

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07321

研究課題名（和文）細胞内S-アデノシルメチオニン量変動適応機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of intracellular S-adenosylmethionine adaptation mechanism

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：S-アデノシルメチオニン（SAM）は、DNA、RNA、タンパク質などのメチル化反応の際にメチル基供与体となる代謝物であり、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ（MAT）によってメチオニンとATPから合成される。SAM恒常性は細胞の生存にとって重要な問題であり、MATによるSAM産生は時間的・空間的に制御されている。その制御の異常がどのような影響を細胞に与えるか、またそれを避けるために細胞がMATを制御するメカニズムを明らかにする手がかりを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細胞外環境の変化への応答、あるいは細胞分化において細胞内メチル化が介するエピゲノム調節のためにMATを制御することが重要であることが示唆される。さらに、なぜSAM産生が制御されなければならないかという点が明らかにすることにより、SAMあるいはメチル化が関与するがん細胞のバイオロジーの解明、治療薬の開発にも貢献できる。

研究成果の概要（英文）：S-adenosylmethionine is an essential metabolite as the primary methyl group donor in methylation reactions of DNA, RNA and proteins and is synthesized by the enzyme called methionine adenosyl transferase (MAT). SAM homeostasis is an issue of importance for living cells, and therefore, production of SAM is spatiotemporally controlled. We obtained cues to uncover what is caused by extraordinary intracellular SAM level and the mechanism how cells control MAT to achieve appropriate SAM production.

研究分野：分子生物学

キーワード：S-adenosylmethionine

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

S-アデノシルメチオニン(SAM)は、細胞内においてメチル基転移酵素が触媒するメチル化反応の際にメチル基供与体として利用される代謝物である。DNA、RNA やヒストンタンパク質などのメチル化は、遺伝子発現制御の軸となるものであることから、細胞内 SAM 濃度、すなわち細胞内 SAM の availability は遺伝子発現制御において重要な因子となりうる。したがって細胞内 SAM 産生は厳密に制御される必要があると考えられる。SAM を細胞外から過剰投与すると細胞増殖を阻害することから、過剰な SAM 産生もまた細胞にとって有害であることが示唆される(Shima et al. 2017)。SAM は、メチオニニアデノシルトランスフェラーゼ(MAT)によってメチオニンと ATP から合成される。哺乳類のユビキタスアイソザイムである MAT2 の触媒サブユニットである MAT2A の mRNA では、細胞内 SAM 量に応じた 3' 非翻訳領域のアデノシンのメチル化を介して mRNA 安定性が変化する。これによって MAT2A 発現がフィードバック制御されることで、細胞内 SAM 量の恒常性が維持されると考えられている(Shima et al. 2017, Pendleton et al., 2017)。また、ヒトやマウスの細胞株では MAT2A は核内に多く分布し、転写因子やヒストンメチル基転移酵素と相互作用していることが分かっている(Katoh et al., 2011)。これらのことから、MAT の SAM 産生は時間的・空間的な調節を受けると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに我々が得た知見から、細胞内 SAM 産生は時間的・空間的に制御される必要があると考えられるが、その生理学的意義、すなわち、その制御が破綻したときに何が起こるかについては不明な点が多い。そこで申請者は、いくつかの方法で SAM 産生の制御を破綻させたときの細胞への影響を明らかにすることを目的とした。特に遺伝子発現制御への影響を明らかにし、さらに、不適切な SAM 産生状況に細胞がどのように適応するかを明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

哺乳類 MAT2 は2分子の触媒サブユニット MAT2A と1分子の調節サブユニット MAT2B で構成される。MAT2B の役割はいまだ明らかになっていないものの、我々のグループでは MAT2B が MAT2 の核内局在を制御することを示唆するデータを得ている。これを利用して SAM 産生制御が機能しない状況を作り出す方法として以下の三つを選択し、遺伝子発現制御に及ぼす影響について検討しようとした。

(1) MAT2B との相互作用を欠く MAT2A 変異を分離する。

PCR による random mutagenesis によって、MAT2A 変異ライブラリーを作製する。

2-ハイブリッド法によって、MAT2B との相互作用を欠く MA2A 変異を分離する。

(2) MAT2B オルソログを有しない他生物種の MAT オルソログを哺乳類細胞中で発現させる。

(3) MAT2B ノックアウト細胞を樹立する。

4. 研究成果

(1) マウス MAT2A の cDNA を鋳型として、error-prone PCR によってコーディング領域全長にランダム変異を導入した MAT2A cDNA ライブラリーを得た。これを酵母 2-ハイブリッド法の GAL4DNA 結合ドメイン(GAL4BD)融合タンパク質発現ベクターに挿入し、MAT2A 変異ベクターのライブラリーを作製した。MAT2 の活性には2分子の MAT2A がホモダイマーを形成することが必要と考えられているため、最初にホモダイマー形成に欠損を示さない MAT2A 変異の選択を行った。レポーター酵母には AH109 株を利用し、変異 MAT2A ライブラリーとともに GAL4-転写活性化ドメイン(GAL4AD)融合

MAT2A 発現ベクターとともに用いて形質転換を行った。GAL4BD-MAT2A と GAL4AD-MAT2A の相互作用によりアデニン非要求性を示すコロニーをまとめてプラスミドを回収し、二次ライブラリーとした。二次ライブラリーを GAL4AD-MAT2B 発現ベクターとともに用いてレポーター酵母を形質転換し、アデニン含有培地上で生育させた。GAL4BD-MAT2A と GAL4AD-MAT2B との相互作用を欠くためにアデニン要求性である酵母を、アデニン含有培地上の赤いコロニーとして判別して選択し、candidate MAT2A 変異プラスミドを回収した。このようにして数十個の candidate プラスミドを得たものの、再度のチェックの結果、得られた candidate 変異 MAT2A は MAT2A との相互作用と、MAT2B との相互作用の両方に欠損を示しており、何らかの理由で一次スクリーニングを通過したものであったと思われる。一次スクリーニングで得られたコロニー数は、変異発生率を考慮しても十分な数に達していたことから、このスクリーニングでは目的の変異は得られなかったと考えられた。MAT2A オルソログは生物種間できわめてよく保存されており、その酵素活性が変異によって影響を受けやすいため、MAT2B との相互作用のみに欠損を持つ変異を得るのは難しいのかもしれない。

(2) MAT2B オルソログを有しない生物種の MAT2A オルソログとして、分裂酵母 SAM1 と線虫 SAMS を選び、レトロウイルス感染によってこれらのオルソログを安定発現する HeLa 細胞を作製した。SAM1 や SAMS は HeLa 細胞の内在性 MAT2A との相互作用が低下していることを、免疫沈降法により確認した。MAT2A と異なり、これらのオルソログは HeLa 細胞内において核内に局在していないことが、免疫蛍光顕微鏡法によって分かった。これらのことから、オルソログ発現細胞では通常細胞における SAM 産生調節が失われていることが期待された。オルソログ発現細胞には巨大な核を持ち、SA- - ガラクトシダーゼを多く発現する、いわゆる polyploid giant cancer cells に類似した細胞が多く見られたこと、また通常の大きさの細胞でも M 期における細胞質分裂の異常が頻繁にみられたことから、MAT2A オルソログ発現が細胞ストレスとなっていることが示唆された。

(3) ヒト線維芽細胞株 GM0637 を用いて、MAT2B ノックアウト細胞を作製した。MAT2B 遺伝子中の N 末端付近コーディング配列に対する gRNA と LentiCRISPR v2 システムを利用した。ゲノム DNA のシーケンシングによって MAT2B 遺伝子の両コピーともにフレームシフトを生じたことにより完全長のタンパク質が発現しないクローンを得た。このクローンをもとに、FLAG-HA タグ付きのマウス MAT2B を安定発現する細胞を、レトロウイルス感染により作成した。このときのレトロウイルス作製には、野生型 MAT2B レトロウイルスベクターとともに、MAT2A との相互作用に重要と考えられている C 末端領域を欠く欠失変異を発現するベクターも用いた。得られた reconstruction 細胞を用いて抗 FLAG 免疫沈降を行い内在性 MAT2A との相互作用を調べたところ、野生型 FLAG-HA-MAT2B は内在性 MAT2A との相互作用が確認されたのに対し、C 末端欠失 MAT2B は MAT2A との相互作用を失っていた。MAT2A の細胞内局在を免疫蛍光顕微鏡法により調べると、野生型 MAT2B 発現細胞では内在性 MAT2A が核内に多く分布しているのに対し、C 末端欠失 MAT2B 発現細胞ではノックアウト細胞と同様に、MAT2A が核と細胞質の両方に分布しており、MAT2B は MAT2A の核内移行に重要であることが分かった(図1)とともに、MAT2B ノックアウト細胞および C 末端欠失 MAT2B 発現細胞では、SAM 産生調節が正常に行われていない状況にあると期待

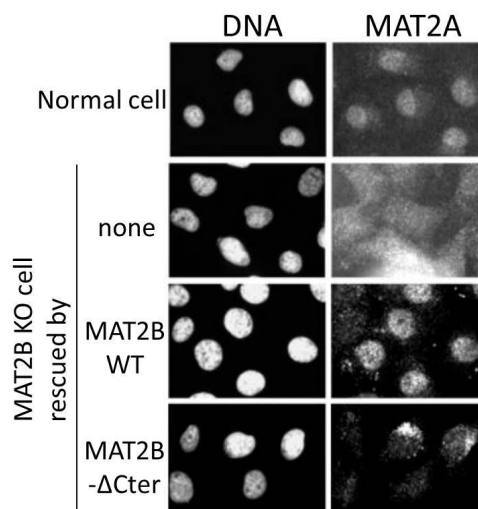


図1 MAT2Bノックアウト細胞の抗MAT2A免疫蛍光顕微鏡

できた。SAM 産生調節の破綻の影響を明らかにするために、これらの細胞を用いて RNA シーケンシングを実施して、遺伝子発現の差異からこれを推測した。

<引用文献>

Shima et al., S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N⁶-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep.* 2017 Dec 19;21(12):3354-3363.

Pendleton et al., The U6 snRNA m6A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell.* 2017 May 18;169(5):824-835.

Katoh et al., Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncogene. *Mol Cell.* 2011 Mar 4;41(5):554-66.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ikeda Masatoshi, Kato Hiroki, Shima Hiroki, Matsumoto Mitsuyo, Furukawa Eijiro, Yan Yan, Liao Ruiqi, Xu Jian, Muto Akihiko, Fujiwara Tohru, Harigae Hideo, Bresnick Emery H., Igarashi Kazuhiko	4. 巻 118
2. 論文標題 Heme-dependent induction of mitophagy program during differentiation of murine erythroid cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2022.11.007	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 該当する
1. 著者名 Suzuki Chie, Fujiwara Tohru, Shima Hiroki, Ono Koya, Saito Kei, Kato Hiroki, Onodera Koichi, Ichikawa Satoshi, Fukuhara Noriko, Onishi Yasushi, Yokoyama Hisayuki, Nakamura Yukio, Igarashi Kazuhiko, Harigae Hideo	4. 巻 42
2. 論文標題 Elucidation of the Role of FAM210B in Mitochondrial Metabolism and Erythropoiesis	5. 発行年 2022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.00143-22	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 Sawata Mizuki, Shima Hiroki, Murayama Kazutaka, Matsui Toshitaka, Igarashi Kazuhiko, Funabashi Kazumasa, Ite Kenji, Kizawa Kenji, Takahara Hidenari, Unno Masaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Autocitrullination and Changes in the Activity of Peptidylarginine Deiminase 3 Induced by High Ca ²⁺ Concentrations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 28378 ~ 28387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c02972	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 Alam Mahabub, Shima Hiroki, Matsuo Yoshitaka, Long Nguyen Chi, Matsumoto Mitsuyo, Ishii Yusho, Sato Nichika, Sugiyama Takato, Nobuta Risa, Hashimoto Satoshi, Liu Liang, Kaneko Mika K., Kato Yukinari, Inada Toshifumi, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 298
2. 論文標題 mTORC1-independent translation control in mammalian cells by methionine adenosyltransferase 2A and S-adenosylmethionine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102084 ~ 102084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102084	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 Kouketsu Takumi, Monma Rina, Miyairi Yuri, Sawatsubashi Shun, Shima Hiroki, Igarashi Kazuhiko, Sugawara Akira, Yokoyama Atsushi	4. 巻 615
2. 論文標題 IRF2BP2 is a novel HNF4 co-repressor: Its role in gluconeogenic gene regulation via biochemically labile interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 81 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.133	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 Zhou Baifeng, Shima Hiroki, Igarashi Kazuhiko, Tanaka Kan, Imamura Sousuke	4. 巻 13
2. 論文標題 CmNDB1 and a Specific Domain of CmMYB1 Negatively Regulate CmMYB1-Dependent Transcription of Nitrate Assimilation Genes Under Nitrogen-Repleted Condition in a Unicellular Red Alga	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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) 10.3389/fpls.2022.821947	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 Yokoyama Atsushi, Kouketsu Takumi, Otsubo Yuri, Noro Erika, Sawatsubashi Shun, Shima Hiroki, Satoh Ikuro, Kawamura Sadafumi, Suzuki Takashi, Igarashi Kazuhiko, Sugawara Akira	4. 巻 5
2. 論文標題 Identification and Functional Characterization of a Novel Androgen Receptor Coregulator, EAP1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	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) 10.1210/jendso/bvab150	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, Shima Hiroki, Ikura Tsuyoshi, Franke Marissa C., Sievert Evelyn P., Sciammas Roger, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for in vitro BCR-mediated plasma cell differentiation and purification of chromatin-associated proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100633 ~ 100633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100633	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 島 弘季・五十嵐 和彦	4. 巻 12月号
2. 論文標題 SAM恒常性とRNAのメチル化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	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 Mitachi Katsutaka, Ariake Kyohei, Shima Hiroki, Sato Satoko, Miura Takayuki, Maeda Shimpei, Ishida Masaharu, Mizuma Masamichi, Ohtsuka Hideo, Kamei Takashi, Igarashi Kazuhiko, Unno Michiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel candidate factors predicting the effect of S-1 adjuvant chemotherapy of pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-86099-0	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 Ito Ryo, Shima Hiroki, Masuda Koji, Sato Ikuko, Shimada Hiroki, Yokoyama Atsushi, Shirahige Katsuhiko, Igarashi Kazuhiko, Sugawara Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparative proteomic analysis to identify the novel target gene of angiotensin II in adrenocortical H295R cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	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) 10.1507/endocrj.EJ20-0144	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 Ochiai Kyoko, Yamaoka Mari, Swaminathan Amrutha, Shima Hiroki, Hiura Hitoshi, Matsumoto Mitsuyo, Kurotaki Daisuke, Nakabayashi Jun, Funayama Ryo, Nakayama Keiko, Arima Takahiro, Ikawa Tomokatsu, Tamura Tomohiko, Sciammas Roger, Bouvet Philippe, Kundu Tapas K., Igarashi Kazuhiko	4. 巻 33
2. 論文標題 Chromatin Protein PC4 Orchestrates B Cell Differentiation by Collaborating with IKAROS and IRF4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108517 ~ 108517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108517	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 Kagawa Y, Umaru BA, Shima H, Ito R, Zama R, Islam A, Kanno SI, Yasui A, Sato S, Jozaki K, Shil SK, Miyazaki H, Kobayashi S, Yamamoto Y, Kogo H, Shimamoto-Mitsuyama C, Sugawara A, Sugino N, Kanamori M, Tominaga T, Yoshikawa T, Fukunaga K, Igarashi K, Owada Y.	4. 巻 57
2. 論文標題 FABP7 Regulates Acetyl-CoA Metabolism Through the Interaction with ACLY in the Nucleus of Astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4891 ~ 4910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-020-02057-3	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 Suzuki Yukie, Takadate Tatsuyuki, Mizuma Masamichi, Shima Hiroki, Suzuki Takashi, Tachibana Tomoyoshi, Shimura Mitsuhiro, Hata Tatsuo, Iseki Masahiro, Kawaguchi Kei, Aoki Takeshi, Hayashi Hiroki, Morikawa Takanori, Nakagawa Kei, Motoi Fuyuhiko, Naitoh Takeshi, Igarashi Kazuhiko, Unno Michiaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Stromal expression of hemopexin is associated with lymph-node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0235904	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 穂積葵、島弘季、斎藤維友、加藤恭丈、五十嵐和彦
2. 発表標題 MAT11複合体形成に欠損を示すMAT2A変異の酵母two-hybrid法によるスクリーニング
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島弘季、穂積葵、Jelle Bonthuis、引地 隼人、五十嵐和彦
2. 発表標題 MAT2A mRNA安定性制御に関わるタンパク質の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------