

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02947

研究課題名（和文）ヒスチジンメチル化酵素METTL9の活性制御機構と生物学的意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism and biological significance of histidine methyltransferase METTL9

研究代表者

大徳 浩照（Daitoku, Hiroaki）

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・講師

研究者番号：30361314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の機能は多様な翻訳後修飾によって巧みに制御されているが、ヒスチジン残基のメチル化については不明な点が多かった。本研究では、研究代表者らが新たに発見したヒスチジンメチル化酵素METTL9について、その分子機能の制御メカニズムや生体における役割の解析を進めた。その結果、意外なことにMETTL9自身がアスパラギン結合型の糖鎖修飾を受けること、さらに細胞外に分泌されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、これまで細胞内の現象と考えられてきたタンパク質のメチル化修飾が、血液中などの細胞外においても起こりうることが世界で初めて示された。血液中には多種多様なタンパク質が存在し、血圧や血糖値の調節、免疫応答などの重要な働きをしている。したがって、それらがMETTL9によるヒスチジンメチル化を受けて機能調節されることが明らかになれば、内分泌学や免疫学の分野に新たな学術的視点を提示するとともに、新たな創薬ターゲットになり得ると期待される。

研究成果の概要（英文）：Protein functions are regulated by a variety of post-translational modification; however, histidine methylation remains largely unclear. In this study, we investigated the regulatory mechanism of molecular function and physiological role of METTL9 that we have newly identified as histidine methyltransferase. Unexpectedly, we found that METTL9 is a target of N-linked glycosylation and thereby secreted to extracellular space.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質メチル化 ヒスチジンメチル化 METTL9 翻訳後修飾

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命現象の根幹をなすタンパク質は、翻訳後に多様な化学修飾を受けることで、分子機能が巧妙に制御されている。このうちメチル化は、メチル基 (-CH₃) がリジン残基やアルギニン残基に付加される反応であり、その基質はヒストンやシグナル伝達因子、代謝酵素など多岐にわたる。一方でヒスチジン (His) 残基もメチル化されることが知られており、イミダゾール基の τ 位のモノメチル化と π 位のモノメチル化の 2 通りが存在する。しかしながら、His 残基のメチル化を触媒する酵素が長年見つからなかったことから、His メチル化研究はリジンやアルギニンと比べて大きく遅れた。そのような中、2010 年に出芽酵母において、リボソームタンパク質の 1 つである Rpl3 を His メチル化する酵素として Hpm1 が同定された。さらに 2019 年にマウスにおいて、それまでリジンメチル化酵素と考えられていた SETD3 がアクチンの His 残基をメチル化することが報告された。ただし Hpm1 と SETD3 はいずれも τ 型の His メチル化酵素であり、 π 型の His メチル化酵素は未だ発見されていない。

そのような背景の下、我々は最近、独自に開発したスクリーニング系を駆使して、His 残基の π 型メチル化を触媒する初めての酵素として METTL9 を同定した (図 1)。

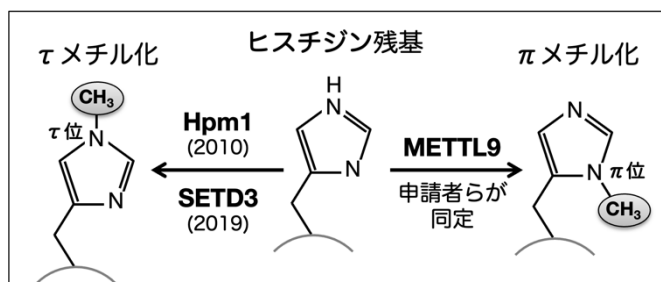


図 1. ヒスチジン残基のメチル化修飾と触媒酵素

2. 研究の目的

本研究では、METTL9 とその基質である炎症関連因子 S100A9 に着目し、生化学・細胞生物学的手法に加えて、線虫 (*C. elegans*) の分子遺伝学も組み合わせることで、 π His メチル化修飾の生物学的意義を多角的に解明する。具体的な本研究の目的は、下記の 3 項目である。

- (1) METTL9 の酵素活性を制御する分子メカニズムの解明
- (2) S100A9 の π His メチル化が分子機能に与える影響の解明
- (3) 線虫を用いた METTL9/METL-9 の生物学的意義の解明

3. 研究の方法

(1) METTL9 の酵素活性を制御する分子メカニズムの解明

- ① METTL9 自身のメチル化が酵素活性に与える影響を検証するため、まずメチル化部位を MALDI-TOF/MS で同定し、そこを Phe に置換した HF 変異体を作製する。次に METTL9 の WT 及び変異体を培養細胞で発現・精製し、S100A9 に対するメチル化活性を比較する。
- ② METTL9 をメチル化する新規の π His メチル化酵素を探索するため、METTL9 を過剰発現する HEK293T 細胞にメチル化酵素遺伝子の siRNA を導入し、免疫沈降後に酸加水分解、LC-MS/MS 分析する。モチーフからメチル化酵素活性が予測される機能未知の 40 遺伝子の siRNA を構築済みであり、これをメチル化酵素ライブラリーとする。
- ③ METTL9 の活性調節に関わる因子もしくは基質を網羅的に同定するために、METTL9 に結合するタンパク質を探索する。方法としては、タンパク質複合体精製や GST pull-down 法を採用し、BioGRID 等のタンパク質間結合データベースの活用も並行して行う。

(2) S100A9 の π His メチル化が分子機能に与える影響の解明

- ① 121 アミノ酸からなる S100A9 は、Ca²⁺結合ドメインと Zn²⁺結合ドメインをそれぞれ 2 つずつ持つ。S100A9 の π His メチル化が両イオンの結合能に与える影響を検証するため、まず大腸菌で発現・精製した未修飾の S100A9 とメチル化部位の HF 変異体を、METTL9 でメチル化し、S100A9 に結合した Ca²⁺と Zn²⁺の量をプラズマ発光分光分析装置で定量する。
- ② S100A9 は細胞内のカルシウムシグナル伝達に関与する一方で、同じファミリーに属する S100A8 (89 アミノ酸) とヘテロ二量体 (カルプロテクチンと呼ばれる) を形成して細胞外に分泌され、血中で様々な炎症応答に関与することが知られている。S100A9 の π His メチル化がヘテロ二量体形成に影響を与えるか検証するため、METTL9 でメチル化させた S100A9 と S100A8 との結合実験を行う。
- ③ 上述した S100A9 の細胞外分泌は、好中球やマクロファージなどの貪食細胞でみられる。S100A9 の π His メチル化が細胞外への分泌プロセスに影響を与えるか検証するため、HL-60 細胞株で METTL9 を siRNA ノックダウンした後に好中球へと分化させ、培地中に分泌されたカ

ルプロテクチン量を ELISA や WB で定量する。

(3) 線虫を用いた METTL9/METL-9 の生物学的意義の解明

- ① 線虫には METTL9 のオルソログとして METL-9 が存在するが、その機能は不明である。ナショナルバイオリソースより供与された *metl-9* 欠失変異体を用いて、線虫の細胞画分（核・細胞質・リボソーム・ミトコンドリア）を調製し、酸加水分解後の LC-MS/MS 分析により、METL-9 が細胞内のどの場所の π His メチル化に寄与しているか調べる。
- ② *metl-9* 欠失変異体の表現型として、産卵数、幼虫～成虫までの発生時間、運動能、寿命、各種ストレス耐性（高温、活性酸素、紫外線）、緑膿菌に対する自然免疫について野生型と比較検討する。
- ③ HEK293T 細胞に過剰発現させた線虫 METL-9 も π His メチル化されることから、質量分析法でこの His 残基を同定し、HF 点変異をもつ *metl-9* ノックイン線虫を CRISPR-Cas9 法で樹立する。その後 (b) の表現型解析を行う。

4. 研究成果

(1) METTL9 の酵素活性を制御する分子メカニズムの解明

METTL9 自身がメチル化される His 残基を 5 箇所同定し、全てを Phe に置換した 5HF 変異体を作製した。これを細胞で発現・精製し、S100A9 に対する *in vitro* メチル化実験を行ったが、野生型と比較してメチル化酵素活性に違いは見られなかった。

METTL9 を His メチル化する酵素について、モチーフからメチル化酵素活性が予測される機能未知の 40 遺伝子の siRNA を用いたスクリーニングを行ったが、結果として METTL9 His メチル化の責任酵素は発見できなかった。一方で、近位依存性ビオチン化標識法 (BioID) による METTL9 の結合タンパク質の探索については、複数の新規結合因子を同定しており、現在も解析を進めている。

また当初予期していなかった成果として、METTL9 のアスパラギン残基に糖鎖が付加されることを発見した (図 2)。この糖鎖修飾が METTL9 の分子機能に与える影響を調べた結果、METTL9 が糖鎖修飾依存的に細胞外に分泌されることも明らかになった (論文投稿準備中)。これまで細胞外に分泌されるメチル化酵素の報告はないことから、この治験の新規性は非常に高いと言える。今後さらに、METTL9 自身のメチル化と糖鎖修飾の相互関係の可能性についても検討する。

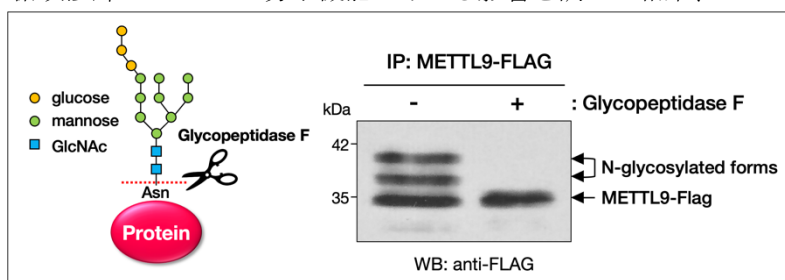


図2. METTL9のN型糖鎖修飾の発見

(2) S100A9 の π His メチル化が分子機能に与える影響の解明

マウス S100A9 の His メチル化部位を含む 16 アミノ酸について、非修飾ペプチドおよび π メチル His に置換した修飾ペプチドを化学合成した。これらに対する亜鉛イオンの結合活性を評価した結果、His メチル化によって亜鉛イオンの結合レベルが有意に低下することを見出した (図 3)。この結果から、METTL9 は S100A9 の His メチル化することによって、S100A9 の亜鉛イオンの輸送・保持活性を抑制しているか、あるいは亜鉛イオンの放出を促進している可能性が示唆された。

なお S100A9 と S100A8 とのヘテロ二量体 (カルプロテクチン) 形成に対しては、Co-IP や GST pull-down で調べた限り、His メチル化の影響は見られなかった。また培養細胞系における S100A9 の細胞外分泌についても、METTL9 のノックダウンによる変化は見られなかったことから、両者については His メチル化の影響を受けないと判断した。

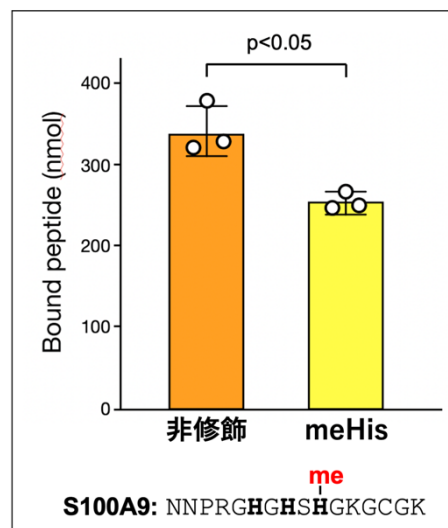


図3. S100A9のメチル化と亜鉛結合活性

(3) 線虫を用いた METTL9/METL-9 の生物学的意義の解明

METTL9 の線虫オルソログと考えられる METL-9 について、その欠失変異体である *metl-9* を同調培養し、全細胞抽出液を精製後にタンパク質を酸加水分解して LC-MS/MS 分析を行った。しかしながら予想に反し、*metl-9* 変異体の π His メチル化レベルは野生型と比較して変化していなかった。この結果は、METL-9 が *in vivo* において His メチル化活性を有していない可能性を示唆しているが、何らかのストレスや生育環境の変化、加齢などによってメチル化活性が顕在化することも考えられるため、引き続き解析を進めている。一方で最近、中国の研究グループにより、線虫 METL-9 が DNA のアデニンの 6 位のメチル化を触媒すること、この DNA メチル化活性が線虫の自然免疫に関与することが報告された (Cell Res. 33; 628-639, 2023)。

metl-9 欠失変異体の表現型については、産卵数、幼虫～成虫までの発生時間、運動能、寿命、各種ストレス耐性（高温、活性酸素、紫外線）を野生型と比較検討したが、有意な差は認められなかった。なお一般的に遺伝子欠失変異体では、代償による適応（近縁遺伝子の発現上昇など）のため表現型が現れない場合があるため、Feeding RNAi 法により時期特異的かつ一過性に *metl-9* をノックダウンしたが、顕著な表現型は観察できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Hayashi Takahiro, Daitoku Hiroaki, Uetake Toru, Kako Koichiro, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 299
2. 論文標題 Histidine N -methylation identified as a new posttranslational modification in histone H2A at His-82 and H3 at His-39	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105131 ~ 105131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.105131	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 Kasai Fumiya, Kako Koichiro, Maruhashi Syunsuke, Uetake Toru, Yao Yuan, Daitoku Hiroaki, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 174
2. 論文標題 -enolase (ENO2) is methylated at the <i>N</i> position of His-190 among enolase isozymes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 279 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad042	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 Daitoku H., Someya M., Kako K., Hayashi T., Tajima T., Haruki H., Sekiguchi N., Uetake T., Akimoto Y., and Fukamizu A.	4. 巻 297
2. 論文標題 siRNA screening identifies METTL9 as a histone N -methyltransferase that targets the proinflammatory protein S100A9	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 101230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101230	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 Fujimura A., Hayashi Y., Kato K., Kako K., Kogure Y., Kameyama M., Matsumoto M., Shimamoto H., Daitoku H., Fukamizu A., Hirota T. and Kimura K.	4. 巻 48
2. 論文標題 Identification of a novel nucleolar protein complex required for mitotic chromosome segregation through centromeric accumulation of Aurora B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nuc. Acids Res.	6. 最初と最後の頁 6583-6596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa449	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18件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroaki Daitoku
2. 発表標題 Protein histidine methylation: An old and new post-translational modification
3. 学会等名 8th Meeting of the Asian Forum for Chromosome and Chromatin Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笠井郁也、加香孝一郎、丸橋俊介、大徳浩照、深水昭吉
2. 発表標題 ヒスチジンN -メチル化修飾の新規基質 -enolaseの同定
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林岳宏、大徳浩照、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 質量分析による哺乳類ヒストンのヒスチジンメチル化修飾の同定
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田音緒、大徳浩照、関口直希、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 ヒスチジンメチル化酵素METTL9は糖鎖修飾を受けて細胞化に分泌される
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田音緒、大徳浩照、関口直希、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 ヒスチジンメチル化酵素METTL9における糖鎖修飾と細胞外分泌の役割
3. 学会等名 2023年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関口直希、大徳浩照、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 ヒスチジンメチル化酵素METTL9のN結合型糖鎖修飾とその役割の検討
3. 学会等名 2022年度 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 岳宏、大徳浩照、加香孝一郎、加藤 薫、丸橋春介、深水昭吉
2. 発表標題 LC-MS/MS を用いたアミノ酸解析によるヒストンヒスチジンメチル化修飾の検証
3. 学会等名 2022年度 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口直希、大徳浩照、池田音緒、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 ヒスチジンメチル化酵素METTL9のN結合型糖鎖修飾と細胞外分泌の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 岳宏、大徳浩照、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 ウシ胸腺ヒストンを用いたヒスチジンメチル化修飾部位の同定
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大徳浩照、染谷百香、加香孝一郎、関口直希、深水昭吉
2. 発表標題 METTL9はS100A9を基質とするヒスチジンN 型のヒスチジンメチル化酵素である
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 岳宏、大徳浩照、加香孝一郎、植竹 徹、深水昭吉
2. 発表標題 ヒストン球状ドメインにおけるメチル化修飾の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関口直希、大徳浩照、染谷百香、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 N ヒスチジンメチル化酵素METTL9の糖鎖修飾とその役割の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 染谷百香、大徳浩照、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 siRNAスクリーニングによる新規ヒスチジンメチル基転移酵素の探索
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春木陽香理、大徳浩照、田島達也、加香孝一郎、深水昭吉
2. 発表標題 線虫の新規ヒスチジンメチル化酵素METL-18の自己メチル化と生物学的意義の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大徳 浩照、田島 達也、春木 陽香理、染谷 百香、加香 孝一郎、深水 昭吉
2. 発表標題 Molecular function and biological significance of protein histidine methyltransferase METL-18 in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大徳 浩照、田島 達也、春木 陽香理、染谷 百香、加香 孝一郎、深水 昭吉
2. 発表標題 線虫における新規ヒスチジンメチル化酵素METL-18の機能解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷 百香, 大徳 浩照, 加香 孝一郎, 深水 昭吉
2. 発表標題 siRNAスクリーニングによる新規ヒスチジンメチル基転移酵素の探索
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 春木 陽香理, 大徳 浩照, 田島 達也, 加香 孝一郎, 深水 昭吉
2. 発表標題 線虫の新規ヒスチジンメチル化酵素METL-18の自己メチル化と生物学的意義の解析
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 大徳 浩照, 深水 昭吉	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 235
3. 書名 栄養・代謝物シグナルと食品機能	

1. 著者名 加香孝一郎, 大徳浩照, 深水昭吉	4. 発行年 2021年
2. 出版社 講談社サイエンティフィク	5. 総ページ数 305
3. 書名 エッセンシャル栄養化学	

〔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
---------	---------