

195. *Mettl20* KO マウスにおける *ETFB* メチル化と脂肪酸代謝異常

島津 忠広

理化学研究所 眞貝細胞記憶研究室

Key words : メチル化酵素, ミトコンドリア, 脂肪酸代謝

緒言

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 [1]。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、ある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となっており、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。そこで本研究では、タンパク質のメチル化を解析するに当たり、抗体に依存しないメチル化修飾解析法を用いることにした。すなわち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の検出・同定系をもちいて解析を行った [2]。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わかった。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、リシン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、*METTL20* によるミトコンドリアタンパク質 *ETFB* のリシンメチル化を発見し、マウスを用いてメチル化修飾の生理的な役割を研究した。

方法および結果

1. *METTL20* の基質探索と *ETFB* の同定

ミトコンドリア局在メチル化酵素である *METTL20* の基質を探索するため、安定同位体標識した培養細胞からミトコンドリアを精製し、タンパク質の基質とした。試験管内で合成コファクターである ProSeAM (図 1B) とリコンビナント *METTL20* を混合し、反応させた後に修飾タンパク質をクリック反応によりビオチン付加し、ストレプトアビジンビーズで精製したのち、SILAC MS 解析を行った。その結果、*ETFB* を *METTL20* の基質として同定した (図 1C)。本研究を行っている途中で別の 2 つのグループからも、*ETFB* が *METTL20* によってメチル化されると報告されたが、試験管内および培養細胞内での *ETFB* リシンメチル化を報告しているものの、動物個体内で *METTL20* が *ETFB* をメチル化することの生理的意義や、脂肪酸代謝に対する影響などは不明なままである [3, 4]。

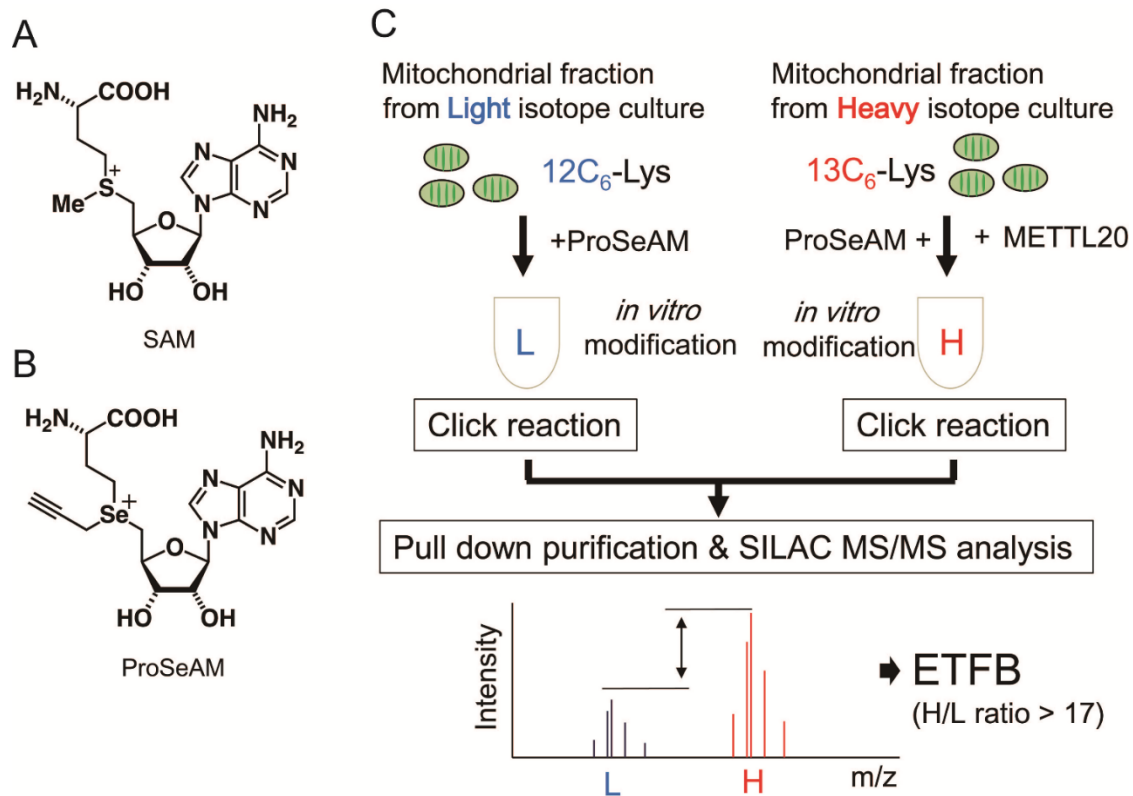


図 1. METTL20 の基質探索

A) SAM の構造。 B) ProSeAM の構造。 C) 基質探索系の概略図。

2. ETFB のメチル化部位とメチル化の機能

ETFB のメチル化部位とメチル化の機能 ETFB のメチル化部位を決定するため、質量分析で解析したところ、9つのリシン残基がメチル化部位として推定された。これらのリシン残基をアルギニンに置換した変異体についてメチル化実験をおこなったところ、K200 と K203 を二箇所変異させた変異体ではメチル化が完全に消失したことから、K200/203 がメチル化部位であることが判明した (図 2A)。

つぎに、メチル化の生理的な意義を調べるため、試験管内で ETF の活性試験を行ったところ、メチル化 ETF では活性が低下することが明らかになった (図 2B)。

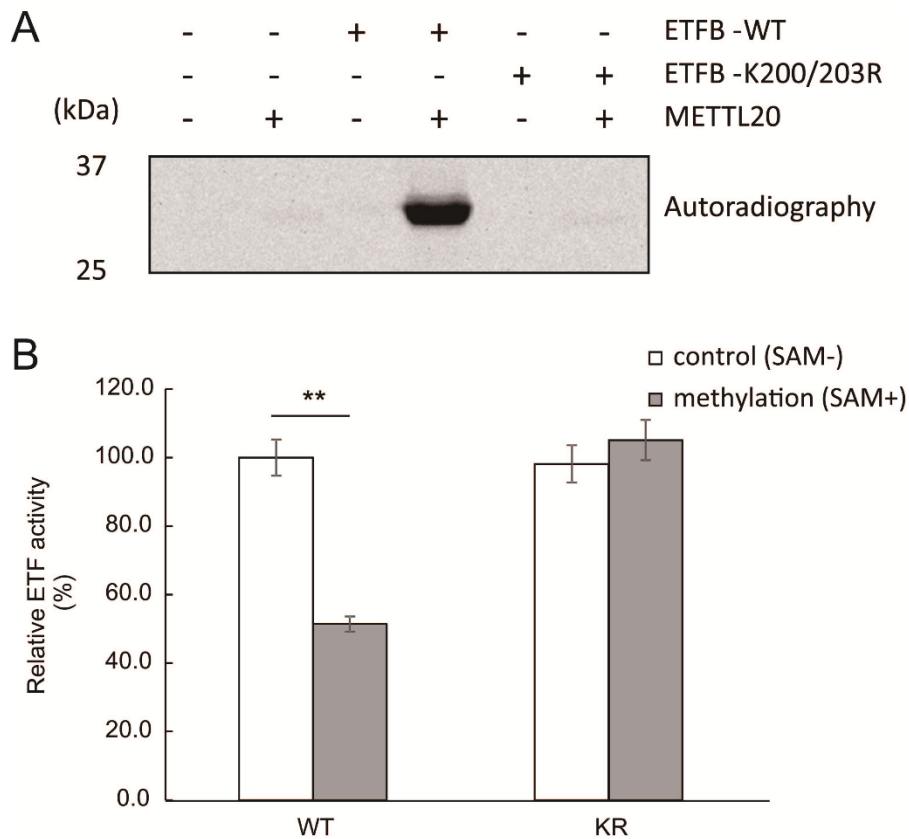


図2. ETFB のメチル化部位と活性

A) アイソトープラベルした SAM 存在下、リコンビナント ETF 複合体を METTL20 と反応させ、SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラフィのシグナルを検出した。

B) リコンビナント ETF 複合体 (WT あるいは K200/203R) を METTL20 存在下で SAM 存在下 (メチル化反応) あるいは非存在下 (コントロール) で 30°C、3 時間反応後に、それぞれの ETF の活性を測定した (mean±SEM、n=3、Student's t-test、**P<0.01)。

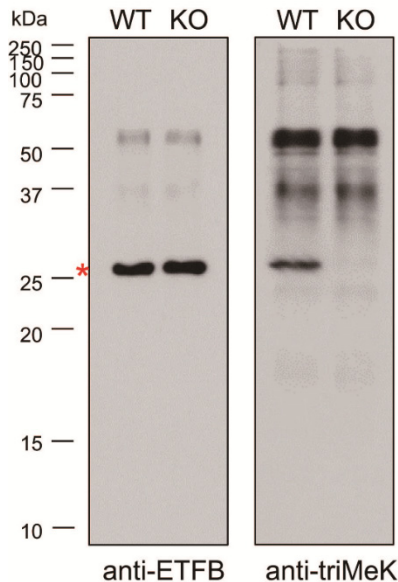
3. *Mettl20* ノックアウト (KO) マウスにおける酸素消費量の亢進と低温耐性の獲得

動物個体での METTL20 の役割を明らかにするため、KO マウスを作製した (図 3A)。KO マウス肝臓での ETF メチル化を検出したところ、WT では ETF がトリメチル化している一方で、KO ではメチル化修飾が検出できなかった (図 3B)。脂肪酸代謝への影響を調べるために、マウスに低糖質・高脂肪食ダイエットであるケトン食を給餌し、呼吸代謝測定を行ったところ、KO マウスにおいて酸素消費量が顕著に上昇していた。さらに、マウスを 24 時間絶食させたのちに低温ストレスを与え、体温変化を経時的に測定したところ、WT に比べて KO マウスでは低温に耐性を示すことが明らかとなった (図 3C)。

A

WT AAGATGAGTGGAGCATCAAAGATCTTGGCCAACGACATAGACCCCAGTAAGGA
 KO AAGATGAGTGGAGCATCAAAG-----AGACCCCAGTAAGGA

B



C

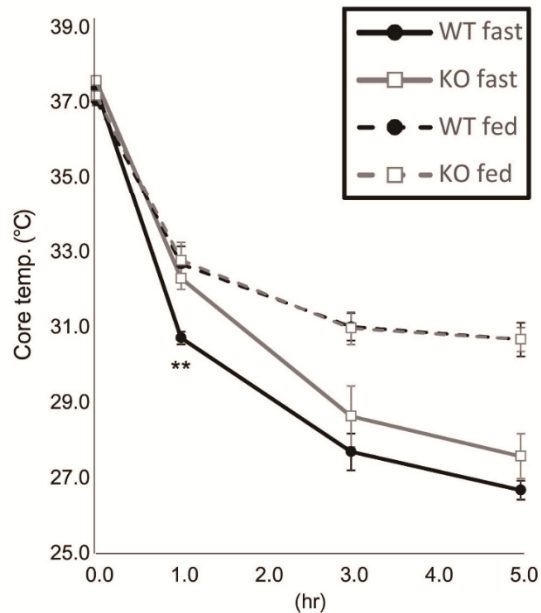


図3. *Mettl20* ノックアウトマウス

- A) WT および KO マウスの *Mettl20* ゲノム配列。CRISPR-Cas9 によるゲノム編集で *Mettl20* のメチル化酵素部位をコードする塩基配列を欠失した KO マウスを作製した。
- B) ETF のトリメチル化を IP ウェスタンで検出した。
- C) *Mettl20* KO マウスの低温耐性試験。自由給餌 (Fed)、24 時間絶食 (Fast)。
 Mean±SEM, n=5, Student's t-test, **P<0.01。

考 察

本研究ではMETTL20の網羅的な基質探索の結果、ETFbを同定した。今回、ETFb以外の基質は見出せなかったが、これはMETTL20がETFb特異的なメチル化酵素であることを示唆していると考えられる一方で、ETFb以外の未知基質が同探索系では検出できていない可能性も否定できない。一方、KOマウスではETFbのメチル化が検出できなかったことから、METTL20はETFbのメチル化に中心的な役割を果たすことがわかった。以上の結果は、METTL20とETFbはお互いに特異性の高い酵素-基質の関係にあることを示唆している。

KOマウス解析の結果、ケトン食給餌下や絶食下など、脂肪酸代謝が亢進する条件下ではMETTL20によるメチル化は脂肪酸代謝を調節し、低温耐性や熱産生に関わっていることが判明した。一方で通常の食事条件では代謝や熱産生に影響が見られなかった。また、一連のKOマウスの解析の結果、体重や肥満、血中グルコースなどへの影響も観察されなかった。このことから、METTL20は脂肪酸代謝が亢進するような特定の生活環境や食生活において、代謝調節に寄与していることを示唆している一方で、通常的环境下では生育に必須の役割を担っているわけではないと考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所バイオリソースセンター日本マウスクリニックの若菜茂晴、古瀬民生である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に感謝申し上げます。

文献

- 1) Petrossian, T.C. and S.G. Clarke Uncovering the human methyltransferasome. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10: M110 000976. DOI:10.1074/mcp.M110.000976.
- 2) Shimazu, T., J. Barjau, Y. Sohtome et al. Selenium-Based S-Adenosylmethionine Analog Reveals the Mammalian Seven-Beta-Strand Methyltransferase METTL10 to Be an EF1A1 Lysine Methyltransferase. *PLoS One*. 2014; 9: e105394. DOI:10.1371/journal.pone.0105394.
- 3) Rhein, V.F., J. Carroll, J. He et al. Human METTL20 Methylates Lysine Residues Adjacent to the Recognition Loop of the Electron Transfer Flavoprotein in Mitochondria. *J Biol Chem*. 2014; 289:24640-24651. DOI:10.1074/jbc.M114.580464.
- 4) Malecki, J., A.Y. Ho, A. Moen et al. Human METTL20 is a mitochondrial lysine methyltransferase that targets the beta subunit of electron transfer flavoprotein (ETFbeta) and modulates its activity. *J Biol Chem*. 2015; 290: 423-434. DOI:10.1074/jbc.M114.614115.