The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	CARM1 regulates proliferation of PC12 cells by methylating HuD.
Author(s)	藤原, 達司
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46342
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　藤原達司（ふじわらたつじ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　20136　号

学位授与年月日　平成18年3月24日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

医学系研究科臓器制御医学専攻

学位論文名　CARM1 regulates proliferation of PC12 cells by methylating HuD.
（CARM1は、HuDのメチル化によってPC12細胞の増殖を制御している。）

論文審査委員　（主査）
教　授　吉川　秀樹

（副査）
教　授　吉峰　俊樹　　教　授　祖父江憲治

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕Huタンパクは、ショウジョウバエにおける神経機構及び分化の維持に必須であるelavと高い相同性をもつタンパクで、かつmRNAの転写後調節を行うRNA結合タンパクの一つである。このHuタンパクにはubiquitousに発現するHuR、神経特異的に発現し、神経分化を正に制御するHuB、HuC、HuDの4つが同定されている。近年、HuRタンパクの塩基性アミノ酸に富むhinge regionと呼ばれる領域の一つのアルギニンが、アルギニンメチル化転位酵素の一つであるCARM1（coactivator associated arginine methyltransferase 1）によってメチル化されることが実証された（Li、H. et al：2002 J. Biol. Chem. 277：44623-44630）。このメチル化されるアルギニン残基周囲のアミノ酸配列は、4つのHuタンパクで非常によく保存されている。このことより、HuR以外の他のHuタンパクも同様にCARM1によってアルギニン残基のメチル化を受けることが予想された。結合するmRNAに関して解析の進んでいるHuDについて、このHuDがHuR同様CARM1の特異的基質であるのか、更に、このCARM1によるHuDのメチル化が、神経分化に対してどのような役割を持つのか、神経分化モデルであるPC12細胞を用いてその機能解析を行った。

〔　方法ならびに結果　〕HuDが、CARM1の特異的基質であるのかをin vitroではS-adenosyl-methionineを用いたin vitro methylation assay法によって、またPC12細胞ではsiRNA法によってCARM1発現をKnock downさせたPC12細胞を作成し、モノ・ジメチル化アルギニン抗体を用いた免疫沈降法によって検討を行った。結果、HuDはin vitro、PC12細胞の両方においてCARM1の特異的基質であることがわかった。更に同様の方法で、in vitro及びPC12細胞において、CARM1によってメチル化を受けるHuDのアルギニン残基は、報告されているHuRのメチル化を受けるアルギニン残基に相当する236番目アルギニン残基であることがわかった。

次に、HuD 236番目アルギニン残基のメチル化がどのような役割を持つのか検討した。HuDがその非翻訳領域（UTR）に結合、安定化させることが報告されているp21 cip1/waf1、p27、GAP43、TauのmRNA及びタンパク発現量についてwild type PC12細胞と、CARM1 knock down PC12細胞を用いて比較検討を行った。結果、p21 cip1/waf1 mRNA及びタンパクの発現量が、CARM1 knock down PC12細胞において増加していることが判明した。このことより、PC12細胞においてCARM1発現を抑制するとp21 cip1/waf1 mRNA及びタンパクの発現が増加することがわかった。次に、このp21 cip1/waf1 mRNAの増加が、転写活性上昇によるものなのか、mRNAの安定性の

向上によるものなのか nuclear run on assay 法、また Actinomycin D を用いた mRNA half life assay によって検討した。結果、CARM1 発現抑制による p21 cip1/waf1 発現の上昇は、転写活性亢進によるものでなく、p21 cip1/waf1 mRNA の半減期延長によるものであることがわかった。この p21 cip1/waf1 mRNA の安定化に、HuD のメチル化が関与する可能性が考えられたので、HuD と 236 番目アルギニンをリシンに変異させた HuDR236K を PC12 細胞に transfection し、IP (immunoprecipitation) -RTPCR 法によってそれぞれの HuD に結合する p21 cip1/waf1 mRNA 量を比較した。結果、HuD と比較して CARM1 によってメチル化されない HuDR236K の方がより p21 cip1/waf1 mRNA と結合することが判明した。興味深いことに、PC12 細胞を NGF によって神経様細胞に分化させると、HuD のメチル化レベルが低下することがわかった。これらのことより、CARM1 は、HuD のメチル化を介して、p21 cip1/waf1 mRNA の安定性をコントロールし、PC12 細胞の増殖・分化を制御する機構が示唆された。更に、in vivo における adult mouse の脳における CARM1 発現細胞の分布を調べた。結果、興味深いことに CARM1 陽性細胞は、脳室周囲に認められ、その部位で BrdU 陽性細胞と高い比率で一致することがわかった。このことより、CARM1 は PC12 細胞の増殖・分化をコントロールしているのと同様に、in vivo において神経幹細胞の増殖・分化も制御していることが予想された。

〔 総　　括 〕今回の実験において、アルギニンメチル化転位酵素の一つである CARM1 は、HuD のメチル化を介して p21 cip1/waf1 mRNA の安定性をコントロールし神経分化モデルである PC12 細胞の増殖・分化を制御することがわかった。また、CARM1 は PC12 細胞同様、神経幹細胞の増殖維持に必要であることが予想された。このことより、CARM1 は中枢神経再生の tool の一つと考えられながらも、未だ不明な点が数多く残る神経幹細胞の増殖・分化を制御する一因子であることが予想された。

論文審査の結果の要旨

本研究によってアルギニンメチル化転位酵素の一つである CARM1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1) が、HuD を基質として持ち、HuD のメチル化を介して p21 cip1/waf1 mRNA の転写後調節に関与し、これによって神経分化モデルである PC12 細胞の増殖・分化を制御することを明らかにした。また、adult mouse brain における CARM1 発現細胞の分布を検討した結果、脳室周囲に存在し、かつ BrdU 陽性細胞と一致した。このことより、神経幹細胞は CARM1 を発現していることがわかった。現在までに、神経幹細胞に関するタンパクメチル化の報告はなく、本研究は、アルギニンメチル化転位酵素の一つである CARM1 と神経幹細胞の増殖・分化機構との関与の可能性を示唆するものである。また本研究の発展は、中枢神経再生分野における重要なテーマである神経幹細胞の増殖・分化機構の解明につながる可能性もあり、このため本研究は、博士（医学）の学位授与に値する。