

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。この分子基盤を明らかにすることから、モデル動物を用いて生体内の様々な生命機能における役割を明らかにし、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。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 (島津、津坂、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の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。

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)。今年度は、このProSeAMを用いた網羅的検出系を使って、ヒスト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った。その結果、WTとG9a/GLP-DKO細胞を用い、SILAC法と組み合わせたMS解析により、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。現在、それらの基質候補タンパク質におけるリジンメチル化の存在の確認と、メチル化の生物学的機能に関して解析を進めている。

研究年報

-----  
**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 (Shimazu, Tsusaka 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.

Last year, 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).

This 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. By using wild type and G9a/GLP-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. Currently, we are validating the presence of lysine methylation on those substrate candidates and elucidating biological role(s) of lysine methylation on them.

***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

***Technical Staff***

福田 幹子 Mikiko Fukuda

***Assistant***

市橋 美香 Mika Ichihashi