

## 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を用いた網羅的メチル化タンパク質検出系の確立 (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。

今回我々は、リジンメチル化酵素の新規標的因子の網羅的検出系の確立を目的として、様々なプローブの付加を可能にするような変異型SAMの開発と、これらの変異型SAMを基質ドナーとして用いることで、高感度あるいは酵素特異的なメチル化標的因子の検出が可能かどうかを検討した。具体的には、袖岡有機合成化学研究室との共同研究により、10種類近くの改変型SAMの合成を行い、各々の改変型SAMについてメチル化修飾のプローブとしての有効性を検証した。その結果、Luoらが2012年に報告したpropargylic Se-adenosyl-L-selenomethionine (以下、ProSeAM) は、G9a, Suv39H1, ESETなどのSETドメインメチル化酵素のプローブとして利用可能であるほか、Seven beta strand型メチル化酵素のプローブとしても有用であることが判明した。そこで、ヒト由来HEK293T細胞溶解物とProSeAMをin vitroで反応させたのちに修飾タンパク質を質量分析によって網羅的に解析したところ、360種類以上のタンパク質が同定された。以上のこと

から、ProSeAMが細胞内の広範なタンパク質メチル化酵素のプロープとなることが確かめられた。また、熱ショックタンパク質HSP70のリジンメチル化酵素であるMETTL21AをHEK293T溶解液に加えることで、HSP70が効率よくラベルされ、質量分析によって同定できたことから、特定のメチル化酵素の基質をプロテオームスケールで探索できることが明らかとなった。さらにこの系を用いて哺乳類では基質・機能が未解明であったseven beta strand型メチル化酵素であるMETTL10の標的タンパク質の探索を行ったところ、翻訳伸長因子EF1A1がMETTL10の基質であることが判明した。METTL10によるメチル化の分子機序を明らかにする為、質量分析および変異体作製実験によってメチル化リシン残基の同定を行ったところ、METTL10はEF1A1のLys318をトリメチル化する酵素であることが分かった。さらに、培養細胞内でMETTL10をノックダウンするとEF1A1のLys318トリメチル化が顕著に減少し、逆に非メチル化体が増加することが判明した。

この系を用いてこれまでほとんど未解明であった非ヒストンリシンメチル化修飾の解析を進めていくとともに、将来はさらなる改変型SAMを作製することで、検出系をより高感度あるいは特異性を持った系に改良することを目指している。

-----  
**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.

**The novel detection system for protein methylation using synthetic cofactors (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.

In this study, we have synthesized a series of S-adenosyl-methionine (SAM) derivatives with alkyne-moieties in order to establish a novel detection system for protein lysine methylation. A

selenium-based SAM analog, propargylic Se-adenosyl-L-selenomethionine (ProSeAM)(Bothwell et al JACS 2012), has a wide spectrum of reactivity against various lysine methyltransferases (KMTs) with sufficient stability to support enzymatic reactions in vitro. By using ProSeAM as a chemical probe for lysine methylation, we identified substrates for two seven-beta-strand KMTs, METTL21A and METTL10, on a proteomic scale in mammalian cells. METTL21A has been characterized as a heat shock protein (HSP)-70 methyltransferase, whereas mammalian METTL10 remains uncharacterized. By using ProSeAM-mediated alkylation followed by purification and quantitative MS analysis, we confirmed that METTL21A specifically labels HSP70 family proteins. Furthermore, we demonstrated that METTL10 specifically labels the eukaryotic elongation factor EF1A1 in mammalian cells. Subsequent functional characterization revealed that METTL10 specifically trimethylates EF1A1 at lysine 318 and that siRNA-mediated knockdown of METTL10 decreases EF1A1 methylation levels in vivo. Thus, our study emphasizes the versatility of the synthetic cofactor ProSeAM as a chemical probe for the identification of novel nonhistone substrates of KMTs.

***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