

平成 30 年度

博士論文

Biogenesis and function of base methylations in
spliceosomal U snRNAs

(スプライソソーム U snRNA 塩基メチル化修飾の
生合成機構と機能)

指導教員 鈴木勉 教授

東京大学大学院工学系研究科

化学生命工学専攻

鈴木研究室

37-167144 石神 宥真

目次

背景.....	2
手法と結果.....	4
U6 snRNA m ⁶ A 修飾酵素は mtl16/METTL16 である.....	4
U6 snRNA m ⁶ A は特定のヌクレオチド配列を持つイントロンのスプライシングを助ける.....	4
結論と考察.....	5
参考文献.....	7
発表状況.....	7
投稿論文.....	7
学会発表など.....	8
受賞等.....	8

背景

すべての生物は、DNAにコードされた遺伝情報をmRNAに転写した後に翻訳することでタンパク質を合成する。真核生物のゲノムDNAにおいて、タンパク質をコードする領域であるエクソンは、タンパク質をコードしないイントロンによって分断されている。したがって、真核生物において、mRNA前駆体であるpre-mRNAが転写された後に、スプライシングによって、イントロンが取り除かれ、エクソンがつなぎ合わさることで、成熟したmRNAが生成する。スプライシングは遺伝子の恒常的な発現に必須であるのみならず、エクソンの多様な組み合わせを可能にする選択的スプライシングにより、タンパク質の多様性を生み出すことで、発生や分化など、複雑な生命現象の一端を担っている。また、スプライシングの異常は様々な疾患に関わることが知られ、創薬の標的としても注目されている。

mRNAのスプライシング反応は、スプライソソームと呼ばれる巨大でダイナミックなリボタンパク質複合体によって触媒されることが知られている。スプライシングは二段階のリン酸エステル転移反応から成る。スプライソソームは、複数のuridine-rich核内低分子RNA(U snRNA)と多数のタンパク質から構成されており、この複合体をU snRNPと呼ぶ。真核生物のほとんどのイントロンは、5'末端(5'SS)にGUを、3'末端(3'SS)にAGを持ち、メジャースプライソソームあるいはU2依存スプライソソームと呼ばれる複合体によって切り出される。この複合体ではU1, U2, U4, U5, U6 snRNAがそれぞれの構成タンパク質と結合することでU snRNPを形成し、これらがダイナミックに相互作用することによって、スプライシング反応を触媒する。

スプライシング反応の第一段階として、U1 snRNPが5'SSに、U2 snRNPがブランチ部位を結合する(A complex)。次にU4/U6, U5 tri snRNPがリクルートされ、U5とU6 snRNPが5'SSを認識することでU1 snRNAと入れ替わる(B complex)。この際に、U5 snRNAのloop Iがエクソン側の3'末端を直接認識し、U6 snRNAのACAGA box部位がイントロン側の4塩基目以降と塩基対合を形成する。この過程で、U4 snRNAがU6 snRNAから解離し、代わりにU2 snRNAがU6 snRNAと対合しB^{act} complexを形成する。この時点で、ブランチ部位のアデノシン残基は5'SS近傍に移動し、U6 snRNAの触媒作用により、アデノシン残基の2'水酸基が5'SSのリン原子を求核置換攻撃することで、一段階目のエステル転移反応が生じ、5'エクソンが遊離し、ラリアットイントロンが形成される(C complex)。次に、遊離した5'エクソンの3'末端が3'SSを求核置換攻撃することで、二段階目のエステル転移反応が生じ、ラリアットイントロンが脱離し、5'エクソンと3'エクソンが連結する。以上の過程において、pre-mRNAとU snRNAの間で形成される塩基対合が、スプライス部位の選択とスプライシング反応に必要な構造形成に非常に重要な役割を果たしている。

RNAは転写された後、酵素的に多様な化学修飾を受けることが知られている。歴史的には、tRNAやrRNAなどのRNAを中心にRNA修飾の研究がなされてきたが、次世代シーケンサーの利用に相まって、mRNAや様々なnon-coding RNAにも修飾が見つかり、最近ではエピトランスクリプトームと呼ばれ、転写後段階における新しい遺伝子発現制御機構として、生命科学に大きな潮流を生み出している。U snRNAも他のRNA同様に多くの転写後修飾が存在するが、その中で役割が明らかになっているのは5'末端のキャップ構造やブランチ部位の認識に関与するU2 snRNAのシュードウリジル化など、ごく一部の修飾のみであった。

私は本研究において、U6 snRNAのN⁶-メチルアデノシン(m⁶A)修飾(図1)[1]に注目した。このメチル化はACAGA boxの3番目のアデニン塩基に生じるが、このm⁶A修飾はACAGA boxがpre-mRNAとの相互作用を開始するB complexあるいはB^{act} complexからスプライシング終了までイントロン4番目のヌクレオチドと近接する場所に位置する[2,3]ことから、pre-mRNA基質認識に関わることが示唆されていた。またこの修飾は分裂酵母から植物、哺乳類に至る真核生物に広く保存されており、その機能的な重要性が示唆されている。1990年代にヒト細胞の核抽出液にU6 snRNAへのm⁶A修飾活性がある[4]ことが報告されているが、その修飾酵素は同定されていなかった。本研究ではm⁶A修飾酵素の同定と、逆遺伝学的解析を通じ、U6 snRNAにおけるm⁶A修飾の機能を明らかにすることを目標とした。

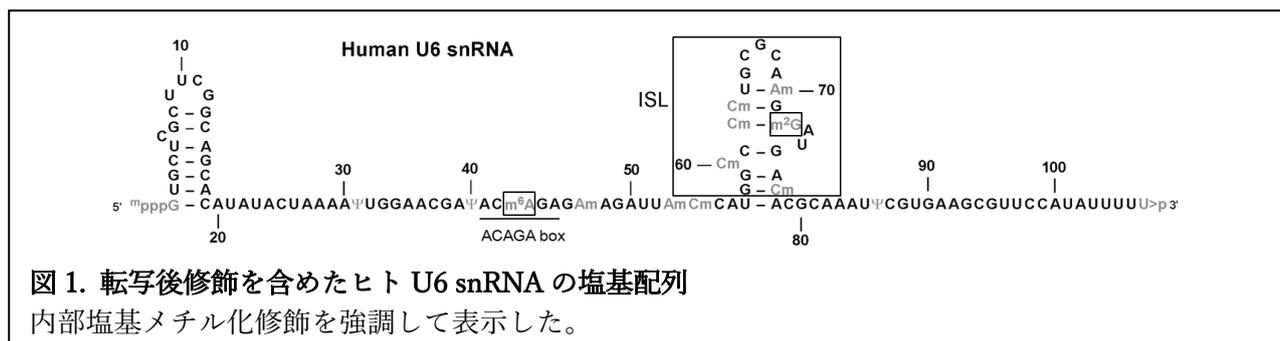


図1. 転写後修飾を含めたヒト U6 snRNA の塩基配列

内部塩基メチル化修飾を強調して表示した。

手法と結果

U6 snRNA m⁶A 修飾酵素は *mtl16*/METTL16 である

U6 snRNAのm⁶Aは哺乳類と分裂酵母に存在し出芽酵母には存在しないことから、メチル化酵素ドメインを持つ機能未知遺伝子の中から、哺乳類と分裂酵母で保存され、出芽酵母に保存されていない遺伝子を候補とした。候補遺伝子を破壊した分裂酵母株から、U6 snRNAを単離精製し、m⁶A修飾の有無をLC/MS-MSにより解析した。その結果、候補遺伝子の一つである *mtl16*の欠損株においてm⁶A修飾が欠損していることが判明した。また、ヒト細胞で*mtl16*オルソログであるMETTL16をノックダウンするとU6 snRNAのm⁶A修飾率が低下することが判明した。さらに、これらの遺伝子がコードする*mtl16*およびMETTL16の組換えタンパク質を取得し、U6 snRNAを基質として、*in vitro*メチル化反応を行ったところ、S-アデノシルメチオニン(AdoMet)存在下で、これらの酵素は、標的の位置にm⁶A修飾を導入することが明らかとなった。したがって、*mtl16*/METTL16がU6 snRNAのm⁶A修飾酵素であることが示された。

U6 snRNA m⁶A は特定のヌクレオチド配列を持つイントロンのスプライシングを助ける

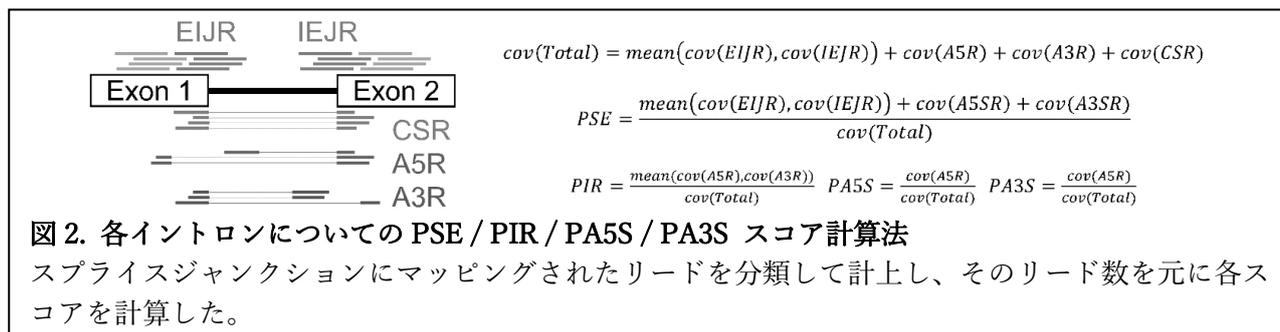
細胞中でスプライシングに異常が発生している場合、遺伝子発現の変化により生育に影響が出る場合がある。分裂酵母*mtl16*欠損株に関しては、網羅的な解析からHydroxyureaとThiabendazoleに対する感受性が報告されていた[5]。私はさらに、*mtl16*欠損株はKClとCaCl₂に対する感受性が高く、この表現型は高温で亢進することを見出した。次に、m⁶A修飾の欠損がU6 snRNAの安定性に寄与する可能性を考え、ノザンプロットによるU6 snRNAの定常状態量を計測したが、野生株との比較で差が見られなかったことから、m⁶A修飾の欠損による表現型への影響は、U6 snRNAの量的な効果ではなく、U6 snRNAの性能的なもの、すなわち質的な効果であると考えられた。

イントロン特異的な逆転写半定量PCRを用いて、野生株と*mtl16*欠損株でスプライシング効率をいくつかのイントロンで観測したところ、欠損株において保持されることが判明した。また、それらはすべて4番目のヌクレオチドとしてAを持つものであった。m⁶Aの欠損が影響を与えるイントロンを網羅的に探索し、影響を受けたイントロンが持つ特徴を検出するため、野生株と*mtl16*欠損株についてRNA-Seqを行った。分裂酵母のゲノムにマッピングされたリードのうち、スプライス部位に関わるものについて分類し、スプライシングの異常をイントロンが保持されたもの(PIR: Percentage of Intron Retention)、crypticなスプライス部位と連結したもの (PA5S: Percentage of Alternative 5' Splice siteおよびPA3A: Percentage of Alternative 3' Splice site)、これらを併せてスプライシング異常が発生したもの(PSE: Percentage of Splicing Error)として定義して、イントロン毎にその割合を計算した(図2)。*mtl16*欠損株でPSEが高い、すなわちスプライシング異常が高い頻度で見られるイントロンの配列的特徴を調べたところ、5'SSの周辺配列に特徴が見られた。特に、4番目にAを持つイントロンは*mtl16*欠損株でPSEが有意に高かった。またPA5Sの高いイントロンでは、4番目にAを持つ5'SSが避けられ、4番目にUを持つcrypticな5'SSが選択されることが判明した。これらの結果により、U6 snRNAのm⁶A修飾は4番目にAを

持つイントロンとの相互作用を助ける働きがあることが示唆された。さらに、4番目にAを持つにも関わらず、*mtl16*欠損株でPSEが高くないイントロンには、5'エキソンの3'末端の配列にAAG配列が保存されているという特徴を見出した。この配列は、U5 snRNAのloop Iと相補的であることから、U5 snRNAが5'エキソンと安定に相互作用できる際には、U6 snRNAのm⁶A修飾がなくとも、イントロン4番目にAを持つイントロンのスプライシング効率は正常に保たれることを意味している(図3A)。

次に、上述のRNA-Seqにより見出された5'SS周辺配列がスプライシング効率に関わることを検証するためレポーターアッセイを行った。レポーターには、野生株と *mtl16*欠損株でPSEの差が大きかった *SPAC18B11.09c* 遺伝子のイントロンとその周辺配列を用いた。*nmt1*プロモーター下流に上記遺伝子のイントロン配列を挿入した発現ベクターを構築し、5'SS近傍に系統的な変異を導入した。これらのレポーターを野生株と *mtl16*欠損株に導入し、RT-PCRにより発現したmRNAのスプライシング効率を比較した。その結果、イントロン4番目のAをTに置換した変異体と、5'エキソンの3'端をAAGに置換した変異体では野生株と *mtl16*欠損株のスプライシング効率に差がなくなっていた。この結果は、スプライシングのm⁶A欠損への感受性を決定するシス因子が5'エキソン配列とイントロン4番目のヌクレオチドにあることを示す。

以上の結果から私は、スプライソソームのBあるいはB^{act} complexにおいて、U5 snRNAとU6 snRNAがpre-mRNAとの相互作用を協調的に安定化することにより、スプライシングを促進するという新規の機構を提唱した(図3B)。



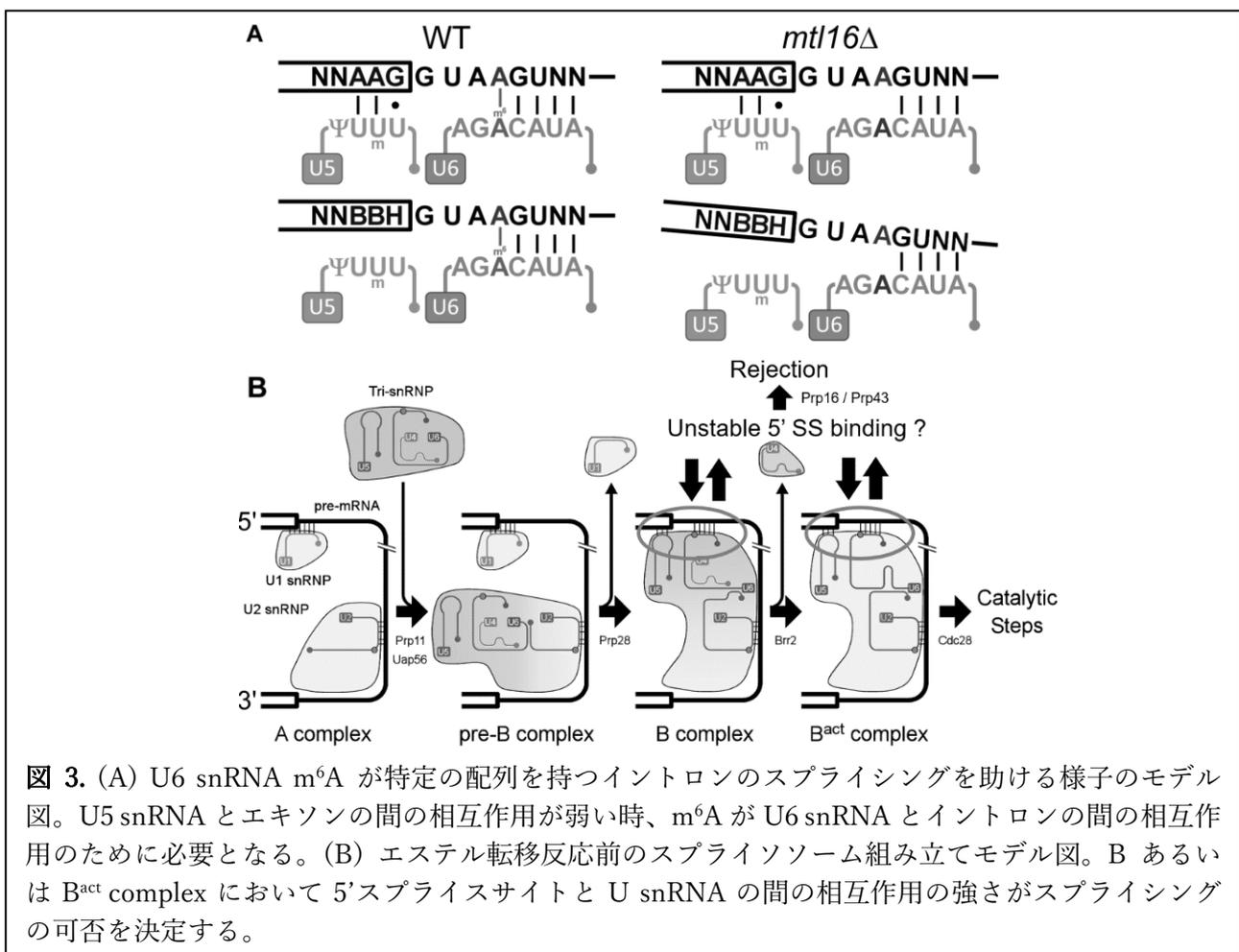
結論と考察

本研究において、私はU6 snRNA m⁶A修飾酵素を同定し、その欠損株のトランスクリプトーム解析により、このm⁶A修飾が、4番目にAを持つイントロンの効率的なスプライシングに寄与することを明らかにした。特にこの効果は、5'エキソンの3'末端にAAGを持たないイントロンで顕著であった。以上の結果は、U5およびU6 snRNAがpre-mRNAとの相互作用を協調的に安定化することで、効率的なスプライシングに寄与するというこれまでにない概念を提唱するものである。また本結果は、m⁶A修飾が存在することによって5'エキソンの3'末端配列は配列的な制限を受けなくなること、すなわちm⁶A修飾はアミノ酸配列の多様化に貢献していることを示唆しており、この修飾が真核生物の進化において非常に重要な役目を果たしている可能性が考えられる。

U6 snRNAにm⁶Aを導入するMETTL16は、動物・植物・真菌・一部の原生生物において広く保存され

ており、真核生物の進化の中で非常に早い段階で獲得されたと思われる。METTL16オルソログの欠損はシロイヌナズナ[6]や線虫[7]でも表現型が報告されており、これらの生物種でも分裂酵母同様のスプライシング異常が発生している可能性がある。哺乳類においては、METTL16はU6 snRNAのメチル化のみならず、AdoMet合成酵素である *MAT2A* mRNAの3'UTRをメチル化することにより、AdoMetの生合成を調節しているため[8-10]、その影響で *METTL16* のノックアウトは致死である[11]。しかし、ゲノム編集の技術を用いて、*MAT2A* 遺伝子を改変し、METTL16によるメチル化制御の影響を取り除くことが可能ならば、*METTL16* をノックアウトすることで、哺乳類細胞でも同様のスプライシング異常を観察できると考えている。

本研究は、mRNAスプライシングにおけるU snRNAの修飾の寄与を網羅的に調べた初めての研究である。今後は、本研究において立ち上げられた解析系を駆使することで、他のU snRNA修飾の機能解析のみならず様々なスプライシング因子の寄与を明らかにすることを通じ、mRNAスプライシングの分子機構の全貌の解明に迫りたい。



参考文献

1. Epstein P, Reddy R, Henning D, Busch H (1980) The nucleotide sequence of nuclear U6 (4.7 S) RNA. *The Journal of biological chemistry* 255 (18):8901-8906
2. Sontheimer EJ, Steitz JA (1993) The U5 and U6 small nuclear RNAs as active site components of the spliceosome. *Science* 262 (5142):1989-1996
3. Yan C, Hang J, Wan R, Huang M, Wong CC, Shi Y (2015) Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution. *Science* 349 (6253):1182-1191. doi:10.1126/science.aac7629
4. Shimba S, Bokar JA, Rottman F, Reddy R (1995) Accurate and efficient N-6-adenosine methylation in spliceosomal U6 small nuclear RNA by HeLa cell extract in vitro. *Nucleic acids research* 23 (13):2421-2426
5. Pan X, Lei B, Zhou N, Feng B, Yao W, Zhao X, Yu Y, Lu H (2012) Identification of novel genes involved in DNA damage response by screening a genome-wide *Schizosaccharomyces pombe* deletion library. *BMC genomics* 13:662. doi:10.1186/1471-2164-13-662
6. Kim J, Kim Y, Yeom M, Kim JH, Nam HG (2008) FIONA1 is essential for regulating period length in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant cell* 20 (2):307-319. doi:10.1105/tpc.107.055715
7. Dorsett M, Westlund B, Schedl T (2009) METT-10, a putative methyltransferase, inhibits germ cell proliferative fate in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 183 (1):233-247. doi:10.1534/genetics.109.105270
8. Pendleton KE, Chen B, Liu K, Hunter OV, Xie Y, Tu BP, Conrad NK (2017) The U6 snRNA m(6)A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell* 169 (5):824-835 e814. doi:10.1016/j.cell.2017.05.003
9. Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, Ebina M, Muto A, Sato Y, Kumagai S, Ochiai K, Suzuki T, Igarashi K (2017) S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N(6)-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell reports* 21 (12):3354-3363. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.092
10. Warda AS, Kretschmer J, Hackert P, Lenz C, Urlaub H, Hobartner C, Sloan KE, Bohnsack MT (2017) Human METTL16 is a N(6)-methyladenosine (m(6)A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs. *EMBO reports* 18 (11):2004-2014. doi:10.15252/embr.201744940
11. Mendel M, Chen KM, Homolka D, Gos P, Pandey RR, McCarthy AA, Pillai RS (2018) Methylation of Structured RNA by the m(6)A Writer METTL16 Is Essential for Mouse Embryonic Development. *Molecular cell* 71 (6):986-1000 e1011. doi:10.1016/j.molcel.2018.08.004

発表状況

投稿論文

Dan Bar-Yaacov, Idan Frumkin, Yuka Yashiro, Takeshi Chujo, Yuma Ishigami, Yonatan Chemla, Amit Blumberg, Orr Schlesinger, Philipp Bieri, Basil Greber, Nenad Ban, Raz Zarivach, Lital Alfonta, Yitzhak

Pilpel, Tsutomu Suzuki, Dan Mishmar. Mitochondrial 16S rRNA Is Methylated by tRNA Methyltransferase TRMT61B in All Vertebrates. *PLoS Biol.* 2016 Sep 15;14(9):e1002557.

Hiroki Shima, Mitsuyo Matsumoto, Yuma Ishigami, Masayuki Ebina, Akihiko Muto, Yuho Sato, Sayaka Kumagai, Kyoko Ochiai, Tsutomu Suzuki, Kazuhiko Igarashi. S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective *N*⁶-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep.*, 2017 Dec 19; 21(12):3354-3363

Yuma Ishigami, Tsutomu Suzuki, and Takeo Suzuki *Methods in Molecular Biology*, in press

Yuma Ishigami *et al.*, to be submitted.

学会発表など

BMB2015 Biochemistry and Molecular Biology (Kobe, Japan), Dec. 2015, Poster

19th Tokyo RNA Club (Tokyo, Japan), Apr. 2016, Oral

RNA2016 (Kyoto, Japan) Jun. 2016, Poster

The 43rd Naito Conference (Sapporo, Japan), Jun. 2017, Poster

CSH Asia Conference on RNA Modifications & Epitranscriptomics (Suzhou, China), Nov. 2017, Oral

RNA2018 (Berkeley, USA), May. 2018, Oral

The 91st Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (Kyoto, Japan), Sep. 2018, Invited talk

The 20th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (Osaka, Japan), Feb. 2019, Poster

受賞等

Selected as Excellent Presenter in the 43rd Naito Conference (2017)

Appointed as JSPS Fellow DC2 (2018~)