

研究終了報告書

「情報分子としてのメチオニンによる新規遺伝子発現制御の開拓」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：山下 由衣

1. 研究のねらい

高等植物のメチオニン生合成経路は、メチオニンの直接の代謝産物である *S*-アデノシルメチオニン (SAM) が事実上の最終産物である。私はこれまでに、メチオニン生合成のフィードバック調節の分子機構の研究に取り組んできた。その結果、メチオニン生合成の鍵段階を触媒する *CGS1* 遺伝子の発現が翻訳の段階で、SAM に応答して抑制される分子機構を明らかにした。一方で、これまでにこのフィードバック制御の適応的な意義は未解明である。本研究では、第 1 の課題として、①細胞内メチオニン濃度制御の適応的な意義の解明を目的と設定した。

また、本研究では、メチオニンに感受性を示す現象として、タンパク質の N 末端メチオニン除去機構に新規に着目した。遺伝子発現のセントラルドグマにおいてタンパク質合成を担う翻訳反応は、mRNA 上のメチオニンのコドン (AUG) から始まる。これは、翻訳開始機構上の都合であり、全タンパク質の約 3 分の 2 では、N 末端のメチオニンは、メチオニルアミノペプチダーゼ (MAP) によって除去される。この現象を N-terminal methionine excision (NME) と呼ぶ。細胞質で機能する MAP には 2 種類があり、MAP1 は原核生物と真核生物で保存されているが、MAP2 は真核生物にのみ存在する。私は申請前に、MAP を欠損したシロイヌナズナの生育が、メチオニンの投与によって顕著に阻害されることを発見した。このことは、MAP の欠損下で、メチオニンがなんらかの情報を持ち、細胞の生育を制御するメカニズムが存在を示唆する。本研究は、前述の①に加え、第 2 の課題として②タンパク質の N 末端メチオニンの除去という観点から、メチオニンの新機能を解明することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、植物におけるメチオニンの新機能を解明するために、研究テーマ①「植物におけるメチオニン蓄積制御の適応的意義の解明」と研究テーマ②「遊離メチオニンと NME 機構の関係」の 2 テーマに切り分けて遂行した。

研究テーマ①ではこれまでに見逃されていた、「植物におけるメチオニン蓄積制御の適応的意義の解明」を行なった。メチオニン過剰蓄積変異株は、先行研究で行われた通常条件での生育解析では野生型株とほぼ同等に育つ。そこで、本研究では、遺伝子発現の網羅的解析を用いてメチオニンが植物に与える影響を分子レベルで評価した。翻訳の網羅的解析 (トランスレートム解析) によって、細胞内メチオニン蓄積量が多い場合のみならず、*CGS1* 遺伝子の翻訳制御がメチオニン合成の恒常性維持に重要であることが示された。トランスクリプトーム解析では、より多くの遺伝子の発現変動が認められ、メチオニン投与およびメチオニン過剰蓄積株では無機栄養の利用効率に変化し恒常的なストレス状態にあることで適応度が低下していることが示唆された。栄養応答解析からも、細胞内遊離メチオニンの無機栄養利用効率への影響が支持された。テーマ①ではこの他に、メチオニンの酸化物の生理機能として、MetO₂ が細胞内タンパ

ク質を不安定化させ、植物の生育を阻害することが明らかになった。また、時空間分解能を持つメチオニン濃度センサー遺伝子を構築し、植物体内での発現に成功した。組織・細胞レベルでのメチオニン蓄積量制御の解明に資するものである。

研究テーマ②では「メチオニンと NME 機構の関係」に取り組んだ。これまでに幼植物へのメチオニンの投与実験から、NME を担う *MAP* 遺伝子の欠損株がメチオニンに感受性を示すことが明らかになっていた。本研究では、*MAP* 欠損株をメチオニンの過剰蓄積変異株と交配した。生活環を通じた表現型解析から、遊離メチオニンの蓄積量がより高い系統で、成長相転換や、生殖ステージにおける異常がみられた。稔性低下の原因の一つとして花粉数が低下している可能性が示唆された。これらのことから、メチオニンと NME 機構のクロストークが、植物の生活環を通じての個体の恒常性維持に寄与していると考えられる。2 重変異株の幼植物を用いたトランスクリプトーム解析では、葉緑体や低酸素応答、根の形態形成等のプロセスに異常があることが示された。幼植物の遺伝子発現プロファイルと生活環を通じた表現型の整合性については現段階では追求できていない。しかしながら、本研究は上記の表現型やプロセスを支配する遺伝子の中に、メチオニンの蓄積量に依存して NME が制御される遺伝子が存在するというモデルを示唆するものと考えている。

(2) 詳細

研究テーマ①「植物におけるメチオニン蓄積制御の適応的意義の解明」

有用植物の作出を目指して、シロイヌナズナの遊離メチオニンの過剰蓄積株がこれまでに単離されてきた。私はそのユニークな翻訳制御によるフィードバック調節機構に着目し、分子機構の解明に取り組んできた。本研究では、フィードバック調節機構、すなわち細胞内遊離メチオニン濃度を適切に保つことの適応的意義の解明を目的とした。

①-1. メチオニンを投与したシロイヌナズナにおける網羅的遺伝子発現解析

野生型シロイヌナズナを、メチオニンを投与した条件で生育させ、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実施した。加えて、メチオニン生合成のフィードバック調節が翻訳段階で起こることから、リボソームプロファイリング (Ribo-seq) によるトランスレートーム解析を実施した。

RNA 発現量が大きく変動した遺伝子としては約 800 遺伝子が検出された。一方で、翻訳量のみが変動した遺伝子は約 200 遺伝子が検出された。*CGS1* mRNA については顕著に翻訳が抑制されていた。このことから、SAM に応答した翻訳停滞の制御が *CGS1* mRNA 上で起こり、メチオニン生合成経路の恒常性が維持されていることが示唆された。以上の結果からメチオニン蓄積量制御における翻訳制御の重要性が改めて支持された。Ribo-seq のデータ解析は東京大学・反田直之氏との共同研究で実施した。

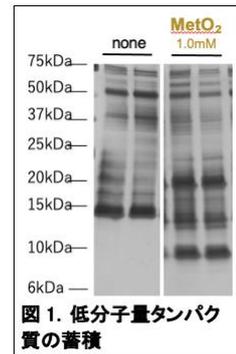
①-2. メチオニン過剰蓄積株におけるトランスクリプトーム解析と栄養応答解析

野生型株とメチオニン過剰蓄積株の幼植物を解析に供した。当該変異株のトランスクリプトーム、GO enrichment 解析結果は、酸化還元酵素等の GO term が濃縮されていた。さらに、無機栄養応答解析により、メチオニン過剰蓄積株の無機栄養欠乏に対する感受性が明らか

になった。したがって、メチオニン過剰蓄積株では無機栄養の利用効率が変化している可能性が示唆された。

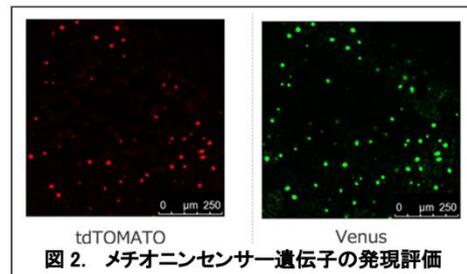
①-4. メチオニンの酸化物の解析

本研究の申請の段階で、これまでに生理機能が報告されていない、遊離メチオニンの酸化物 (MetO、MetO₂) の作用の検証を提案した。寒天培地からの投与実験により検証した。MetO の投与は生育に特に影響を与えなかったが、MetO₂ の投与は発芽、生育阻害と植物体の黄化を引き起こした。タンパク質中のメチオニン残基の酸化についての先行研究では、細胞内にはタンパク質中の MetO を還元する酵素は存在するが、MetO₂ の還元酵素は存在しないと報告されている。本研究で、MetO₂ が示した生育阻害は、遊離の MetO₂ もしくはタンパク質に取り込まれた MetO₂ を還元できなかった結果を見ているのではないかと考えている。MetO₂ の投与時に細胞内のタンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、タンパク質分解が起きた結果と考えられる低分子タンパク質が多く検出された (図 1)。このことから、MetO₂ が取り込まれたタンパク質が不安定化した可能性を考えている。今後は、投与した MetO₂ がタンパク質に取り込まれているか否かを解析する必要がある。



①-5. 細胞内遊離メチオニン濃度のイメージング解析

組織・細胞特異的に、もしくは分化や成長において経時的に変動するかといったスケールでのメチオニン濃度の測定はこれまでになされていない。そこで、蛍光イメージングによるメチオニン濃度のセンサーを構築することを目的とした。タバコ葉の一過的発現系を用いて、メチオニンセンサーの発現テストを実施し、Venus、内部標準の tdTomato の両方の発現が確認された (図 2)。今後はメチオニンセンサー遺伝子のホモ個体が得られる T3 世代で、メチオニンへの感度の評価等を行う。



研究テーマ②「遊離メチオニンと NME 機構の関係」

②-1. メチオニン過剰蓄積株と MAP 欠損株の交配と表現型解析

①-2 で使用したメチオニン過剰蓄積株を、MAP 欠損株と交配し、2 重変異株を確立した。2 重変異株は最終的な草丈は野生型株や両親株の半分程度にしか成長しないため、顕著に生育が抑制されていると判断された。また、地上部の枝分かれ数の増加が認められた。生殖成長期への相転換の時期が遅延したとともに、生殖ステップの形態形成にも大きな異常が出ており、稔性も低下していた。今後は花粉数を解析するとともに、花粉の発芽率等を解析する予定である。

②-2. 2 重変異株のトランスクリプトーム解析

個体や組織間での遺伝子発現の差異の影響を受けにくい材料として、寒天培地で生育させた幼植物を解析に供した。GO エンリッチメント解析の Cellular component のカテゴリーの GO term では、葉緑体関係遺伝子の発現上昇が認められた。Biological process のカテゴリーの GO term では、低酸素応答プロセスや葉緑体構成プロセスに関与する遺伝子の発現が変動していた。また、根の形態形成プロセスに関する遺伝子の発現にも変化が見られた。

本項で行った、幼植物のトランスクリプトーム解析では、②-1 で見出した、形態変化や稔性の低下を直接的に説明することはできなかった。表現型解析とトランスクリプトーム解析の結果を踏まえ、生殖成長や葉緑体構成、低酸素応答、側根形成を支配する遺伝子の中に、メチオニンの蓄積量に依存して NME が制御される遺伝子が存在するというモデルを考えている。

3. 今後の展開

研究テーマ①-3 までで、メチオニン高蓄積が植物個体の無機栄養応答における適応度を低下させるという新知見を得ることができた。この成果については、2022 年度中に投稿論文として発表する準備を進めている。2025 年を目標に、シロイヌナズナをモデルに、無機栄養応答の改変によってメチオニン過剰蓄積株の適応度を上昇させるための方策を個体、培養細胞の両方で示したいと考えている。

研究テーマ①-4 では、MetO₂を投与した場合に、タンパク質中に MetO₂ が取り込まれるの可否かを明らかにする必要がある。また、自然界で MetO₂ が投与される場合はないが、細胞内の遊離メチオニン量が多い場合などに、MetO、MetO₂ が生じるの可否か評価する必要がある。タンパク質中のメチオニンの酸化というトピックの研究は存在するが、遊離メチオニンの酸化は見逃されたトピックである。本研究では、既にメタボローム解析にサンプルを提出しており、データが得られ次第、メチオニン投与や過剰蓄積株での、MetO、MetO₂ の蓄積量から、遊離メチオニンの酸化が細胞内で起こるか否かを明らかにしたいと考えている。

研究テーマ①-5 の細胞内のメチオニンの濃度センサー遺伝子の構築については、形質転換シロイヌナズナが完成し次第、メチオニン濃度への感受性を評価する。組織や細胞のレベルでのメチオニン蓄積量の時空間変化を評価し、2024 年を目標に投稿論文として発表したい。

研究テーマ②「遊離メチオニンと NME 機構の関係」では、実験に用いた植物の生育段階の違いから、現段階では表現型と遺伝子発現プロファイルの整合性を議論できる状態ではない。また、NME はタンパク質の安定性に関与する機構であるので、表現型を説明する分子機構の解明にはタンパク質レベルでの解析が不可欠である。

4. 自己評価

申請の段階で研究テーマ①「植物におけるメチオニン蓄積制御の適応的意義の解明」について、その重要性を認識していながらも、うまく研究計画に表現できていなかったため、テーマ②に偏った内容での申請になってしまっていた。メチオニンの新機能を考える上で、蓄積量制御の適応的な意義を解明することは必須である。本研究では翻訳制御の重要性とともに、無機栄養応答への寄与という新たな機能を発見することができた。論文としての成果発表の第 1 報目としては翻訳制御の重要性を示す論文の投稿準備を進めている。また、無機栄養応答についても

検証実験が成功したため、データを収集し、論文化する計画を立てられている。メチオニンと栄養応答との関係は有用植物の育種的研究への波及効果も期待される。

本研究は私にとって、メチオニンの新機能のみならず NME 機構の研究への挑戦でもあった。仮説に基づいての研究構想であったが、特に顕著な表現型が得られたことは、研究を推進する上で自信につながった。今後は、分子機構を解明するためにタンパク質レベルでの解析を実施する。並行して、メチオニンとの関係のみならず、NME 機構の研究として、全生物に共通の、メチオニンから始まるタンパク質合成に関わる新たな原理を開拓する研究としても発展させたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表: 5 件

1. Yui Yamashita, リボソームによる栄養センシングと代謝制御、第 10 回メタボローム勉強会(国内学会、日本、鶴岡)、2020 年 2 月 9 日.

2. Naoyuki Sotta, Miku Fujita, Seidai Takamatsu, Hitoshi Onouchi, Yukako Chiba, Toru Fujiwara, Satoshi Naito and Yui Yamashita, Translatome profiling of methionine biosynthesis regulation in plants, TRANSLATIONAL CONTROL (国際学会、オンライン開催), 2020 年 9 月 4 日.

3. 小田 一輝, 村岡 栞, 尾之内 均, 内藤哲, 山下 由衣, 植物におけるタンパク質 N 末端メチオニン除去機構とそのメチオニン感受性の研究, 第 43 回日本分子生物学会年会(国内学会、オンライン開催), 2020 年 12 月 3 日.

4. 小田 一輝, 村岡 栞, 尾之内 均, 内藤哲, 山下 由衣, Crosstalk of N-terminal methionine excision and methionine homeostasis in plants, 第 62 回日本植物生理学会年会(国内学会、オンライン開催), 2021 年 3 月 16 日.

5. 小田 一輝, 村岡 栞, 尾之内 均, 内藤哲, 山下 由衣, Effects of Methionine Overaccumulation on Growth of *Arabidopsis thaliana*, 2022 年 3 月, 第 63 回日本植物生理学会年会(国内学会、オンライン開催), 2022 年 3 月 24 日.