

ヒスチジン残基の pi メチル化修飾による RNA 代謝調節

— 哺乳類の胚発生に必須な仕組みの可能性 —

概要

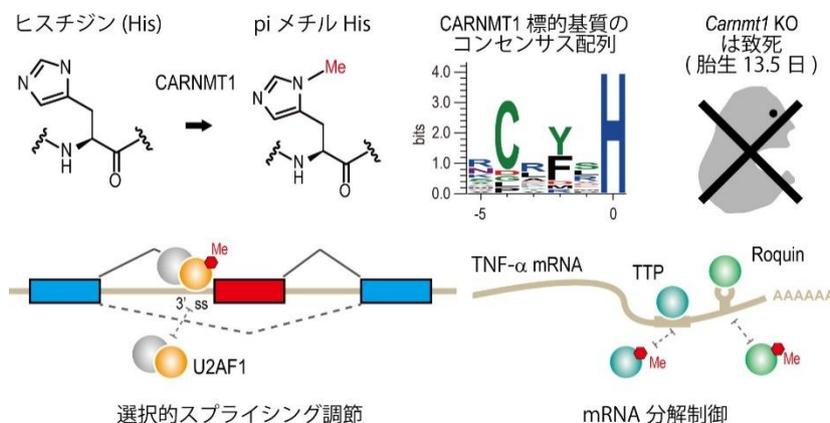
理化学研究所（理研）開拓研究本部眞貝細胞記憶研究室の島津忠広専任研究員、眞貝洋一主任研究員、摂南大学農学部応用生物科学科の芳本玲講師らの共同研究グループは、CARNMT1（カルノシンメチル基転移酵素 1）^[1]がタンパク質のヒスチジン残基（His）を pi メチル化（イミダゾール環の N1 位置でのメチル化）する酵素であり、哺乳類の胚発生において必須であることを発見しました。

本研究成果は、タンパク質の His メチル化修飾が果たす生命機能の全容解明に向けた一歩であり、疾患治療や創薬の基礎につながるものと期待されます。

タンパク質の His メチル化は、イミダゾール環の N1 または N3 の位置のいずれかで起こることが知られており、島津専任研究員らは 2021 年、pi メチル化する酵素として初めて METTL9^[2]を報告しました。

今回、共同研究グループは、真核生物に共通した「第 2 の pi メチル化酵素」として CARNMT1 を同定しました。Carnmt1 遺伝子をノックアウトしたマウスは胎生期に死亡したことから、この酵素がマウスの胚発生に不可欠であることが示されました。さらに、CARNMT1 は RNA 結合タンパク質^[3]に見られる C3H 型ジンクフィンガーモチーフ^[4]の His を pi メチル化すること、この pi メチル化修飾は RNA 結合タンパク質の RNA 結合能を変化させ、mRNA の選択的スプライシング^[5]や mRNA 分解に関わることが明らかになりました。このような RNA 代謝^[6]調節は、哺乳類の胚発生に必須な仕組みの一つである可能性があります。

本研究は、科学雑誌『Genes & Development』オンライン版（8 月 23 日付）に掲載されました。



CARNMT1 によるタンパク質のヒスチジン残基（His）の pi メチル化修飾

背景

タンパク質の翻訳後修飾¹⁾は可逆的な分子調節機構として、原核生物から真核生物に至るまで、広く起こることが知られています。ヒトをはじめとした真核生物では、特にヒストンタンパク質のアセチル化やメチル化がエピゲノム²⁾制御の中心的な役割を果たすことから、注目を集めています。

タンパク質のヒスチジン残基 (His) のメチル化修飾には、イミダゾール環の N1 の位置で起こる「pi メチル化」と、N3 の位置で起こる「tau メチル化」の二つがありますが、その詳細は今なお明らかになっていません。His のメチル化が最初に発見されたのは 50 年以上前で、筋肉の収縮時に働くアクチンやミオシンと呼ばれるタンパク質に tau メチル化された His が含まれていることが示されました。しかしそれ以降、tau メチル化を触媒する酵素は不明でした。2018 年になり、酵素 SETD3 がアクチンの His の tau メチル化に関与し、His の tau メチル化がアクチン機能と筋肉収縮性の調節に重要な役割を果たすことが示されました^{注 1、2)}。

その発見とほぼ同時期に、島津専任研究員らは、酵素 METTL9 がさまざまなタンパク質に存在する His の繰り返し配列 (HxH 配列) 中の His を pi メチル化すること^{注 3)} や、酵素 METTL18 が哺乳類でリボソームタンパク質 RPL3 を tau メチル化し、翻訳調節に関わること^{注 4)} を発見しました。

注 1) Wilkinson, A.W. *et al.* SETD3 is an actin histidine methyltransferase that prevents primary dystocia. *Nature* 565, 372-376 (2019).

注 2) Kwiatkowski, S. *et al.* SETD3 protein is the actin-specific histidine N-methyltransferase. *Elife*. 7, e37921 (2018).

注 3) 2021 年 2 月 9 日プレスリリース「ヒスチジン残基を pi メチル化する酵素を発見」
https://www.riken.jp/press/2021/20210209_2/index.html

注 4) 2022 年 6 月 21 日プレスリリース「リボソームタンパク質に起きる翻訳後修飾の機能」
https://www.riken.jp/press/2022/20220621_2/index.html

研究手法と成果

共同研究グループは、これまでタンパク質のメチル化修飾酵素であることがゲノム解析から推定された遺伝子の中で、特に His のメチル化酵素に着目して解析してきました。そして今回、「第 4 の His メチル化酵素 (pi メチル化酵素としては 2 番目)」として、CARNMT1 (カルノシンメチル基転移酵素 1) を同定しました (図 1A)。

CARNMT1 は、2015 年にアミノ酸の β -アラニンとヒスチジンが結合したカルノシンというジペプチドの His を pi メチル化する酵素として報告されていました。この酵素がタンパク質の His も pi メチル化するか調べたところ、CARNMT1 遺伝子をノックアウト (KO) したヒト細胞では、タンパク質 His の pi メチル化の量が半分程度に減少すること、METTL9 遺伝子と CARNMT1 遺伝子をダブルノックアウトしたヒト細胞では、pi メチル化が検出されないことが分かりました (図 1B)。このことは、CARNMT1 が METTL9 とともに、タンパク質 His の pi メチル化を担う中心酵素であることを示しています。

さらに、*Carnt1* 遺伝子をノックアウトしたマウスは胎児期 (胎生 13.5 日後) に死亡したことから、CARNMT1 はマウスの胚発生において必須の役割を

担っていることが分かりました (図 1C)。さらに、CARNMT1 によって pi メチル化される標的基質を探索した結果、RNA 結合タンパク質に多く見られる C3H 型ジンクフィンガーモチーフ (C3H-ZF、CxxxH) を持つタンパク質が多数見つかりました (図 1D)。

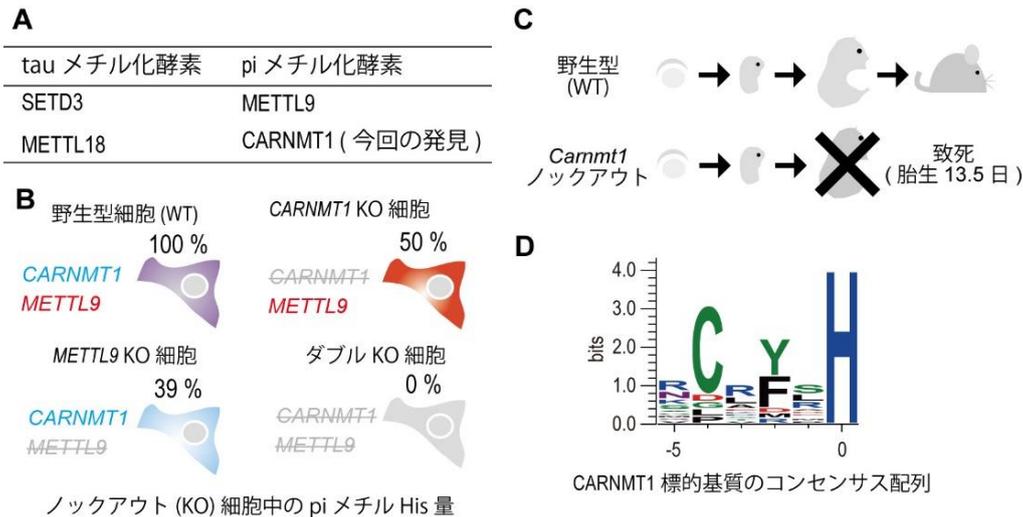


図 1 タンパク質 His の pi メチル化酵素として、CARNMT1 を同定

- タンパク質 His メチル化酵素の種類。CARNMT1 が METTL9 に次ぐ、第 2 の pi メチル化酵素であることを発見。
- ノックアウト (KO) ヒト細胞に含まれるタンパク質 His pi メチル化の割合。野生型に比べて、CARNMT1 KO 細胞では 50%、METTL9 KO 細胞では 39% に低下し、両方の遺伝子を KO した細胞は検出限界以下 (0%) になった。
- Cammt1* 遺伝子の KO マウスでは胎児期に死亡したことから、CARNMT1 がマウスの胚発生に必須の遺伝子であることが分かった。
- CARNMT1 によってメチル化修飾を受けやすい共通配列 (コンセンサス配列) は CxxxH であり、これは C3H 型ジンクフィンガーモチーフ (C3H-ZF) と同一であった。

次に、CARNMT1 によって His の pi メチル化を受ける C3H 型ジンクフィンガーモチーフを持つタンパク質のうち、スプライシング^[5]因子である U2AF1^[9]と、TNF- α ^[10]の mRNA の分解に関わる Tristetraprolin (TTP)^[11]および Roquin^[12]について解析しました。その結果、U2AF1 の 37 番目の His (His37) の pi メチル化がなくなると、mRNA 前駆体の 3' スプライス部位 (イントロン^[5]の 3' 末端で、エクソン^[5]との境界) への結合が抑制され、エクソンスキップ^[13]が起こることが判明しました (図 2A)。これは、mRNA の選択的スプライシングが CARNMT1 によって調節されていることを示しています。

一方、Roquin (His438) や TTP (His120/His158) は pi メチル化によって TNF- α の mRNA との結合が阻害され、TNF- α の mRNA の分解が抑制されることが分かりました (図 2B)。このような RNA 代謝の調節は、哺乳類の胚発生に必須な仕組みの一つである可能性があります。

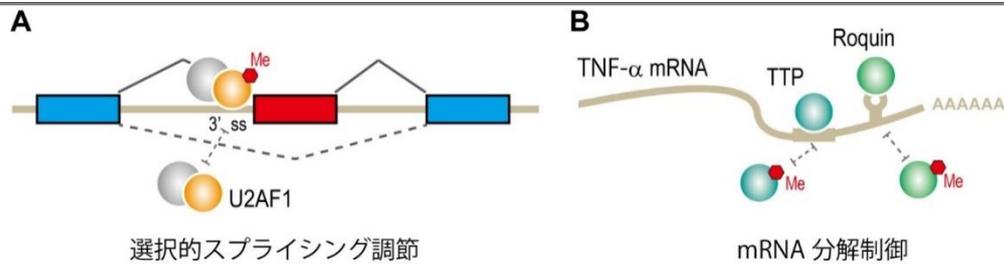


図2 CARNMT1によるHisのpiメチル化の働き

- A. U2AF1は、mRNA前駆体の3'スプライスサイト(3'ss)を認識して結合するタンパク質である。U2AF1の37番目のHis(His37)はほぼ100%の割合でpiメチル化を受けているが、CARNMT1がなくなるとそのpiメチル化はほぼ完全に消失する。ある種のmRNA前駆体の3'ss結合が弱まることで、選択的スプライシングのパターンが変化した。
- B. TTPおよびRoquinは、TNF- α のmRNAの3'-UTR(非翻訳領域)に結合して分解を促進する。TTPやRoquinがCARNMT1によりpiメチル化されると、mRNAとの結合が弱まり、mRNAの分解が抑制された。

今後の期待

今回、CARNMT1がタンパク質のHisのpiメチル化を担う第2のメチル化酵素であり、マウスの胚発生において必須の働きをすることが初めて明らかになりました。本研究は、従来の分子生物学では知られていなかった「Hisのpiメチル化による生命機能制御」という新しい役割を示したものです。

今後は、RNA結合タンパク質のHisの翻訳後修飾がどのようなメカニズムでマウスの胎児期に決定的に重要であるのか、あるいは成体においてHisのpiメチル化がどういった生理機能を果たしているのかを明らかにすることで、哺乳類の胚発生の仕組みやその破綻による疾患の理解、さらには創薬研究へと応用展開することが期待されます。

論文情報

<タイトル>

Histidine N1-position-specific methyltransferase CARNMT1 targets C3H Zinc finger proteins and modulates RNA metabolism

<著者名>

Tadahiro Shimazu, Rei Yoshimoto, Kaoru Kotoshiba, Takehiro Suzuki, Shogo Matoba, Michiko Hirose, Mai Akakabe, Yoshihiro Sohtome, Mikiko Sodeoka, Atsuo Ogura, Naoshi Dohmae, Yoichi Shinkai

<雑誌>

Genes & Development

<DOI>

[10.1101/gad.350755.123](https://doi.org/10.1101/gad.350755.123)

補足説明

[1] CARNMT1 (カルノシンメチル基転移酵素 1)

β -アラニンとヒスチジンから成るジペプチドのカルノシンを pi メチル化する酵素として 2015 年に報告された。7 β ストランド型のメチル化酵素ドメインを持ち、ヒトから酵母まで真核生物に広く保存されている。

[2] METTL9

初めて同定されたタンパク質のヒスチジン残基 pi メチル化酵素。7 β ストランド型のメチル化酵素ドメインを持ち、ヒトからショウジョウバエ、線虫に至るまで多くの真核生物に存在し、さまざまなタンパク質の繰り返しヒスチジン配列 (HxH 配列) 中のヒスチジン残基を pi メチル化する。

[3] RNA 結合タンパク質

細胞内の一本鎖または二本鎖 RNA に結合するタンパク質で、RNA の働きを制御する。RNA 結合タンパク質には、RNA 認識モチーフや RNA 結合ドメイン (ジンクフィンガーモチーフなど) など、さまざまな構造モチーフが含まれる。

[4] C3H 型ジンクフィンガーモチーフ

ジンクフィンガーモチーフは、DNA や RNA に結合する性質を持つタンパク質の部分構造の一つであり、C3H 型、C2H2 型などの複数のタイプが存在する。このうち、C3H 型ジンクフィンガーモチーフは特に RNA に結合する性質を持つ。

[5] 選択的スプライシング、スプライシング、イントロン、エクソン

スプライシングは、DNA から転写された mRNA 前駆体に含まれるタンパク質の配列情報を持たない領域 (イントロン) を取り除き、持つ領域 (エクソン) を連結する反応のこと。一つの mRNA 前駆体から特定のエクソンを取捨選択することで、多種の成熟 mRNA ができるスプライシングを選択的スプライシングという。

[6] RNA 代謝

RNA の転写開始、5'キャッピング、転写伸長、スプライシング、3'末端プロセッシング、転写終結およびその後の輸送、翻訳、分解に至るまで、すなわち RNA の合成から分解までの全ての過程のことを指す。

[7] 翻訳後修飾

タンパク質が生合成された後 (翻訳後) に、タンパク質へ付加されるさまざまな修飾のこと。リン酸化、アセチル化、メチル化、糖鎖付加などが知られている。

[8] エピゲノム

生物の DNA やヒストンタンパク質に起こる化学修飾で、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化などがある。これらの修飾状態は細胞複製後も維持され、世代を超えて生物の子孫に受け継がれることもある。

[9] U2AF1

mRNA 前駆体のイントロン (タンパク質をコードしていない領域) とエクソン (タンパク質をコードしている領域) の境界 (3'スプライス部位) を特異的に認識して、



mRNA 前駆体に結合するタンパク質。

[10] TNF- α

サイトカインの一種で、当初はがんに対して出血性の壊死を生じさせるサイトカインとして発見された。現在では、炎症や免疫、細胞の生死に関わる因子として注目されている。

[11] Tristetraprolin (TTP)

mRNA の 3'UTR (3'非翻訳領域) に結合し、TNF- α などの炎症性サイトカインの mRNA を分解する。

[12] Roquin

TTP と同様に、mRNA の 3'UTR (3'非翻訳領域) に結合し (ただし Roquin はステムループ構造を認識する)、TNF- α などの炎症性サイトカインの mRNA を分解する。

[13] エクソンスキップ

RNA スプライシングの一種であり、mRNA 前駆体から特定のエクソン (タンパク質をコードしている領域) が飛ばされて成熟 mRNA ができる現象のこと。

共同研究グループ

理化学研究所

開拓研究本部

眞貝細胞記憶研究室

専任研究員

島津忠広 (シマツ・タダヒロ)

テクニカルスタッフ I (研究当時)

事柴 芳 (コトシバ・カオル)

主任研究員

眞貝洋一 (シンカイ・ヨウイチ)

袖岡有機合成化学研究室

専任研究員

五月女宜裕 (ソウトメ・ヨシヒロ)

テクニカルスタッフ I

赤壁麻依 (アカカベ・マイ)

主任研究員

袖岡幹子 (ソデオカ・ミキコ)

環境資源科学研究センター 技術基盤部門 生命分子解析ユニット

専任技師

鈴木健裕 (スズキ・タケヒロ)

ユニットリーダー

堂前 直 (ドウマエ・ナオシ)

バイオリソース研究センター 遺伝工学基盤技術室

専任研究員

的場章悟 (マトバ・ショウゴ)

テクニカルスタッフ II

廣瀬美智子 (ヒロセ・ミチコ)

室長

小倉淳郎 (オグラ・アツオ)

摂南大学 農学部 応用生物科学科

講師

芳本 玲 (ヨシモト・レイ)

研究支援

本研究は、理研横断プロジェクト「エピゲノム操作 (研究代表者：眞貝洋一)」、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業基盤研究 (C) 「タンパク質ヒスチジンメチル化の理解 (研究代表者：島津忠広、20K06497)」「未知の核外輸送機構を短い環状 RNA

から解明する（研究代表者：芳本玲、22K05565）」、同基盤研究（B）「タンパク質メチル化関連因子の化学的複合制御（研究代表者：五月女宜裕、22H02214）」、同学術変革領域研究（B）「neo-PTMs の階層間シナジー（研究代表者：五月女宜裕、22H05019）」、「neo-PTMs の生命機能解析（研究代表者：島津忠広、22H05020）」、武田科学振興財団「ビジョナリーリサーチ助成（スタート）（研究代表者：島津忠広）」による助成を受けて行われました。

発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所 開拓研究本部 眞貝細胞記憶研究室

専任研究員 島津忠広（シマツ・タダヒロ）

主任研究員 眞貝洋一（シンカイ・ヨウイチ）



島津忠広



眞貝洋一

摂南大学 農学部 応用生物科学科

講師 芳本 玲（ヨシモト・レイ）



芳本 玲

<機関窓口>

理化学研究所 広報室 報道担当

Tel: 050-3495-0247

Email: ex-press [at] ml.riken.jp

学校法人常翔学園 広報室

Tel: 06-6954-4026

Email: Koho [at] joshu.ac.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。