコントロールとして、MS023 処理群を用意した。細胞抽出液に Pierce anti-HA magnetic beads を添加して DDX3 を濃縮し、ヘリカーゼアッセイに供した。なお、細胞には DDX3 以外のヘリカーゼも存在することから DDX3 を過剰発現した場合にのみ ssRNA を検出できることを確認するために、コントロールとして DDX3 をトランスフェクションしていない細胞由来のサンプルを用いた。この時、DDX3 をトランスフェクションした場合にのみ細胞抽出液のタンパク質量依存的に ssRNA レベルが増加することを確認した (図 19)。検討の結果、NO 未処理のコントロールと比較して NO ドナー処理群と MS023 処理群では ssRNA レベルが増加した (図 20A, B)。以上から、DDX3 は NO ドナーや PRMT1 阻害薬処理によって酵素活性が上昇することが示唆された。

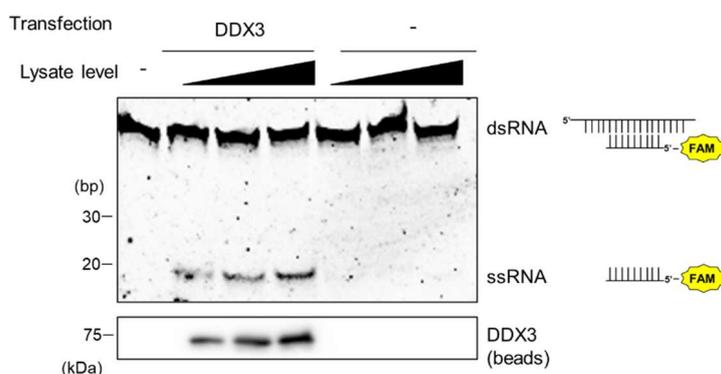


図 19 DDX3 のヘリカーゼ活性測定

HEK293T 細胞に HA タグ標識された DDX3 もしくは pCMV10 ベクターをトランスフェクションし、48 時間後に細胞抽出液を回収した。0, 500, 1000, 1500  $\mu$ g のタンパク質量の細胞抽出液に Pierce anti-HA magnetic beads を添加して DDX3 を濃縮し、ヘリカーゼアッセイに供した。免疫沈降した DDX3 をヘリカーゼアッセイ終了後にウエスタン・ブロッティングに供し、抗 HA 抗体 (HA tag Polyclonal antibody (rabbit)) で検出した。

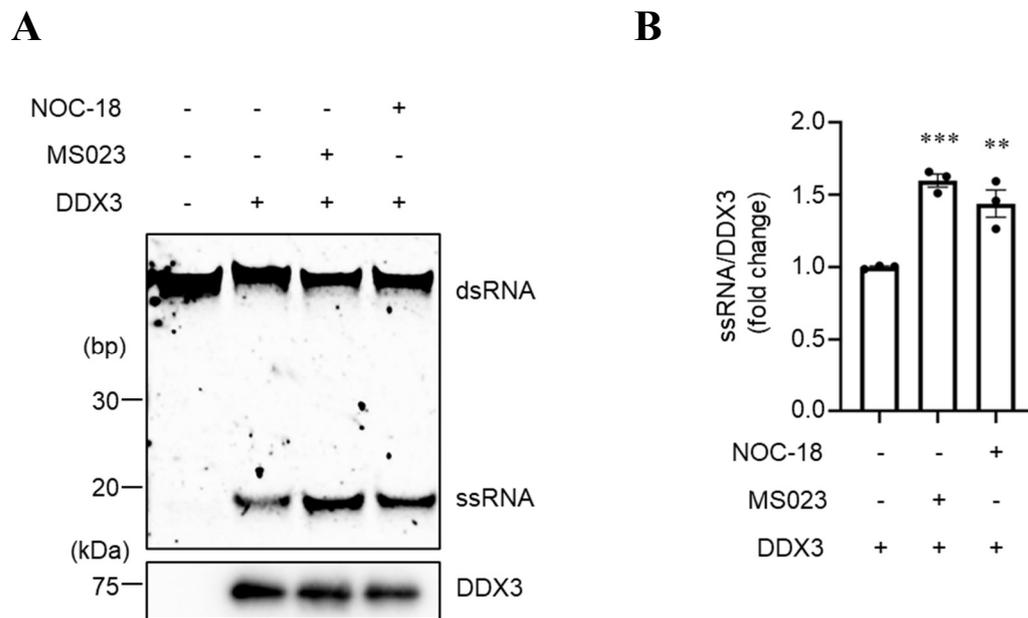


図 20 NO ドナーによる DDX3 ヘリカーゼ活性への影響

(A) HEK293T 細胞に HA タグ標識された DDX3 をトランスフェクションし、その 6 時間後に 100  $\mu$ M の NOC-18 または 10  $\mu$ M の MS023 を処理し、48 時間後に細胞抽出液を回収した。500  $\mu$ g のタンパク質量の細胞抽出液に Pierce anti-HA magnetic beads を添加して DDX3 を濃縮し、ヘリカーゼアッセイに供した。免疫沈降した DDX3 を、ヘリカーゼアッセイ終了後にウエスタン・ブロッティングに供し、抗 HA 抗体 (HA tag Polyclonal antibody (rabbit)) で検出した。

(B) (A) の ssRNA レベルを定量化し、免疫沈降した DDX3 で標準化した。One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $n = 3$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs コントロール (NOC-18-, MS023-).

## 2-2-7 NO ドナーによる DDX3 基質のタンパク質レベルへの影響

これまでの結果から、仮説として、PRMT1 が SNO 化されて DDX3 の ADMA 化レベルが減少し、ヘリカーゼ活性が上昇する可能性が考えられた (図 21)。NO ドナーによってヘリカーゼ活性が上昇したことから、DDX3 制御タンパク質の発現に NO が影響するか検討した。DDX3 のノックダウンは翻訳全体には影響しないが、5'UTR に 2 次構造を持つ RNA の翻訳抑制を解除することが報告されている<sup>36</sup>。DDX3 の RNA 基質の一つに STAT1 がある。STAT1 は 5'UTR に 2 次構造をもち、DDX3 によって 2 次構造が解かれることで翻訳が促進されるという報告がある<sup>72</sup>。そこで HEK293T 細胞に 100  $\mu$ M の NOC-18 を 72 時間処理して、細胞抽出液を回収し、ウエスタン・ブロッティングに供した。その結果、NO ドナーの処理によって STAT1 のタンパク質レベルが増加した (図 22A, B)。以上から PRMT1 の SNO 化は DDX3 のヘリカーゼ活性を上昇させ、STAT1 のタンパク質レベルでの発現を増加させる可能性がある。

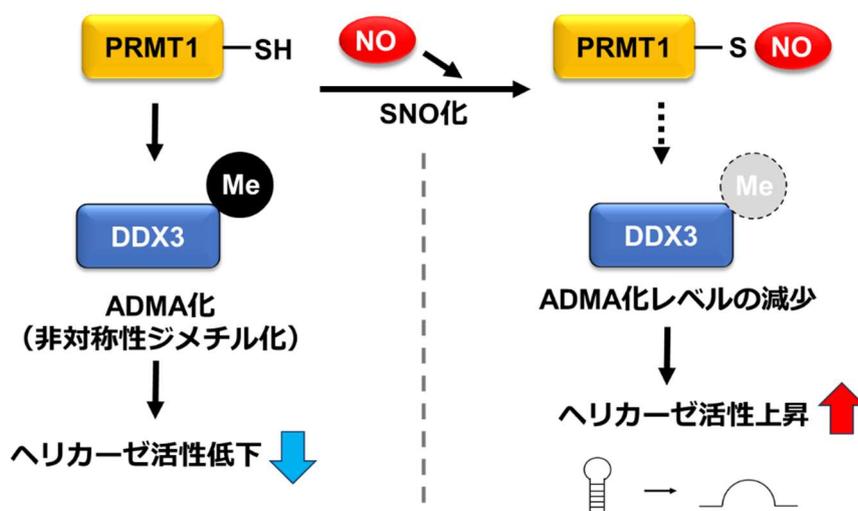


図 21 PRMT1 の SNO 化における DDX3 への影響の仮説

DDX3 は定常状態でヘリカーゼ活性を有するが、PRMT1 が SNO 化されて DDX3 の ADMA 化レベルが減少することで、ヘリカーゼ活性が上昇する可能性が考えられた。

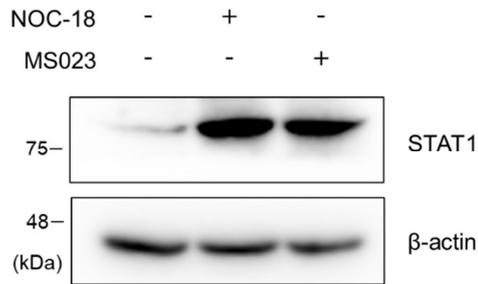
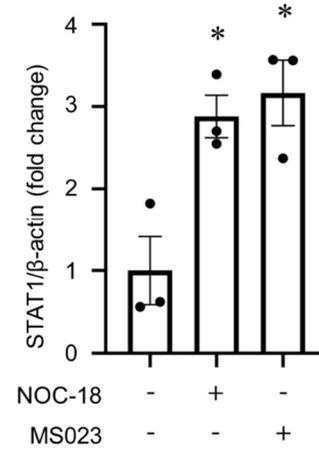
**A****B**

図 22 NO ドナーによる STAT1 のタンパク質レベルへの影響

(A) HEK293T 細胞に 100  $\mu$ M NOC-18 または 10  $\mu$ M MS023 を 72 時間処理して細胞抽出液を回収し、ウエスタン・ブロッティングに供し、抗 STAT1 抗体または抗  $\beta$ -actin 抗体で検出した。

(B) (A) の STAT1 レベルを定量化し、 $\beta$ -actin で標準化した。One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $n = 3$ , \* $p < 0.05$  vs コントロール (NOC-18-, MS023-).

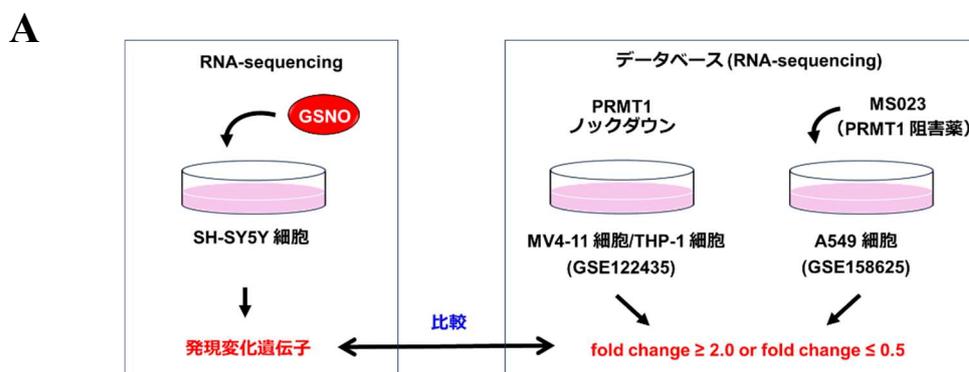
## 2-2-8 NO ドナーと PRMT1 阻害による転写への影響

PRMT1 の基質にはヒストンや転写因子があり、転写制御に関わることが報告されている<sup>31-33</sup>。また、DDX3 についても転写調節に関与することが報告されている<sup>37</sup>。そのため、SNO 化による PRMT1 の機能抑制が転写に影響する可能性が予想された。そこで、PRMT1 の SNO 化と遺伝子発現変化との関連性を明らかにすることを目的とし、gene set enrichment analysis (GSEA) を行い、NO ドナー処理と PRMT1 ノックダウンまたは阻害薬処理における遺伝子発現変化を比較した。NO ドナー処理によって発現が変化する遺伝子は SH-SY5Y 細胞に GSNO を処理して 48 時間後に回収した細胞を RNA sequencing に供して得られた 26443 種の遺伝子のデータを用いた (DRA017247)。神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を選択した理由は、将来展望として神経変性疾患への PRMT1 の SNO 化の影響を検討することを考慮したためである。また、PRMT1 ノックダウンもしくは PRMT1 阻害薬 MS023 処理によって発現が変化する遺伝子は、データベースから引用した (GSE122435, GSE158625)<sup>73,74</sup>。比較に用いたデータベースの遺伝子群は、ヒト白血病細胞腫 MV4-11 細胞もしくは THP-1 細胞で PRMT1 をノックダウンしたもの、またはヒト肺胞上皮腺がん由来 A549 細胞で 1  $\mu$ M の MS023 を 7 日間処理したもので、それぞれコントロールと比較して fold change が 2 以上である発現増加した遺伝子と 0.5 以下の発現低下した遺伝子を解析に供した (表 2, 図 23A)。なお、NO を処理した細胞とデータベースから引用した細胞が異なる理由は、データベースには SH-SY5Y 細胞などの神経細胞を用いて PRMT1 のノックダウンまたは阻害薬処理を行った検討がなかったためである。GSEA に用いた細胞種が異なるものであったため、3 種類の細胞のデータを用いて解析に供し、どの細胞を用いても同様の結果が得られるか確認した。なお、Human Protein Atlas から、用いる細胞すべてで PRMT1 と DDX3 が発現していることを確かめている (表 2)。また、SH-SY5Y 細胞を用いた RNA sequencing での PRMT1 と DDX3 の NO ドナー処理による fold change は、それぞれ 0.83, 1.0 であり、NO ドナー処理によって発現量は大きく変化しなかった。また、GSEA では FDR q-value が 0.25 以下であると信頼性が高いと考えられている (GSEA のホームページの user guide にも記載がある、[https://www.gsea-msigdb.org/gsea/doc/GSEAUUserGuideFrame.html?Interpreting\\_GSEA](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/doc/GSEAUUserGuideFrame.html?Interpreting_GSEA))<sup>75</sup>。解析の結果、PRMT1 ノックダウンまたは阻害薬処理によって fold change が 2 以上の発現増加した遺伝子は GSNO 処理で発現増加した遺伝子に有意に多く含まれていることが分かった (図 23B)。また、fold change が 0.5 以下の発現低下した遺伝子については、MV4-11 細胞で PRMT1 をノックダウンした際に発現低下した遺伝子が、NO で発現低下した遺伝子に有意に多く含まれていることが分かった (図 23C)。以上から、PRMT1 のノックダウンや阻害薬処理にお

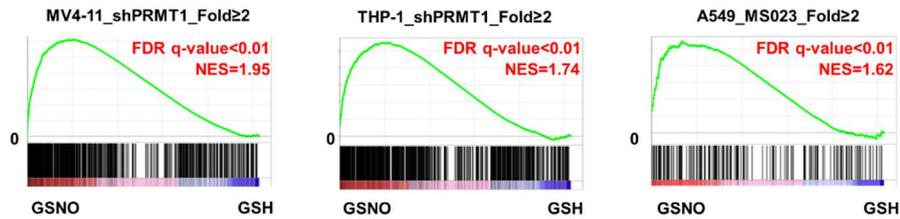
ける遺伝子発現変化と NO ドナー処理における遺伝子発現変化に類似性が認められた。次に、NO ドナー処理と、MV4-11 細胞における PRMT1 のノックダウンで、GSEA においてともに発現増加した遺伝子を制御する転写因子を Homer の promoter motif analysis を用いて解析した。該当遺伝子のプロモーター配列を基に、一致する転写因子の配列を解析した。その結果、炎症に関わる interferon regulatory factor (IRF) ファミリーの結合配列をプロモーター領域にもつ遺伝子が多く含まれることが分かった (図 23D)。

表 2 GSEA で使用した細胞の由来, PRMT1 と DDX3 の発現量

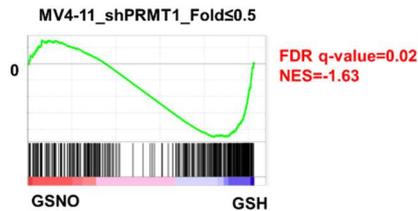
細胞	由来	PRMT1 (TPM)	DDX3 (TPM)
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫由来	322.8	207.5
MV4-11	ヒト急性慢性白血病由来	527.2	81.1
THP-1	ヒト単球白血病由来	248.0	124.1
A549	ヒト肺胞上皮腺がん由来	388.4	240.7



**B**



**C**



**D**

Rank	Motif	Name
1		IRF2(IRF)/Erythroblas-IRF2-ChIP-Seq(GSE36985)/Homer
2		ISRE(IRF)/ThioMac-LPS-Expression(GSE23622)/Homer
3		IRF3(IRF)/BMDM-Irf3-ChIP-Seq(GSE67343)/Homer
4		IRF1(IRF)/PBMC-IRF1-ChIP-Seq(GSE43036)/Homer
5		NFkB-p65-Rel(RHD)/ThioMac-LPS-Expression(GSE23622)/Homer
6		PU.1:IRF8(ETS:IRF)/pDC-Irf8-ChIP-Seq(GSE66899)/Homer

図 23 NO ドナー処理と PRMT1 ノックダウンまたは阻害薬処理における発現変動遺伝子の比較

(A) GSEA に供した遺伝子の概要図.

(B) GSEA を行い、NO ドナー処理と PRMT1 ノックダウンまたは阻害薬処理における遺伝子発現変化を比較した。NO ドナー処理によって発現が変化する遺伝子は SH-SY5Y 細胞に GSNO を処理して 48 時間後に回収した細胞を RNA sequencing に供して得られた遺伝子の

データを用いた。また、PRMT1 ノックダウンもしくは PRMT1 阻害薬 MS023 を処理した際に発現が変化する遺伝子は、データベースから引用した (GSE122435, GSE158625)。比較に用いたデータベースの遺伝子群は、MV4-11 細胞もしくは THP-1 細胞で PRMT1 をノックダウンしたもの、または A549 細胞で 1  $\mu$ M の MS023 を 7 日間処理したもので、それぞれコントロールと比較して fold change が 2 以上の遺伝子を解析に供した。縦軸は enrichment score であり、NES は normalized enrichment score である。

(C) GSEA を行い、NO ドナー処理と PRMT1 ノックダウンまたは阻害薬処理における遺伝子発現変化を比較した。NO ドナー処理によって発現が変化する遺伝子は SH-SY5Y 細胞に GSNO を処理して 48 時間後に回収した細胞を RNA sequencing に供して得られた遺伝子のデータを用いた。また、MV4-11 細胞において PRMT1 ノックダウン時に発現が変化する遺伝子は、データベースから引用し (GSE122435)、fold change が 0.5 以下の遺伝子を解析に供した。

(D) NO ドナー処理時と MV4-11 細胞における PRMT1 ノックダウン時とともに発現増加した遺伝子 322 種を制御する転写因子を Homer の promoter motif analysis を用いて解析した。遺伝子のプロモーター領域に結合配列を有する転写因子の上位 6 種を示している。

## 2-3 考察

### PRMT1 の SNO 化による酵素活性抑制について

本研究では、まず SH-SY5Y 細胞を用いて PRMT1 が NO ドナー処理濃度依存的に SNO 化されることを確認した (図 10)。SNO 化の検出のために用いたビオチンスイッチアッセイは、2001 年に Jaffrey らによって確立され、それ以降タンパク質の SNO 化を検出する手法として多くの論文で用いられてきた<sup>6-11,13,43</sup>。この手法では、細胞を可溶化して細胞抽出液の状態にし、NO ドナーによって修飾されていないフリーのチオール基を MMTS によるジスルフィド結合で保護する。次にアスコルビン酸を添加して、SNO 化修飾を還元してビオチンを付加させ、NeutrAvidin agarose で沈降することで SNO 化タンパク質を検出する手法である。この手法では、アスコルビン酸が弱いジスルフィド結合やスルフヒドリル化修飾を還元し、ビオチン化標識することがある。しかし、今回の検討ではビオチン標識によって濃縮されたタンパク質が NO ドナー処理濃度依存的に増加したことを確認できたため、NO ドナー処理によって増加する SNO 化タンパク質を主に検出できていると考える。

この時、SNOC もしくは GSNO を用いて 50  $\mu$ M 以上の濃度で SNO 化が確認され、100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M ではより顕著な SNO 化がみられた。また 50  $\mu$ M 以上の濃度で同じく NO 供与体である NOC-18 処理濃度依存的な ADMA 化レベルの減少がみられた (図 12)。この際、Type I PRMT 阻害薬である MS023 を用いて、NO ドナー処理によって減少したバンドと同じ位置で ADMA 化レベルが減少したことを確認した。ADMA 化修飾を担う酵素は Type I PRMT のみであることが知られていることから、ADMA 化レベルの減少は Type I PRMT の酵素活性抑制を介していることが推定された。さらに、PRMT1 がタンパク質アルギニンメチル化の約 85%を担うこと、今回 ADMA 化レベルを検討した HEK293T 細胞、HeLa 細胞、SH-SY5Y 細胞における PRMT1 の転写レベルでの発現が PRMT ファミリーや脱メチル化酵素 JMJD6 と比べて高いことが公共データベース Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) で公表されていることから (表 3)、PRMT1 がアルギニンメチル化において主要な役割を担っていると考えられる<sup>26</sup>。以上から、NO ドナー処理による ADMA 化レベルの減少は Type I PRMT の酵素活性抑制を介していることが推定され、さらに PRMT1 の細胞での発現量が他の Type I PRMT より顕著に多いこと、PRMT1 が SNO 化されたことを合わせると、Type I の中でも PRMT1 の酵素活性が抑制されたと考える。これを支持するデータとして、NO ドナーによってヒストン H4R3 の ADMA 化レベルの減少を確認した (図 13)。ヒストン H4R3 の ADMA 化を担う酵素は主に PRMT1 であることが報告されている<sup>67,76-78</sup>。そのため NO ド

ナーによってみられたヒストン H4R3 の ADMA 化レベルの減少は、PRMT1 の酵素活性抑制によるものと考えられる。さらに PRMT1 を過剰発現した HEK293T 細胞で、DDX3 の ADMA 化レベルが NO ドナーによって減少したことを合わせると、PRMT1 の SNO 化は PRMT1 の酵素活性の抑制をもたらすことが示唆された (図 18)。一方で、SNO 化されている PRMT1 の割合は現在報告されている情報では推定できず、推定する方法も報告されていない。ビオチンスイッチアッセイによって得られた SNO 化 PRMT1 のバンドと input のバンドの強度を比較するという方法も考えられるが、SNO 化 PRMT1 の回収率が不明であるため、SNO 化される PRMT1 の割合を推定できない。PRMT1 の酵素活性が SNO 化を介して低下しているか否かは、*in vitro* の実験で検証することで議論の限界を補う必要がある。さらに、PRMT1 のノックダウンやノックアウト細胞を用いた検討を行うことで、NO ドナーによる ADMA 化レベルの減少が PRMT1 の機能抑制に起因しているのかを補填するデータを得られると考える。また、今回の議論の限界点として、HeLa 細胞においては SNO 化の検討を行っていないことがある。MS023 処理によって ADMA 化レベルの減少が認められていることから、Type I PRMT が ADMA 化レベルの減少に関わっていることが示唆される。HeLa 細胞においても HEK293T 細胞や SH-SY5Y 細胞と同様に PRMT1 が発現しており、発現量が他の Type I PRMT と比較して多いということを踏まえると、NO ドナーによる ADMA 化レベルの減少は PRMT1 の SNO 化に起因していることが考えられる (表 3)。しかし、HeLa 細胞でみられた NO ドナーによる ADMA 化レベルの減少が、PRMT1 の SNO 化によって起こることを示すためには、HeLa 細胞でも PRMT1 の SNO 化を検討する追加実験が必要である。

また、タンパク質全体の ADMA 化レベルを検討した際に、63-75 kDa 付近のタンパク質が顕著に検出された。同じ抗体を用いて ADMA 化を検出している過去の論文でも同様の位置にバンドが検出されていることを確認した<sup>79</sup>。一方で、PRMT1 の基質の分子量に偏りがあることは報告されていない。63-75 kDa 付近でバンドが強く検出される理由として、Type I PRMT の基質が多数存在する、発現量が多い、メチル化されるアルギニン部位の数が多いことが考えられた。またタンパク質全体の ADMA 化レベルの検討では 10 kDa 付近のバンドの ADMA 化はほとんど検出されていないが、ヒストン H4R3 のみを検出した際には、ヒストン H4R3 の ADMA 化レベルの NO ドナー処理による減少を検出できた。理由として、ヒストンよりも 63-75 kDa 付近のタンパク質の存在量が多く相対的にバンドが検出されなかったことが考えられた。ヒストン抽出を行いかつヒストン H4R3 の ADMA 化修飾特異的な抗体を用いたため検出感度が増加したと考える。

また、NO ドナーの濃度について、生理的な NO の濃度は数 pM から数  $\mu$ M オーダーとす

る報告があったため<sup>54,55</sup>、PRMT1のSNO化によるADMA化レベルの減少は病態を模倣する高濃度のNO産生下で惹起される現象であると考えられる。さらに、50 μMのNOドナーでは200 μMと比較して顕著なADMA化レベルの減少が認められなかったことから、PRMT1のSNO化を介した酵素活性の抑制は、生理的なNO濃度よりも高濃度で起こると考えられた。しかし、NOの病態における濃度はこれまでに報告がなく、過剰量のNOは半減期が1秒間未満とされる報告があり、NOの濃度を正確に計測することは困難である<sup>80</sup>。より病態を模倣する条件での検討として、NO合成酵素の過剰発現系を用い、NOを内在性に過剰量産生させる検討を行う必要がある。また、PRMT1のSNO化が*in vivo*や患者でみられた報告はない。PRMT1では不明だが、先行論文でパーキンソン病とアルツハイマー病の患者の死後脳の組織においてタンパク質のSNO化を検出している報告があることから<sup>6</sup>、神経変性疾患などの患者の剖検を用いてSNO化を検出することで、PRMT1のSNO化が病態で起こるのか明らかにする必要がある。一方で、PRMT1のSNO化や酵素活性の抑制が生理的条件下でも起こるか確かめるためには、50 μMより低濃度のNOドナーを用いたPRMT1のSNO化の検討が必要である。

**表3 PRMTファミリーと脱メチル化酵素JMJD6の発現量**

Human Protein Atlas で公表されている各細胞における転写レベルでの発現量。表の数値は transcripts per million (TPM) で示されている。

		SH-SY5Y	HEK293T	HeLa
Type I	PRMT1	322.8	544.3	178.4
	PRMT2	53.3	53.7	48.8
	PRMT3	23.4	24.7	34.1
	PRMT4	42.6	49.4	35.5
	PRMT6	55	23.8	39.8
Type II	PRMT8	0	0	0
	PRMT7	10.3	15.4	22.5
Type III	PRMT5	75.3	111.9	122
	PRMT9	3.9	2.8	4.1
脱メチル化	JMJD6	29.3	43.1	35.4

## PRMT1 の SNO 化部位について

PRMT1 のタンパク質表面に露出しているシステインは 7 個 (C119, 226, 250, 272, 295, 360, 364) あり, PRMT1 の構造モデルで C119 が SAH 結合部位近傍に位置していたことから, C119 が最も有力な候補と考えて検討を行った. 検討の結果, C119S 変異体では SNO 化がほとんど見られなくなったことから, 主要な SNO 化部位であることが示唆された (図 11). SNO 化されやすいシステインは, 特徴的なモチーフ配列を持つことが知られている. 例えばトランスニトロシル化 (タンパク質の SNO 化が別のタンパク質に移る) を促進する酸性アミノ酸や, チオラートアニオン (SNO 化されやすい状態) の形成を促進する塩基性アミノ酸が一次配列上もしくは立体構造上システインの近傍に存在することが特徴として明らかとなっている<sup>15</sup>. 興味深いことに, C119 の近傍には塩基性アミノ酸であるリジン, 酸性アミノ酸であるグルタミン酸とアスパラギン酸が位置しており, NO との反応性が高いと予想された (図 24). さらに種間における PRMT1 のアミノ酸配列を比較したところ, C119 は種間で高度に保存されていることから, PRMT1 の機能において C119 の SNO 化が重要な可能性が推定された (図 25A). 一方, PRMT ファミリーの中で C119 は, 今回用いた細胞種では発現しない PRMT8 を除いて保存されておらず, PRMT1 に特異性の高い SNO 化部位である可能性が考えられた (図 25B). 以上から, C119 は非常に反応性が高いシステインであり, 図 11C, D の結果と合わせて PRMT1 の主要な SNO 化部位であることが示唆された.

一方で, 本研究では C250, C360 の変異体を用いた検討を行っていないため, LC-MS/MS による検出が擬陽性であったかどうかは明らかでなく, C250S, C360S 変異体を用いて SNO 化の検討をする必要がある. C119S でほとんど SNO 化がみられず, 他のシステインの SNO 化が検出されなかったことに対する擬陽性以外の理由として, C119 以外のシステインにおける SNO 化の割合が低く, ビオチンスイッチアッセイを用いたウエスタン・ブロッティングによる方法では検出できなかった可能性が考えられる. また, NO の濃度や反応時間によって SNO 化されるシステインの部位や基質が変化することが報告されていることから<sup>8,81</sup>, NO ドナーの処理濃度や時間などの検討条件の違いが, SNO 化部位の違いを生む可能性がある.

AR**K**VIGIE**C**SSISD**D**YAVK

図 24 PRMT1 C119 近傍のアミノ酸配列

赤のハイライトは C119, 青のハイライトは SNO 化モチーフを示している. C119 は塩基性アミノ酸のリジン (K), 酸性アミノ酸のグルタミン酸 (E) とアスパラギン酸 (D) と一次配列上近傍に位置している.

## A

human	MAAAEAANCIMENFVATLANGMSLQPPLLEEVSCGQAESSEKPN AEDMTSKDYDFDSYAHF
mouse	MAAAEAANCIMENFVATLANGMSLQPPLLEEVSCGQAESSEKPN AEDMTSKDYDFDSYAHF
rat	MAAAEAANCIME-----VSCGQAESSEKPN AEDMTSKDYDFDSYAHF
frog	-----MAEASTCNMEVSCGQAESSEKPN AEDMTSKDYDFDSYAHF
zebrafish	-----MAETADRMEVSCGQAESSEKPN AEDMTSKDYDFDSYAHF
human	GIHEEMLKDEVRTLTYRNSMFHNRHLFKDKVWLDVGSSTGILCMFAAKAGARKVIGIECS
mouse	GIHEEMLKDEVRTLTYRNSMFHNRHLFKDKVWLDVGSSTGILCMFAAKAGARKVIGIECS
rat	GIHEEMLKDEVRTLTYRNSMFHNRHLFKDKVWLDVGSSTGILCMFAAKAGARKVIGIECS
frog	GIHEEMLKDEVRTLTYRNSMFHNRHLFKDKVWLDVGSSTGILCMFAAKAGARKVIGIECS
zebrafish	GIHEEMLKDEVRTLTYRNSMFHNRHLFKDKVWLDVGSSTGILCMFAAKAGARKVIGIECS
human	SISDYAVKIVKANKLDHVVTIIKGGVVEEVELPVEKVDIIISEWNGYCLFYESMLNTVLYA
mouse	SISDYAVKIVKANKLDHVVTIIKGGVVEEVELPVEKVDIIISEWNGYCLFYESMLNTVLYA
rat	SISDYAVKIVKANKLDHVVTIIKGGVVEEVELPVEKVDIIISEWNGYCLFYESMLNTVLYA
frog	SISDYAVKIVKANKLDHVVTIIKGGVVEEVELPVEKVDIIISEWNGYCLFYESMLNTVLYA
zebrafish	SISDYAVKIVKANKLDHVVTIIKGGVVEEVELPVEKVDIIISEWNGYCLFYESMLNTVLYA
human	RDKWLAPDGLIFPDRATLYVTAIEDRQYKDYKIHWWENVYGFDMSCIKDVAIKEPLVDVV
mouse	RDKWLAPDGLIFPDRATLYVTAIEDRQYKDYKIHWWENVYGFDMSCIKDVAIKEPLVDVV
rat	RDKWLAPDGLIFPDRATLYVTAIEDRQYKDYKIHWWENVYGFDMSCIKDVAIKEPLVDVV
frog	RDKWLAPDGLIFPDRATLYVTAIEDRQYKDYKIHWWENVYGFDMSCIKDVAIKEPLVDVV
zebrafish	RDKWLAPDGLIFPDRATLYVTAIEDRQYKDYKIHWWENVYGFDMSCIKDVAIKEPLVDVV
human	DPKQLVTNACLIKEVDIYTVKVEDLTFSPFCLQVQRNDYVHALVAYFNIETFTRCHKRTG
mouse	DPKQLVTNACLIKEVDIYTVKVEDLTFSPFCLQVQRNDYVHALVAYFNIETFTRCHKRTG
rat	DPKQLVTNACLIKEVDIYTVKVEDLTFSPFCLQVQRNDYVHALVAYFNIETFTRCHKRTG
frog	DPKQLVTNACLIKEVDIYTVKVEDLTFSPFCLQVQRNDYVHALVAYFNIETFTRCHKRTG
zebrafish	DPKQLVTNACLIKEVDIYTVKVEDLTFSPFCLQVQRNDYVHALVAYFNIETFTRCHKRTG
human	FSTSPESPYTHWKQTVFYMEDYLVKVTGEEIFGTIGMRPNKNNRDLDFIDLDFKGGQLC
mouse	FSTSPESPYTHWKQTVFYMEDYLVKVTGEEIFGTIGMRPNKNNRDLDFIDLDFKGGQLC
rat	FSTSPESPYTHWKQTVFYMEDYLVKVTGEEIFGTIGMRPNKNNRDLDFIDLDFKGGQLC
frog	FSTSPESPYTHWKQTVFYMEDYLVKVTGEEIFGTIGMRPNKNNRDLDFIDLDFKGGQLC
zebrafish	FSTSPESPYTHWKQTVFYMEDYLVKVTGEEIFGTIGMRPNKNNRDLDFIDLDFKGGQLC
human	ELSCSTDYRMR
mouse	ELSCSTDYRMR
rat	ELSCSTDYRMR
frog	ELSCSTDYRMR
zebrafish	EVSKTSEYRMR

## B

119

PRMT1	CMFAAKAG-ARKVIGIE	CSSISDYAVKIVKANKLDHVVTIIK GKVEEVE
PRMT8	SMFAAKAG-AKKVFGIE	CSSISDYSEKIIKANHLDNIIITIFK GKVEEVE
PRMT3	SMFAAKAG-AKKVLGVD	QSEILYQAMDIIIRLNKLEDTITLIK GKIEEVH
PRMT2	SLFCAHYARPRAVYAVE	ASEMAQHTGQLVLQNGFADIIITVYQQKVEDVV
PRMT6	SIFCAQAG-ARRVYAVE	ASAIWQQAREVVRFNGLVDRVHVLPGPVETVE
PRMT4	SFFAAQAG-ARKIYAVE	ASTMAQHAEVLVKSNNLTDRIVVIPGKVEEVS
PRMT9	SMFAKKAGAHSVYACEL	SKTMYELACDVVAANKMEAGIKLLHTKSLDIE
PRMT5	LEIGADLPSNHVIDRWL	GEPKAAIILPTSIFLTNKKGFPVLSKMHQRLI
PRMT7	PVDVESC PGAPSVCDIQL	NQVSPADFTVLSDVLP MFSIDFSKQVSSAA

図 25 PRMT1 アミノ酸配列の比較

(A) Uniprot から human (Q99873), mouse (Q9JIF0), rat (Q63009), frog (Q28F07), zebrafish (F1R3J9) のアミノ酸配列を取得し, ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いてアライメントを行った. 赤色でハイライトしたアミノ酸は human の C119 と C226 にあたるシステインを示している.

(B) Uniprot から human の PRMT1 (Q99873), PRMT2 (P55345), PRMT3 (O60678), PRMT4 (Q9NQ92), PRMT5 (O14744), PRMT6 (Q96LA8), PRMT7 (Q9NVM4), PRMT8 (Q9NR22), PRMT9 (Q6P2P2) のアミノ酸配列を取得し, ClustalW を用いてアライメントを行った. PRMT1 のアミノ酸 103 から 150 にあたる配列を示しており, PRMT ファミリーはアライメントの順に出力されている. 赤色でハイライトしたアミノ酸は PRMT1 の C119 にあたるシステインを示している.

## PRMT1 の SNO 化による酵素活性抑制機構について

C119 はメチル基供与体 SAM の代謝物である SAH の結合部位近傍に位置していることから、SNO 化修飾により SAM との結合が阻害されることによって酵素活性が低下する可能性が考えられた。C119 と SAH が相互作用するか否かは明らかとなっていないため、C119 のチオール基から最も近い位置にある SAH のアデニンの 3 位の窒素との距離を測定したところ、3.4 Åであった (図 26)。ただし、SNO 化はタンパク質の構造や基質との結合を変化させることが知られており、C119 以外のシステインが修飾されて酵素活性に影響を与える可能性を排除できていない。そのため、PRMT1 の SNO 化による酵素活性抑制メカニズムを明らかにする必要がある。そこで、PRMT1 の基質との相互作用が NO ドナーによって阻害されるか否か検討し、また NO ドナーによる ADMA 化レベルの減少が高濃度の SAM の供給により抑制されるかどうか検討することで、SNO 化による酵素活性抑制機構を明らかにできると考える。

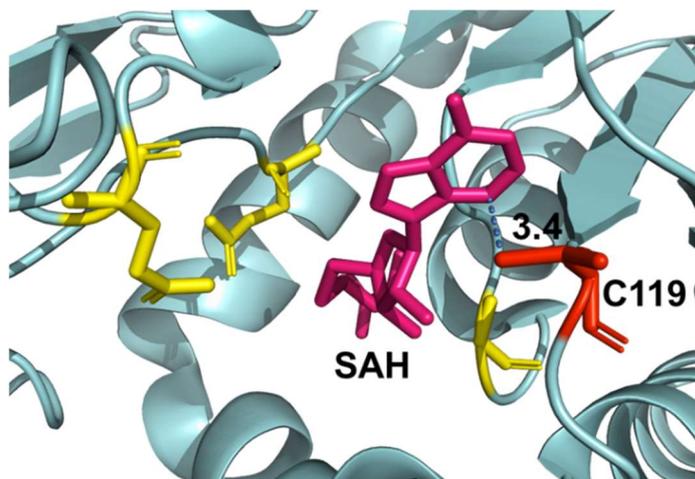


図 26 C119 と SAH との距離

pyMOL ver. 2.5.5 を用いて PRMT1 (PDB 6NT2) の C119 のチオール基から最も近い位置にある SAH のアデニンの 3 位の窒素との距離 (青の点線で示す距離) を調べたところ、3.4 Åであった。赤は C119、ピンクは SAH を示している。

## BioID による PRMT1 基質の探索について

BioID によって 1349 種の基質候補を同定し、そのうちアルギニンメチル化が検出されたのは 38 種であった。BioID は、BirA から 10 nm の範囲にあるタンパク質のリジンをビオチン化標識して検出する手法であるため、同定した基質候補が PRMT1 によってメチル化されるかどうかは明らかでない。メチル化が検出されていない候補は、PRMT1 の基質でない可能性、検出の過程でメチル基が外れた可能性、LC-MS/MS ではすべてのアミノ酸配列をカバーできていないことからメチル化部位のペプチドを読み取れていない可能性が考えられた。共免疫沈降法を用いて DDX3 が基質であるか確認したところ、PRMT1 と DDX3 が相互作用し、さらに DDX3 が ADMA 化されることが分かった (図 17, 18)。また今回基質候補として同定した 1109 種のうち約半数の 580 種がデータベース Harmonizome に PRMT1 の基質として記載されているものであった。興味深いことに、ALS 関連タンパク質であり、PRMT1 の基質として知られている fused in sarcoma (FUS) を BioID で単離出来ていたことから、BioID による PRMT1 基質の探索は効果的であると考えられた。

PRMT1 の基質に普遍的に起こりうることとして、PRMT1 の SNO 化を介した ADMA 化レベルの減少がある。一方で、ADMA 化レベルの減少による基質機能への影響は、基質によって異なるものであるため、個々の基質に着目した検討が必要である。BioID によって同定した基質候補について、基質であるかを相互作用や ADMA 化の検討から確認し、さらに NO ドナーによる ADMA 化や基質の機能への影響を検討することで、PRMT1 の SNO 化に制御される分子機構を明らかにできる可能性がある。

## NO ドナーによる DDX3 の ADMA 化レベルの減少について

本研究によって、DDX3 が ADMA 化され、NO ドナーによって ADMA 化レベルが減少することが明らかとなった (図 18)。本研究では、DDX3 と PRMT1 を共発現し、DDX3 を免疫沈降して ADMA 化レベルを検出しているため、今回検出された ADMA 化は PRMT1 による影響が大きいと考える。また 200  $\mu$ M NOC-18 処理という高濃度の NO 暴露条件下で DDX3 の ADMA 化レベルの減少がみられた。この結果から、PRMT1 の酵素活性が NO ドナーによって抑制され、DDX3 の ADMA 化レベルが減少したことが示唆された。そのため、神経の過剰興奮や炎症によって NO が高濃度、長期間産生される病態条件下では、生体内でも DDX3 の ADMA 化レベルが減少している可能性があると考えられる。NO 合成酵素の過剰発現系や、病態患者の剖検を用いて DDX3 の ADMA 化レベルを検出することで、病態で起こる現象か

明らかにする必要がある。

### NO ドナーによる DDX3 のヘリカーゼ活性上昇について

ヘリカーゼアッセイを実施し、DDX3 のヘリカーゼ活性における PRMT1 の SNO 化の影響を検討したところ、NO ドナーを処理した細胞由来の DDX3 はコントロールと比較してヘリカーゼ活性が上昇することが明らかとなった (図 20)。また MS023 の処理においてもヘリカーゼ活性が上昇したことから、PRMT1 の SNO 化を介した ADMA 化レベルの減少が、DDX3 のヘリカーゼ活性上昇に寄与することが示唆された。BioID において LC-MS/MS から明らかとなった DDX3 アルギニンメチル化部位は種間での保存性が高く、酵素活性に重要な役割を果たす可能性が考えられた (図 27)。また、先行論文において DDX3 のアルギニン変異体が  $\gamma$ -globulin のタンパク質レベルでの発現を増加させたという報告があり、ADMA 化が DDX3 のヘリカーゼ活性を介した翻訳に影響を及ぼす可能性を示している<sup>71</sup>。しかし、NO ドナーによる ADMA 化レベルの減少が DDX3 のヘリカーゼ活性を上昇させた機構は不明である。本研究で BioID によって明らかにしたメチル化部位である R88 と R617 は DDX3 の N 末端と C 末端側の領域に位置している。これらの領域は構造が解かれておらず、報告されている ATP 結合ドメインや RNA 結合ドメインとは異なる位置にあるが<sup>37</sup>、N 末端と C 末端を欠く DDX3 (アミノ酸 168-582) は ATP アーゼ活性を失うことが報告されている<sup>82</sup>。また、R617 はアルギニンとセリンに富む RS-like ドメインに位置し、R88 近傍はアルギニンとグリシンに富んでいる (図 27)<sup>37</sup>。アルギニンとグリシン、またはアルギニンとセリンに富む領域は RNA との結合に関与することが報告されているが、DDX3 においては不明である<sup>83</sup>。また、LC-MS/MS で検出された DDX3 のカバー率は 44%であったことから、R88 と R617 以外のアルギニンについてもヘリカーゼ活性制御に関わるメチル化部位である可能性がある。今後は、ヘリカーゼ活性の制御に関わるアルギニンメチル化部位を同定し、ADMA 化が RNA や ATP (DDX3 が ATP 依存性ヘリカーゼ活性を有するため) との相互作用に影響するのか検討を行い、NO を介した DDX3 酵素活性制御の様式を明らかにする必要がある。また、ヘリカーゼ活性の測定に使用した DDX3 が細胞から抽出したものであるため、ヘリカーゼ活性上昇が PRMT1 の SNO 化に起因しているかは明らかではない。DDX3 のアルギニンメチル化部位の同定とその変異体を用いた検討を行うことで、ヘリカーゼ活性上昇における ADMA 化の影響を明らかにすることが出来ると考える。

また、NO ドナーの処理によって DDX3 のヘリカーゼ活性が上昇したことから、DDX3 が SNO 化されて酵素活性が上昇した可能性を排除できていない。これまでに DDX3 が SNO 化

されることは報告されていないが、この可能性を排除するためには、DDX3のSNO化の検討や、DDX3がSNO化された場合にはDDX3のSNO化がヘリカーゼ活性に寄与しないことを示す必要がある。具体的には、リコンビナントDDX3を用いて、PRMT1の存在しない条件下では、NOドナーによるヘリカーゼ活性の上昇がみられないことを確認する必要があると考える。

human	MSHVAVENALGLDQQFAGLDLNSSDNQSGGSTAS-----
mouse	MSHVAVENALGLDQQFAGLDLNSSDNQSGGSTAS-----
rat	-----IDLR-----
frog	MSHVAVENVLSLDQQFAGLDLNSADAQSGGSATKGRYIPPHLRNKEASRQDANWDAGRGG
human	-----KGRYIPPHLRNREATKGFYDKDSSGWSSSKDKDAYSSFGSRSD
mouse	-----KGRYIPPHLRNREATKGFYDKDSSGWSSSKDKDAYSSFGSRSD
rat	-----DVHSEYSYLVICFFFLGFYDKDSSGWSSSKDKDAYSSFGSRGD
frog	NGYVNGTNDDRSRMNGYDRSGYGNRSGSRTDRGFYDRENSGWNSGRDKDAYSSFGSRGE
human	SRGKSSFFSDR <sup>88</sup> SGSGSRG-----RFDDRGRSDYDGI GSRGDRSGF
mouse	SRGKSSFFGDRSGSGSRG-----RFDDRGRGDYDGI GGRGDRSGF
rat	SRGKSSFFGDRSGSGSRG-----RFDDRGRGDYDGI GGRGDRSGF
frog	-RGKPSLFNDRSGSGSRRVVLCE LAPWPLQLKLVNHLRPDDRDPGYDGMANRGDRSGF
human	GKFERGGNSRWCDKSD EDDWSKPLPPSERLEQELFSGGNTGINFEKYDDIPVEATGNNCP
mouse	GKFERGGNSRWCDKSD EDDWSKPLPPSERLEQELFSGGNTGINFEKYDDIPVEATGNNCP
rat	GKFERGGNSRWCDKSD EDDWSKPLPPSERLEQELFSGGNTGINFEKYDDIPVEATGNNCP
frog	GRFDRGNSRWSDERNE DDDWSKPLAPNDRVEQELFSGSNTGINFEKYDDIPVEATGNNCP
human	PHIESFSDVEMGEIIMGNIELTRYTRPTPVQKHAIP I I KEKRDLMACAQTGSGKTA AFLL
mouse	PHIESFSDVEMGEIIMGNIELTRYTRPTPVQKHAIP I I KEKRDLMACAQTGSGKTA AFLL
rat	PHIESFSDVEMGEIIMGNIELTRYTRPTPVQKHAIP I I KEKRDLMACAQTGSGKTA AFLL
frog	PHIESFQDVTMGEIIMGNIQLSRYTRPTPVQKHAIP I I I EKRDLMACAQTGSGKTA AFLL
human	PILSQIYSDGPG EALRAMKENG RYGRRKQYPI SLVLAPTRELAVQI YEEARKFSYRSRVR
mouse	PILSQIYADGPG EALRAMKENG RYGRRKQYPI SLVLAPTRELAVQI YEEARKFSYRSRVR
rat	PILSQIYADGPG EALRAMKENG RYGRRKQYPI SLVLAPTRELAVQI YEEARKFSYRSRVR
frog	PILSQIYADGPGD AMKHLKENG RYGRRKQFPLSLVLAPTRELAVQI YEEARKFAYRSRVR
human	PCVVYGGADIGQQIRD LERGC HLLVATPGRLVDMMERGKIGLDFCKYLVLDEADRMLDMG
mouse	PCVVYGGAEIGQQIRD LERGC HLLVATPGRLVDMMERGKIGLDFCKYLVLDEADRMLDMG
rat	PCVVYGGAEIGQQIRD LERGC HLLVATPGRLVDMMERGKIGLDFCKYLVLDEADRMLDMG
frog	PCVVYGGADIGQQIRD LERGC HLLVATPGRLVDMMERGKIGLDFCNYLVLDEADRMLDMG
human	FEPQIRRI VEQDTMPPKGV RHTMMFSATFPKEIQMLARDFLDEYIFLAVGRV GSTSENI T
mouse	FEPQIRRI VEQDTMPPKGV RHTMMFSATFPKEIQMLARDFLDEYIFLAVGRV GSTSENI T
rat	FEPQIRRI VEQDTMPPKGV RHTMMFSATFPKEIQMLARDFLDEYIFLAVGRV GSTSENI T
frog	FEPQIRRI VEQDTMPPKGV RQTMMFSATFPKEIQILARDFLDEYIFLAVGRV GSTSENI T
human	QKVWVVEESDKRSFLLDLLNATGKDSLTLVFVETKKGADSL EDFLYHEGYACTSIHGDRS
mouse	QKVWVVEEIDKRSFLLDLLNATGKDSLTLVFVETKKGADSL EDFLYHEGYACTSIHGDRS
rat	QKVWVVEEIDKRSFLLDLLNATGKDSLTLVFVETKKGADSL EDFLYHEGYACTSIHGDRS
frog	QKVWVVEEMDKRSFLLDLLNATGKDSLTLVFVETKKGADALEDFLYHEGYACTSIHGDRS
human	QRDREEALHQFRSGKSPILVATAVAARGLDISNVKHVINFDLPSDIEEYVHRIGRTGRVG
mouse	QRDREEALHQFRSGKSPILVATAVAARGLDISNVKHVINFDLPSDIEEYVHRIGRTGRVG
rat	QRDREEALHQFRSGKSPILVATAVAARGLDISNVKHVINFDLPSDIEEYVHRIGRTGRVG
frog	QRDREEALHQFRSGKSPILVATAVAARGLDISNVKHVINFDLPSDIEEYVHRIGRTGRVG
human	NLGLATSFNERNINITKD LLDLLVEAKQEVPSWLENMAYEHYKGS SRGRSKSSRFSGG
mouse	NLGLATSFNERNINITKD LLDLLVEAKQEVPSWLENMAYEHYKGS SRGRSKSSRFSGG
rat	NLGLATSFNERNINITKD LLDLLVEAKQEVPSWLENMAYEHYKGS SRGRSKSSRFSGG
frog	NLGLATSFNERNINITKD LLDLLVEAKQEVPSWLENMAYEQHHKSS TRGRSKS-RFSGG
human	FGARDYRQSSGASSSSFSSSRASSRSRSGGGGHGSSRGFGGG-----GYGGFYN
mouse	FGARDYRQSSGASSSSFSSSRASSRSRSGGGGHGSSRGFGGG-----GYGGFYN
rat	FGARDYRQSSGASSSSFSSSRASSRSRSGGGGHGSSRGFGGGSVHLRFGEIQHCGYGGFYN
frog	FGARDYRQSSGASSGFGSSR <sup>617</sup> GGRS-----SGHGGSRGFGGG-----YGGFYN
human	SDGYGGNYN-SQGV DWWGN
mouse	SDGYGGNYN-SQGV DWWGN
rat	SDGYGGNYN-SQGV DWWGN
frog	SDGYGGNYGGSSQVDWWGN

図 27 DDX3 アルギニンメチル化部位の種間の保存性

Uniprot から human (O00571), mouse (Q62167), rat (A0A0G2K719), frog (A0A6I8REU5) のアミノ酸配列を取得し, ClustalW を用いてアライメントを行った. 赤色でハイライトしたアミノ酸は human の R88, R617 に該当する.

### NO ドナーによる STAT1 のタンパク質レベルの増加について

STAT1 は 5'UTR に 2 次構造を有し, DDX3 によって翻訳を制御されることが報告されている<sup>72</sup>. NO と MS023 処理のそれぞれで STAT1 のタンパク質レベルが増加したため(図 22), NO ドナーによる PRMT1 酵素活性の抑制が, DDX3 のヘリカーゼ活性上昇を介して STAT1 のタンパク質レベルの発現を増加させた可能性がある. また, RNA-sequencing では, NO ドナー処理による STAT1 の fold change は 1.1 であったため, NO ドナーによる STAT1 のタンパク質レベルの増加は, 転写レベルの増加ではなく翻訳レベルでの増加であり, 転写以降の RNA 代謝の過程に依存するものであることが示唆された. これらの結果により, PRMT1 の SNO 化による酵素活性の抑制が, RNA 代謝を制御する可能性が分かった.

これまでに STAT1 のタンパク質レベルでの発現増加はインターフェロン刺激後に短時間から誘導されることが報告されている<sup>84</sup>. 本研究では, 100  $\mu$ M の NO ドナーを 72 時間処理することで STAT1 のタンパク質レベルが増加したが, NO ドナーが DDX3 を介さずに STAT1 の翻訳を促進した可能性を排除できない. STAT1 の mRNA の 2 次構造を解き翻訳を促進する因子として DDX5 も報告されているが<sup>85</sup>, DDX5 に対する NO や PRMT1 の影響は明らかではない<sup>86</sup>. DDX3 と DDX5 の基質の中には, 共通した基質があることが報告されている<sup>87</sup>. Human Protein Atlas を用いて, HEK293T 細胞における RNA の発現量を調べたところ, DDX3 の TPM は 218.7, DDX5 の TPM は 71.2 であり, 存在量は DDX3 の方が多かった. 今後, DDX3 をノックダウンして NO ドナーを処理した場合の STAT1 のタンパク質レベルを検討することで, STAT1 の NO ドナー処理による発現増加が DDX3 を介した機構か明らかにする必要がある.

### PRMT1 の SNO 化における転写への影響に関して

PRMT1 が転写調節に関わる基質を有すること, またその中の一つとして DDX3 が報告されていることから, PRMT1 の SNO 化による転写への影響を検討した<sup>31-33,37</sup>. PRMT1 のノックダウンまたは阻害薬処理において 2 倍以上発現増加した遺伝子が, NO ドナー処理によって発現増加した遺伝子に有意に多く含まれることが明らかとなった(図 23B). 興味深い

ことに過去の知見では、PRMT1 が cGAS のメチル化を担っており IRF3 制御下にある遺伝子の発現に関与することが報告されている (図 28)<sup>62</sup>。具体的には、cGAS は非 ADMA 化状態では、STING を介してリン酸化酵素 TBK1 を活性化する。すると TBK1 による IRF3 のリン酸化とそれに伴う核移行が促進され、標的遺伝子の発現が誘導される。一方で、PRMT1 によって cGAS が ADMA 化されると、IRF3 を介した遺伝子の発現が抑制される。実際に、GSEA において PRMT1 ノックダウンと NO ドナー処理の両方で発現が増加した遺伝子の一部には、プロモーター領域に転写因子 IRF3 の結合配列を持つ遺伝子が含まれていた (図 29)。このことから、PRMT1 と NO ドナーによる発現制御を受ける遺伝子の一部は、転写因子 IRF3 の制御を受ける可能性がある。以上から、PRMT1 の酵素活性抑制を介した遺伝子発現増加メカニズムが存在する可能性が考えられた。発現が増加した遺伝子において炎症に関わる IRF ファミリーに制御される遺伝子が多く含まれたのは、GSEA に供した発現変動遺伝子がデータベースから抽出したものであり、細胞種が異なるものであることが考えられる。炎症は異なる細胞種間で共通して NO ドナー処理や PRMT1 ノックダウンを介して惹起される可能性が考えられた。一方で、NO ドナー処理と PRMT1 のノックダウンによってそれぞれが別の機構を介して炎症関連遺伝子の発現を誘導した可能性を否定できない。機構の詳細は明らかとなっていないが、NO がサイトカインの産生を促すという報告や<sup>55</sup>、PRMT1 ノックアウトマウスでは炎症関連遺伝子が増加するという報告がある<sup>29</sup>。PRMT1 の SNO 化が遺伝子の発現を制御するか明らかにするためには、PRMT1 基質を用いた検討が必要であると考える。例えば、cGAS に着目し、NO ドナーによる cGAS の ADMA 化レベルの減少や、IRF3 のリン酸化、下流遺伝子の発現増加がみられるかを検討することで、SNO 化による PRMT1 の酵素活性抑制を介して、遺伝子の転写が制御される機構を明らかに出来ると考える。

また、DDX3 が転写調節に関与する遺伝子として Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A (CDKN1A, P21) が報告されている<sup>37</sup>。RNA sequencing の結果から fold change を算出して NO ドナー処理によって p21 の発現が変化するか確認したところ、fold change が 5.0 であり、NO ドナーによって発現が増加したことが分かった。また、PRMT1 をノックダウンした MV4-11 細胞と THP-1 細胞のデータを調べたところ、それぞれ fold change が 2.5, 6.8 と、NO ドナー処理と同様に発現が増加していた。また、これらの細胞で NO ドナー処理や PRMT1 ノックダウンを行った際の RNA sequencing の結果では、DDX3 の fold change はいずれも 1.0 であり、変化がほとんどなかった。これらのことから、PRMT1 の SNO 化による DDX3 の ADMA 化レベルの減少は、DDX3 による転写調節にも影響を及ぼす可能性が考えられた。

さらに、1 例ではあるが PRMT1 ノックダウンにおいて fold change が 0.5 以下の発現が低

下した遺伝子が、NO ドナー処理によって発現低下した遺伝子に有意に多く含まれることが明らかとなった (図 23C). PRMT1 はヒストン H4R3 や転写因子のメチル化を介して転写を促進することが報告されている<sup>31-33</sup>. そのため、PRMT1 の SNO 化による酵素活性の抑制が遺伝子の転写抑制にも寄与する可能性がある. このことは、ヒストン H4R3 の ADMA 化レベルが NO ドナー処理濃度依存的に減少したことからも予想できる (図 13). 今後は、PRMT1 の SNO 化によって発現が制御される遺伝子とその転写制御を介在する因子を明らかにするために、ヒストンや転写因子のメチル化が NO ドナー処理によって減少するか検討し、さらに下流遺伝子の発現への影響を検討する必要があると考えている.

PRMT1 ノックダウンや阻害薬処理で fold change が 2 以上だった遺伝子の多くは、GSNO で発現増加した遺伝子と有意な相関がみられた一方で、一部の遺伝子では相関しなかったため、遺伝子の中には PRMT1 の SNO 化による制御を受けないものがあると考えられた. また同様に、PRMT1 のノックダウンで fold change が 0.5 以下であった遺伝子の一部には、GSNO 処理では反対に発現増加したものもあったため、PRMT1 のノックダウンで発現低下する遺伝子の中には、PRMT1 の SNO 化による制御を受けないものがあると考えられる. この点を踏まえても、PRMT1 による ADMA 化が転写制御に関わる基質を選定し、PRMT1 の SNO 化による制御を受けるか明らかにする必要がある. GSEA で用いたデータでは、NO を処理した細胞と PRMT1 ノックダウン、もしくは阻害薬を処理した細胞が異なるものであったため、データベースから引用する際に、1 種類ではなく 3 種類の細胞を用いたデータを使用した. 今後はデータベースから引用したデータに追加して、SH-SY5Y 細胞を用いて PRMT1 のノックダウンや MS023 処理のデータを得ることで、より PRMT1 の SNO 化によって制御される可能性の高い遺伝子を抽出することに繋がると考える.

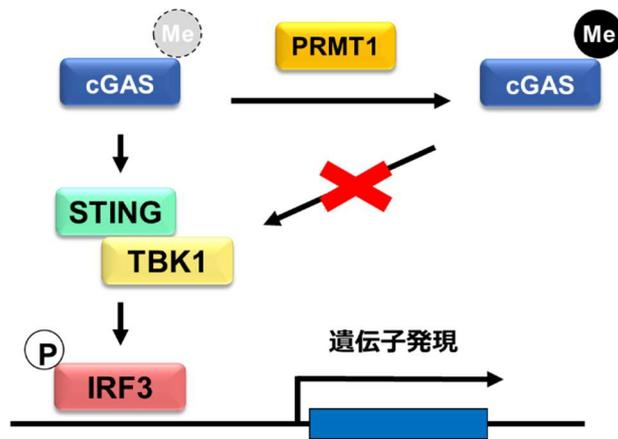


図 28 PRMT1 の cGAS を介した遺伝子転写制御機構

Liu らが明らかにした cGAS のメチル化を介した遺伝子転写制御機構のまとめ図.

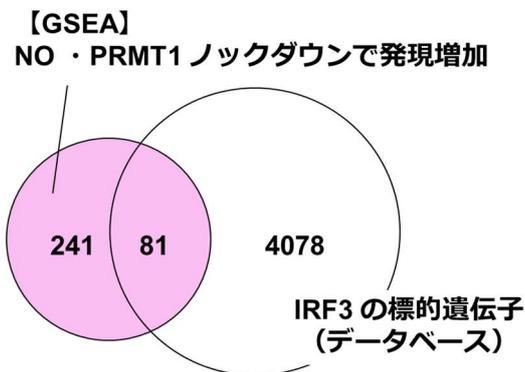


図 29 NO と PRMT1 ノックダウンでともに発現増加した遺伝子と IRF3 によって発現制御を受ける遺伝子の比較

GSEA において NO ドナー処理と、MV4-11 細胞における PRMT1 ノックダウンでともに発現増加した遺伝子 322 種について、IRF3 による制御を受ける遺伝子があるか調べた。Harmonizome 3.0 の Encode transcription factor target というデータベースを用いて、転写開始点近傍で IRF3 が結合する遺伝子 4159 種と比較した。比較には、BioVenn を用いてベン図を作製した。

### 第3章 本研究のまとめと展望

本研究により以下のことが分かった。

1. PRMT1 の C119 (システイン 119) は SNO 化標的であった。
2. NO ドナーによって PRMT1 基質の ADMA (非対称性ジメチルアルギニン) 化レベルが減少した。
3. PRMT1 基質として DDX3 を BioID で同定し, その ADMA 化レベルが NO ドナーによって減少した。
4. DDX3 のヘリカーゼ活性が NO ドナーによって上昇した。
5. DDX3 の基質である STAT1 のタンパク質レベルが NO ドナーによって増加した。
6. PRMT1 発現抑制および阻害薬処理後に発現上昇する遺伝子は, NO ドナー処理においても同様に発現上昇する傾向を示した。

本研究により, PRMT1 の C119 で SNO 化が起こり, 活性抑制を生じることが示唆された。BioID を用いて PRMT1 基質を網羅的に探索したところ, 既知および未知の基質候補が複数同定された。GO 解析の結果, RNA 代謝に関わるタンパク質が濃縮されていた。さらに, RNA ヘリカーゼ活性を有し, RNA 代謝に関与する DDX3 は, 過剰な NO ドナー処理によってその ADMA 化が抑制され, ヘリカーゼ活性が上昇することが分かった。PRMT1 の基質には RNA 代謝を制御する多くのタンパク質が含まれていることから, 本研究は, NO による RNA 代謝制御機構について新たな視点を提供するものと考えられる。さらに GSEA から, 過剰な NO 曝露による遺伝子発現変化は, PRMT1 の活性阻害に関連することが明らかになり, SNO 化が PRMT1 基質を介した転写制御に関与することが示唆された。以上から, PRMT1 の SNO 化が RNA 代謝や転写を制御するキーファクターとなる可能性がある (図 30)。

PRMT1 の SNO 化による機能抑制と関連する疾患として, NO の過剰産生が報告されてかつ RNA 代謝異常が報告されている, ALS が考えられる<sup>88,89</sup>。ALS では RNA 代謝に関与する TDP-43 や FUS といった RNA 結合タンパク質の変異や, C9orf72 の翻訳開始点より 5' 側の領域でおこる異常な翻訳がみられ, これらのタンパク質の凝集体形成による細胞毒性が報告されている<sup>56,89</sup>。また ALS はグルタミン酸による神経毒性が発症に寄与することが報告されており, グルタミン酸による神経興奮は NO 合成酵素を介して NO の産生を促進す

ることが知られている<sup>6,90,91</sup>。また ALS には炎症が関与することが知られているが、NO の産生は炎症性サイトカインによって誘発されることや、反対に NO がサイトカインの産生を促進することが知られている<sup>55,92</sup>。また NO は神経変性疾患でみられる神経細胞死を惹起することが知られている<sup>6,91</sup>。さらに、PRMT1 ノックアウトマウスではミクログリアやアストロサイトの増加、炎症関連遺伝子の増加が報告されている<sup>25,29,30</sup>。本研究では、DDX3 のヘリカーゼ活性に着目し、その機能が PRMT1 の SNO 化を介して制御される可能性を見出した。興味深いことに、DDX3 は ALS や脆弱 X 症候群においてシトシンとグアニンの繰り返し配列から成る有毒な凝集ペプチドの合成に関連する repeat-associated non-AUG (RAN) の翻訳を制御している<sup>36,93</sup>。さらに BioID において PRMT1 基質として検出された FUS の PRMT1 を介したアルギニンのメチル化は、ALS の病態に関連する不溶性凝集体の形成を抑制するという報告がある<sup>21,94</sup>。これらの知見は、PRMT1 の酵素活性阻害が ALS 病態形成に関与する可能性を示唆している。しかし、PRMT1 活性が FUS の凝集を促進したことを示唆する報告もあるため、PRMT1 活性と ALS の関係を明らかにするためには、さらなる検討が必要である<sup>95</sup>。興味深いことに、ALS 病態に特徴的な TDP-43 凝集体形成が SNO 化によって引き起こされるという知見がある<sup>56</sup>。このように NO や PRMT1 の活性抑制が ALS でみられる凝集体形成や細胞死といった表現型に関与することから、PRMT1 の SNO 化が病態発症に関わる可能性が考えられる。しかし、これまでに ALS 患者や病態モデル動物において PRMT1 の SNO 化が検討された報告がないため、今後検討する必要がある。具体的には患者の死後脳の組織をバイオチンスイッチアッセイに供して SNO 化を検出し、さらに ADMA 化レベルについても組織を用いて健常者と比較検討することを想定している。また、PRMT1 の SNO 化が ALS の結果引き起こされる可能性を排除するために、PRMT1 の SNO 化によって ALS の表現型が誘導されるか検討する必要がある。本研究では、PRMT1 の SNO 化による活性制御と転写や DDX3 の機能への影響に焦点を当てたため、神経細胞死やタンパク質凝集体形成といった病態に特徴的な表現型に対する PRMT1 の SNO 化の影響については検討しなかった。今後、PRMT1 の SNO 化が ALS の表現型に与える影響を検討することで、PRMT1 の SNO 化が病態発症に寄与するか明らかにできると考える。具体的には、PRMT1 の SNO 化による FUS など ALS 関連タンパク質のメチル化や凝集体形成、細胞死への影響を検討する必要がある。さらに、PRMT1 の SNO 化を介した DDX3 ヘリカーゼ活性の上昇が病態形成に寄与するか明らかにするために、RAN 翻訳への影響を検討することも興味深いと考える。

ALS は RNA 代謝異常が報告されてきた疾患であり、根本的治療法は未だ開発されていない<sup>88,89</sup>。本研究によって、PRMT1 の SNO 化を RNA 代謝の制御因子として見出したことか

ら、ALS 発症メカニズムの一端の解明につながる可能性がある。さらに、PRMT1 の活性に影響を与えることなく、PRMT1 の SNO 化を特異的に阻害する化合物の開発は、ALS や他の関連病態における PRMT1 の SNO 化の影響を調べるためのツールとなることが期待される。

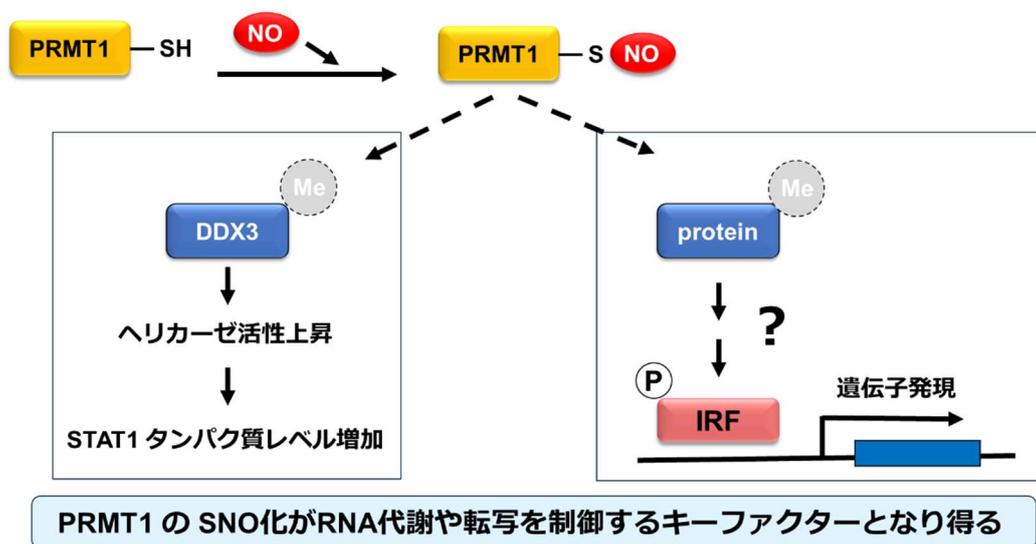


図 30 本研究のまとめ

## 引用文献

1. Stamler, J. S. Redox Signaling: Nitrosylation and Related Target Interactions of Nitric Oxide. *Cell* 78, 931-936 (1994).
2. Nakamura, T., Oh, C. ki, Zhang, X. & Lipton, S. A. Protein S-nitrosylation and oxidation contribute to protein misfolding in neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine* 172, 562–577 (2021).
3. Gu, Z., Nakamura, T. & Lipton, S. A. Redox reactions induced by nitrosative stress mediate protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology* 41, 55–72 (2010).
4. Nott, A., Watson, P. M., Robinson, J. D., Crepaldi, L. & Riccio, A. S-nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature* 455, 411–415 (2008).
5. Anand, P. & Stamler, J. S. Enzymatic mechanisms regulating protein s-nitrosylation: Implications in health and disease. *Journal of Molecular Medicine* 90, 233–244 (2012).
6. Uehara, T. *et al.* S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441, 513–517 (2006).
7. Okuda, K. *et al.* Pivotal role for S-nitrosylation of DNA methyltransferase 3B in epigenetic regulation of tumorigenesis. *Nature Communications* 14, 621 (2023).
8. Numajiri, N. *et al.* On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 10349–10354 (2011).
9. Nakato, R. *et al.* Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Scientific Reports* 5, 14812 (2015).
10. Okuda, K., Ito, A. & Uehara, T. Regulation of Histone Deacetylase 6 Activity via S-Nitrosylation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 38, 1434-1437 (2015).
11. Fujikawa, K. *et al.* S-Nitrosylation at the active site decreases the ubiquitin-conjugating activity of ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1 (UBE2D1), an ERAD-associated protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 524, 910–915 (2020).
12. Takasugi, N. *et al.* The emerging role of electrophiles as a key regulator for endoplasmic reticulum (Er) stress. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1783 (2019).
13. Nakahara, K. *et al.* Attenuation of Macrophage Migration Inhibitory Factor-Stimulated Signaling via S-Nitrosylation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 42, 1044-1047 (2019).
14. Uehara, T. & Nishiya, T. Screening systems for the identification of S-nitrosylated proteins. *Nitric Oxide* 25, 108–111 (2011).
15. Mnatsakanyan, R. *et al.* Proteome-wide detection of S-nitrosylation targets and motifs using bioorthogonal cleavable-linker-based enrichment and switch technique. *Nature*

- Communications* 10, 2195 (2019).
16. Zhang, F. *et al.* Global analysis of protein arginine methylation. *Cell Reports Methods* 1, 10016 (2021).
  17. Lassak, J., Koller, F., Krafczyk, R. & Volkwein, W. Exceptionally versatile- Arginine in bacterial post-translational protein modifications. *Journal of Biological Chemistry* 400, 1397-1427 (2019).
  18. Lorton, B. M. & Shechter, D. Cellular consequences of arginine methylation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76, 2933–295 (2019).
  19. Ahmad, N. N., Kamarudin, N. H. A., Leow, A. T. C. & Rahman, R. N. Z. R. A. The role of surface exposed lysine in conformational stability and functional properties of lipase from staphylococcus family. *Molecules* 25, 3858 (2020).
  20. Xu, J. & Richard, S. Cellular pathways influenced by protein arginine methylation: Implications for cancer. *Molecular Cell* 81, 4357–4368 (2021).
  21. Yamaguchi, A. & Kitajo, K. The Effect of PRMT1-Mediated Arginine Methylation on the Subcellular Localization, Stress Granules, and Detergent-Insoluble Aggregates of FUS/TLS. *PLoS One* 7, 49267 (2012).
  22. Li, Z. *et al.* Methylation of EZH2 by PRMT1 regulates its stability and promotes breast cancer metastasis. *Cell Death & Differentiation* 27, 3226–3242 (2020).
  23. Nakai, K. *et al.* The role of PRMT1 in EGFR methylation and signaling in MDA-MB-468 triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer* 25, 74–80 (2018).
  24. Liu, X. *et al.* Methylation of arginine by PRMT1 regulates Nrf2 transcriptional activity during the antioxidative response. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1863, 2093–2103 (2016).
  25. Hashimoto, M., Fukamizu, A., Nakagawa, T. & Kizuka, Y. Roles of protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in brain development and disease. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* 1865, 129776 (2021).
  26. Poulard, C., Corbo, L. & Le Romancer, M. Protein Arginine Methylation/Demethylation and Cancer. *Oncotarget* 7, 67532-67550 (2016).
  27. Bedford, M. T. & Clarke, S. G. Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Molecular Cell* 33, 1–13 (2009).
  28. Tang, J. *et al.* PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 275, 7723–7730 (2000).
  29. Hashimoto, M. *et al.* Loss of PRMT1 in the central nervous system (CNS) induces reactive astrocytes and microglia during postnatal brain development. *Journal of Neurochemistry* 156, 834–847 (2021).
  30. Hashimoto, M. *et al.* Regulation of neural stem cell proliferation and survival by protein

- arginine methyltransferase 1. *Frontiers in Neuroscience* 16, 948517 (2022).
31. Bedford, M. T. & Richard, S. Arginine methylation: An emerging regulator of protein function. *Molecular Cell* 18 263–272 (2005).
  32. Di Lorenzo, A. & Bedford, M. T. Histone arginine methylation. *FEBS Letters* 585 2024–2031 (2011).
  33. Boisvert, F. M., Côté, J., Boulanger, M. C. & Richard, S. A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. *Molecular & Cellular Proteomics* 2, 1319–1330 (2003).
  34. Kwak, Y. T. *et al.* Methylation of SPT5 Regulates Its with RNA Polymerase II and Transcriptional Elongation Properties. *Molecular Cell* 11, 1055-1066 (2003).
  35. Yamagata, K. *et al.* Arginine Methylation of FOXO Transcription Factors Inhibits Their Phosphorylation by Akt. *Molecular Cell* 32, 221–231 (2008).
  36. Ryan, C. S. & Schröder, M. The human DEAD-box helicase DDX3X as a regulator of mRNA translation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10, 1033684 (2022).
  37. Mo, J. *et al.* DDX3X: structure, physiologic functions and cancer. *Molecular Cancer* 20, 38 (2021).
  38. Park, J. T. & Oh, S. The translational landscape as regulated by the RNA helicase DDX3. *BMB Reports* 55, 125–135 (2022).
  39. Chen, H. H., Yu, H. I. & Tarn, W. Y. DDX3 modulates neurite development via translationally activating an RNA regulon involved in Rac1 activation. *Journal of Neuroscience* 36, 9792–9804 (2016).
  40. Lai, M.-C., Chang, W.-C., Shieh, S.-Y. & Tarn, W.-Y. DDX3 Regulates Cell Growth through Translational Control of Cyclin E1. *Molecular & Cellular Biology* 30, 5444–5453 (2010).
  41. Samir, P. *et al.* DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome. *Nature* 573, 590–594 (2019).
  42. Sun, M., Song, L., Li, Y., Zhou, T. & Jope, R. S. Identification of an antiapoptotic protein complex at death receptors. *Cell Death & Differentiation* 15, 1887–1900 (2008).
  43. Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P. & Snyder, S. H. Protein S-Nitrosylation: A Physiological Signal for Neuronal Nitric Oxide. *Nature Cell Biology* 3, 193–197 (2001).
  44. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. & Burke, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 196, 801–810 (2012).
  45. Nguyen-Tien, D., Suzuki, T., Kobayashi, T., Toyama-Sorimachi, N. & Dohmae, N. Identification of the interacting partners of a lysosomal membrane protein in living cells by BioID technique. *STAR Protocols* 3, 10126 (2022).
  46. Rouillard, A. D. *et al.* The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve

- and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)* 2016, 100 (2016).
47. Hulsen, T., de Vlieg, J. & Alkema, W. BioVenn - A web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* 9, 488 (2008).
  48. Zhou, Y. *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications* 10, 1527 (2019).
  49. Ariumi, Y. *et al.* DDX3 DEAD-Box RNA Helicase Is Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* 81, 13922–13926 (2007).
  50. Yedavalli, V. S. R. K., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L. & Jeang, K. T. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* 119, 381-392 (2004).
  51. Garbelli, A., Beermann, S., Di Cicco, G., Dietrich, U. & Maga, G. A motif unique to the human dead-box protein DDX3 is important for nucleic acid binding, ATP hydrolysis, RNA/DNA unwinding and HIV-1 replication. *PLoS One* 6, 19810 (2011).
  52. Gherardini, L. *et al.* The FHP01 DDX3X helicase inhibitor exerts potent anti-tumor activity in vivo in breast cancer pre-clinical models. *Cancers (Basel)* 13, 4730 (2021).
  53. Jit Singh, R., Hogg, N., Joseph, J. & Kalyanaraman, B. Mechanism of Nitric Oxide Release from S-Nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry* 271, 18596-603 (1996).
  54. Hall, C. N. & Garthwaite, J. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide* 21, 92–103 (2009).
  55. Man, M. Q., Wakefield, J. S., Mauro, T. M. & Elias, P. M. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. *Inflammation* 45, 949–96 (2022).
  56. Pirie, E. *et al.* S-nitrosylated TDP-43 triggers aggregation, cell-to-cell spread, and neurotoxicity in hiPSCs and in vivo models of ALS/FTD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118,2021368118 (2016).
  57. Cho, D. H. *et al.*  $\beta$ -Amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324, 102–105 (2009).
  58. Jin, L. *et al.* Effects of ERK1/2 S-nitrosylation on ERK1/2 phosphorylation and cell survival in glioma cells. *International Journal of Molecular Medicine* 41, 1339–1348 (2018).
  59. Zhang, J., Jin, B., Li, L., Block, E. R. & Patel, J. M. Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 288, 840–849 (2005).
  60. Weerapana, E. *et al.* Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 468, 790–797 (2010).
  61. Dillon, M. B. C. *et al.* Novel inhibitors for PRMT1 discovered by high-throughput screening using activity-based fluorescence polarization. *ACS Chemical Biology* 7, 1198–1204 (2012).

62. Liu, J. *et al.* PRMT1 mediated methylation of cGAS suppresses anti-tumor immunity. *Nature Communications* 14, 2806 (2023).
63. Zhang, X. & Cheng, X. Structure of the Predominant Protein Arginine Methyltransferase PRMT1 and Analysis of Its Binding to Substrate Peptides. *Structure* 11, 509-520 (2003).
64. Wang, J. *et al.* Methylation of HBP1 by PRMT1 promotes tumor progression by regulating actin cytoskeleton remodeling. *Oncogenesis* 11, 45 (2022).
65. Wang, J., Wang, Z., Inuzuka, H., Wei, W. & Liu, J. PRMT1 methylates METTL14 to modulate its oncogenic function. *Neoplasia (United States)* 42, 100912 (2023).
66. Sakamaki, J.-I. *et al.* Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death (BAD) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 6085-90 (2011).
67. Eram, M. S. *et al.* A Potent, Selective, and Cell-Active Inhibitor of Human Type I Protein Arginine Methyltransferases. *ACS Chemical Biology* 11, 772–781 (2016).
68. Singh, S. P., Wishnok, J. S., Keshive, M., Deen, W. M. & Tannenbaum, S. R. The Chemistry of the S-Nitrosoglutathione-glutathione System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14428-14433. (1996).
69. Takahata, K. *et al.* Retinal Neurotoxicity of Nitric Oxide Donors With Different Half-Life of Nitric Oxide Release: Involvement of N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *Journal of Pharmacological Sciences Journal of Pharmacological Sciences* 92, 428-432 (2003).
70. Wei, H. H. *et al.* A systematic survey of PRMT interactomes reveals the key roles of arginine methylation in the global control of RNA splicing and translation. *Science Bulletin (Beijing)* 66, 1342–1357 (2021).
71. Wang, Y. *et al.* The methyltransferase PRMT1 regulates  $\gamma$ -globin translation. *Journal of Biological Chemistry* 296, 100417 (2021).
72. Ku, Y.-C. *et al.* DDX3 Participates in Translational Control of Inflammation Induced by Infections and Injuries. *Molecular & Cellular Biology* 39, 00285-18 (2019).
73. He, X. *et al.* PRMT1-Mediated FLT3 Arginine Methylation Promotes Maintenance of FLT3-ITD 1 Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 134, 548-560 (2019).
74. Maron, M. I. *et al.* Independent transcriptomic and proteomic regulation by type I and II protein arginine methyltransferases. *iScience* 24, 102971 (2021).
75. Subramanian, A. *et al.* Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15545-15550 (2005).
76. Cura, V. & Cavarelli, J. Structure, activity and function of the prmt2 protein arginine methyltransferase. *Life* 11, 1263 (2021).
77. Wang H *et al.* Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by

- nuclear hormone receptor. *Science* 293, 853-857 (2001).
78. Strahl BD *et al.* Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Current Biology* 11, 996-100 (2001).
  79. Lim, Y. *et al.* Proteomic identification of arginine-methylated proteins in colon cancer cells and comparison of messenger RNA expression between colorectal cancer and adjacent normal tissues. *Ann Coloproctol* 38, 60–68 (2022).
  80. Thirumalraj, B. *et al.* Half-Life of Nitric Oxide in Aqueous Solutions with and without Haemoglobin. *Physiological Measurement* 17, 267-277 (1996).
  81. Barglow, K. T., Knutson, C. G., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. & Marletta, M. A. Site-specific and redox-controlled S-nitrosation of thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 600-606 (2011).
  82. Soto-Rifo, R. & Ohlmann, T. The role of the DEAD-box RNA helicase DDX3 in mRNA metabolism. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA* 4, 369–385 (2013).
  83. Järvelin, A. I., Noerenberg, M., Davis, I. & Castello, A. The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Communication and Signaling* 14, 9 (2016).
  84. Zimmerman, O. *et al.* STAT1 gain-of-function mutations cause high total STAT1 levels with normal dephosphorylation. *Frontiers in Immunology* 10, 1433 (2019).
  85. Sun, J. *et al.* RNA helicase DDX5 enables STAT1 mRNA translation and interferon signalling in hepatitis B virus replicating hepatocytes. *Gut* 71, 991–1005 (2022).
  86. Mersaoui, S. Y. *et al.* Arginine methylation of the DDX 5 helicase RGG / RG motif by PRMT 5 regulates resolution of RNA:DNA hybrids. *The EMBO Journal* 38, 100986 (2019).
  87. Secchi, M., Lodola, C., Garbelli, A., Bione, S. & Maga, G. DEAD-Box RNA Helicases DDX3X and DDX5 as Oncogenes or Oncosuppressors: A Network Perspective. *Cancers* 14, 3820 (2022).
  88. Cluskey, S. & Ramsden, D. B. Mechanisms of Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Clinical Pathology* 54, 386-392 (2001).
  89. Zhao, M., Kim, J. R., Bruggen, R. van & Park, J. RNA-binding proteins in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecules and Cells* 41, 818–829 (2018).
  90. Urushitani, M. & Shimohama, S. The role of nitric oxide in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis Other Motor Neuron Disorders* 2, 71-81 (2001).
  91. Drechsel, D. A., Estévez, A. G., Barbeito, L. & Beckman, J. S. Nitric oxide-mediated oxidative damage and the progressive demise of motor neurons in ALS. *Neurotoxicity Research* 22, 251–264 (2012).
  92. Lyon, M. S., Wosiski-Kuhn, M., Gillespie, R., Caress, J. & Milligan, C. Inflammation, Immunity, and amyotrophic lateral sclerosis: I. Etiology and pathology. *Muscle and Nerve* 59, 10–22 (2019).

93. Linsalata, A. E. *et al.* DDX3X and specific initiation factors modulate FMR 1 repeat-associated non-AUG-initiated translation. *EMBO Reports* 20, 47498 (2019).
94. Jun, M. H. *et al.* Sequestration of PRMT1 & Nd1-L mRNA into ALS-linked FUS mutant R521C-positive aggregates contributes to neurite degeneration upon oxidative stress. *Scientific Reports* 7, 40474 (2017).
95. Tradewell, M. L. *et al.* Arginine methylation by PRMT1 regulates nuclear-cytoplasmic localization and toxicity of FUS/TLS harbouring ALS-linked mutations. *Human Molecular Genetics* 21, 136–149 (2012).

## 参考文献

本研究内容は原著論文として、以下のように発表した。

Attenuation of protein arginine dimethylation via S-nitrosylation of protein arginine methyltransferase

1

Taniguchi R, Moriya Y, Dohmae N, Suzuki T, Nakahara K, Kubota S, Takasugi N, Uehara T.

*Journal of Pharmacological Sciences* 154, 209-217 (2024)

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行に際してご指導およびご教鞭を賜りました岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬効解析学 上原 孝 教授に謹んで感謝の意を表します。

折に触れて多大なる御助言を賜りました岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬効解析学 高杉 展正 准教授、並びに本研究科 薬効解析学教室 久保田 翔 助教に心より感謝申し上げます。

また、本博士論文を審査していただき、有益なご助言を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 疾患薬理制御科学分野 有吉 範高 教授、生体膜生理化学分野 表 弘志 准教授、自然生命科学研究支援センター ゲノム・プロテオーム解析部門 宮地 孝明 准教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、LC-MS/MS 解析でご協力いただきました理化学研究所 環境資源科学研究センター 生命分子解析ユニット 堂前 直 先生、DDX3 プラスミドをご恵与くださいました長崎大学 高度感染症研究センター ウイルス宿主相互作用研究分野 有海 康雄 准教授に厚く御礼申し上げます。

多くの時間を共にし、様々なご協力をいただいた薬効解析学教室の皆様から心から感謝申し上げますとともに、今後ますますのご活躍をお祈り申し上げます。また研究活動をサポートし、温かく見守ってくださった秘書の岡本 陽子さん、中井 仁美さん、松本 真里さん、末吉 寿恵さんに心から感謝申し上げます。

本研究に取り組むにあたり、支援してくださった日本薬学会長井記念薬学研究奨励金に心より感謝申し上げます。また本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2126 の支援を受けたものであり、心より感謝申し上げます。

2024年2月8日 谷口 理香子