

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06497

研究課題名(和文) タンパク質ヒスチジンメチル化の理解

研究課題名(英文) Role of protein histidine methylation

研究代表者

島津 忠広 (Shimazu, Tadahiro)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：10618771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：METTL18の標的基質探索を試みた結果、リボソームタンパク質であるRPL3が基質となることを発見した。このRPL3メチル化およびMETTL18がリボソームの翻訳機能に与える影響について、理研・岩崎RNAシステム生化学研究室との共同研究により解析したところ、METTL18 KO細胞ではTyrコドンの伸長が早く進み、タンパク質翻訳異常が起こりやすいことを見出した。また、CARNMT1によってHisメチル化を受ける複数の基質タンパク質を同定した。このうちU2AF1のHis37のメチル化率がほぼ100%であり、CARNMT1 KO細胞ではスプライシング(CE)が変化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究開始当時、未知であったHis残基のpiメチル化酵素としてMETTL9とCARNMT1を研究対象とした結果、これら2つの酵素がともに複数の基質を修飾するタンパク質His残基のpiメチル化酵素であることを明らかにした。METTL9のノックアウトマウスは正常に発生し目立った異常が見られなかった一方で、本研究で作出したCARNMT1ホモノックアウトマウスは胎生13.5日付近で致死になったことから、Hisメチル化修飾は生命機能に必須の役割を持つものと考えられる。今後、胚発生に重要な役割を果たすHisメチル化修飾を明らかにすることで、生命の基本原則を解明することにつながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：As a result of trying to search for the targets of METTL18, we discovered that RPL3, a ribosomal protein, is the substrate. We analyzed the effects of RPL3 methylation and METTL18 on ribosome translation function in collaboration with RIKEN's Iwasaki RNA Systems Biochemistry Laboratory.

We also identified multiple substrate proteins that undergo His-methylation by CARNMT1. Among them, the methylation rate of His37 of U2AF1 was almost 100%, and it was revealed that splicing (CE) was changed in CARNMT1 KO cells or KO mice embryos.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：メチル化

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム上には全ゲノムのうち約1%、すなわち200種類を超えるメチル化酵素遺伝子が存在することが示唆されている [MCP 10, M110 000976 (2011)]。メチル化酵素が関わる生命現象は多岐に渡り、とりわけヒストンの Lys/Arg メチル化や DNA のメチル化修飾はエピジェネティクスに中心的な役割を持っている。さらに最近では、非ヒストンタンパク質においても Lys 残基や Arg 残基に起こるメチル化修飾が様々な生理的意義を持つことが徐々に明らかになってきた。その一方で半数以上のメチル化酵素遺伝子の機能は未解明のままであり、メチル化が関わる生命現象の全容はまだ謎に包まれている。申請者はケミカルプローブを利用したタンパク質メチル化修飾の検出系を確立し、メチル化酵素が果たす新しい機能を明らかにしてきた (Fig. 1)。その過程で、タンパク質 His 残基を π メチル化する酵素、METTL9 を発見した。タンパク質の His 残基に起こるメチル化修飾は、

酵母のリボソーム [J Biol Chem. 285: 37598 - 37606 (2010)]、哺乳類のアクチンタンパク質 [Nature. 565: 372 (2019)] に関する報告があるが、それ以外の His メチル化修飾の大部分は謎に包まれたままである。加えて、リボソームやアクチンの His メチル化修飾はいずれも τ メチル化であり、研究開始当初は π メチル His 修飾を司るメチル化酵素、およびその生理学的な役割については、報告が無かった。申請者はタンパク質の His 残基を π メチル化する酵素として世界で初めて METTL9 を同定し

[Nat Commun, 12(1): 891 (2021)]、METTL9 によって引き起こされるタンパク質 His 残基の π メチル化が制御する生命現象の解明を進めていた (Fig. 2)。

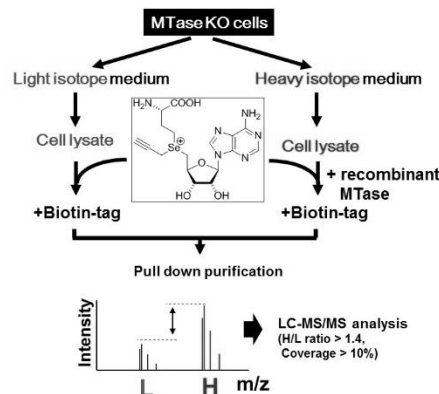


Fig. 1 ケミカルプローブを用いたメチル化基質探索系の概略図

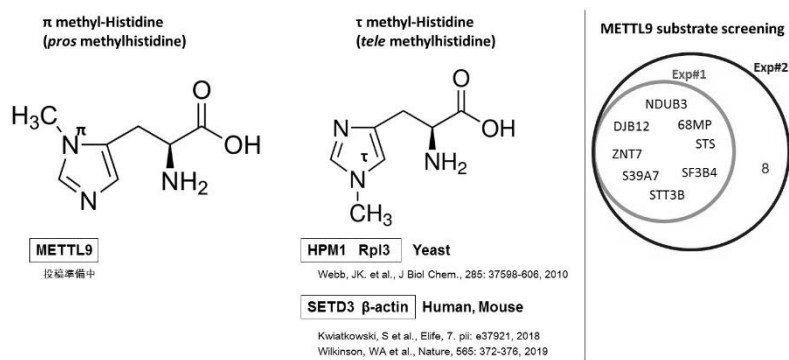


Fig. 2 左) π メチル化と τ メチル化。右) METTL9 の基質同定

2. 研究の目的

申請者はこれまでの実験で、ヒト培養細胞において METTL9、および SETD3 をノックアウト (KO) した場合に、それぞれ細胞内タンパク質中の π メチル His 含量および τ His 含量が顕著に減少することを見出していた。しかしながら、各 KO 細胞中でも 40%程度の π メチル His (in METTK9 KO)、10%程度の τ メチル His (in SETD3 KO) が残存していたことから、未知のタンパク質 His メチル化酵素が存在することが強く示唆された。そこで本研究では、『SETD3, METTL9 以外のタンパク質 His メチル化酵素は何であるか？またその生命機能は何か？』を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

メチル化酵素の新規基質探索を行うにあたって、申請者が確立した独自の探索系を利用した (Fig. 1)。また、ゲノム編集技術を用いて His メチル化酵素候補遺伝子のノックアウト細胞

(METTL9, SETD3, METTL18, CARNMT1 の KO 細胞やダブルノックアウト(DKO)細胞) やノックアウトマウス(METTL9 KO, METTL18 KO, CARNMT1 KO)を作製した。そのほか質量分析による基質タンパク質のメチル化部位の同定や、メチル His のアミノ酸定量分析を実施した。

4. 研究成果

酵母のHPM1のホモログである*METTL18* KO細胞においてMETTL18の標的基質探索を試みた結果、リボソームタンパク質であるRPL3が基質となることを発見した。また、そのメチル化部位(His245)は酵母において報告されていたメチル化部位(His243)と同様であった。KO細胞中ではRPL3のHisメチル化が完全に消失し、KO細胞にMETTL18を再発現することでメチル化が回復したことから、RPL3のメチル化にはMETTL18が決定的に重要であることが示唆された。RPL3メチル化およびMETTL18がリボソームの翻訳機能に与える影響について、理研・岩崎RNAシステム生化学研究室との共同研究により解析したところ、*METTL18* KO細胞ではTyrコドンの伸長が早く進み、タンパク質翻訳異常が起りやすいことを見出した(Matsuura-Suzuki,Shimazu et al. eLife 2022;11:e72780.)。

また、CARNMT1(別名 UPF0586)については、タンパク質基質探索の結果、CARNMT1によってHisメチル化を受ける複数の基質タンパク質を同定することが出来た。さらに同酵素は、CxxxHモチーフを持つC3H型ジンクフィンガータンパク質のHis残基を主にメチル化する活性を持つことがわかった。特にmRNAのスプライシング因子であるU2AF1はHis37がCARNMT1によるメチル化修飾を受けており、HEK293T細胞において内在性U2AF1のH37のメチル化率はほぼ100%であることが明らかとなった。さらに、U2AF1のメチル化がmRNAのスプライシングを制御しているかを明らかにするため、*CARNMT1* KO細胞でRNA-seq解析を行った。その結果、*CARNMT1* KO細胞ではカセットエクソン(CE)のパターンが変化していることが分かった。さらに、U2AF1のHisメチル化の有無によって3'splice site(3'SS)の認識が変化すること、3'ssの塩基を置換することによりメチル化の影響を受けなくなることが分かり、CARNMT1によるスプライシング調節には3'ssの塩基配列が重要であることを突き止めた。さらに、マウス13.5日胚の脳および肝臓からRNAを抽出し、RNA-seq解析したところ、KOマウス胚では、培養細胞同様にCEの変化が観察された。現在、上記の結果をまとめて論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Sohtome Yoshihiro, Shimazu Tadahiro, Shinkai Yoichi, Sodeoka Mikiko | 4. 巻 54 |
| 2. 論文標題 Propargylic <i>Se</i> -adenosyl- <i>I</i> -selenomethionine: A Chemical Tool for Methylome Analysis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research | 6. 最初と最後の頁 3818 ~ 3827 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.accounts.1c00395 | 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 Matsuura-Suzuki Eriko, Shimazu Tadahiro, Takahashi Mari, Kotoshiba Kaoru, Suzuki Takehiro, Kashiwagi Kazuhiro, Sohtome Yoshihiro, Akakabe Mai, Sodeoka Mikiko, Dohmae Naoshi, Ito Takuhiro, Shinkai Yoichi, Iwasaki Shintaro | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 METTL18-mediated histidine methylation of RPL3 modulates translation elongation for proteostasis maintenance | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 1-33 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.72780 | 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 - |

〔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 島津 忠広、鈴木 健裕、赤壁 麻衣、五月女 宜裕、袖岡 幹子、堂前 直、眞貝 洋一 |
| 2. 発表標題 タンパク質ヒスチジン -メチル化酵素METTL9の機能解析 |
| 3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|