

ナンセンスコドン介在的 mRNA 分解（NMD）と共役した 選択的スプライシングによる遺伝子発現の制御

黒柳 秀人

筆者らは、線虫のナンセンスコドン介在的 mRNA 分解（NMD）欠損変異株を利用して、全長 mRNA の直接シーケンシング解析により、NMD の基質となるスプライスバリエントの網羅的探索を行い、259 遺伝子の 289 バリエントを同定した。このうち、S-アデノシル-L-メチオニン（SAM）合成酵素をコードする *sams* 遺伝子群では、SAM の濃度に応じて 3' スプライス部位の AG ジヌクレオチドのアデニン塩基が N⁶-メチルアデノシン（m⁶A）修飾を受けることで発現量が間接的にフィードバック制御されるという新奇の制御機構の発見に至った。本稿では、直接 RNA シーケンシング解析を利用した mRNA 全長配列解析や *sams* 遺伝子の発現量の選択的スプライシングによる制御の意義などについて概説する。

1. はじめに

真核多細胞生物における mRNA 前駆体の選択的スプライシングは、タンパク質の多様性に寄与するのみではなく、中途の終止コドン（premature termination codon：PTC）を持つ mRNA をあえて産生することによって遺伝子の発現量を制御するものがある。しかし、PTC を持つ mRNA のスプライスバリエントはナンセンスコドン介在的 mRNA 分解（nonsense-mediated mRNA decay：NMD）と呼ばれる品質管理機構により速やかに分解されるため、一般的に不安定でほとんど検出されない。酵母や線虫を用いた遺伝学的な解析により、進化的に保存された必須の NMD 因子として UPF1、UPF2 および UPF3 などが同定された。さまざまな生物で、NMD が欠損する状態で安定化される mRNA を探索することにより、snoRNA のホスト遺伝

子、偽遺伝子、長鎖非コード遺伝子、ウイルス遺伝子などの他、一部の mRNA スプライスバリエントが天然の NMD 基質として同定された。多くのスプライシング制御因子では、NMD と共役した選択的スプライシングにより自身の遺伝子の発現量を負に自己制御することが知られている。

NMD と共役した選択的スプライシング制御の研究のモデルに線虫 *Caenorhabditis elegans* を利用する利点として、NMD 因子群が生存や生殖に必須でないために、天然の NMD 基質を個体レベルでゲノムワイドに探索できる点があげられる。線虫のゲノムは脊椎動物などの高等動物と同様にイントロンに富んでおり、少なくとも 25% 以上のタンパク質遺伝子が何らかの選択的 mRNA スプライシングを受ける。初期に行われたスプライスバリエント感受性マイクロアレイ解析により、線虫で NMD と共役した選択的スプライシングを受ける遺伝子が 30 個以上同定された。筆者らは、線虫で UPF1 をコードする *smg-2* 遺伝子の変異体の大規模 RNA シーケンシング（RNA-seq）解析を行い、リボソームタンパク質をコードする 80 個の遺伝子のうち 8 個が NMD と共役した選択的スプライシングにより発現量を負に自己制御することを報告した¹⁾。近年では、長寿の表現型を示す変異体線虫やカロリー制限により寿命が延長した線虫において NMD と共役した選択的スプライシングが重要な役割を果たすことが示され、RNA-seq 解析により長寿に関連した選択的スプライシングが同定されている。しかし、リード長が短い RNA-seq 解析では、そのような天然の NMD 基質となる mRNA の全長の配列を正確に再構成

琉球大学大学院医学研究科生化学講座（〒903-0215 沖縄県中頭郡西原町字上原 207 番地）

Comprehensive analysis of alternative splicing coupled with nonsense-mediated mRNA decay (AS-NMD) in *C. elegans*

Hidehito Kuroyanagi (Department of Biochemistry, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Nishihara-cho, Okinawa 903-0215, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940868

© 2022 公益社団法人日本生化学会

することが困難であった。

mRNAの転写後の塩基修飾は、遺伝子発現における新しい階層の制御機構となっている。そのような塩基修飾の一つである N^6 -メチルアデノシン (m^6A) 修飾は、高等真核生物のmRNAの内部修飾において最も高頻度に見られるものである。一般に m^6A 修飾は可逆的であり、“writer”と呼ばれるメチル基転移酵素がmRNAをメチル化し、“eraser”と呼ばれる脱メチル化酵素がmRNAを脱メチル化する。mRNA中の m^6A 修飾のほぼすべては、methyltransferase-like 3 (METTL3)/METTL14のヘテロ二量体からなるコアと他の制御サブユニットを含む複合体により形成される。 m^6A 修飾は、RNAの局所的な構造を変化させてRNA結合タンパク質との相互作用を変化させたり、YTHDC1, YTHDF1やYTHDF2などの“reader”と呼ばれるタンパク質による特異的な認識を介してmRNAのスプライシング、核外輸送、翻訳開始や安定性に影響を与えたりする。RNA中の m^6A 修飾は、eraserであるFTOやALKBH5によって除去される。しかし、線虫においては上述のような m^6A writer, eraserやreaderのオルソログ遺伝子がゲノム中に見当たらず^{2,3)}、生化学的解析でもmRNAの m^6A 修飾は限定的であることが示された。したがって、mRNAの m^6A 修飾が線虫のmRNA制御においてどのような役割を果たしているかについては不明であった。

2. 線虫のNMDアイソフォームの全長配列の解析

筆者らは、線虫で発現する天然のNMD基質となるmRNAアイソフォームの全長配列を網羅的に明らかにするために、線虫でUPF1をコードする*smg-2*遺伝子の変異体のL1ステージ幼虫から調製したポリ(A)⁺RNAを用いて、Nanopore MinIONプラットフォームで長リード直接RNAシーケンシング解析を行った⁴⁾。140万超のリードが線虫のゲノムにマップされ、少なくとも三つの長リードと以前のRNA-seqデータ^{1,5,6)}に支持される12,517種類のmRNAアイソフォームが8028遺伝子から同定された。一方、比較として野生型株N2のさまざまな発生段階のポリ(A)⁺RNAの直接RNAシーケンシングデータ等^{1,5,7)}に同様の解析を行うと、351万超のリードがゲノムにマップされ、11,331遺伝子から18,376種類のmRNAアイソフォームが同定された。二つの株で共通に検出された6642個の遺伝子についてみると、*smg-2*変異体では解析したステージやリード数が限られているにもかかわらず、野生型株やWormBaseの予測にはない700個以上の新しいエクソン-エクソン境界リードが検出されており、*smg-2*変異体では通常では存在しないスプライスバリエーションが安定化していることが示唆された。

複数のスプライスバリエーションがあり少なくとも10リード以上が検出された2931遺伝子の8701種類のmRNAバリエーションについて、*smg-2*変異体と野生型株で存在比率が異なるものを探索したところ、*smg-2*変異体で減少する208

遺伝子の219バリエーションと、*smg-2*変異体で増加する375遺伝子の420バリエーションを見いだした。mRNAが最初のAUGコドンから翻訳されると仮定すると、*smg-2*変異体で増加するバリエーションの3'非翻訳領域の長さの中央値は613塩基で、*smg-2*変異体で減少するバリエーション（中央値194塩基）や両株で少なくとも10リード以上検出された4366遺伝子の全10,136バリエーション（中央値218塩基）よりも有意に長かった。また、最下流のエクソン-エクソン境界から50塩基以上上流にある終止コドンをPTCだと仮定すると、*smg-2*変異体で増加するバリエーションの68.8%がPTCを持つものに対して、*smg-2*変異体で減少するバリエーションではたったの13.7%、検出されたすべてのバリエーション中でも28.1%のみがPTCを持っていた。*smg-2*変異体で増加しPTCを持つバリエーションがある12個の遺伝子について半定量的RT-PCRで解析したところ、イントロン保持型バリエーションが安定化された1遺伝子を例外として、PTCを持つバリエーションの*smg-2*変異体における安定化が確認された。これらの結果から、PTCを持ち*smg-2*変異体で増加する289個のバリエーションを産生する259個の遺伝子が、線虫においてNMDと共役した選択的スプライシングにより発現量が制御される遺伝子であると強く考えられた。

上述の259遺伝子について遺伝子オントロジー解析を行うと、RNAの翻訳やプロセッシングに関連した遺伝子の濃縮が明らかとなった。この結果は、哺乳類と線虫の両方においてリボソームタンパク質を含むRNA結合タンパク質の多くが自身の遺伝子発現をスプライシング段階で負に自己制御する、というこれまでの知見と整合するものである。

3. SAM合成酵素 (*sams*) 遺伝子の摂食と絶食による動的な選択的スプライシング制御

遺伝子オントロジー解析では、代謝に関連した遺伝子もNMDと共役した選択的スプライシングにより発現が制御される遺伝子として有意に濃縮されていた。そのような代謝関連遺伝子の解析の過程で、筆者らは、*smg-2*変異体における*sams-3*遺伝子、*sams-4*遺伝子と*sams-5*遺伝子のバリエーションのうちPTCを持ちNMDで分解されるものの比率が、孵化したばかりのL1幼虫の摂食によって急上昇し、その後の絶食によって元に戻ることを見いだした。これらの遺伝子の発現が摂食状態に応じてスプライシング段階で動的に制御されることに何らかの生物学的意義があると考えられたことから、これらの遺伝子のスプライシング制御について、さらに詳しく解析することとした。

*sams*遺伝子はL-メチオニンとアデノシン三リン酸(ATP)からSAMを生成するSAM合成酵素をコードする遺伝子ファミリーである。線虫のゲノムには五つのファミリー遺伝子がコードされている(図1)。*sams-3*と*sams-4*は互いに最も塩基配列の相同性が高く(*sams-3*と*sams-4*の間で87.5%の塩基配列同一性)、エクソン構造も保存されている。*sams-5*もこれらとエクソン構造および選択的スプ

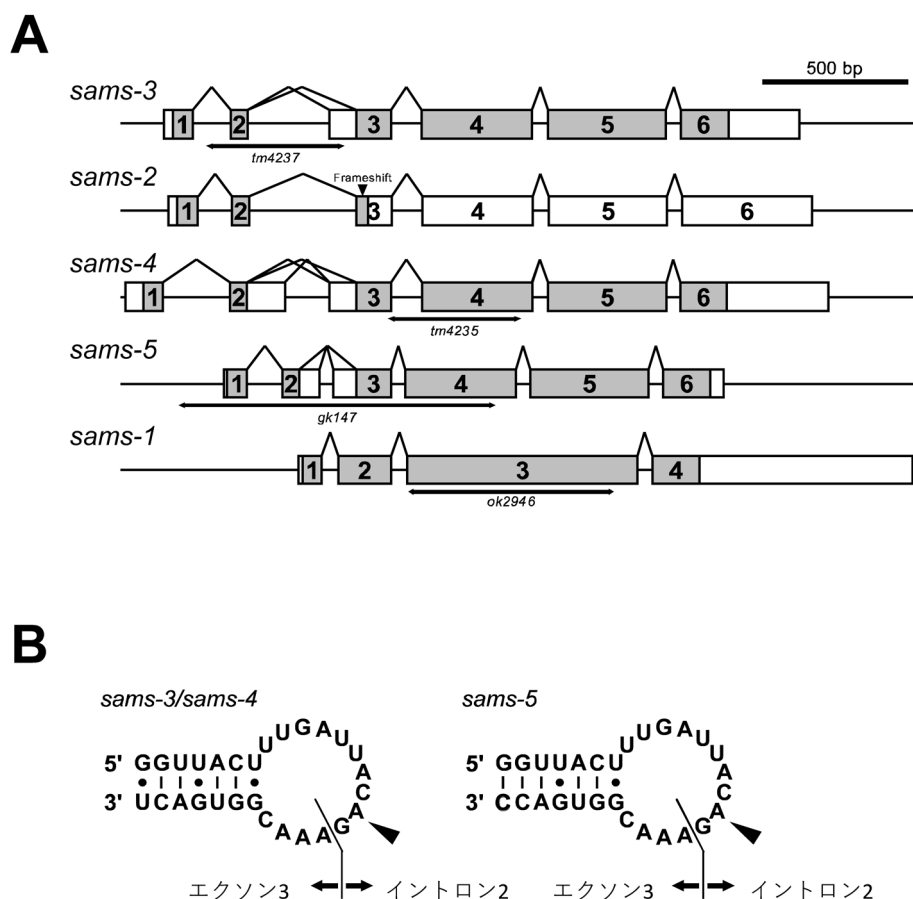


図1 *sams* 遺伝子の構造

(A) 線虫の *sams* 遺伝子の構造の模式図。箱はエクソンを表す。コード領域は灰色。*sams-2* 遺伝子のコード領域は PTC により短縮されていることに留意。両向き矢印は変異体株で欠損する領域を示す。(B) *sams-3/sams-4* 遺伝子 (左) および *sams-5* 遺伝子 (右) の mRNA 前駆体の遠位 3' スプライス部位周辺で予測されるヘアピン構造。イントロン 2 とエクソン 3 の境界を図中に示す。矢尻は m⁶A 修飾されるアデニンを示す。

ライシングパターンが保存されている。筆者らは、これら三つの遺伝子で選択的スプライシング制御を受けるイントロン 2 の塩基配列がイントロンとしては異例に配列が保存されていることを見いだした。対照的に、*sams-1* 遺伝子はイントロン 2 を欠いており、構成的に発現すると考えられた。*sams-2* 遺伝子は *sams-3* 遺伝子と最も同一性が高い (ゲノム全体で 94.2% の同一性) が、エクソン 3 にフレームシフト変異があることから偽遺伝子と考えられ、イントロン 2 の近位の 3' スプライス部位に塩基置換変異があることから、構成的なスプライシングを受けると考えられた。

摂食による *sams* 遺伝子の選択的スプライシングパターンの変化にタンパク質の新規合成が必要か確かめるために、タンパク質合成阻害剤エメチンの存在下で *smg-2* 変異体到大腸菌を与えたところ、脂肪酸不飽和化酵素をコードする *fat-7* 遺伝子の誘導と中鎖脂肪酸-アシル CoA 合成酵素をコードする *acs-2* 遺伝子の抑制は完全に抑圧された一方、*sams* 遺伝子のスプライスバリエーションの量と比率の変化はある程度まで誘導された。この結果から、*sams* 遺伝子の摂食による動的な選択的スプライシング制御には、摂食に伴う新規のタンパク質合成を必要としないことがわかった。

4. SAM 合成酵素 (*sams*) 遺伝子の選択的スプライシングのフィードバック制御

sams 遺伝子の NMD と共役した選択的スプライシング制御の生物学的な意義に迫るため、SAM 合成酵素活性が SAM 合成酵素の発現を自己制御するかどうかを調べた。*sams-1* 遺伝子は構成的に発現することから、*smg-2* 変異体背景で *sams-1* 遺伝子と *sams-5* 遺伝子の二重破壊株における *sams-3* 遺伝子と *sams-4* 遺伝子の選択的スプライシングパターンを調べたところ、摂食前では *smg-2* 変異体と *smg-2* ; *sams-5* ; *sams-1* 三重変異体でそれほど違いがみられなかったが、摂食後ではタンパク質をコードするバリエーションの比率と量が *smg-2* ; *sams-5* ; *sams-1* 三重変異体で明らかに多くなっていた。また、SAM 合成酵素の競合阻害剤であるシクロロイシンの投与によりわずかに有意にタンパク質を産生する *sams-3* バリエーションの比率と量が増加した。これらの結果から、SAM 合成酵素活性が *sams-3* 遺伝子と *sams-4* 遺伝子の NMD と共役した選択的スプライシングを制御していることが明らかとなった。

SAM 合成酵素をコードするバリエーションの量の増加が実際に SAM 合成酵素タンパク質の量の増加につながってい

るかどうかについて、四つの *sams* 遺伝子産物を区別できる抗体を用いてウェスタンブロット法で確認したところ、*smg-2* 変異体では SAMS-3 タンパク質と SAMS-4 タンパク質の量が幼虫発生期を通じて一定であったのに対し、*smg-2 ; sams-5 ; sams-1* 三重変異体では SAMS-1 と SAMS-5 の欠損を補償するように幼虫発生期に次第に増加した。同様の SAMS-3 と SAMS-4 の mRNA とタンパク質の増加は、野生型背景の *sams-1* 単独変異体でもみられた。これらの結果から、線虫における SAM 合成酵素活性の恒常性は、NMD と共役した *sams* 遺伝子の選択的スプライシング制御により維持されていることが明らかとなった。

5. METT-10 が生体で摂食に応答した *sams* 遺伝子の選択的スプライシングを制御する

SAM はタンパク質、DNA、RNA、脂質などをメチル化するさまざまなメチル基転移酵素の反応においてメチル基の主要な供与体であることから、筆者らは、SAM 合成酵素活性の変動による *sams* 遺伝子の選択的スプライシングパターンの変動は特定の基質分子のメチル化レベルの変動を介したものと推測した。メチル化修飾されたヒストンがスプライシング制御因子をリクルートしたり転写の速度に影響したりすることで選択的スプライシングパターンが変化する例が哺乳類で知られていたことから、クロマチン免疫沈降-大規模シーケンス (ChIP-seq) 法でヒストン H3 の K4 のジメチル化、K27 のトリメチル化および K36 のトリメチル化を調べてみたが、*smg-2* 変異体と *smg-2 ; sams-5 ; sams-1* 三重変異体で *sams-3* 遺伝子座と *sams-4* 遺伝子座での選択的スプライシングを受けるエクソンのメチル化状態に有意な差異はみられなかった。

次に、*sams* 遺伝子の mRNA 前駆体自体のメチル化を推測した。高等真核生物の mRNA の内部にみられる最も豊富な化学修飾は m⁶A 修飾であるが、線虫ゲノムは哺乳類の mRNA の m⁶A 修飾のほとんどを担う METTL3、METTL14 などのメチル基転移酵素複合体の構成因子のオルソログ遺伝子を欠いている^{2,3)}。一方、哺乳類において別のメチル基転移酵素 METTL16 が、ヒトで SAM 合成酵素をコードする *MAT2A* 遺伝子の 3' 非翻訳領域の 6 個のヘアピン構造のループ内にある UACAGARAA というコンセンサス配列の下線部の m⁶A 修飾を特異的に触媒することが、近年に相次いで報告されていた⁸⁻¹⁰⁾。筆者らは、*sams-3* 遺伝子、*sams-4* 遺伝子および *sams-5* 遺伝子の mRNA 前駆体が METTL16 のコンセンサス配列をループ内に持つヘアピン構造をとりうること、しかも、m⁶A 修飾を受けるアデニンがまさに選択的スプライシングを受けて SAM 合成酵素を生成するための遠位 3' スプライス部位にある不変の AG ジヌクレオチドの A の位置に当たることに気がついた。そこで、METTL16 の線虫オルソログである METT-10 が生体で *sams-3* 遺伝子、*sams-4* 遺伝子および *sams-5* 遺伝子の選択的スプライシング制御に関与するか調べた。すると、摂食に

より誘導される NMD 基質となるスプライスバリエーションの量は、*smg-2* 単独変異体と比べて *smg-2 ; mett-10* 二重変異体で大きく減少していた。この結果は、METT-10 が *sams* 遺伝子の選択的スプライシングを、5' スプライス部位からみて遠位にありタンパク質をコードするバリエーションを産生するための 3' スプライス部位から、近位にあり NMD で分解されるバリエーションを産生するための 3' スプライス部位へ摂食に応答してシフトさせるのに必須であることを示している。野生型背景の *mett-10* 単独変異体においても、*sams-3* 遺伝子および *sams-4* 遺伝子でタンパク質をコードする mRNA スプライスバリエーションの量が増加し、それに応じて SAMS-3 タンパク質および SAMS-4 タンパク質も野生型と比べて増加していた。これらの結果から、METT-10 が *sams* 遺伝子の選択的スプライシングの摂食に応答した負のフィードバック制御に必須であることが確認された。

6. METT-10 は試験管内で *sams* 遺伝子の遠位 3' スプライス部位を特異的に m⁶A 修飾する

筆者らは次に、線虫の METT-10 が *sams* 遺伝子の mRNA 前駆体を直接かつ特異的にメチル化できるか調べた。*sams-3/sams-4* 遺伝子のイントロン 2 からエクソン 3 にまたがる 127 塩基の領域 (両者の配列は同一) の RNA を試験管内転写で調製して、組換え全長 METT-10 タンパク質または組換え METTL16 メチルトランスフェラーゼドメインタンパク質を用いて試験管内メチル化反応を行ったところ、予期したとおり、両組換えタンパク質は遠位 3' スプライス部位の AG のアデニンを SAM 依存的に特異的かつ効率的にメチル化した。

7. 内在性の *sams* 遺伝子 mRNA は遠位 3' スプライス部位に m⁶A 修飾を持つ

最後に、筆者らは内在性 *sams* 遺伝子 mRNA の m⁶A 修飾について調べた。潜在的な m⁶A 修飾部位はイントロン 2 の終端にあるため酵素をコードするバリエーションではスプライシングで除去されてしまうが、NMD 基質となるバリエーションでは遠位 3' スプライス部位は選択されずに成熟 mRNA 上に残っているはずである。m⁶A 修飾特異的な抗体を用いた RNA 免疫沈降と半定量的および定量的な RT-PCR の結果は、*sams-3* 遺伝子、*sams-4* 遺伝子、*sams-5* 遺伝子のすべてにおいて酵素をコードするバリエーションが相対的に減少し、NMD の基質となるバリエーションが濃縮されていたことから、*sams* 遺伝子 mRNA の NMD 基質バリエーションに特異的な領域に m⁶A 修飾部位が存在する、という仮説と合致した。

内在性 *sams* 遺伝子 mRNA の m⁶A 修飾についてさらに調べるため、先に述べた筆者らの RNA 直接シーケンシングのデータを活用した。比較のために、161 塩基の *sams-3/sams-4* 遺伝子 RNA および 163 塩基の *sams-5* 遺伝子 RNA を試験管内転写で調製し、さらに組換え METTL16 による試

試験管内メチル化反応で遠位3'スプライス部位のアデニンを特異的にm⁶A修飾したものを調製した。これら4種類の試験管内調製RNAをプールして、RNAがナノ小孔を通過する際に流れる電流を記録するNanopore社の直接RNAシーケンシング解析¹¹⁾にかけた。標準的な塩基決定アルゴリズムとマッピングにより*sams-3/sams-4*遺伝子RNAと*sams-5*遺伝子RNAの配列は区別されたが、それぞれをm⁶A修飾したものと未修飾のものでは、振動する電流の平均値や標準偏差、通過時間は、期待したほどにははっきりと区別できなかった。そこで、13種類のアルゴリズムを使用して試験管内調製RNAのm⁶A修飾状態を分類器に機械学習させ、内在性*sams*遺伝子のNMD基質となるスプライスバリエーションを分類させたところ、教師に用いたRNAの分類の正確性と同程度に相当する73~100%のリードがm⁶A修飾型であるとほとんどのアルゴリズムで判定された。これらの結果は、内在性*sams*遺伝子mRNAのNMD基質となるスプライスバリエーションの、すべてとはいわないまでもほとんどのmRNAにおいて、遠位3'スプライス部位がm⁶A修飾されていることを示している。

8. AGジヌクレオチドのm⁶A修飾による3'スプライス部位の認識の阻害

本研究成果は、3'スプライス部位の不変のジヌクレオチドであるAGのアデニンがm⁶A修飾されることで選択的スプライシングが制御されることを実験的に示した、すべての生物を通じて最初の例である。3'スプライス部位のAGは、タンパク質のヘテロ二量体からなる進化的に保存されたU2補助因子(U2 auxiliary factor: U2AF)の小サブユニットによって認識される。線虫では、3'スプライス部位のコンセンサス配列UUUUCAGが大サブユニットUAF-1と小サブユニットUAF-2からなるU2AFにより認識される。U2AF小サブユニットによる3'スプライス部位の認識機構については、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*におけるオルソログであるU2AF23と大サブユニットU2AF59の一部分からなる複合体によるRNA認識の結晶構造が解かれているのみであった^{12, 13)}。また、3'スプライス部位を模した配列5'-UUAGGU-3'-の2位のm⁶A修飾(UUm⁶AG-GU)により、U2AF23複合体との親和性が劇的に減少することが試験管内の実験で示された¹²⁾。3'スプライス部位のAGジヌクレオチドのm⁶A修飾が線虫UAF-2による3'スプライス部位の認識にも同様に影響するか明らかにするため、UAF-2と分裂酵母のU2AF23のアミノ酸配列相同性に基いて、UAF-2による5'-UAGGU-3'配列認識の3次元構造のモデリングを行った。m⁶A修飾によりメチル化される-2位のアデニン塩基のアミノ基は、UAF-2においてもZnフィンガードメイン1の表面ポケットに埋め込まれており、分裂酵母のU2AF23でポケットを構成するのと同じアミノ酸残基により密接に取り囲まれていた¹²⁾(図2)。このモデルは、m⁶Aのreaderタンパク質が存在しない線虫で

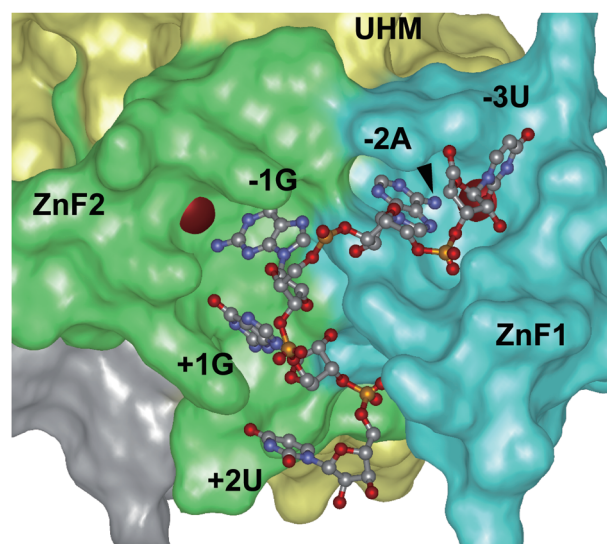


図2 線虫UAF-2による3'スプライス部位認識のモデリング
線虫のU2AFの小サブユニットであるUAF-2による5'-UAGGU-3'の認識のモデリング結果。このモデリングは、RNAに結合した分裂酵母のU2AF23/U2AF59複合体の立体構造¹²⁾およびUAF-2とU2AF23とのアミノ酸配列の相同性に基いている。N末端のZnフィンガー1(ZnF1)ドメイン、U2AFホモロジーモチーフ(UHM)ドメインおよびC末端のZnフィンガー2(ZnF2)ドメインがそれぞれ青、黄、緑に塗られている。赤色の球は亜鉛イオンを示す。m⁶A修飾でメチル化されるアミノ基(N⁶)の位置が矢尻で示されている。

も3'スプライス部位の不変のAGジヌクレオチドのm⁶A修飾により3'スプライス部位としての認識を阻害できる、という我々の遺伝学的実験結果とよく合致した。哺乳類のmRNA前駆体のm⁶A修飾による選択的スプライシングの制御については相反する結果が報告されているが、3'スプライス部位の不変のAGジヌクレオチドのm⁶A修飾については、まだ報告例がない。

9. 線虫におけるSAM合成酵素の恒常性制御のモデル

図3に、我々の実験結果に基づく線虫*sams*遺伝子のNMDと共役した選択的スプライシングによる恒常性維持機構のモデルを示す。SAMの濃度が低いときには、イントロン2の遠位の3'スプライス部位が未修飾のまま優先的に選択され、酵素をコードするmRNAが産生されて活性があるSAM合成酵素タンパク質に翻訳され、SAMレベルの上昇につながる。SAMの濃度が過剰なときには、メチル基転移酵素METT-10が遠位3'スプライス部位を特異的にm⁶A修飾することでスプライシングが阻害されて近位の3'スプライス部位が選択され、NMDの基質となるスプライスバリエーションが産生される。

筆者らのこの研究と同時期に、スイスUniversity of GenevaのRamesh Pillaiらの研究グループは、筆者らとは別のアプローチで、しかし、実質的にはまったく同じ結論に達した¹⁴⁾。彼らは抗m⁶A抗体を用いたRNA免疫沈降法により線虫でm⁶A修飾を持つRNAを濃縮し、*mett-10*変異体背

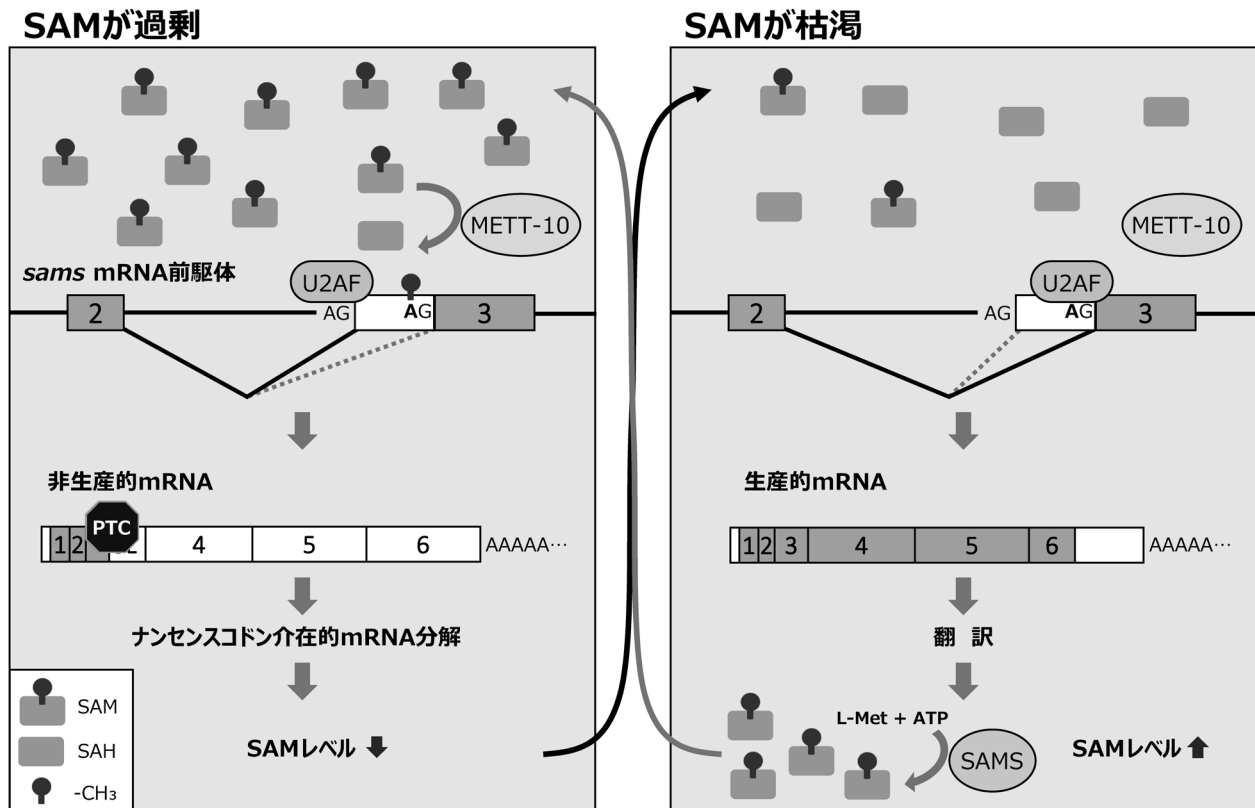


図3 線虫SAM合成酵素 (*sams*) 遺伝子の恒常性維持のための負のフィードバック制御モデル
詳細は本文を参照。

景と野生型背景で異なる濃縮を示す部位として *sams-3* 遺伝子, *sams-4* 遺伝子および *sams-5* 遺伝子の遠位3'スプライス部位を同定した。そして, *mett-10* 変異体ではこの遠位3'スプライス部位を選択するmRNAが増加することから, METT-10による遠位3'スプライス部位のAGのアデニンの m^6A 修飾によりスプライス部位の選択が阻害されることを示した。また, 試験管内でのメチル化反応により, METT-10によるこの遠位3'スプライス部位の認識にはRNAの局所的な二次構造が必要であることを示した。食餌である大腸菌の量によってもスプライスバリエーションの比率が変化することを示し, 大腸菌量が少ない場合でもメチオニンやビタミン B_{12} の添加によりスプライスバリエーションの比率が変化することも示した。 m^6A 修飾により分裂酵母のU2AFとの親和性が大きく低下すること, m^6A 修飾によりヒト培養細胞株抽出液による線虫 *sams* 遺伝子の試験管内スプライシング反応が阻害されることなども示した。彼らの論文ではNMDとスプライシング制御の関係については解析しておらず, 筆者らが行った実験とはほとんど重複がないものの, 実質的に同じ結論を支持しており, 不変の3'スプライス部位の m^6A 修飾による選択的スプライシングの制御という新奇の機構が独立の研究でそれぞれ生化学的・遺伝学的に明らかにされた点で大変興味深い。

10. 線虫におけるSAM合成酵素の恒常性制御のモデル

ヒトの培養細胞では, 先に述べたように, SAM合成酵素をコードする *MAT2A* 遺伝子のmRNAレベルが, SAMの濃度により2種類の機構で間接的にフィードバック制御されている。一つは, METTL16が *MAT2A* mRNAの3'非翻訳領域のヘアピン構造に結合することで, スプライシングされにくい最下流のイントロンのスプライシングを促すというもので, METTL16の酵素活性に依存せずヘアピンへの結合時間が延びることでSAM合成酵素をコードするmRNAの産生が促進される⁸⁾。もう一つは, SAM過剰時に3'非翻訳領域に位置する6個のヘアピン構造がMETTL16により m^6A 修飾されることで, 核内の m^6A “reader”タンパク質であるYTHDC1を介したmRNA分解が促進される^{9, 15)}。SAMはさまざまなメチル化反応において主要なメチル基の供与体であることから, さまざまな生物においてSAMレベルの維持が生物学的に重要であることが報告されている。今回の筆者らの論文を含め, さまざまな生物でSAM合成酵素の発現がSAMのレベルにより間接的にフィードバック制御を受けていることは, その恒常性維持の重要性を裏書きしている。

文 献

- 1) Takei, S., Togo-Ohno, M., Suzuki, Y., & Kuroyanagi, H. (2016) Evolutionarily conserved autoregulation of alternative pre-

- mRNA splicing by ribosomal protein L10a. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 5585–5596.
- 2) Arribere, J.A., Kuroyanagi, H., & Hundley, H.A. (2020) mRNA Editing, Processing and Quality Control in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **215**, 531–568.
 - 3) Cunningham, F., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Amode, M.R., Armean, I.M., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., et al. (2019) Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res.*, **47**(D1), D745–D751.
 - 4) Watabe, E., Togo-Ohno, M., Ishigami, Y., Wani, S., Hirota, K., Kimura-Asami, M., Hasan, S., Takei, S., Fukamizu, A., Suzuki, Y., et al. (2021) m⁶A-mediated alternative splicing coupled with nonsense-mediated mRNA decay regulates SAM synthetase homeostasis. *EMBO J.*, **40**, e106434.
 - 5) Son, H.G., Seo, M., Ham, S., Hwang, W., Lee, D., An, S.W., Artan, M., Seo, K., Kaletsky, R., Arey, R.N., et al. (2017) RNA surveillance via nonsense-mediated mRNA decay is crucial for longevity in daf-2/insulin/IGF-1 mutant *C. elegans*. *Nat. Commun.*, **8**, 14749.
 - 6) Kuroyanagi, H., Watanabe, Y., Suzuki, Y., & Hagiwara, M. (2013) Position-dependent and neuron-specific splicing regulation by the CELF family RNA-binding protein UNC-75 in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4015–4025.
 - 7) Roach, N.P., Sadowski, N., Alessi, A.F., Timp, W., Taylor, J., & Kim, J.K. (2020) The full-length transcriptome of *C. elegans* using direct RNA sequencing. *Genome Res.*, **30**, 299–312.
 - 8) Pendleton, K.E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O.V., Xie, Y., Tu, B.P., & Conrad, N.K. (2017) The U6 snRNA m⁶A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell*, **169**, 824–835.e14.
 - 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 N⁶-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep.*, **21**, 3354–3363.
 - 10) Duxtader, K.A., Wang, P., Scarborough, A.M., Seo, D., Conrad, N.K., & Nam, Y. (2018) Structural Basis for Regulation of METTL16, an S-Adenosylmethionine Homeostasis Factor. *Mol. Cell*, **71**, 1001–1011.e4.
 - 11) Garalde, D.R., Snell, E.A., Jachimowicz, D., Sipos, B., Lloyd, J.H., Bruce, M., Pantic, N., Admassu, T., James, P., Warland, A., et al. (2018) Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat. Methods*, **15**, 201–206.
 - 12) Yoshida, H., Park, S.Y., Sakashita, G., Nariyai, Y., Kuwasako, K., Muto, Y., Urano, T., & Obayashi, E. (2020) Elucidation of the aberrant 3' splice site selection by cancer-associated mutations on the U2AF1. *Nat. Commun.*, **11**, 4744.
 - 13) Yoshida, H., Park, S.Y., Oda, T., Akiyoshi, T., Sato, M., Shirouzu, M., Tsuda, K., Kuwasako, K., Unzai, S., Muto, Y., et al. (2015) A novel 3' splice site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit. *Genes Dev.*, **29**, 1649–1660.
 - 14) Mendel, M., Delaney, K., Pandey, R.R., Chen, K.M., Wenda, J.M., Vagbo, C.B., Steiner, F.A., Homolka, D., & Pillai, R.S. (2021) Splice site m⁶A methylation prevents binding of U2AF35 to inhibit RNA splicing. *Cell*, **184**, 3125–3142.e25.
 - 15) Bresson, S.M., Hunter, O.V., Hunter, A.C., & Conrad, N.K. (2015) Canonical Poly(A) Polymerase Activity Promotes the Decay of a Wide Variety of Mammalian Nuclear RNAs. *PLoS Genet.*, **11**, e1005610.

著者寸描

●黒柳 秀人 (くろやなぎ ひでひと)



琉球大学大学院医学研究科生化学講座教授。博士(理学)。

■略歴 1994年東京大学理学部卒業。99年同大学院理学系研究科修了。2000年東京医科歯科大学助手。03年同講師。08年同准教授。21年より現職。

■研究テーマと抱負 真核生物の遺伝子発現制御機構。特に、mRNA前駆体の転写後プロセッシングを制御する個体レベル

での「細胞暗号」の解明などの基礎研究と、遺伝子変異や遺伝子発現制御機構の破綻に起因する疾患の病態発現機序の解明および治療法の開発を目指して研究を展開している。

■ウェブサイト <http://biochem.med.u-ryukyu.ac.jp/>

■趣味 街歩き。