

平成30年 5月31日現在

機関番号：82401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2017
課題番号：16K18476
研究課題名(和文) METTL9によるIDH2ヒスチジンメチル化修飾の意義

研究課題名(英文) Role of Histidine methylation by METTL9

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・眞貝細胞記憶研究室・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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、これまでの研究からMETTL9がヒスチジン残基をメチル化する酵素であることを見出したので、METTL9によるヒスチジンメチル化の生理的役割や分子機構を明らかにすることを目指した。アミノ酸成分分析による解析から、IDH2のヒスチジンメチル化が3-メチルヒスチジンであることが判明した。Mettl9 KOマウスにおいても胎生致死、低体重、行動異常など顕著な表現型は観察されなかった。また、代謝や2-HG産生についても顕著な差異は認められなかった。メチル化の生理的な意義については培養細胞レベル、マウス個体レベルで現在も引き続き解明を進めているところである。

研究成果の概要(英文)：METTL9 is a mitochondrial methyltransferase whose biological functions remain to be uncovered. The applicant has found that METTL9 methylates a specific histidine residue. METTL9 KO mice were generated with CRISPR-Cas9, and their phenotypes including metabolic change was studied. Metabolic change in METTL9 knockdown cells were observed as well.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：タンパク質翻訳後修飾 メチル化

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析により、ヒトゲノム上には全遺伝子の約 1%を占める、200 種類以上のメチル化酵素 (MTase) 遺伝子が存在することが示唆されている (MCP 10, M110 000976 (2011))。このうち、SET ドメインファミリーに属する (SET 型) MTase は主にヒストンのリシンメチル化修飾に関わることが、ここ 15 年程の間に解明されてきた。ヒストンリシンメチル化は遺伝子発現調節、DNA 修復、複製、クロマチン凝集などに重要であり、今日においてもヒストンリシンメチル化を介したクロマチン構造機能制御に関する研究は盛んに行われている。一方で、近年ではヒストンメチル化に加えて、非ヒストンタンパク質を対象としたタンパク質メチル化修飾の解析も行われるようになってきた。しかしながら、SET 型 MTase のヒストン以外の基質や、多くの SET ドメインを持たない (nonSET 型) MTase の基質、メチル化修飾を受けるタンパク質の全体像、或いはメチル化の生理的機能等に関しては究明の途上であり、まだ不明な点も多い。これまでタンパク質メチル化の研究においては、メチル化リシン特異的な抗体を利用した解析が主流で、メチル化修飾研究の成否は抗体の性質に大きく依存してきた。申請者は、タンパク質のメチル化を解析するに当たり、抗体に依存しない新しいメチル化修飾解析法を確立するため、ここ数年間に渡って研究を行ってきた。その結果、タンパク質メチル化酵素が SAM を基質 (コファクター) として利用することに着目して、SAM アナログ (ProSeAM) を指標としたメチル化タンパク質検出・同定系を構築することに成功した (PLoS One, 2014. 9(8): p. e105394)。現在、申請者はこの SAM アナログを指標とする探索系を用いて、複数の機能未知の MTase の解析を進めているところである。200 種におよぶヒト MTase 候補分子のうち、コンピュ

ータープログラムによる局在予測等によって 30 種類以上がミトコンドリアに局在することが予測された。ミトコンドリアにおける翻訳後修飾はアセチル化を始めとしたアシル化修飾やリン酸化修飾については最近盛んに研究されているが、メチル化修飾の分子機構や生理的意義に関してはほとんど未解明のままである。本研究では、機能未知のミトコンドリア局在 MTase のうち、METTL9 に注目した研究を提案する。METTL9 は N 末端にシグナル配列 (MTS) を持ち、C 末側に 7-beta-strand 型の MTase 領域 (Methyltransf_31) を持つタンパク質である。FLAG タグを付加した野生型 METTL9(WT) はミトコンドリアに局在した。

一方、N 末端の MTS を欠失した変異体 (Δ MTS) はミトコンドリアへの局在が失われたことから、METTL9 の MTS シグナル配列依存的に局在していることがわかった。次に METTL9 のミトコンドリア内基質を明らかにするため、ProSeAM を用いた探索系によるスクリーニングを行った。その結果、IDH2 を含む数種類のタンパク質が同定され、さらに 14C-SAM を用いた *in vitro* 実験により、IDH2 が METTL9 によるメチル化修飾を受けることが確かめられた。その後、タンデム MS 解析によって修飾部位を同定したところ、His175 のメチル化が METTL9 存在下で顕著に亢進することが判明した (図 3B, 173-HAHGDQYK-180)。さらに H175 を Y に置換した変異体 (H175Y) は METTL9 によるメチル化を受けなくなったことから、H175 が METTL9 によるメチル化修飾部位であることが確かめられた。

2. 研究の目的

本研究では、IDH2 のヒスチジンメチル化修飾の役割を解明することを目指す。ヒスチジンのメチル化には 1-メチルヒスチジンと 3-メチルヒスチジンの 2 種類があるので、アミ

ノ酸成分分析によってどちらが増加しているのか明らかにしたい。メチル化の型が判明した後は特異的な抗体を作製し、培養細胞あるいはマウス個体での IDH2 のメチル化を検出可能にする。これと平行して、METTL9 ノックアウトマウスの作製を行い、個体での METTL9, IDH2 メチル化の生理的意義を調べたい。IDH2 は TCA 回路におけるイソクエン酸をケトグルタル酸(α -KG)に変換する代謝酵素であるとともに、癌化に重要なタンパク質であり、IDH2 の変異は癌代謝産物 2-hydroxyglutarate (2-HG)を産生することが知られている(Front Oncol. 2013; 3: 169.)。そこで、IDH2 のメチル化によって 2-HG 産生が生じるのかを検証したい。特に、IDH2 の R172 変異によって 2-HG 産生が亢進することが報告されていることから、その近傍アミノ酸である H175 のメチル化は 2-HG 生産に影響を与える可能性が大いに期待される。その場合、2-HG は DNA 脱メチル化酵素(Tet)やヒストン脱メチル化酵素 (JHDM) 等の α -ケトグルタル酸依存性 dioxygenases を阻害することから (Neuro-Oncology 15(9):1114–1126, 2013)、DNA やヒストン修飾などのエピゲノムに変化があるのかについても研究していきたい。

3. 研究の方法

IDH2 におけるヒスチジンメチル化の型を明らかにし、修飾特異的な抗体を作製することで培養細胞あるいは動物 (マウス) 個体での IDH2 ヒスチジンメチル化を比較する。特に、癌細胞やマウス組織特異的なメチル化が見られるのか検討する。また、IDH2 タンパク質の *in vitro* 活性試験を行うことでメチル化が酵素活性(α -KG 産生、2-HG 産生)に影響するのか検討する。さらに、ゲノム編集技術を用いて KO マウスを作製し、薬剤による癌化実験、および KO マウスにおけるエピゲノム変化の有無について研究を進めていく。

4. 研究成果

(1) メチル化の分子機構: IDH2 メチル化は 3-メチルヒスチジンである
ヒスチジンのメチル化には 1-メチルヒスチジンと 3-メチルヒスチジンの 2 種類がある。アミノ酸成分分析による解析から、IDH2 のヒスチジンメチル化が 3-メチルヒスチジンであることが判明した。

(2) 抗 IDH2 メチル化抗体の作製

メチル化の型が判明した後、修飾特異的な抗体を作製した。同抗体の作製はモノクローナル抗体研究所の協力で進めた。作製したモノクローナル抗体は、*in vitro*での IDH2 メチル化をウエスタンブロットで感度よく検出することが出来た一方で、培養細胞における IDH2 のメチル化レベルを検出した場合、バックグラウンドが高く、免疫沈降による精製などが必要であると考えられる。今後、内在性の IDH2 メチル化を検出する場合、抗体の使用条件などについてより詳細な検討が必要である。

(3) 抗 METTL9 抗体の作製

内在性 METTL9 を認識する抗体が必要になるが、試した限りでは市販の良い抗体が無かったため、METTL9 に対する抗体を作製した。バキュロウイルス系で発現精製した His-METTL9 タンパク質を抗原としてウサギへの免疫後、採血を行い全血清を取得後、His-METTL9 を結合させた抗原カラムに供することで、METTL9 に特異的な抗体を取得した。しかしながら、本抗体は過剰発現した METTL9 を検出可能である一方で、内在性の METTL9 の検出は出来なかった。今後のさらなる検討が必要である。

(4) Mett19 ノックアウトマウスの作製と表現型解析

CRISPR-Cas9 のゲノム編集技術を用いて、

Mettl19 ノックアウト (KO) マウスを作製した。ホモの KO マウスにおいても胎生致死、低体重、行動異常など顕著な表現型は観察されなかった。

(5) 培養細胞におけるヒスチジンメチル化の生理的意義

培養細胞に FLAG タグを融合した IDH2 を安定発現させた細胞株や shRNA により METTL9 をノックダウンした細胞株を樹立し、代謝変化、特に 2-HG 産生に変化があるかを調べたが顕著な差異は認められなかった。さらに KO マウス血清中に含まれる代謝物を解析したが、2-HG の産生や α -KG, イソクエン酸の顕著な違いは見られなかった。

本研究を通じて METTL9 がヒスチジンを 3-メチル化する酵素であること、その基質が IDH2 であることが明らかとなったが、生理的な意義については培養細胞レベル、マウス個体レベルで現在も引き続き解明を進めているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 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・眞貝細胞
記憶研究室・専任研究員
研究者番号: 10618771

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし