

アルギニル化

美濃部 晃平¹, 黒坂 哲²

要旨

タンパク質の多くはゲノム上の遺伝子が転写・翻訳された後、様々な修飾を受け、その構造、局在、活性、他の分子との相互作用などが調節される。このような修飾を翻訳後修飾と呼び、リン酸化やアセチル化、ユビキチン化などが広く知られている。アルギニル化は、アルギニン転移酵素 (ATE1) によってアルギニンがタンパク質に付加する翻訳後修飾である。アルギニル化は 1960 年代に発見され、2000 年代になって生体におけるその機能の研究が進んできたが、いまだ未解明の部分が多い。本稿では、遺伝子改変マウスを用いた研究の成果を中心に、これまでにわかっているアルギニル化の機能について解説する。

キーワード：翻訳後修飾、アルギニル化、arginylation、アルギニン転移酵素、ATE1

アルギニル化とは？

アルギニル化は 1960 年代に tRNA 依存的にアルギニンを付加する翻訳後修飾として発見され、この修飾は原核生物から真核生物まで広い範囲の生物で確認されている。ターゲットとなるのはタンパク質の N 末端のアスパラギン酸、グルタミン酸、システインだと考えられており、この N 末端のアルギニル化は N 末端側経路の一部として知られていた^{(1), (2), (3), (4)}。N 末端側は、タンパク質の寿命が N 末端のアミノ酸残基によって決定されるという法則であり、原核生物と真核生物の双方で保存されている。アルギニル化により N 末端にアルギニンが付加したタンパク質はユビキチンプロテアソーム系のターゲットとなり、分解される (図 1)。例えば、G タンパクシグナルに関わる RGS4 はアルギニル化によって分解が促進され、そのことが正常な心血管の形成にかかわっていることが示されている⁽⁵⁾。また、Tau、TDP-43、 α -シヌクレインといった神経変性疾患に関わるタンパク質の断片の N 末端におけるアルギニル化がこれらの分解を促進し、ATE1 ノックアウト細胞では過剰発現させた TDP-43 の断片が細胞内に蓄積するという報告があり、アルギニル化および N 末端側によるこれらのタンパク質の分解が十分でないことが神経変性疾患の原因であることが示唆されている^{(6), (7)}。また、 β アクチンのアルギニル化が細胞骨格の形成や細胞遊走において重要な役割を果たすことが報告されているが、現在までにアルギニル化された γ アクチンは検出されていない。翻訳直後に N 末端にアルギニンが付加した γ アクチンはユビキチンプロテアソーム系で急速に分解されるようであり⁽⁸⁾、これもアルギニル化が N 末端側経路の一部として機能していることを示している。しかし、近年アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン以外のアミノ酸、そして N 末端だけでなく側鎖もアルギニル化されることが分かってきた⁽⁹⁾。N 末端側経路以外のアルギニル化の機能も明らかになってきており、アルギニル化の基質として細胞骨格やアクチン結合、解糖系に関わるタンパク質など数十種類が同定されている⁽¹⁰⁾。 β アクチンは細胞骨格の主要構成タンパク質であり、アルギニル化されることが知られている。ATE1 ノックアウトマウス胎仔由来の線維芽細胞はラメラ形成が十分でなく、その表現型は野生型 β アクチンの過剰発現ではレスキューされないが、恒常的アルギニル化 β アクチンの過剰発現でレスキューされる。このことは、アルギニル化された β アクチンが細胞骨格の形成において機能していることを示している⁽¹¹⁾。

原稿受付 2019 年 2 月 13 日

1. 近畿大学生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所, 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

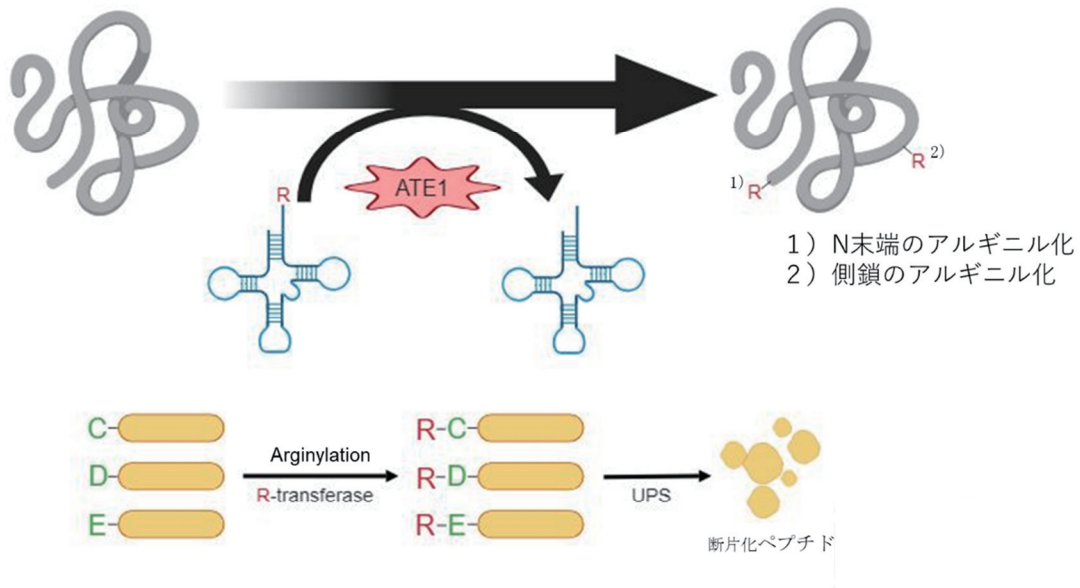


図1 アルギニル化とユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解

アルギニル化に関わる酵素

タンパク質をアルギニル化する酵素として、アルギニン転移酵素 (Arginyl-tRNA-protein transferase 1, arginyltransferase, arginine transfer enzyme; ATE1) が同定されている。ATE1 は、tRNA 依存的にアルギニンを基質となるタンパク質のペプチド鎖にペプチド結合させる働きを持つ。しかしその構造には、特に機能が知られているようなドメインは存在しない。マウスでは ATE1 の mRNA には選択的スプライシングによってつくられる 6 つのアイソフォームが存在する (図 2)。それぞれのアイソフォームの呼称は報告によって異なり、その統一が必要であるが、本稿では図 2 に示す呼称で記述する。ATE1 の 6 つのアイソフォームのうち 4 つ (ATE1-1、-2、-3 および -4) は他の 2 つのアイソフォーム (ATE1-5、-6) よりはるかに活性が高く、これらの組織発現パターンや細胞内局在については、ATE1-1、ATE1-2 が胚発生から成体まで通して多くの組織で普遍的に発現する一方、ATE1-3、ATE1-4、ATE1-5、ATE1-6 には組織特異性があるようである^{(12)、(13)、(14)、(15)}。それぞれのアイソフォーム間の機能の違いは現在のところ明らかになっていないが、ペプチドアレイを用いた最新の研究でアイソフォームごとにターゲットが異なることが報告された⁽¹⁶⁾。

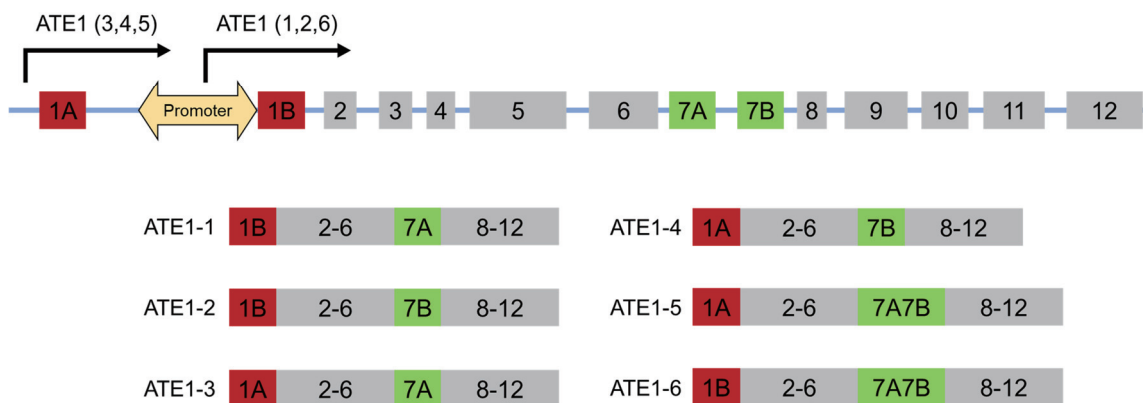


図2 ATE1 アイソフォーム

ATE1 の機能

ATE1 を欠損した酵母で明らかな表現型の違いがみられなかったことから、アルギニル化の機能の重要性は注目されてこなかった。しかし、ATE1 ノックアウトマウスが発生 12.5 日目以降に心臓形成や血管新生などの異常を伴う胚性致死であることが 2002 年に報告され⁽¹⁷⁾、哺乳類細胞や哺乳類個体におけるアルギニル化の機能についての研究が加速した。

ATE1 ノックアウトマウスが胚性致死であるため、アルギニル化の機能は ATE1 コンディショナルノックアウトマウスを用いて解析されるようになった。

神経堤細胞特異的ノックアウトマウスでは神経堤細胞の遊走速度の低下や頭部神経堤細胞由来組織の形成異常がみられ、多くは呼吸障害による産後直死となる⁽¹⁸⁾。心筋特異的ノックアウトマウスでは出生時にはすでに心筋繊維の微細構造の異常がみられ、約 3 ヶ月齢から拡張型心筋症様の症状を呈する⁽¹⁹⁾。神経細胞特異的ノックアウトマウスではパーキンソン病様の運動失調がみられ⁽⁷⁾、その神経細胞を培養すると、野生型と比較して神経突起の伸長が短くなる⁽²⁰⁾。骨格筋特異的ノックアウトマウスでは骨格筋強度が有意に低下し、筋力が低下する⁽²¹⁾、⁽²²⁾。さらに、血管内皮細胞特異的プロモーター Tek (Tie2) の制御化で ATE1 をノックアウトするマウスでは、血管における表現型はみられないが、生殖能力の顕著な低下がみられ、その後代のほとんどは発生 7.5 日目までに致死となる⁽²³⁾。これは、Tek プロモーターが生殖細胞においても働くためであると考えられ、おそらく減数分裂時に配偶子に異常が生じると考察されている。また、出生後に ATE1 を全身でノックアウトすると、体重の急激な減少、代謝率の増加、運動過多、脳の拡大、精子形成不全といった異常がみとめられる⁽²⁴⁾。このマウスでみられた精子形成不全は、前述の Tek プロモーターを用いたコンディショナルノックアウトマウスでみられた生殖能力の低下を支持する結果である。

このほかにも、最近になり、アルギニル化がオートファジー⁽²⁵⁾、⁽²⁶⁾、⁽²⁷⁾や細胞ストレス応答⁽²⁸⁾、⁽²⁹⁾、⁽³⁰⁾、血小板機能の調節因子⁽³¹⁾として働くことが明らかになってきた。以上のように、アルギニル化は発生、分化、細胞・組織・器官の機能制御といったさまざまな生命現象にかかわる重要な翻訳後修飾である⁽³²⁾。

アルギニル化と疾患

現在のところ、アルギニル化と疾患のかかわりを直接的に示す臨床例はない。しかしながら、ATE1 ノックアウトマウス胎仔由来線維芽細胞 (ATE1 KO MEF) を用いた研究では、ATE1 KO MEF は核型異常を頻発し、野生型 MEF が増殖を停止する栄養条件下や細胞密度においても増殖すること、さらには ATE1 KO MEF は免疫不全マウスに移植されると腫瘍を形成し、その腫瘍形成能は ATE1 の過剰発現によって低下することが示されている⁽³³⁾。また、ヒト腎臓がん組織およびヒト結腸がん組織では ATE1 の発現量が低下しており、ヒト前立腺がんではステージが進行したものや予後が悪いものほど ATE1 の発現が低いことも示されている⁽³³⁾。これらのことから、アルギニル化ががんに関わっている可能性は小さくないと思われる。また、心筋細胞における ATE1 の欠失が拡張型心筋症⁽¹⁹⁾、神経細胞における ATE1 の欠失が神経変性疾患⁽⁷⁾を引き起こすこと、さらには、ATE1 の欠損により神経変性にかかわるタンパク質の分解が抑制され細胞質中に蓄積すること⁽⁶⁾などから、ATE1 の発現低下、活性低下、あるいは特定のタンパク質におけるアルギニル化の異常がこれらの疾患の発症および進行に関わっている可能性は十分にあり得る。加えて、加齢ラット由来の細胞では ATE1 の発現量が低下していたという報告⁽³⁴⁾もあることから、加齢にともなうさまざまな疾患にアルギニル化が関わっている可能性も考えられる。さらには、加齢にともなう生殖能力の低下にもアルギニル化がかかわっている可能性も考えられる。

おわりに

現在のところ、アルギニル化は広く認知されているとはいえ、その研究はまだ萌芽期である。本項で述べたようにアルギニル化は重要な翻訳後修飾である。このことが広く認知され、アルギニル化の研究が広がることを願って本稿の結びとしたい。

参考文献

1. Tasaki, T., Kwon, Y. T. (2007) The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles. *Trend Biochem Sci* 132, 520-528.
2. Hwang, C. -S. et al. (2011) Ubiquitin ligases of the N-end rule pathway: Assessment of mutations in UBR1 that cause the Johanson-Blizzard Syndrome. *Plos One* 6, e24925.
3. Tasaki, T. et al. (2012) The N-end rule pathway. *Annu Rev Biochem* 81, 261-289.
4. Varshavsky, A. (2011) The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci* 20, 1298-1345.
5. Lee, M. J. et al. (2012) Characterization of arginylation branch of N-end rule pathway in G-protein-mediated proliferation and signaling of cardiomyocytes. *J Biol Chem* 287, 24043-24052.
6. Brower, C. S. et al. (2013) Neurodegeneration-associated protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway. *Mol Cell* 50, 161-171.
7. Wang, J. et al. (2017) Protein arginylation targets alpha synuclein, facilitates normal brain health, and prevents neurodegeneration. *Sci Rep* 7, 1-14.
8. Zhang, F. et al. (2010) Differential arginylation of actin isoforms is regulated by coding sequence-dependent degradation. *Science* 329, 1534-1537.
9. Wang, J. et al. (2014) Arginyltransferase ATE1 catalyzes midchain arginylation of proteins at side chain carboxylates in vivo. *Chem Biol* 21, 331-337.
10. Wong, C. C. L. et al. (2007) Global analysis of posttranslational protein arginylation. *Plos Biol* 5, e258.
11. Karakozova, M. et al. (2006) Arginylation of b-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science* 313, 192-196.
12. Kwon, Y. T. et al. (1999) Alternative splicing results in differential expression, activity, and localization of the two forms of arginyl-tRNA-protein transferase, a component of the N-end rule pathway. *Mol Cell Biol* 19, 182-193.
13. Rai, R., Kashina, A. (2005) Identification of mammalian arginyltransferases that modify a specific subset of protein substrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 10123-10128.
14. Hu, R. -G. et al. (2006) Arginyltransferase, its specificity, putative substrates, bidirectional promoter, and splicing-derived isoforms. *J Biol Chem* 281, 32559-32573.
15. Galiano, M. R. et al. (2016) Post-translational protein arginylation in the normal nervous system and in neurodegeneration. *J Neurochem* 138, 506-517.
16. Wang, J. et al. (2018) Target site specificity and in vivo complexity of the mammalian arginylome. *Sci Rep* 8, 16177.

17. Kwon, Y. T. et al. (2002) An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science* 297, 96–99.
18. Kurosaka, S. et al. (2010) Arginylation-dependent neural crest cell migration is essential for mouse development. *Plos Genet* 6, e1000878.
19. Kurosaka, S. et al. (2012) Arginylation regulates myofibrils to maintain heart function and prevent dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 53, 333–341.
20. Wang, J. et al. (2017) Arginyltransferase ATE1 is targeted to the neuronal growth cones and regulates neurite outgrowth during brain development. *Dev Biol* 430, 41–51.
21. Cornachione, A. S. et al. (2014) Arginylation of myosin heavy chain regulates skeletal muscle strength. *Cell Rep* 8, 470–476.
22. Leite, F. S. et al. (2016) Posttranslational arginylation regulates striated muscle function. *Exerc Sport Sci Rev* 44, 98–103.
23. Leu, N. A. et al. (2009) Conditional Tek promoter-driven deletion of arginyltransferase in the germ line causes defects in gametogenesis and early embryonic lethality in mice. *Plos One* 4, e7734.
24. Brower, C. S., Varshavsky, A. (2009) Ablation of arginylation in the mouse N-end rule pathway: loss of fat, higher metabolic rate, damaged spermatogenesis, and neurological perturbations. *Plos One* 4, e7757.
25. Cha-Molstad, H. et al. (2015) Amino-terminal arginylation targets endoplasmic reticulum chaperone BiP for autophagy through p62 binding. *Nat Cell Biol* 17, 917–929.
26. Jiang, Y. et al. (2016) The arginylation branch of the N-end rule pathway positively regulates cellular autophagic flux and clearance of proteotoxic proteins. *Autophagy* 12, 2197–2212.
27. Yoo, Y. D. et al. (2018) N-terminal arginylation generates a bimodal degron that modulates autophagic proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, E2716–E2724.
28. Kumar, A. et al. (2016) Posttranslational arginylation enzyme Atel affects DNA mutagenesis by regulating stress response. *Cell Death and Dis* 7, e2378.
29. Deka, K. et al. (2016) Protein arginylation regulates cellular stress response by stabilizing HSP70 and HSP40 transcripts. *Cell Death Discov* 2, e16074.
30. Deka K., Saha, S. (2017) Arginylation: a new regulator of mRNA stability and heat stress response. *Cell Death Dis* 8, e2604.
31. Bender, M., Falet, H. (2014) Post-translational arginylation as a novel regulator of platelet function. *Haematologica* 99, 402–404.
32. Kashina, A. (2014) Protein arginylation, a global biological regulator that targets actin cytoskeleton and the muscle. *Anat Rec* 297, 1630–1636.
33. Rai, R. et al. (2016) Arginyltransferase suppresses cell tumorigenic potential and inversely correlates with metastases in human cancers. *Oncogene* 35, 4058–4068.
34. Lamon, K. D., Kaji, H. (1980) Arginyl-tRNA transferase activity as a marker of cellular aging in peripheral rat tissues. *Exp Gerontol* 15, 53–64.

英文抄録

Arginylation

Kohei Minobe¹, Satoshi Kurosaka²

The structure, localization, activity, and interaction of proteins are regulated by various modifications following translation. Those modifications, such as phosphorylation, acetylation, and ubiquitination for well-known examples, are called posttranslational modifications. A posttranslational modification, called “Arginylation”, is the addition of arginine to target proteins, mediated by arginyltransferase (ATE1). Arginylation has been first reported in 1960s, and after decades of progress of researches on its functions in live cells/organisms, this posttranslational modification is still poorly understood. This review focuses on critical roles of arginylation, especially that are revealed in studies using gene modified mice.

Keywords : posttranslational modification, arginylation, arginyltransferase, ATE1

1. Graduate school of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Institute of Advanced Technology, Kindai University, Wakayama 624-0017, Japan