

眞貝細胞記憶研究室  
Cellular Memory Laboratory

主任研究員 眞貝 洋一 (医博)  
SHINKAI, Yoichi (Ph.D)



キーセンテンス：

1. 生命機能におけるエピジェネティクス制御の重要性を解明する
2. タンパク質リジンメチル化の新たな役割を解明する
3. 新たなモデル動物を作成し疾患の分子機構を解明する

キーワード：

エピジェネティクス、ヒストンメチル化、タンパク質翻訳後修飾、DNAメチル化、遺伝子ノックアウト、遺伝子発現制御、クロマチン、代謝、ゲノム、モデル動物

研究目的

当研究室は、エピジェネティクス制御の観点から生命現象を理解することを目標に研究を行っている。ヒストンの翻訳後修飾、特にヒストンリジン残基のメチル化制御は遺伝子の発現だけでなくDNAの修復さらにはクロマチンの構造や安定性にも重要な役割を持つ。このエピジェネティクスに関わる分子基盤を明らかにし (1)、それらエピジェネティクス因子の生体内の様々な生命機能における役割をモデル動物を用いて明らかにし (2)、エピジェネティクス制御不全の視点から疾患を理解する (3)。また、エピジェネティクス制御機構をコントロールする新たな手法の開発にも取り組んでいる。

変異型SAMを用いたメチル化タンパク質検出系による網羅的新規メチル化基質の同定II (津坂、島津、眞貝)

これまで様々な生命現象のシグナルカスケードが解析されてきたが、そこでは、タンパク質 (分子) 間の相互作用の調節が重要な作用点として働いていることがわかっている。細胞内の局在を換えることで、或は分子の構造を換えることでタンパク質間の相互作用が調節される。この調節には、タンパク質の化学修飾が重要な役割を果たしている。例えば、リン酸化がタンパク質内の構造変換を誘導したり新たなタンパク質の結合部位を生み出したりすることにより、タンパク質間の相互作用が制御されている。

近年、蛋白質リジン残基のメチル化酵素が動物細胞でもいくつも同定され、特にヒストンのリジンメチル化が様々なクロマチン機能制御に関わることが示されてきた。この場合も、ヒストン・リジンメチル化修飾の重要な機能は、ヒストンの異なるリジン残基がメチル化修飾を受けることで異なる機能分子をそのクロマチン領域にリクルートする (つまり、タンパク質間の相互作用を調節する) ことにあった。これまで解析されてきたリジンメチル化酵素のほとんどはSETドメインをもつ分子に限られて来た。そして、SETドメイン分子の標的的中心がヒストンだったこともあり、リジンメチル化の研究はほとんどヒストンに限局して進んで来た (そして多くの進展があった)。しかし、他の翻訳後修飾酵素が様々なタンパク質を標的とすること、タンパク質のメチル化でもアルギニン残基に対するメチル化酵素はヒストンを含む様々なタンパク質を標的としている。これらのことを考えると、リジンメチル化に関してもヒストン以外の様々なタンパク質を標的とし、その機能制御に関わっていることが予想される。さらに最近では、SETドメインを持たないクラス (Seven beta strand enzymes別名 “Class I” methyltransferases) のリジンメチル化酵素もたくさん見つかって来ており、これらの酵素はヒストン以外を標的とすることも示されつつある。

一昨年、我々は、袖岡有機合成化学研究室との共同研究により、propargylic Se-adenosyl-L-selenomethionine (以下、ProSeAM) をメチル化修飾のプローブとして用いるタンパク質メチル化酵素の網羅的検出系を確立し、それを報告した (Shimazu T et al., PLOS ONE 2014)。その後、このProSeAMを用いた網羅的検出系を用いて、ヒストンリジンメチル化酵素として知られているG9aとGLPの新規標的因子のスクリーニングを行い、G9aに対して7種類、GLPに対しては54種類の新規メチル化基質候補を同定した。今年度はその候補因子の1つであるDNA ligase 1 (Lig1) に関して解析を進めた。Lig1は、DNA複製の際、ラギング鎖で新しく合成された岡崎フラグメント同士をつなぐ役割を担っている酵素である。今回のProSeAMを用いたスクリーニングで同定されたG9a或はGLPの標的基質候補のうち、いくつかの因子はG9aおよびGLPがメチル化するヒストンH3の9番目のリジンH3K9を含む前数アミノ酸 (TARK) と類似した配列

(H3K9様配列) を有しており、Lig1にもこの配列(TARK)が存在していた。解析の結果、ヒトのLig1のTARKのK126がG9a, GLPによりメチル化されること、このKをアルギニン (R) 置換するとG9a, GLPによってメチル化されなくなることが分かった。さらに細胞内におけるLig1のメチル化をMS解析で調べた結果、正常のマウスES細胞ではLig1K142(ヒトのK126に対応)のほとんどはメチル化されており、その中で大半はジメチル化修飾を受けていること、*G9a+GLP*ダブルノックアウト(DKO) ES細胞ではK142のメチル化が消失することが分かった。in vivoではG9aとGLPはヘテロ複合体がH3K9メチル化酵素として機能することが分かっており、*G9a* KO, *GLP* KO ESではいずれも同等にH3K9me2が減弱するが、Lig1K142のメチル化は*GLP* KO ESでは激減するのに対して、*G9a* KO ESではK142はさらにメチル化(高トリメチル化)されることが分かった。この結果より、Lig1のメチル化酵素は主にはGLPであり、H3K9のメチル化とは別の制御を受けていることが分かった。次に、このLig1K142のメチル化の機能を探るために、Lig1K142を認識する分子の同定を進め、DNAのメチル化維持に重要な役割を持つ分子がメチル化されたLig1K142に特異的に結合することを見出した。現在、Lig1K142me認識の生物学的重要性を調べている。

-----  
**Key Sentence :**

1. Studies for epigenetic regulation of biological processes
2. Biology of protein lysine methylation
3. Elucidation of molecular mechanisms of human diseases by utilizing novel animal models

**Key Word :**

epigenetics, histone methylation, protein post-translational modifications, DNA methylation, gene knockout, gene transcriptional regulation, chromatin, metabolism, genome, model animal

**Purpose of Research :**

Our laboratory's principal objective is to understand the molecular mechanism of epigenetic gene regulation and the role of epigenetics in health and disease. To address these topics, we take multidisciplinary approaches, including molecular biology, biochemistry, cell biology, structural biology and mouse molecular genetics.

**SAM analog, ProSeAM-based screening of novel substrate candidates to lysine methyltransferases, G9a and GLP, II (Tsusaka, Shimazu and Shinkai)**

The modulation of protein-protein interaction is a key regulatory mechanism for various signaling cascade pathways that control most biological processes. Modulation of intracellular localization or conformational changes in target molecules is crucial for such regulation. In many cases, post-translational modifications play an important role in the regulation of these pathways. For example, phosphorylation can induce conformational changes in target molecules or create binding sites for the interacting molecules.

Recently, many enzymes involved in protein lysine methylation have been discovered in the animal kingdom. They are classified as SET-domain containing proteins and methylate-specific lysine residue(s) of histone molecules. From the studies of SET-domain enzymes, histone lysine methylation has been shown to play many important roles in chromatin-based biological processes, including gene expression, DNA repair, replication, and chromatin condensation. Methylation of specific histone lysine residue(s) activates unique biological process(es) by recruiting different functional molecule(s) to chromatin loci containing different histone methyl mark(s). Thus, histone lysine methylation also controls protein-protein interactions. A major reason for the dominated studies of lysine methylation in chromatin function is that SET-domain molecules may have evolved as special enzymes for histone molecules. However, it is not surprising that lysine methylation occurs on non-histone proteins and those methylations also play crucial roles for their regulation since other posttranslational modifications occur on various different protein molecules and regulate their functions. Additionally, non-SET-domain lysine methyltransferases, known as seven beta-strand enzymes/"Class I" methyltransferases, have recently been identified, and they target non-histone proteins.

Two years ago, in collaboration with Sodeoka synthetic organic chemistry laboratory, we have established and reported a novel detection system for protein lysine methylation by using selenium-based SAM analog, propargylic Se-adenosyl-L-selenomethionine (ProSeAM) as a methyl donor (Shimazu T et al., PLOS ONE 2014).

Last year, we challenged to identify novel non-histone protein substrates of lysine methyltransferases, G9a and GLP both of which are known to methylate histone H3 lysine 9 (H3K9). By using wild type and *G9a/GLP* double knockout (DKO) cells as substrate sources, the ProSeAM-based labelling/MS analysis in combination with the SILAC method identified 7 and 54 novel protein substrate candidates for G9a and GLP, respectively. This year, we focused on one of those candidates, DNA ligase 1 (Lig1) and investigated whether Lig1 is really methylated by G9a and GLP *in vitro* and *in vivo* and examined the biological role of this modification. Lig1 is responsible for joining Okazaki fragments formed during discontinuous DNA synthesis on the DNA's lagging strand during DNA replication and the base excision repair process. Among those G9a and GLP substrate candidates, some of them including Lig1 possess H3K9-like sequences, TARK (K9). *In vitro* methylation assay, Lig1K126 (human) in TARK was methylated by G9a and GLP and this Lig1 methylation was abolished by K126R substitution. Furthermore, by using MS analysis, we found that K142 of mouse Lig1 (mouse counterpart of human K126) was mostly methylated (majority of them are di-methylated) and this methylation was lost in *G9a/GLP*-DKO ES cells. G9a and GLP exist predominantly as a G9a-GLP heteromeric complex that appears to be a functional H3K9 methyltransferase *in vivo* and H3K9me1 and me2 are severely diminished in both *G9a*-KO and *GLP*-KO cells. Interestingly, Lig1K142 methylation was also severely affected in *GLP*-KO, but oppositely enhanced in *G9a*-KO ES cells, suggesting that regulation of Lig1K142 and H3K9 methylation are different even though both K are methylated by the G9a-GLP complex.

Then, we searched for a reader molecule of Lig1K142 methylation and found that one molecule which is involved in maintenance of DNA methylation binds to Lig1 methylated at K142. Currently, we are investigating the role of Lig1K142 methylation in biological functions.

***Principal Investigator***

眞貝 洋一 Yoichi Shinkai

***Research Staff***

島津 忠広 Tadahiro Shimazu

山田 亜夕美 Ayumi Yamada

加藤 雅紀 Masaki Kato

白井 温子 Atsuko Shirai

福田 溪 Kei Fukuda

***Technical Staff***

福田 幹子 Mikiko Fukuda

事柴 芳 Kaoru Kotoshiba

***Assistant***

市橋 美香 Mika Ichihashi