

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05565

研究課題名(和文) 翻訳後修飾ライブラリー構築を指向したヒストン合成法の開発

研究課題名(英文) Synthesis of histone protein for the post-translationally modified protein library

研究代表者

川上 徹 (Kawakami, Toru)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：70273711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発したCPEライゲーション法を用いて、修飾ヒストンライブラリーを構築するための基盤となる合成法の開発を目的として以下の成果を得た。(1) 組換えペプチドをC末端セグメントに用いる修飾ヒストン合成法を開発し、トリメチル化リシン含有ヒストンの合成に成功した。(2) チイランリンカーを用いる簡便なイソペプチド類似体を調製する方法を見出し、ユビキチン化ヒストンH3の調製に成功した。(3) このユビキチン化ヒストンを用いて、ユビキチンヒストンペプチドの機能と構造に関する情報を得た。(4) より簡便な合成法の開発を目的とした固相ペプチドライゲーション法の開発に向けた予備的な結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The site specific modification of proteins such as post-translational modification (PTM) is important for studies of protein functions. The PTMs of histones play an important role in the epigenetic regulation. In this research we aimed to develop the methods for preparation of the site specifically modified histones by using the CPE ligation method. At first, a semi-synthetic method was developed, in which recombinant C-terminal peptides were ligated with the N-terminal site specifically modified CPE peptides, followed by desulfurized to produce trimethyl lysine containing histones H3 and H4. We also developed a convenient method for preparation of isopeptide mimetics by using a thirane linker. Using this method, ubiquitinated histone H3 peptide and full length H3 were prepared, and these peptides were used for their structural and functional studies. In addition, in order to develop more convenient synthetic method for histones preliminary result of solid phase peptide ligation.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：ヒストン 翻訳後修飾 ペプチドライゲーション イソペプチド チイラン ユビキチン DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

ヒストンは遺伝子を収納するための足場となるタンパク質で、H2A、H2B、H3、H4のそれぞれ2分子の計8分子がコアを作り、これにDNAが巻き付くことでヌクレオソームが形成され、これはクロマチンの基本単位となる。これらのヒストンやDNAの化学修飾は、塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな遺伝情報の発現制御に寄与していることが知られている。ヒストンはC末端側にコアを形成するフォールド領域を、N末端側にフレキシブルなテール領域を有し、複数の部位にアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など多様な化学修飾を受ける。また、最近になってモクロトノイル化など新しい修飾が見つかっている。これらの翻訳後修飾はお互いに強く影響しあい、またそれは、DNAの化学修飾とも関連し、クロマチンの構造変化などを介してエピジェネティックに遺伝情報発現を制御している。これらのヒストン修飾の機能解析には、特定の部位を均一に修飾することが必須であるが、生化学的手法では確実に部位特異的に化学修飾を施したヒストンの調製が難しいことから、それぞれの修飾と機能の俯瞰的な理解はなされていない。

これまでにタンパク質の化学合成法としてペプチドフラグメントの縮合法、いわゆるケミカルライゲーション法を開発してきた。このケミカルライゲーション法を駆使して、N末端領域に N^{ϵ} -トリメチル化リシン残基を含むH3の完全化学合成に成功している。しかし、この方法では合成途中での保護基の着脱など煩雑な操作があり、また最終ライゲーションの収率も高いとは言えない。

2. 研究の目的

本研究では、部位特異的に確実に化学修飾を施したヒストンライブラリーを構築するための基盤となる合成法の開発を目的とし、この修飾ヒストンから調製するヌクレオソームの物性・機能解析も視野に入れる。

3. 研究の方法

(1) 組換えペプチドをC末端セグメントに用いる修飾ヒストンの合成

ヒストンの大多数の修飾部位はN末端領域に存在する。そこで、修飾部位を含むN末端側ペプチドセグメントを化学合成により調製し、C末端側ペプチドを組換え体として大腸菌を用いて調製し、両者を縮合することによって、全長のヒストンを調製する。組換えペプチドの調製は条件が整えば、容易に大量生産系を構築することが可能である。本研究では、ネイティブケミカルライゲーション法を用いる縮合によるタンパク質の合成法の開発を行う。

(2) システイン残基を介する簡便なユビキチン化ヒストン調製法の開発

ユビキチンは76残基のタンパク質で、そのC

末端Gly残基がタンパク質中のLys残基側鎖アミノ基にイソペプチド結合し、種々の生理機能を示す。ヒストンではその修飾部位はC末端領域に多く、上記(1)の方法を適用することは難しい。また、タンパク質をイソペプチド結合によりLys残基に導入するためには特別な仕掛けを施したヒストンが必要となる。そこでまず、任意の位置にCys残基を導入した組換えヒストンを調製し、そのチオール基にリンカーを導入する方法を開発し、そのリンカーに対してアミド結合によりユビキチンを非天然型構造で簡便に導入する方法を開発する。ユビキチン化はヒストン以外にも広くみられる翻訳後修飾であり、また、類似の修飾としてSUMO化が知られている。この方法はこれらの修飾反応にも有用である。

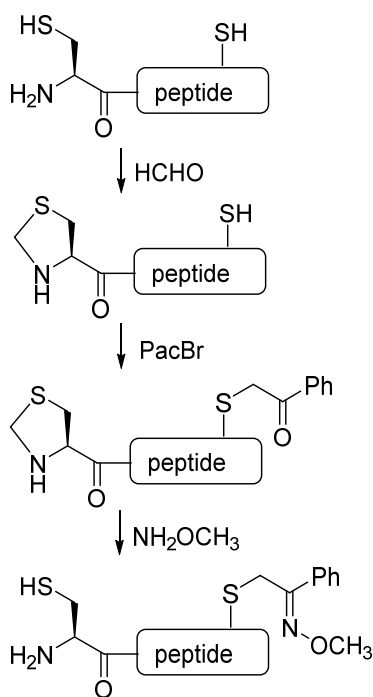
(3) 簡便かつ効率的なヒストン合成法の開発

上記(2)ではCys残基を利用する簡便なユビキチン修飾法の開発を目指したものであるが、天然型構造を合成するために、より効率的な化学合成法の開発を行う。ヒストンはそれぞれ102-135残基のタンパク質であり、固相上でペプチドセグメントの連続的なライゲーションによる合成法の開発を行う。

4. 研究成果

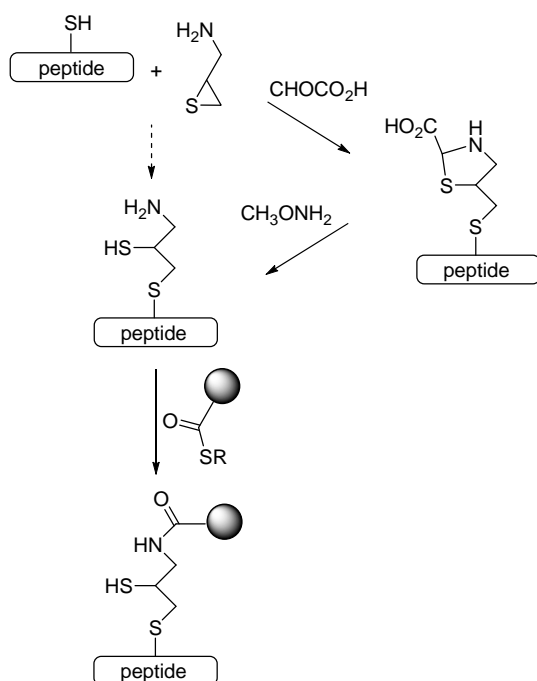
(1) 組換えペプチドをC末端セグメントに用いる修飾ヒストンの合成

Cys残基を含まないH4(102残基)については、本来はAla残基の位置をCys残基で置換した、N末端にCys残基を有するC末端側部分ペプチドを大腸菌を用いて組換えペプチドとして調製し、化学合成したN末端側部分CPEペプチドとのライゲーションの後、脱硫することによってCys残基をAla残基へ変換し、N末端領域に N^{ϵ} -トリメチルリシン残基を含み、アミノ酸配列に変異のないH4の合成に成功した。この方法は、同じくCys残基を含まないH2A、H2Bの調製に適用できると考えられる。一方で、H3(135残基)はC末端領域にCys残基を有する。そのため組換えペプチドから、N末端Cys残基以外のCys残基チオール基に保護基を導入したペプチドを調製する必要がある。下図に示すような経路を考案し、 N^{ϵ} -トリメチルリシン残基を含むH3の合成に成功した。この方法ではまずN末端Cys組換えペプチドに対してホルムアルデヒドによってチアゾリジンへ誘導しチオール基を保護する。その後、チオール基をPac基で保護したのちに、チアゾリジンを開環する。この保護基導入法は3ステップからなるが、反応は一つの試験管内で連続的に行うことができる。なお、この際に、Pac基がオキシムエーテル化されるが、通常Pac基除去条件と同じ亜鉛処理により除去されることがわかった。



(2) システイン残基を介する簡便なユビキチン化ヒストン調製法の開発

タンパク質の修飾としてチオール基はよく利用され、ジスルフィド化やオレフィンなどに対するアルキル化が汎用される。本研究では、天然構造に近いアミド結合によるユビキチン化修飾を行う方法として、Cys残基チオール基に1,2-アミノチオール構造を導入するリンカーを開発し、下図に示す経路によって、チオエーテル結合を含む構造ではあるが、簡便にイソペプチド結合を形成する方法を開発した。本法を用いてユビキチン化ヒストンH3ペプチドおよびユビキチン化全長ヒストンH3の合成に成功した。



本法では、チイランの多量化を防ぐためにいったんチアゾリジン体を経由する必要があるが、3段階の一連の反応を1つの試験管内で連続的に行うことができる。

また、本法で合成したユビキチン化H3を用いて、ヌクレオソームの形成とその安定性、DNAメチル化酵素に対する酵素活性化に関する知見が得られた。

(3) 簡便かつ効率的なヒストン合成法の開発

本計画では、市販のペプチド固相合成用の樹脂を用い、固相上でのライゲーション反応によるタンパク質合成法を開発するために予備的な検討を行い、有望な知見を得ることができた。今後この簡便な固相ライゲーション法を確立し、最終的に修飾ヒストンライブラリーの構築を進めていく。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7 件)

T. Kawakami, R. Yoshikawa, Y. Fujiyoshi, Y. Mishima, H. Hojo, S. Tajima, I. Suetake. Synthesis of histone proteins by CPE ligation using a recombinant peptide as the C-terminal building block. *Journal of Biochemistry* **2015**, 158(5), 403-411.
DOI: 10.1093/jb/mvv056

Y. Mishima, C. D. Jayasinghe, K. Lu, J. Otani, M. Shirakawa, T. Kawakami, H. Kimura, H. Hojo, P. Carlton, S. Tajima, I. Suetake. Nucleosome compaction facilitates HP1 γ binding 1 to methylated H3K9. *Nucleic Acids Research* **2015**, 43(21), 10200-10212.
DOI: 10.1093/nar/gkv841

T. Kawakami, Y. Mishima, M. Kinoshita, Y.-H. Lee, I. Suetake. A thirane linker for isopeptide mimetics by peptide ligation. *Tetrahedron Letters* **2016**, 57(19), 2112-2115.
DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.04.006

Y. Asahina, T. Kawakami, H. Hojo. One-pot native chemical ligation by combination of two orthogonal thioester precursors. *Chemical Communications* **2017**, 53(13), 2114-2117.
DOI: 10.1039/C6CC10243C

T. Kawakami, Y. Mishima, H. Hojo, I. Suetake. Synthesis of ubiquitylated histone H3 using a thirane linker for chemical ligation. *Journal of Peptide Science* **2017**, 23(7,8), 532-538.
DOI: 10.1002/psc.2976

Y. Mishima, L. Brueckner, S. Takahashi, T.

Kawakami, K. Arita, S. Oka, J. Otani, H. Hojo, M. Shirakawa, A. Shinohara, M. Watanabe, I. Suetake. RFTS-dependent negative regulation of Dnmt1 by nucleosome structure and histone tails. *FEBS Journal* **2017**, 284(20), 3455-3469.
DOI: 10.1111/febs.14205

S. Ishiyama, A. Nishiyama, Y. Saeki, K. Moritsugu, D. Morimoto, L. Yamaguchi, N. Arai, R. Matsumura, T. Kawakami, Y. Mishima, H. Hojo, S. Shimamura, F. Ishikawa, S. Tajima, K. Tanaka, M. Ariyoshi, M. Shirakawa, M. Ikeguchi, A. Kidera, I. Suetake, K. Arita, M. Nakanishi. Structure of the Dnmt1 reader module complexed with a unique two-mono-ubiquitin mark on histone H3 reveals the basis for DNA methylation maintenance. *Molecular Cell* **2017**, 68(2), 350-360.e7.
DOI: 10.1016/j.molcel.2017.09.037

[学会発表](計 16 件)

川上 徹, 三島優一, 北條裕信, 田嶋正二, 末武 勲. 組換えペプチドを C 末端側合成ブロックとして用いたライゲーション法によるヒストン H3 の合成. エピジェネティクス研究会第 9 回年会, 東京, 2015 年 5 月 25-26 日.

T. Kawakami, I. Suetake. Total Chemical Synthesis and Semi-synthesis of Histone Proteins by Chemical Ligation. 第 40 回内藤コンファレンス: Epigenetics-From Histone Code to Therapeutic Strategy, Sapporo, 2015 年 9 月 15-18 日.

T. Kawakami, R. Yoshikawa, Y. Fujiyoshi, Y. Mishima, H. Hojo, S. Tajima, I. Suetake. Synthesis of modified histone proteins by CPE ligation using a recombinant peptide. 第 52 回ペプチド討論会, 平塚, 2015 年 11 月 16-18 日.

川上 徹. ヒストンの化学合成.(フォーラム)ヒストン修飾に関わるクロマチンテクノロジーの新展開(川上 徹, 末武 勲) BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.

T. Kawakami, R. Yoshikawa, Y. Fujiyoshi, Y. Mishima, H. Hojo, S. Tajima, I. Suetake. Synthesis of Modified Histone Proteins by CPE Ligation Using a Recombinant Peptide. 7th International Peptide Symposium, Singapore, 2015 年 12 月 9-11 日.

川上 徹, 三島優一, 木下 岬, 李 映

昊, 末武 勲. ライゲーション法によるイソペプチド類似構造を介したヒストンペプチドのコピキチン化. エピジェネティクス研究会第 10 回年会, 豊中, 2016 年 5 月 19-20 日.

T. Kawakami. Synthesis of Modified Histone Proteins by CPE Ligation. The 16th Akabori Conference, Kobe, 2016 年 5 月 24-25 日.

川上 徹, 三島優一, 木下 岬, 李 映昊, 末武 勲. チランリンカーを用いたペプチドライゲーション法によるイソペプチド類似体の合成. 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 金沢, 2016 年 9 月 7-9 日.

川上 徹, 三島優一, 木下 岬, 李 映昊, 末武 勲. チランリンカーを用いるイソペプチド類似構造を介したヒストンペプチドのコピキチン化. 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016 年 9 月 25-27 日.

T. Kawakami, Y. Mishima, M. Kinoshita, Y.-H. Lee, I. Suetake. Ubiquitination of Histone Peptides via Isopeptide Mimetics by Using a Thiirane Linker. 第 53 回ペプチド討論会, 京都, 2016 年 10 月 16-18 日.

川上 徹. ライゲーションケミストリーに基づく修飾ヒストンの化学合成. 蛋白研セミナー: 生命システムを支配するエピジェネティクス(岩波礼将, 末武 勲), 吹田, 2016 年 12 月 21 日.

T. Kawakami. Synthesis of modified histone proteins by CPE ligation. 蛋白研セミナー: Japan-Korea Bilateral Symposium, 吹田, 2016 年 12 月 22 日.

川上 徹, 三島優一, 北條裕信, 末武 勲. チランリンカーを用いるイソペプチド類似構造を介したヒストンタンパク質のコピキチン化. 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 仙台, 2017 年 6 月 20-22 日.

T. Kawakami, Y. Mishima, H. Hojo, I. Suetake. Histone Ubiquitination via an Isopeptide Mimetic Structure by Using a Thiirane Linker. 第 54 回ペプチド討論会, 堺, 2017 年 11 月 20-22 日.

川上 徹, 三島優一, 北條裕信, 末武 勲. チランリンカーを用いるイソペプチド

類似構造を介したユビキチン化ヒストンタンパク質の調製 . 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 , 神戸 , 2017 年 12 月 6-9 日 .

川上 徹 , 三島優一 , 北條裕信 , 末武 勲 .
チランリンカーを用いる蛋白質の簡便なユビキチン化 . 日本化学会第 98 春季年会 , 船橋 , 2018 年 3 月 20-23 日 .

〔図書〕(計 1 件)

北條裕信 , 川上 徹 . ペプチドチオエステルの合成とタンパク質合成への利用 . 中分子創薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成技術 (監修) 千葉一裕 , シーエムシー出版 , pp28-35, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organization/publication/kawa.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

川上 徹 (KAWAKAMI Toru)
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号 : 70273711

(2) 連携研究者

末武 勲 (SUETAKE Isao)
甲子園大学・栄養学部・教授
研究者番号 : 80304054