

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト由来 m⁶A 修飾酵素 METTL16 の構造と機能に関する研究
(Study on the structure and functions of human m⁶A methyltransferase METTL16)

氏名 青山 智彦

<背景>

N⁶-methyadenosine (m⁶A)は、mRNA に多く見られるアデノシンの6位の窒素がメチル化された修飾塩基であり、様々な遺伝子発現制御の目印として生体内のタンパク質の発現を調節する。RNA の m⁶A 修飾の有無によって、その物理化学的な性質が変化するだけでなく、遺伝子発現を制御するタンパク質との結合が調節されている。その結果、m⁶A 修飾依存的に、スプライシング・RNA 輸送・RNA 分解・翻訳制御などが変化し、生体内の遺伝子発現が巧妙に制御される。

Methyltransferase like 3 (METTL3) は、RRACH (R = A or G, H = A, C or U、下線がメチル化部位) 配列を含む RNA のアデノシンを m⁶A 修飾する。近年、新たな RNA の m⁶A 修飾酵素として Methyltransferase like 16 (METTL16) が同定された(1)。METTL16 は、MAT2A (Methionine adenosyltransferase 2A)の mRNA 3'非翻訳領域のヘアピン構造 (MAT2A hairpin RNA) と、スプライシング反応に必須の機能性 RNA である U6 small nuclear RNA (U6 snRNA)の 43 位を m⁶A 修飾する。また、生体内での役割として、MAT2A mRNA の m⁶A 修飾は、YTHDC1 というタンパク質が結合する目印となり、RNA を不安定化させる機能が明らかにされている。一方、U6 snRNA の m⁶A 修飾は、5'側の splicing site の認識配列中に位置するため、スプライシング反応に重要であると考えられている。

METTL16 は、MAT2A hairpin RNA や U6 snRNA の UACAGAGAA (下線がメチル化部位) 配列を認識して m⁶A 修飾する。しかし、この配列を含むだけでは、METTL16 による m⁶A 修飾の基質にはならない (1)。METTL16 は、N 末端側のメチル基転移活性ドメイン (MTD) と C 末端側の脊椎動物保存ドメイン (VCR) から構成される。最新の研究で、METTL16 の MTD と MAT2A hairpin RNA の複合体結晶構造が報告され、METTL16 は MTD だけで MAT2A hairpin RNA を認識できることが示された(2)。METTL16 との複合体結晶構造中で、MAT2A hairpin RNA は、m⁶A 修飾されるアデノシンを含む認識配列 (Recognition loop)、遷移領域 (Transition region)、ステム構造 (Stem) で構成される。METTL16 の MTD は、AGAA-GU 残基による特殊な塩基対を形成する遷移領域に複合体結晶中で相互作用する。そして、MAT2A hairpin RNA が m⁶A 修飾を受けるためには遷移領域の構造が必要であることが示された(2)。したがって、METTL16 は特定の RNA 構造を認識して標的 RNA を m⁶A 修飾することが明らかにされている。

本研究の目的は、メチル基転移酵素 METTL16 による RNA の m⁶A 修飾機構の解明とした。先行研究で、METTL16 による MAT2A hairpin RNA の m⁶A 修飾機構は詳細が明らかにされた (2)。しかし、METTL16 による U6 snRNA の m⁶A 修飾機構は明らかにされていない。特に、U6 snRNA の m⁶A 修飾における VCR の役割は不明であった。以上の背景のもと、VCR の U6 snRNA の m⁶A 修飾活性への寄与に着目し、METTL16 による m⁶A 修飾機構の解明を試みた。

<結果>

METTL16 の VCR が、m⁶A 修飾活性へ寄与するか検証した。METTL16 の全長(METTL16_FL) および MTD 単独 (MTD) の組み換えタンパク質を精製し、試験管内で U6 snRNA へのメチル化活性を調べた。その結果、METTL16_FL は MTD よりも U6 snRNA に対して高い反応効率を示し、METTL16 の VCR が U6 snRNA の m⁶A 修飾を促進することが明らかになった (図 1)。

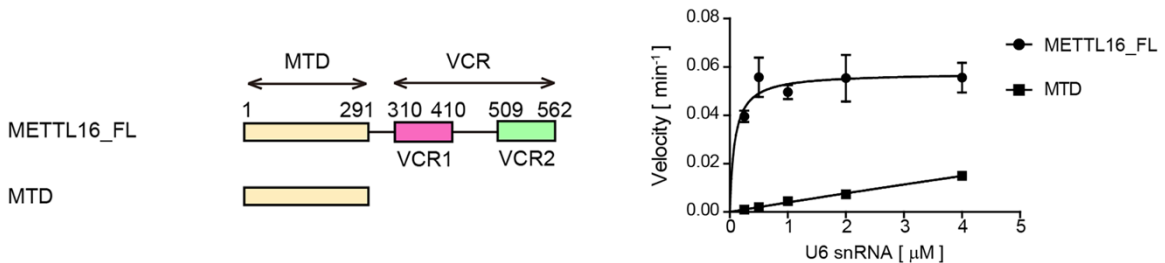


図 1 METTL16 の VCR は U6 snRNA の m⁶A 修飾を促進する

(左) METTL16 のドメイン構造、(右) METTL16_FL と MTD のメチル化活性の評価

METTL16 による U6 snRNA の m⁶A 修飾機構を明らかにするため、METTL16 の VCR の結晶構造を決定した(図 2 左)。METTL16 の VCR は、U6 snRNA 特異的な RNA 末端修飾酵素である TUT1 の RNA 結合ドメイン (KA1) に類似した立体構造であった (図 2 右)。そこで、VCR が TUT1 の KA1 ドメインと同様に RNA 結合能を持つかをゲルシフト解析で検証したところ、METTL16 の VCR が U6 snRNA と結合する結果が得られた。さらに、TUT1 の KA1 を参考に VCR の RNA 結合能を欠失させた変異体 (ΔRRR) を作成して U6 snRNA へのメチル化活性を定量した。その結果、ΔRRR は METTL16_FL に比べて U6 snRNA を効率的にメチル化できなかった。以上より、METTL16 の VCR は、RNA 結合能依存的に U6 snRNA の m⁶A 修飾を効率化することが明らかになった。

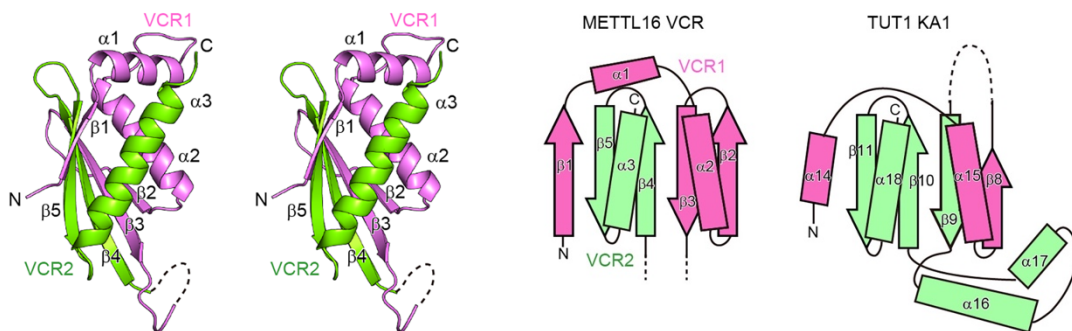


図 2 METTL16 の VCR の結晶構造を決定

(左) VCR の結晶構造 [立体視：平行法]、(右) METTL16-VCR と TUT1-KA1 の比較

U6 snRNA 内の VCR の結合領域を特定するため、U6snRNA の欠失変異体を作成し、METTL16 による m⁶A 修飾反応における VCR の効果を調べた。その結果、METTL16 の VCR は、U6 snRNA の ISL (Internal stem loop) を欠失した変異体 (ΔISL) に対するメチル化活性は促進しなかった。よって、VCR は U6 snRNA の ISL に結合して m⁶A 修飾を促進することが明らかになった。

METTL16 の VCR による U6 snRNA の m⁶A 修飾促進機構を明らかにするため、MTD との複合体結晶構造中の MAT2A hairpin RNA を参考に (図 3 右)、METTL16 から m⁶A 修飾される際の U6 snRNA の 2 次構造モデルを構築した。U6 snRNA が単独で存在するとき、U6 snRNA は

telestem-bulge-ISL が直線的に配置した 2 次構造 (straight form) をとると考えられている (図 3 左)。しかし、U6 snRNA の塩基を telestem-bulge-ISL が折り曲がるように配置させると (bent form)、MAT2A hairpin RNA と同様の遷移領域を形成できることを見出した (図 3 中央)。実際に、U6 snRNA の推定された遷移領域を形成する残基の変異は、METTL16 によるメチル化活性を低下させた。したがって、METTL16 による U6 snRNA の m⁶A 修飾においても遷移領域の形成が必要であると考えられる。

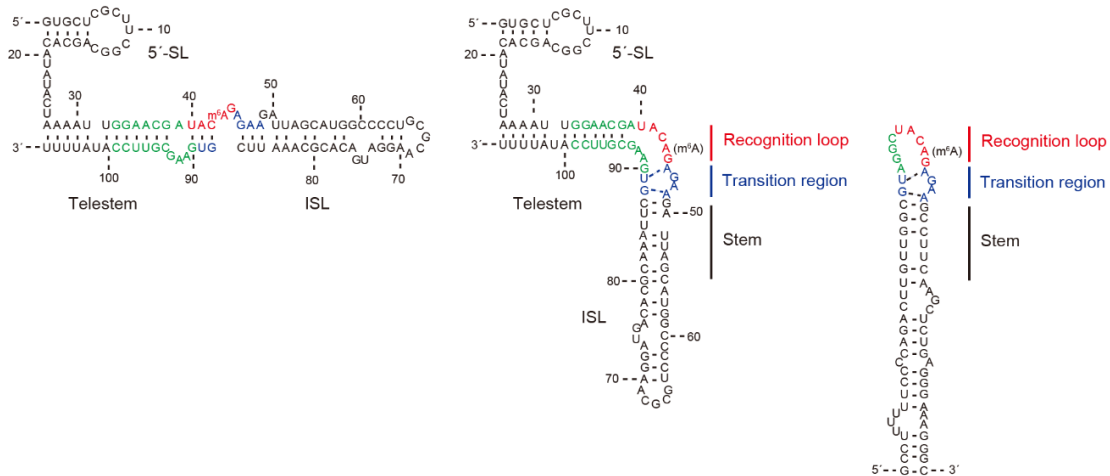


図 3 U6 snRNA と MAT2A hairpin RNA (hp1) の 2 次構造

(左) U6 snRNA straight form、(中央)U6 snRNA bent form、(右) MAT2A hairpin RNA

METTL16 の MTD のみの変異体は、METTL_FL と比較すると、U6 snRNA に対するメチル化活性が著しく低下するが、MAT2A hairpin RNA に対するメチル化活性は大きく影響を受けない。U6 snRNA と MAT2A hairpin RNA の大きな違いとして、U6 snRNA には telestem という RNA 2 次構造があるということが挙げられる (図 3)。このことから、U6 snRNA は telestem が原因で、METTL16 の MTD 単独では m⁶A 修飾が困難になっている可能性を考えた。そこで、telestem の塩基対合を崩した U6 snRNA 変異体 (TSmt) を作成したところ、METTL16 の MTD 単独による m⁶A 修飾活性がやや向上した (図 4)。さらに、U6 snRNA の telestem を完全に除いた変異体 (Δ TS3) に対しては、METTL16 の MTD 単独による m⁶A 修飾活性が大きく向上した (図 4)。以上のことから、METTL16 の VCR は、telestem の構造を崩して不安定化することで、修飾に適した立体構造への変換を促進し、U6 snRNA の m⁶A 修飾を効率化すると考えられる。

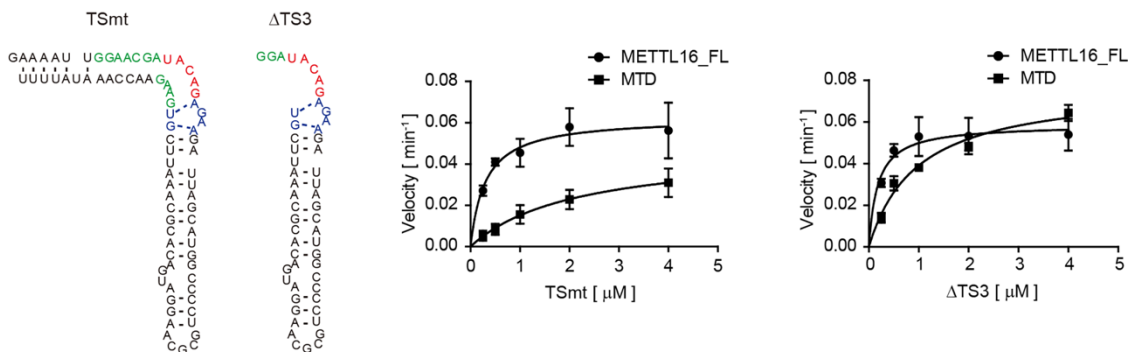


図 4 VCR は telestem の構造を不安定化することで U6 snRNA の m⁶A 修飾を促進する

(左) U6 snRNA の変異体の 2 次構造、(右) U6 snRNA の変異体に対するメチル化活性

<結論・考察>

本研究により、METTL16のVCRはU6 snRNAのm⁶A修飾を促進することが明らかになった。また、METTL16のVCRは、U6 snRNAの特異的なRNA末端修飾酵素であるTUT1のRNA結合ドメイン(KA-1)と非常によく似た構造をしていることも見出した。METTL16のVCRとTUT1のKA1は、双方ともU6 snRNAのISLに結合し、U6 snRNAの生合成の異なる段階を促進する。先行研究において、TUT1のKA1はU6 snRNAに結合して構造変化を引き起こすことが報告されている(3)。よって、METTL16のVCRも同様にU6 snRNAの構造変化を促すことは十分に考えられる。そして、U6 snRNAがMETTL16によってm⁶A修飾される際には、MAT2A hairpin RNAと同様の遷移領域を形成することも示唆された。以上より、METTL16のVCRは、U6 snRNAのISLに結合することでm⁶A修飾部位周辺の構造変化を促進し、MTDによる認識配列と遷移領域への相互作用を効率化してm⁶A修飾するという新たな反応モデルが明らかになった。

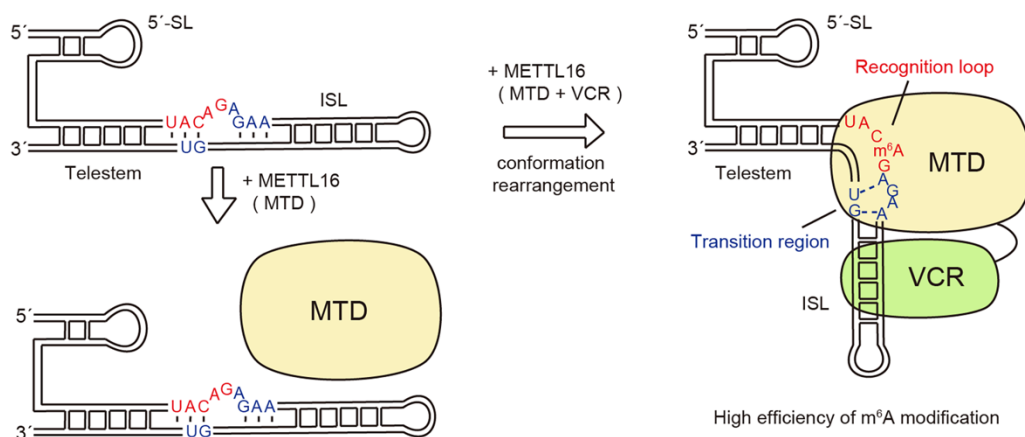


図5 METTL16によるU6 snRNAのm⁶A修飾反応モデル

<発表論文>

1. Aoyama T, Yamashita S, Tomita K. Mechanistic insights into m⁶A modification of U6 snRNA by human METTL16. *Nucleic Acids Res.* (2020)

<参考文献>

1. Pendleton KE *et al.* The U6 snRNA m⁶A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell.* (2017)
2. Doxtader KA *et al.* Structural Basis for Regulation of METTL16, an S-Adenosylmethionine Homeostasis Factor. *Mol Cell.* (2018)
3. Yamashita S *et al.* Crystal Structures of U6 snRNA-specific Terminal Uridylyltransferase *Nat Commun.* (2017)