

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)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ことから、pre-mRNA基質認識に関与す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。

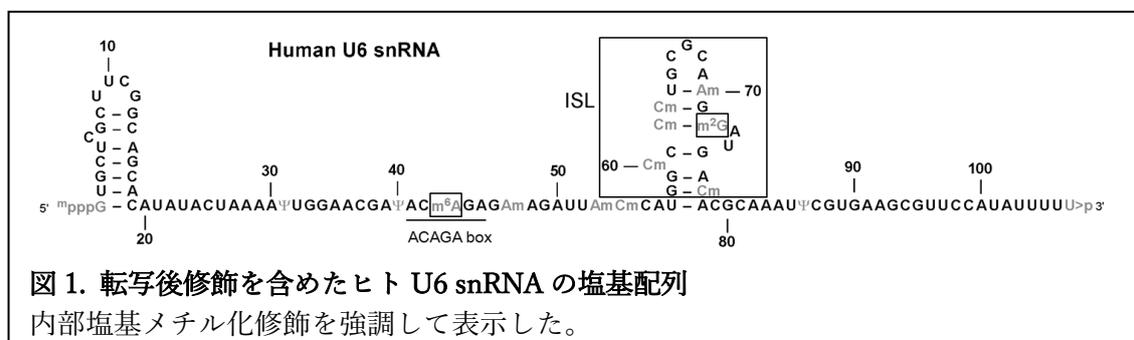


図1. 転写後修飾を含めたヒト U6 snRNA の塩基配列

内部塩基メチル化修飾を強調して表示した。

【結果】

U6 snRNA m⁶A修飾酵素はmtl16/METTTL16である

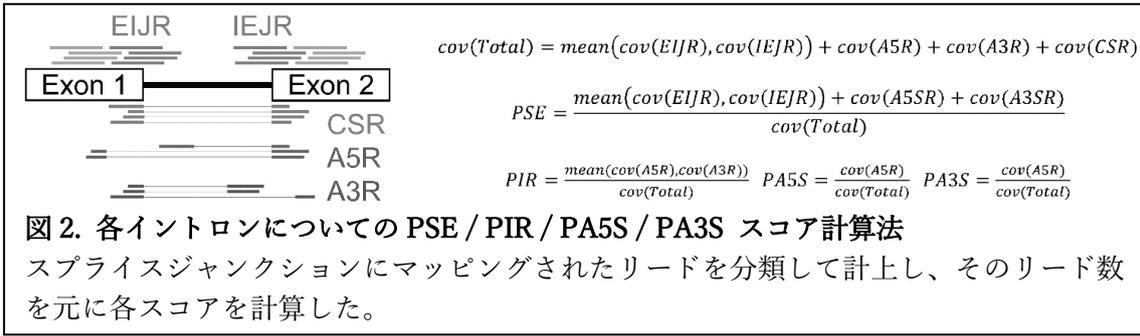
U6 snRNAのm⁶Aは哺乳類と分裂酵母に存在し出芽酵母には存在しないことから、メチル化酵素ドメインを持つ機能未知遺伝子の中から、哺乳類と分裂酵母で保存され、出芽酵母に保存されていない遺伝子を候補とした。候補遺伝子を破壊した分裂酵母株から、U6 snRNAを単離精製し、m⁶A修飾の有無をLC/MS-MSにより解析した。その結果、候補遺伝子の一つである *mtl16* の欠損株においてm⁶A修飾が欠損していることが判明した。また、ヒト細胞で *mtl16* オルソログである *METTTL16* をノックダウンするとU6 snRNAのm⁶A修飾率が低下することが判明した。さらに、これらの遺伝子がコードする *mtl16* および *METTTL16*

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のm⁶A修飾は特定の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。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、ノザンブロッティングによる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)、crypticなスプライス部位と連結したもの(PA5SおよびPA3A)、これらを併せてスプライシング異常が発生したもの(PSE)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な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'エキソンを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)。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】

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。

