

研究種目：基盤研究 (B)  
研究期間：2006～2009  
課題番号：18310145  
研究課題名 (和文) 遺伝子発現制御の分子機構の解明を目的とした修飾ヒストン合成法の開発  
研究課題名 (英文) Development of a synthetic method of modified histone aiming at elucidation of the molecular mechanism of the gene expression regulation  
研究代表者  
相本 三郎 (AIMOTO SABURO)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号：80029967

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：ヒストン、メチル化、化学合成、翻訳後修飾、遺伝子発現、メチル化リシン、ヒストン H3、ライゲーション法

#### 1. 研究計画の概要

ヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化などによる遺伝子の発現制御の解析が、近年急速な展開を見せている。しかしながら多くの場合、ある部位の修飾に焦点を当て、その機能を分子生物学的に解析するという手法がとられ、ヒストン H3 だけに限っても、翻訳後修飾とそれがもたらす機能との関係を俯瞰的に捉えるには至っていない。

最近、限定的ではあるが化学合成された修飾ヒストンをヌクレオソームへ導入することが可能であるとの報告が見られるようになってきた。このことは、化学合成修飾ヒストンを導入したヌクレオソームと DNA との相互作用の解析、さらにヒストンの修飾構造と機能との相関関係の解析という一連の研究を開始する環境が整ってきたことを意味する。

そこで、申請者らにより開発されたペプチド・蛋白質合成法を駆使し、*N*<sup>ε</sup>-アセチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-モノメチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-ジメチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-トリメチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-モノメチル化アルギニンなどを含有する多様な修飾ヒストンの効率的合成法を開発することを目的として本研究を行う。また、合成修飾ヒストンを通して遺伝子発現制御の分子機構の解明の推進に寄与する。

本研究では、まず、N末端テイル部位に相当するヒストンH3(1-33) (以後ヒストンテイル) を合成ターゲットとし、Fmocペプチド合成法による*N*<sup>ε</sup>-アセチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-モノメチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-ジメチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-トリメチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-モノメチル化アルギニ

ンやリン酸化セリン含有ヒストンテイルの合成条件を探索する。その結果を基に他種類の修飾ヒストンテイルを正確かつ同時並行的に合成することのできる条件を確立する。また、ここで得られる合成標品は蛍光ならびにビオチン標識を施し、ヒストンテイルの修飾パターンとDNAとの結合実験や結合蛋白質の解析研究に提供する。修飾ヒストンテイルの合成法の確立と平行して、修飾された全長ヒストンの合成法の開発を行う。

#### 2. 研究の進捗状況

(1) Fmocペプチド合成法による*N*<sup>ε</sup>-アセチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-モノメチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-ジメチル化リシン、*N*<sup>ε</sup>-トリメチル化リシン含有ヒストンテイルの合成条件を検討し、蛍光ならびにビオチン標識された修飾ヒストンテイルの合成に成功した。

(2) 修飾された全長ヒストンの合成法の開発に関しては、昨年度までに、収率は低いものの目的とする [Lys(Me)<sub>3</sub>]<sup>9</sup>-Histon H3(1-135) が生成していることを質量分析法により確認することができたが、縮合反応効率の改善や反応混合液からの生成物の単離・精製効率を向上させるには、それぞれの点において抜本的検討が必要であるとの結論に至った。

(3) 縮合法については、これまで拡張型ライゲーション法とnative chemical ligation法を組み合わせてペプチド鎖を縮合させ、全長ヒストンを合成する予定であったが、収率を向上させることができなかった。そこで、Histon H3(44-95) チオエステルとHiston

H3(96-135)をnative chemical ligation法で縮合させ、その生成物であるHiston H3(44-135)とHiston H3(13-43)チオエステルは、チオエステル法で縮合させることとした。そのため、Histon H3(44-135)の遊離のチオール基を穏和な条件下で修飾でき、しかもチオエステル法での縮合の際に用いる銀イオンに対しても安定なチオール保護基とその導入試薬の検討を行った。その結果、保護基としてCH<sub>3</sub>-S-基が、導入試薬としてCH<sub>3</sub>-S-SO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>がその目的に合致することを見出した。

(4) 現在、Histon H3 [Lys(Me<sub>3</sub>)<sup>9</sup>]-H3(1-12)、H3(13-43)、H3(44-95)、H3(96-135)の4つの合成ブロックに分割し、それぞれを順次縮合することにより、全合成を試みている。また、ヒストン合成中間体の精製のため、光照射や選択的化学反应により切断できるペプチド精製用のタグを開発した。これによりHPLCを用いる際の非特異的吸着を軽減できるものと期待している。

### 3. 現在までの達成度

#### ③やや遅れている。

(理由)

修飾ヒストンテイルの化学合成は、想定通り、順調に達成できた。しかし、ヒストンの全合成では、多くの予期せぬ問題が発生した。まず、ヒストン全合成用の合成ブロックを逆相 HPLC で効率よく精製することが極めて困難であったことである。条件検討の結果、HPLC での精製も可能とはなかったが、依然として回収率が低い状態が続いている。さらに、合成ブロックどうしを縮合させた場合、生成物の HPLC カラムへの吸着が極めて強く、反応の評価が困難となっている。そのため、精製法の開発も併せて行うこととなった。精製法に関しては3通りの新規な方法を開発することに成功した。今後、ヒストン合成に於ける有効性を調べる。縮合反応の評価自体も困難な状態であるが、1段階目で用いた native chemical ligation 法も2段階目で用いた拡張型ライゲーション法も効率的には進行していない状態である。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) 新規に開発した精製法を用いて、合成ブロックの精製を行う。

(2) 反応を単純化するため、合成ブロックとして直接法で合成したペプチドチオエステルを用いる。

(3) 縮合法を native chemical ligation 法と拡張型ライゲーション法の組み合わせから、native chemical ligation 法とチオエステル法の組み合わせに変更する。

(4) 時間的な制約もあり、9位 lys のメチル化体に焦点を絞り、合成する。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7件)

① Toshiaki Hara, Akira Tainosho, Ken'ichiro Nakamura, Takeshi Sato, Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Peptide purification by affinity chromatography based on  $\alpha$ -ketoacyl group chemistry, *J. Peptide Sci.*, **15**, 369-376 (2009). 査読有

② Toru Kawakami, Saburo Aimoto, The Use of a Cysteinyl Prolyl Ester (CPE) Autoactivating Unit in Peptide Ligation Reactions, *Tetrahedron*, **65**, 3871-3877 (2009) 査読有

③ Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Sequential Peptide Ligation by Using a Controlled Cysteinyl Prolyl Ester (CPE) Autoactivating Unit, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 1903-1905 (2007). 査読有

④ Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Peptide Ligation Using a Building Block Having a Cysteinyl Prolyl Ester (CPE) Autoactivating Unit at the Carboxy Terminus, *Chem. Lett.*, **36**, 76-77 (2007). 査読有

[学会発表] (計 17件)

① 赤井 優一他、ペプチド Cys-Pro エステルを合成ブロックとして用いるトリメチルリシン含有ヒストン H3 合成法の研究、日本化学会第 88 春季年会、平成 20 年 3 月 27 日 東京池袋

[その他]

ホームページ

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/index.html>