

代謝ダイナミクス

「ヒスチジンメチル化酵素の発見と機能の解析」

タンパク質の翻訳後修飾のひとつであるメチル化は、タンパク質のリジン残基やアルギニン残基、またはヒスチジン残基にメチル基 (-CH₃) が付加される反応である。このうちヒスチジン残基のメチル化は、イミダゾール環の1位 (π) または3位 (τ) の窒素原子にメチル基がひとつ付加される反応であり、その存在は半世紀以上前から知られていたが、反応を触媒する酵素は長年見つかっていなかった。2021年度において我々は、独自のメチルアミノ酸検出技術と培養細胞の siRNA ノックダウン法を組み合わせたスクリーニング系を用いることで、世界で初めてヒスチジン残基を π メチル化する酵素として METTL9 の同定に成功した。生化学的な解析から、METTL9 は自然免疫や炎症応答に関わる S100A9 の Zn²⁺結合モチーフに含まれるヒスチジン残基をメチル化すること、またこのメチル化が S100A9 の Zn²⁺に対する結合活性を低下させることが明らかになった。本研究成果は、ヒスチジンメチル化修飾の分子機能的・生物学的な役割の解明に向けた大きな一歩であり、現在、線虫 *C. elegans* やマウスを用いた個体機能解析も展開している。

Protein methylation is one of the post-translational modifications transferring a methyl group (-CH₃) to lysine, arginine, and histidine residues in target proteins. Among them, histidine residues can potentially be methylated on the nitrogen in either position 1 ($N\pi$) or 3 ($N\tau$) of the imidazole ring. **Although protein histidine methylation was discovered half a century ago, responsible enzymes that catalyze histidine methylation had not been found for many years.** In 2021, we identified METTL9 as a novel histidine $N\pi$ -methyltransferase by siRNA knockdown screen coupled with an original method that allows discrimination of the methylhistidine isomers of cellular proteins. Biochemical analysis demonstrated that METTL9 catalyzes $N\pi$ -methylhistidine formation in the pro-inflammatory protein S100A9 and thereby attenuates its affinity for zinc. This is a big step forward for uncovering functional and biological roles of histidine methylation and currently we started a physiological analysis using *C. elegans* and mouse.



プロジェクト メンバー

教授

深水 昭吉

講師

石田 純治
大徳 浩照
加香 孝一郎
(生命環境系)

博士研究員

田島 達也

生命環境科学研究科 (生物機能科学専攻)

矢野 秀法
岡村 浩

人間総合科学研究群 (ヒューマンバイオロ ジー学位プログラム)

姚 遠

生命地球研究群 (生命農学学位プロ グラム)

原 智也
林 岳宏
室町 直人

人間総合科学研究群 (フロンティア医科学 学位プログラム)

笠井 郁也

生命地球研究群 (生物資源科学学位 プログラム)

岸川 奈那
染谷 百香
中村 夏奈子
春木 陽香理
森 遙佳
張 文瑜
植竹 徹

生物資源学類

秋元 佑斗
関口 直希
松田 紘奈

研究概要

1) 第3のメチル化ターゲット：ヒスチジン残基のメチル化

あらゆる生命現象の根幹であるタンパク質は、翻訳された後にリン酸化やアセチル化、メチル化などの多様な化学修飾を受けることで、分子機能が巧妙に制御されている。このうちメチル化は、メチル基 (-CH₃) がタンパク質のリジン残基やアルギニン残基に付加される反応であり、我々はこれまでアルギニン残基のメチル化酵素である PRMT に着目し、ノックアウトマウスや変異体線虫の解析を通じて、その生物学的な役割を明らかにしてきた。一方、リジンやアルギニンと同じ塩基性アミノ酸であるヒスチジン残基もメチル化されることが、半世紀以上前から知られている。ヒスチジンメチル化はイミダゾール環の1位 (π) または3位 (τ) の窒素原子にメチル基がひとつ付加される反応であり (図1)、1967年、哺乳類の筋肉から抽出したアクチンやミオシンに τ メチルヒスチジンが含まれていることが示された。その20年後には、 π メチルヒスチジンがミオシン軽鎖キナーゼ2 (MLCK2) に見つかったが、ヒスチジンメチル化を触媒する酵素の発見にはさらなる時間を要した。2010年、出芽酵母において、リボソームタンパク質 Rpl3 のヒスチジン残基をメチル化する酵素として Hpm1 が同定されると、2018年にはそれまでリジンメチル化酵素と考えられていた SETD3 が、アクチンのヒスチジン残基をメチル化することが報告された。ただし両者はいずれもヒスチジン τ メチル化を触媒する酵素であり、 π メチル化を担う酵素は見つかっていなかった。そこで我々は、未知のヒスチジン π メチル化酵素の探索に着手することとした。

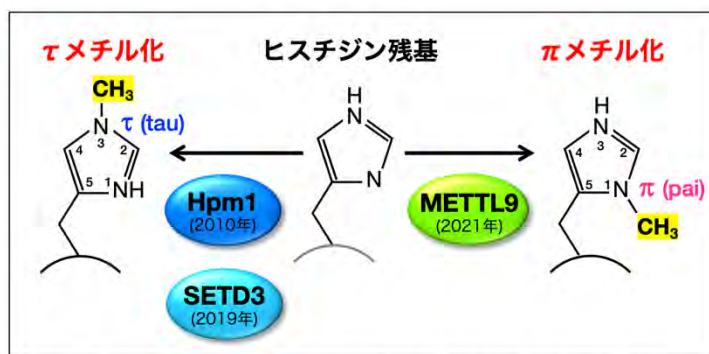


図1. ヒスチジン残基のメチル化修飾様式と触媒酵素

2) ヒスチジンメチル化の検出方法の確立

ヒスチジンメチル化酵素の発見を遅らせた理由の一つは、ヒスチジンメチル化修飾を高感度かつ特異的に検出する方法が確立されていないことにあった。そこで我々は、メチル基がリン酸基やアセチル基とは異なり、タンパク質の加水分解処理後でもメチルアミノ酸の形で残存することに着目し、“ヒスチジンメチル化タンパク質”を検出するのではなく、タンパク質をアミノ酸レベルまで分解し、“メチルヒスチジン”として液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて定量する方法を考案した (図2)。この方法はメチルヒスチジンを直接イオン化して測定するため極めて感度が高く、さらに MS/MS にてメチルヒスチジンを開裂させて得られるプロダクトイオンの違いから、原理的には τ 型

と π 型のメチル化を見分けることが可能である。その検証のため、ヒスチジン残基の π メチル化が報告されている Ca^{2+} 結合タンパク質の S100A9 を

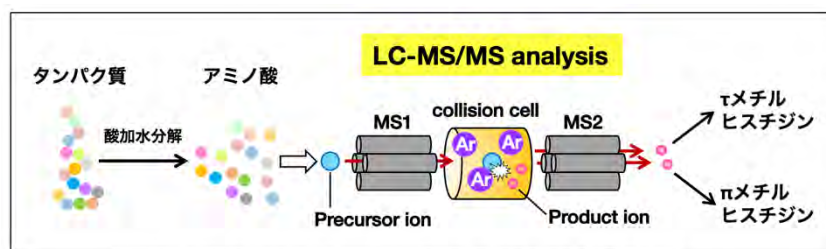


図2. 質量分析計によるメチルアミノ酸の検出

HEK293T 細胞に過剰発現させ、免疫沈降で精製した後に酸加水分解を行い、これを LC-MS/MS で測定した。その結果、期待通り π メチルヒスチジンのピークが強く検出されたことから、我々はこの検出方法と siRNA スクリーニングを組み合わせることで、HEK293T 細胞内に発現するヒスチジン π メチル化酵素の同定を試みた。

3) 新規ヒスチジン π メチル化酵素 METTL9 の同定とメチル化の機能的意義

配列情報からメチル化酵素と予想される機能未知の 21 遺伝子に対して siRNA スクリーニングを行った結果、METTL9 遺伝子のノックダウンにおいて S100A9 の π メチルヒスチジンレベルの顕著な低下が認められた。METTL9 は典型的な 7- β ストランド型メチル化酵素であり、ヒトから線虫に至る真核生物に保存されている。我々は放射性同位体ラベルした S-アデノシルメチオニン (SAM) を用いた *in vitro* メチル化実験で、METTL9 が直接 S100A9 をメチル化することを証明し、さらにこのメチル化部位が先行報告で示されていた 107 番目のヒスチジン (H107) であることを明らかにした。また METTL9 は N 末端にシグナルペプチド様の疎水性アミノ酸に富む α -ヘリックスを有し、細胞内では小胞体に局在するが、この配列を欠失させても小胞体局在および S100A9 のメチル化に影響はなかった。

Ca^{2+} 結合タンパク質である S100A9 は白血球の一種である好中球に豊富に発現し、同じファミリーの S100A8 とカルプロテクチンと呼ばれるヘテロ二量体を形成して、自然免疫や炎症応答に寄与している。S100A9 のヒスチジン π メチル化がヘテロ二量体形成に影響を与えるか検証するため、METTL9 をノックダウンした細胞から調製した S100A9 と大腸菌で発現させた S100A8 との結合実験を行った。METTL9 ノックダウンで S100A9 のメチル化レベルは顕著に低下したが、S100A8 との結合に変化はみられなかった。一方、S100A9 は C 末端側に 2 つの Zn^{2+} 結合モチーフ (HxxxH ; x は任意のアミノ酸) を有するが、興味深いことに METTL9 によるメチル化部位が HxxxH モチーフと重複することから (図 3)、S100A9 のメチル化が Zn^{2+} 結合活性に与える影響を検証した。その結果、H107 を π メチルヒスチジンに置換したペプチドでは、非修飾ペプチドに比べて Zn^{2+} に対する結合活性が有意に低下した。

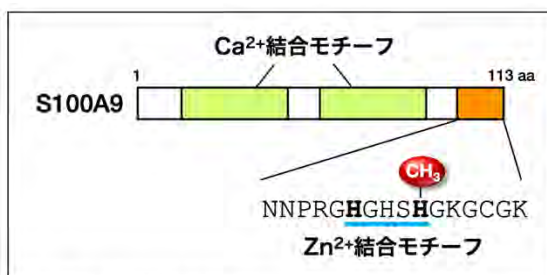


図3. S100A9の構造とヒスチジンメチル化部位

S100A9 は細菌の増殖に必須な Zn^{2+} をキレートすることで、細菌感染防御に寄与することから、この機能の調節に METTL9 によるヒスチジン π メチル化が関与する可能性が考えられた (*J. Biol. Chem.* 101230, 2021)。

4) ヒスチジンメチル化研究の動向と今後の展望

METTL9 に関しては、同年、我々に先行して欧州の国際共同研究グループからも報告されており、METTL9 が繰り返しヒスチジン配列 (HxH) をもつ様々なタンパク質を π メチル化することや、*Mettl9* ノックアウトマウスの各組織において、 π メチルヒスチジンレベルが著しく低下することが示されている。また最近では、酵母 *Hpm1* のヒトオルソログである METTL18 も ϵ 型のヒスチジンメチル化酵素であることが報告されている。一方、最新のプロテオミクス解析によると、HeLa 細胞には 254 種類ものヒスチジンメチル化タンパク質が同定されていることから、細胞内においてヒスチジンメチル化修飾が、リジンやアルギニンのメチル化と同様に普遍的な翻訳後修飾であることが示唆される。

ヒスチジンメチル化研究は今まさに黎明期にある。我々はこれまでのアルギニンメチル化研究で培った技術や知識を総動員し、さらに線虫 *C. elegans* とマウスという二つの異なるモデル動物の利点を生かすことで、ヒスチジンメチル化修飾の生物学的な意義を世界に先駆けて明らかにしていきたい。また現在、並行してアルギニンメチル化修飾に関する研究も継続しており、そこでは従来の酵素と基質の関係性に加えて、メチル化されたタンパク質が分解された後に生じるメチルアミノ酸の生理活性にも着目している。我々が研究対象としているメチル化反応は、SAM をメチル基供与体として利用する。SAM は必須アミノ酸であるメチオニンから生合成されるが、メチル化以外にも代謝中間体として、システインやポリアミンの材料となっている (図 4)。したがって、食品や栄養という視点からタンパク質メチル化修飾の全体像を俯瞰することも、我々「代謝ダイナミクス」プロジェクトが取り組むべき重要な課題であると考えている。

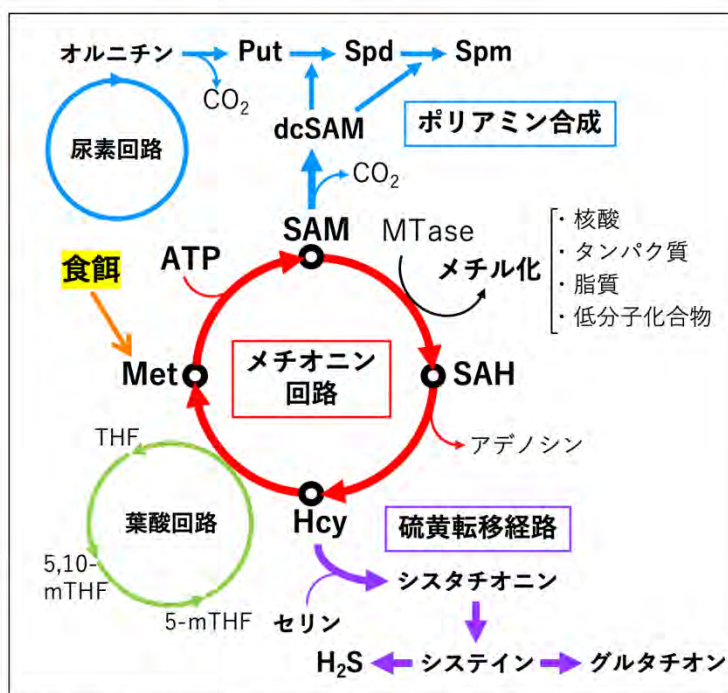


図 4. メチオニン回路と硫黄転移経路およびポリアミン経路

2021年度研究業績

原著論文（全て査読あり）

Dinh TTH, seki H, Mizuno S, Iijima-Mizuno S, Tanimoto Y, Daitoku Y, Kato K, Hamada Y, Hassan ASH, Suzuki H, Murata K, Muratani M, Ema M, Kim JD, Ishida J, Fukamizu A, Kato M, Takahashi S, Yagami KI, Wilson V, Arkell RM and Sugiyama F.

Distruption of entire *Cables2* locus leads to embryonic lethality by diminished *Rps21* gene expression and enhanced p53 pathway.

Elife 10: e50346 (2021)

Watabe E, Togo-Ohno M, Ishigami Y, Wani S, Hirota K, Kimura-Asami M, Hasan S, Takei S, Fukamizu A, Suzuki Y, Suzuki T, and Kuroyanagi H.

m6A-mediated alternative splicing coupled with nonsense-mediated mRNA decay regulates SAM synthetase homeostasis.

EMBO J. e106434 (2021)

Satou-Kobayashi Y, Kim JD, Fukamizu A and Asashima M.

Temporal transcriptomic profiling reveals dynamic changes in gene expression of *Xenopus* animal cap upon activin treatment.

Sci. Rep. 11(1):14537 (2021)

Daitoku H, Someya M, Kako K, Hayashi T, Tajima T, Haruki H, Sekiguchi N, Uetake T, Akimoto Y and Fukamizu A.

siRNA screening identifies METTL9 as a histidine N π -methyltransferase that targets the pro-inflammatory protein S100A9.

J. Biol. Chem. 101230 (2021)

Uchiyama C, Fukuda A, Mukaiyama M, Nakazawa Y, Kuramochi Y, Muguruma K, Arimoto M, Ninomiya A, Kako K, Katsuyama Y, Konno S, Taguchi A, Takayama K, Taniguchi A, Nagumo Y, Usui T, Hayashi Y.

Structural revision of natural cyclic depsipeptide MA026 established by total synthesis and biosynthetic gene cluster analysis.

Angew Chem. Int. Ed. Engl. 60, 8792-8797. (2021)

Ozawa K, Shinkai Y, Kako K, Fukamizu A, and Doi M.

The molecular and neural regulation of ultraviolet light phototaxis and its food-associated learning

behavioral plasticity in *C. elegans*.

Neurosci. Lett. 770, 136384. (2022)

学会発表等

口頭・ポスター発表

加香 孝一郎、植竹 徹、秋元 佑斗、有本 光江、大徳 浩照、深水 昭吉

“質量分析を応用したメチル化タンパク質のシームレスな探索法の開発”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.3.Web 開催

笠井 郁也、石田 純治、室町 直人、野口 和之、金 俊達、深水 昭吉

“遺伝子発現プロファイリングから探る、心腎連関病態の H3 アゴニストによる病態改善メカニズム”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

春木 陽香理、大徳 浩照、田島 達也、加香 孝一郎、深水 昭吉

“線虫の新規ヒスチジンメチル化酵素 METL-18 の自己メチル化と生物学的意義の解析”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

松田 紘奈、石田 純治、室町 直人、深水 昭吉

“ヒトアンジオテンシノーゲン外来遺伝子のマウスゲノム挿入部位の同定”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

染谷 百香、大徳 浩照、加香 孝一郎、深水 昭吉

“siRNA スクリーニングによる新規ヒスチジンメチル基転移酵素の探索”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

張 文瑜、田島 達也、大徳 浩照、染谷 百香、加香 孝一郎、深水 昭吉

“線虫を用いたタンパク質アルギニンモノメチル化酵素の同定と機能解析”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

田島 達也、大徳 浩照、加香 孝一郎、張 文瑜、秋元 佑斗、深水 昭吉

“線虫の精子特異的タンパク質におけるアルギニンメチル化制御機構の解析”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

ポスター発表

森 遥佳、金 俊達、石田 純治、深水 昭吉

“二重酵素活性を有する PRMT8 の活性変異マウスの作製と機能解析”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

中村 夏奈子、金 俊達、権 哲源、深水 昭吉

“心臓における METTL18 を介したヒスチジンメチル化の生物学的意義の解明”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

大徳 浩照、染谷 百香、加香 孝一郎、関口 直希、深水 昭吉

“METTL9 は S100A9 を基質とするヒスチジン N^{π} 型のヒスチジンメチル化酵素である”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

室町 直人、石田 純治、野口 和之、深水 昭吉

“心腎連関モデルマウスの初期心腎機能・障害の解析”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

関口 直希、大徳 浩照、染谷 百香、加香 孝一郎、深水 昭吉

“ N^{π} ヒスチジンメチル化酵素 METTL9 の糖鎖修飾とその役割の解析”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

岸川 奈那、金 俊達、石田 純治、深水 昭吉

“脂肪組織形成における METTL18 を介したヒスチジンメチル化に関する研究”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

秋元 佑斗、加香 孝一郎、大徳 浩照、深水 昭吉

“LC-MS/MS を用いたヒスチジンメチル化ペプチドの金属結合活性の検討”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

植竹 徹、加香 孝一郎、有本 光江、春木 陽香理、大徳 浩照、深水 昭吉

“線虫のヒスチジンメチル化タンパク質の探索法の確立”

第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4.Web 開催

石田 純治、松田 紘奈、金 俊達、深水 昭吉

“高血圧妊娠仔 FGR の遺伝子発現の特質解析”

第 94 回日本生化学会大会.

2021.11.4.Web 開催

林 岳宏、大徳 浩照、加香 孝一郎、植竹 徹、深水 昭吉
“ヒストンの球状ドメインにおけるメチル化修飾の解析”
第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4. Web 開催

姚 遠、金 俊達、大徳 浩照、室町 直人、石田 純治、深水 昭吉
“Study on the effect of H179Y one-point mutation in murine PRMT1 on biological functions”
第 94 回日本生化学会大会. 2021.11.4. Web 開催

姚 遠、金 俊達、大徳 浩照、室町 直人、石田 純治、深水 昭吉
“Effect of H179Y substitution from mouse to human PRMT1 on biological functions”
Tsukuba Conference 2021.9.30. Web 開催

室町 直人、石田 純治、野口 和之、深水 昭吉
“心腎連関モデルマウスの病態初期での心腎機能・障害の解析”
CVEM2021. 2021.12.10. Web 開催

受賞

田島 達也
第 94 回日本生化学会大会 若手優秀発表賞

姚 遠
Tsukuba Conference 2021 Outstanding Speaker Award
筑波会議 2021 ヒューマンバイオロジー学位プログラム 優秀発表賞

染谷 百香
生物資源科学学位プログラム 修士論文優秀賞

笠井 郁也
フロンティア医科学学位プログラム 優秀論文賞

アウトリーチ

深水 昭吉
第 94 回日本生化学会大会 会頭

加香孝一郎

令和3年度筑波大学公開講座「構造から探る生命のダイナミクス」(オンライン講座)
筑波大学 生存ダイナミクス研究センター (令和3年7月27日)

学会および社会的活動

深水 昭吉

日本生化学会・常務理事, 日本心血管内分泌代謝学会・理事、日本高血圧学会・評議員, 日本妊娠高血圧学会・代議員

東北大学 学際科学フロンティア研究所 (運営協議会委員)

独立行政法人大学改革支援・学位授与機構 (国立大学教育研究評価委員会専門委員)

筑波大学 医学医療系トランスボーダー医学研究センター (評価委員会委員)

公益財団法人 日本応用酵素協会 (選考委員)

公益財団法人 東京生化学研究会 (選考委員)

公益財団法人 住友財団 (選考委員)

国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST) 「創発的研究支援事業」(水島パネル) アドバイザー

国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST) さきがけ「ERATO 鈴木 RNA 修飾生命機能プロジェクト」運営・評価委員会分科会 委員

国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST) さきがけ「エピジェネティクスの制御よ生命機能」追跡評価 委員長

公益財団法人 国際科学振興財団 (兼任研究員)

一般社団法人 キャノン財団研究助成 (選考委員)

Swiss National Science Foundation (SNSF, Swiss) Grant Scientific Evaluation

科学研究費補助金・外部資金獲得状況

深水 昭吉

研究種目名：共同研究費 (宇部興産)

研究課題名：部材を用いる細胞培養に関する研究

研究期間：2014年度～2021年度

研究種目名：奨励金・研究助成 (宇部興産)

研究課題名：「生物機能の研究」に関する研究助成

研究期間：2014年度～2021年度

研究種目名：研究助成 (武田科学振興財団：特定研究助成)

研究課題名：遺伝情報の定量解析から捉える心腎ネットワークの基盤的研究

研究期間：2020年度～2023年度

研究種目名：AMED-CREST「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」

研究課題名：不可逆的タンパク質メチル化を介した進行性および加齢性心腎障害の分子基盤

研究期間：2021年度～2026年度

石田 純治

研究種目名：基盤研究（C）

研究課題名：遺伝子-生理情報の定量解析から紐解く心腎連関の病態形成ネットワーク

課題番号：21K05986

研究期間：2021年度～2023年度

大徳 浩照

研究種目名：基盤研究（B）

研究課題名：ヒスチジンメチル化酵素 METLL9 の活性制御機構と生物学的意義の解明

課題番号：20H02947

研究期間：2020年度～2023年度

研究種目名：奨励金・研究助成（ニチリョー）

研究課題名：細胞応答機能に関する研究

研究期間：2018年度～2021年度

田島 達也

研究種目名：若手研究

研究課題名：線虫の精子特異的なタンパク質のアルギニンメチル化による制御機構の解析

課題番号：20K15799

研究期間：2020年度～2022年度