

## 22. 細胞内メチル化恒常性の維持機構とその異常

五十嵐 和彦

東北大学 大学院医学系研究科 医科学専攻 生物化学分野

Key words : エピジェネティクス, RNA, メチル化, 代謝

### 緒言

エピゲノム制御の根幹を成す DNA やヒストンのメチル化は、メチオニン回路で合成される S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体とする。メチル化反応では SAM からメチル基がヒストンなど基質分子に転移されるとともに、残渣骨格は S-アデノシルホモシステイン (SAH) となる。これまでの生化学研究から、SAM 量が DNA やヒストンのメチル化量を大きく左右することが明らかになっている。一方、我々は、HeLa 細胞等に対して SAM が強い毒性を示すことを見いだした。SAM 量が過剰になる、あるいは逆に枯渇するとエピゲノムの安定性を維持できなくなる可能性が大きい。したがって、細胞には SAM 量を厳密に調節するシステムが存在すると予想される。実際、細菌では SAM 結合 RNA によるフィードバック制御などが知られている。しかしながら、ヒトをはじめとする高等生物では、この問題はほとんど研究がなされていない。

SAM 合成は methionine adenosyltransferase (MAT) により触媒される。真核生物は全て複数の MAT アイソザイムを有する。哺乳類の場合、MAT I および MAT III は肝臓特異的であり、その他大部分の臓器では MAT II が働く。我々は、MAT II が細胞質のみならず、核にも分布し、エピゲノム制御に必要な SAM を核内で産生するという、SAM 地産地消モデルを提唱してきた<sup>1,2)</sup>。このシステムにより核内で必要な SAM を核内で合成することで、細胞はその SAM 含量を最小限に保つことができると考えられる。これは、上に述べた SAM の毒性を回避することにも貢献すると思われる。また、SAM 1 分子の合成には ATP 1 分子が消費されることからすると、エピゲノム制御のエネルギー経済性という観点からも重要であろう。しかし、この核局在の生理的意義も十分には理解されていない。

そこで本研究では、SAM 量が厳密に制御される仕組みを、SAM 合成酵素 mRNA の発現制御に焦点をあて解明する。また、SAM 合成酵素細胞内局在のエピジェネティクス制御における意義も追求する。

### 方法

#### 1. 細胞

以下の実験には、マウス形質細胞株 X63/0 は 10% ウシ胎児血清を含む IMDM 培地で培養した。ヒト子宮がん由来 HeLa 細胞は 10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地にて培養した。

#### 2. SAM 合成酵素の発現変動と RNA メチル化測定

SAM 合成酵素阻害剤サイクロロイシン (cLeu) を細胞培地に添加し (最終濃度 30 mM)、SAM 合成酵素の発現変動を調べた。SAM 量の変化は質量分析計を用いたメタボローム測定により確認した。mRNA レベルは定量的 PCR 法にて測定した。1  $\mu$ g の総 RNA を Omniscript キットにて逆転写し、cDNA を合成した。定量 PCR は SYBR Green 法を用いて実施した。その変動の原因が遺伝子転写にあるのか、転写後にあるのかをアクチノマイシン D を用いることで調べた。細胞培地に 30 mM cLeu を添加し、3 時間後に 5  $\mu$ g/ml となるようアクチノマイシン D を添加した。その直後、4 時間後、8 時間後に細胞を回収し、RNA を精製した。SAM 合成酵素 mRNA のメチル化については市販のメチル化アデニン (m6A) 抗体を用いて RNA 免疫沈降法を実施し、定量 PCR 法にて対照免疫沈降物と RNA 量を比較することでメチル化量を相対的に測定した。また SAM 合成酵素 mRNA の様々な領域に対して PCR プライマーを準備し、おおよそのメチル化部位をマッピングした。対照として既知メチル化 RNA も同様に測定した。

### 3. SAM 合成酵素 3'非翻訳領域 (UTR) を用いたルシフェラーゼアッセイ系

SAM 合成酵素 3'非翻訳領域 (UTR) を順方向、あるいは逆方向でルシフェラーゼに連結したりポータープラスミドを作製した。さらに、UTR を断片化して挿入したもの、上の実験で同定された領域のアデニンに変異を入れたものも作製した。培養細胞にトランスフェクションし、細胞抽出液調整直前に cLeu を培地に添加し、その影響を調べた。

### 4. 既知 RNA メチル化酵素ノックダウン実験

これまでに、mRNA の m6A メチル化は RNA メチル化酵素 Mettl3 と Mettl14 のヘテロ二量体により触媒されること、その触媒活性は主に Mettl3 が担うことが報告されている。そこでヒト Mettl3 mRNA に対応するステルス siRNA を購入し、リポフェクション法により HeLa 細胞に導入した。定量 PCR により Mettl3 mRNA の減少を確認した上で、SAM 合成酵素 3'UTR ルシフェラーゼリポーター発現への影響を調べた。

### 5. 新規 RNA メチル化酵素候補の同定

我々は様々な核内タンパク質複合体を単離し質量分析により構成因子を同定してきた。その中には RNA 結合モチーフを持つタンパク質複数と SAM 結合ドメインを持つ機能未知のタンパク質を含むものがあった。これらが SAM 合成酵素 3'非翻訳領域のメチル化や安定性制御に関わる可能性を、ステルス siRNA を用いたノックダウン実験により検討した。

### 6. RNA シークエンスを用いた SAM 量応答遺伝子群の同定

SAM 量変化に対して SAM 合成酵素以外の遺伝子も応答し、恒常性維持に関わる可能性が考えられる。そこで、cLeu 処理および対照細胞より RNA を調製し、rRNA 除去キットを用いて rRNA を除き、得られた mRNA を適宜断片化した後、RNA ライブラリーを作製し、バーコード化した。エマルジョン PCR にて増幅した後、次世代シーケンサー Ion Proton によりシーケンシング検出を行った。公開プログラムを用いてシーケンシングデータのゲノムへのマッピングとトランスクリプトーム比較を行った。

### 7. SAM 合成酵素タンパク質の検討

タンパク質量の測定については既に研究室にて作製した MAT2 特異的抗体を用いた。培地中のメチオニン濃度を下げ、細胞内局在の変化を調べた。

## 結 果

### 1. SAM 合成酵素 mRNA の SAM 量に応じた安定性制御

cLeu を培地に添加することで細胞内 SAM 量が 1/5 程度に低下することを確認した。この時、数時間以内に MAT2 mRNA が 3~4 倍に上昇すること、この上昇と共に同 mRNA の半減期延長、そして、この際、3'UTR の m6A の低下が観察された。3'UTR リポーターの発現も cLeu で上昇し、同時に SAM を添加することでこの上昇は解除された。したがって、MAT2 mRNA は SAM 量を感じ取る形で m6A 修飾を受け、それにより分解反応が促進すること、SAM 量低下時にはこの m6A 修飾が減少し、mRNA が安定化すると考えられた。

### 2. SAM 合成酵素 mRNA 安定性制御に関わる新規 RNA メチル化酵素の同定

Mettl3 をノックダウンしても、上記の制御はほとんど影響を受けないことから、この制御には新規 RNA メチル化酵素が関わると考えられた。そこで新規 RNA メチル化酵素候補についてノックダウン実験を行い、これが MAT2 の発現制御に必須であることを確認した (図 1)。

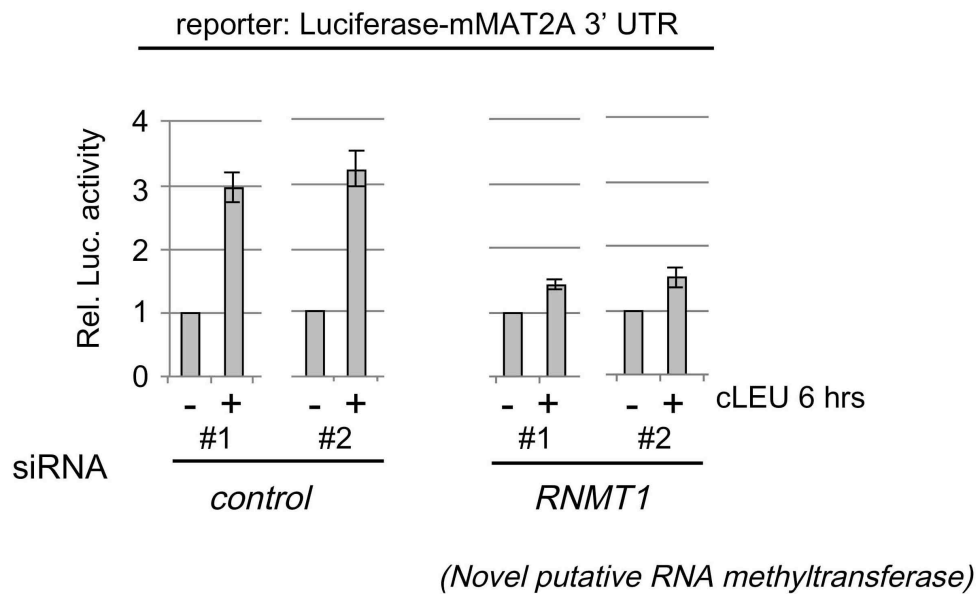


図1. 3' UTR リポーター発現に対する新規 RNA メチル化酵素ノックダウンの効果

MAT2 mRNA の 3' UTR を含むリポータープラスミドを HeLa 細胞へ導入した後、サイクロロイシン (cLeu) を培地に添加した。cLeu によりリポーター発現が上昇したが、新規 RNA メチル化酵素をノックダウンするとこの応答はほぼ消失した。

### 3. SAM 応答遺伝子群の同定

次世代シーケンスを用いた解析から、SAM 濃度低下時に誘導される遺伝子、逆に発現が低下する遺伝子を数十個同定できた。この中には RNA 結合タンパク質をコードするものもあった。

### 4. SAM 合成量と SAM 合成酵素細胞内分布の関係

培地中のメチオニンを低下させることで細胞内 SAM 量が減少することが知られている。そこでこの条件下および通常条件下で MAT2 の細胞内分布を抗体免疫染色により比較した。通常、MAT2 は主に核に分布するが、メチオニン枯渇化ではこの染色シグナルが著明に増強した。

## 考 察

ここに示した実験結果などから、ヒトおよびマウスの細胞における SAM 合成量は、MAT2 mRNA の安定性制御を介して調節されること、この調節には m6A 修飾が関与することが理解された<sup>3)</sup>。しかしながら、SAM 量に依存して MAT2 mRNA の m6A 修飾が変動する仕組みは不明である。この点を解明するためには、まず同定した新規 RNA メチル化酵素の反応速度論的解析を行うことが必要であろう。またこの新規 RNA メチル化酵素の基質となる RNA の同定も重要な課題となる。

一連の研究過程では代謝とエピジェネティクスの連携を考察し、SAM 合成酵素やアセチルコエンザイム A の合成系酵素の核内分布の重要性について<sup>4)</sup>、そして、栄養とエピジェネティクスの関係について<sup>5)</sup>、日本語総説論文としてまとめた。

最後になりましたが、この研究の立ち上げの部分を上原記念生命科学財団にご支援頂いたことで研究を順調に展開することができました。改めて感謝を申し上げます。原著論文は投稿中ですがまだ受理されていないことは残念です。発表へ向けて努力を継続して参ります。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は島弘季（東北大学大学院医学系研究科・助手）、Long Nguyen（東北大学大学院医学系研究科医学履修課程大学院生）である。

## 文 献

- 1) Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M, Kera Y, Noda T, Igarashi K. Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. *Mol Cell*. 2011 Mar 4;41(5):554-66. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.018. PubMed PMID: 21362551.
- 2) Kera Y, Katoh Y, Ohta M, Matsumoto M, Takano-Yamamoto T, Igarashi K. Methionine adenosyltransferase II-dependent histone H3K9 methylation at the COX-2 gene locus. *J Biol Chem*. 2013 May 10;288(19):13592-601. doi: 10.1074/jbc.M112.429738. Epub 2013 Mar 28. PubMed PMID: 23539621; PubMed Central PMCID: PMC3650394.
- 3) Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, Ebina M, Muto A, Sato Y, Kumagai S, Ochiai K, Suzuki T, Igarashi K. S-adenosylmethionine synthesis is regulated by selective N6-adenosine methylation and degradation of mRNA involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep*. in press (2017)
- 4) 五十嵐和彦、井倉毅 エピジェネティクス代謝物の地産地消 「最新医学」2017年72巻5号 685- (特集「エピジェネティクスと環境科学」)
- 5) 五十嵐和彦 代謝経路とエピジェネティクス制御系のクロストーク 「心身医学」2017年57巻4号 343-