

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07278

研究課題名(和文) S-アデノシルメチオニンの恒常性に関わるメチル化RNAシステムの解明

研究課題名(英文) Analysis of proteins involved in the MAT2A mRNA stability control

研究代表者

島 弘季 (Shima, Hiroki)

東北大学・医学系研究科・助手

研究者番号：00448268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類細胞のS-アデノシルメチオニン(SAM)合成酵素であるMAT2AのmRNAは、細胞内SAM量に応じて3'非翻訳領域(3'UTR)に存在するヘアピン構造中の特定のアデノシン部位がN6-メチル化修飾(m6A)されることで、安定性が変動する。本研究では、MAT2A mRNAの3'UTRと相互作用するRNA結合タンパク質を探索した。このとき、細胞内SAM量を変動させたときに結合が変動するもの、あるいは野生型3'UTRとメチル化部位変異型3'UTRの間で差異のあものに注目することで、MAT2A mRNA安定性制御に関与する因子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNAの転写後調節は、遺伝子発現制御の主要な仕組みの一つである。m6A修飾はmRNAに見られる修飾のうち最も多いものであり、これによるRNA制御の分子メカニズムは近年の注目を集めている。本研究の結果はMAT2A mRNAを対象としてとりあげ、m6AによるRNA制御のメカニズムの理解に資するものであるとともに、m6A制御や細胞内SAM量調節の異常を原因とする疾患の研究のための基礎的な情報としても貢献できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：The expression of MAT2A, the ubiquitous S-adenosylmethionine (SAM) synthetase in mammals, is regulated in an intracellular SAM-responsive manner. The feedback control is mediated by methyl-6-adenosine (m6A) modification occurring at six specific adenosine residues in the hairpins located in the 3' UTR of the MAT2A mRNA. The research aimed at identification of RNA binding proteins interacting with the MAT2A 3'UTR. By comparing associating proteins between WT and m6A-site-mutant 3'UTR, we found RNA-binding proteins involved in the stability control of the MAT2A mRNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA S-アデノシルメチオニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (MAT) は、ATP とメチオニンから S-アデノシルメチオニン (SAM) を合成する酵素である。SAM は、ヒストンや DNA のメチル化反応においてメチル基供与体となる重要な代謝物であり、細胞内における SAM の生産は過不足なく厳密にコントロールされる必要がある。

その鍵の一つは、細胞内 SAM 量に応じて、MAT の発現量がフィードバック制御されることである。原核生物の場合は細胞内 SAM がコファクターとして働いており、大腸菌ではリプレッサータンパク質に SAM が結合すると MAT 遺伝子の転写が抑制されること、また乳酸菌では MAT の mRNA の開始コドン上流に SAM が結合すると、翻訳が阻害されることで MAT 発現が制御されていることが知られていた。

哺乳類の MAT には二つのアイソザイムが存在し、肝臓特異的な MAT1 に対し MAT2 はあらゆる細胞でユビキタスに発現している。MAT2 の触媒ドメインである MAT2A の発現は、細胞内 SAM に応じて mRNA の安定性が変動することで制御されることが知られていた。申請者らは、MAT2A mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に複数存在するヘアピン構造のループ部のアデノシンが N6-メチル化修飾 (m6A) されることが安定性制御に重要であること、また、この修飾に RNA メチル基転移酵素 METTL16 が関わることを見出した。

2. 研究の目的

以上のようにメチル化と MAT2A mRNA 安定性制御の関係が示されたものの、メチル化されることで MAT2A mRNA がどのように制御されているのか、METTL16 の他にどのような因子が制御に関わっているのかについて詳細は不明であった。一般的に 3' UTR は、mRNA 機能制御のための種々の RNA 結合タンパク質の標的となると考えられている。MAT2A mRNA 安定性制御機構の解明のため、MAT2A mRNA の 3' UTR に結合するタンパク質を同定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

ホタルルシフェラーゼのコーディング配列の下流にマウス MAT2A の 3' UTR を付加したレポーターベクターを HeLa 細胞に導入すると、レポーターの発現は細胞内 SAM 量に応じて変動する。この系を改変し、ルシフェラーゼと 3' UTR の間にバクテリオファージ MS2 のゲノム中にあり、MS2 の coat タンパク質が結合する配列を挿入する。細胞には同時に Bio-tag 付きの MS2 coat タンパク質を発現させているため、ストレプトアビジンによるアフィニティ精製を行うことで coat タンパク質を介

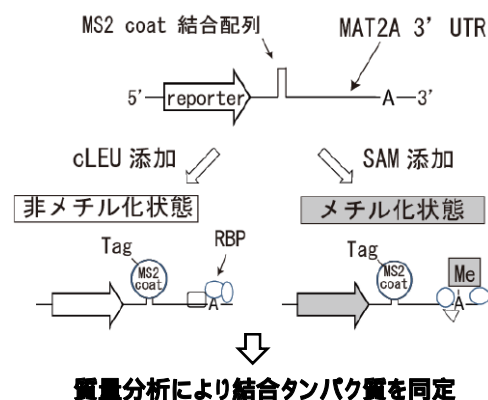


図1. MAT2A 3' UTR 結合タンパク質解析方法

してレポーター mRNA と結合タンパク質の複合体が分離される。タンパク質を LC-MS/MS で同定し、negative control (MS2 認識配列を有しないレポータープラスミドによるサンプル) に結合する background と比較して、MAT2A 3' UTR 結合タンパク質を明らかにする。

4. 研究成果

・ MS2 coat タンパク質認識配列を付加したルシフェラーゼレポーターベクターを作成した。これを HeLa 細胞にトランスフェクションし、MAT 阻害剤シクロロイシン (cLEU) の処理により細胞内 SAM を低下させるとルシフェラーゼ活性が上昇したことから、MS2 配列の付加は mRNA 安定性に関わる 3' UTR の機能に影響を及ぼさないと考えた。

・ レポーターベクターと Bio-tag MS2 coat 発現ベクターを co-transfection した HeLa 細胞の抽出液を用いてストレプトアビジンビーズによりアフィニティ精製を行い、分離されたタンパク質を LC-MS/MS によって解析した。Negative control との比較から、結合タンパク質として多くの因子が得られた。この中には METTL16 が含まれていたことから、この系によりレポーター mRNA に結合するタンパク質を分離できたと考える。

・ 同様の実験を、cLEU あるいは SAM を培地に添加する処理を行った細胞を用いて実施した。ここでは LC-MS/MS において Non-label 定量を行い、細胞内 SAM に応じた 3' UTR への結合の変動を調べた。結合タンパク質のうち変動が見られたものはごくわずかで、その一つは METTL16 であり、低 SAM 条件で mRNA への結合が上昇していることを示す結果が得られ、これは既報の知見と一致していた。METTL16 は MAT2A mRNA の他に U6-snRNA を標的とすることが知られている。興味深いことに、この実験では U6-snRNA 結合タンパク質として知られているものが候補因子として得られた。さらに、この因子は METTL16 とは反対に、低 SAM 条件下でレポーター mRNA への結合が低下することを示す結果が得られた。その他の結合タンパク質としては、METTL16 より以前から m6A 修飾酵素として知られていた METTL3 と複合体を形成する因子や、m6A 認識タンパク質 YTHDC1 がリストアップされたが、これらの結合は細胞内 SAM によって大きく影響は受けなれないと思われる結果であった。

・ MAT2A 3' UTR の 6 か所の m6A 修飾アデノシン部位に変異を導入したレポーターベクターを用いて同様の実験を行った。METTL16 および U6-snRNA 結合タンパク質のレポーター mRNA との相互作用は、変異型レポーターでは見られなかった。

・ U6-snRNA 結合因子のクローニングを HeLa 細胞を用いて行い、FLAG-HA-タグ付きタンパク質の発現ベクターを作成した。これを HeLa 細胞にトランスフェクションして発現させ、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体によるタンデム免疫沈降を行って、沈降画分に含まれる RNA を RT-qPCR によって定量したところ、内在性 MAT2A mRNA の回収が確認された。

以上の結果から、U6-snRNA 結合因子は METTL16 と同様に、MAT2A 3' UTR 中のヘアピン構造部分に結合すると考えられた。一方でその結合は、METTL16 とは逆に高 SAM 条件において促進されると予想された。

・また、3' UTR 相互作用タンパク質には MTR4 が含まれており、これをロックダウンした細胞では、cLEU 処理時の MAT2A mRNA 増加が見られなくなることが分かった(図2)。このことは、RNA 分解装置である RNA エクソソームと mRNA とを介するアダプター因子である MTR4 タンパク質が、MAT2A mRNA の安定化に必要であることを意味し、MTR4 タンパク質の新たな機能を示唆する興味深い結果であると考えられる。

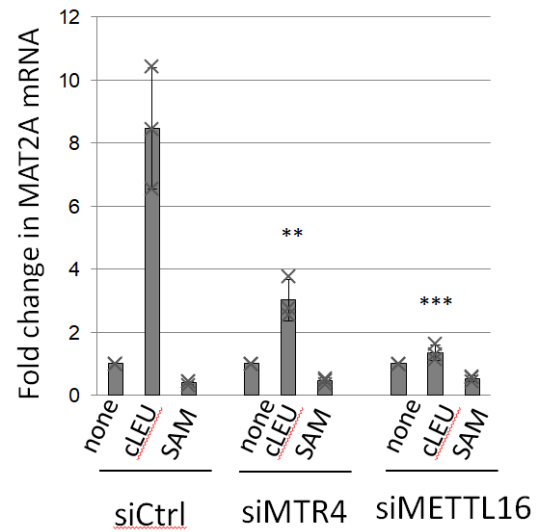


図2. MTR4 ロックダウン細胞では低 SAM 条件下(6時間)での MAT2A mRNA フィードバック制御が損なわれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Dodo Mina, Kitamura Hiroshi, Shima Hiroki, Saigusa Daisuke, Wati Sisca Meida, Ota Nao, Katsuoka Fumiki, Chiba Hatsune, Okae Hiroaki, Arima Takahiro, Igarashi Kazuhiko, Koseki Takeyoshi, Sekine Hiroki, Motohashi Hozumi	4. 巻 165
2. 論文標題 Lactate dehydrogenase C is required for the protein expression of a sperm-specific isoform of lactate dehydrogenase A	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 323 ~ 334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Pancha Imran, Shima Hiroki, Higashitani Nahoko, Igarashi Kazuhiko, Higashitani Atsushi, Tanaka Kan, Imamura Sousuke	4. 巻 97
2. 論文標題 Target of rapamycin-signaling modulates starch accumulation via glycogenin phosphorylation status in the unicellular red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 485 ~ 499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sekine Hiroki, Okazaki Keito, Kato Koichiro, Alam M. Morshedul, Shima Hiroki, Katsuoka Fumiki, Tsujita Tadayuki, Suzuki Norio, Kobayashi Akira, Igarashi Kazuhiko, Yamamoto Masayuki, Motohashi Hozumi	4. 巻 38
2. 論文標題 O-GlcNAcylation Signal Mediates Proteasome Inhibitor Resistance in Cancer Cells by Stabilizing NRF1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00252-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ochiai Kyoko, Kondo Haruka, Okamura Yasunobu, Shima Hiroki, Kurokochi Yuko, Kimura Kazumi, Funayama Ryo, Nagashima Takeshi, Nakayama Keiko, Yui Katsuyuki, Kinoshita Kengo, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Zinc finger-IRF composite elements bound by Ikaros/IRF4 complexes function as gene repression in plasma cell	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 883 ~ 894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2017010413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li Jie, Shima Hiroki, Nishizawa Hironari, Ikeda Masatoshi, Brydun Andrey, Matsumoto Mitsuyo, Kato Hiroki, Saiki Yuriko, Liu Liang, Watanabe-Matsui Miki, Iemura Kenji, Tanaka Kozo, Shiraki Takuma, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 475
2. 論文標題 Phosphorylation of BACH1 switches its function from transcription factor to mitotic chromosome regulator and promotes its interaction with HMMR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 981 ~ 1002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20170520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 島弘季 五十嵐和彦	4. 巻 36
2. 論文標題 RNAメチル化によるSAM代謝制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shima Hiroki, Matsumoto Mitsuyo, Ishigami Yuma, Ebina Masayuki, Muto Akihiko, Sato Yuho, Kumagai Sayaka, Ochiai Kyoko, Suzuki Tsutomu, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 S -Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N 6 -Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3354 ~ 3363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.11.092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shima Hiroki, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 N1-methyladenosine (m1A) RNA modification: the key to ribosome control	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa026	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島弘季 松本光代 五十嵐和彦
2. 発表標題 RNAメチル化によるS-アデノシルメチオニン量の制御機構とその意義
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	五十嵐 和彦 (Igarashi Kazuhiko)		