

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03931

研究課題名(和文) スーパーヌクレオソーム構築による1細胞エピジェネティック修飾マッピング

研究課題名(英文) Single cell mapping of epigenetic modifications through super-nucleosome construction

研究代表者

岡本 晃充 (Okamoto, Akimitsu)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：60314233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1)人工ヌクレオソームの化学的製造法の確立...有機金属錯体を用いた新たなペプチドライゲーション法を確立して、コアヒストン4種類(H2A, H2B, H3, H4)およびリンカーヒストンH1の合成を行った。
(2)スーパーヌクレオソームの創出...原子による細胞機能制御の本質を見抜くために、タンパク質修飾法を検討して、天然にはない機能を付与した「スーパーヌクレオソーム」を化学合成する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

独自の化学合成の確立を通して、天然にはない標識や反応性官能基、複数の複雑な機能性ユニットをヒストン構造に入れることが可能になるので、機能解明を支援する創造的スーパーヌクレオソームを作成して未知のヌクレオソーム機能を明らかにすることができる。これによって、ヌクレオソーム内DNAへ働きかけることができる新たな抗がん剤設計などに利用することができる。

研究成果の概要(英文)：(1) Establishment of a chemical synthesis method for artificial nucleosomes: We established a new peptide ligation method using organometallic complexes, and synthesized four types of core histones (H2A, H2B, H3, and H4) and linker histone H1.
(2) Creation of supernucleosomes: In order to discover the essence of the regulation of cell functions by atoms, we investigated protein modification methods and established a method for the chemical synthesis of "supernucleosomes" with functions not found in nature.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ヌクレオソーム DNA クロマチン ヒストン パラジウム ルテニウム ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオソームは、長さ 2m に及ぶ細胞内 DNA を折りたたむための基本構造である。DNA とヒストン部分から構成され、メチル化・アセチル化・リン酸化などのエピジェネティック修飾によってヌクレオソーム構造を開閉させて、そこからの遺伝子情報の読み取り効率を変化させている。DNA 部分についてはシトシンのメチル化 / 脱メチル化を受けて遺伝子発現効率を制御している。一方、ヒストンにはコアヒストンオクタマーおよびリンカーヒストン H1 に加え、種々のバリエーションが存在し、さらにそれらが様々な翻訳後修飾を受けることにより、多様なヌクレオソーム構造とそれに伴う遺伝子発現等の動的制御を可能にしている。

細胞の分化や細胞機能の初期化 (iPS 細胞などでの) などの細胞機能の変化や制御を解明するには、上記のヌクレオソームの構造と機能の理解が必須である。そのためにこれまでに、ヌクレオソームを構成するメチル化 / ヒドロキシル化 DNA については、研究代表者が特定の配列を持つメチル化 / ヒドロキシル化 DNA を化学的に作成する方法を確立するとともに、それらの化学的検出法を確立し、現在世界で用いられている。もう一方のヌクレオソームのメインプレイヤーであるヒストンにおいては、現在、抗体を用いた収集および解析 (ChIP-seq) が主として用いられている。しかし、この方法では抗体の標的になるエピジェネティック修飾以外の箇所の多様な修飾は無視される。ヒストン上の修飾、それによる構造変化、各ヒストン修飾間およびヒストン - DNA 修飾間のクロストークが細胞機能制御において重要であるはずであり、誰もがそれらが重要であることは認識している中で決定的な研究手法を手に入れられていないのが現状である。

2. 研究の目的

種々の生命現象におけるヌクレオソーム機能の制御と意義を理解するために、研究代表者独自の手法で任意の位置に特定の修飾を入れた化学構造的にピュアな人工ヌクレオソームを製造し、これらの生細胞内のヌクレオソームダイナミクスを顕微鏡観察を用いて時空間的に捉えて、ヌクレオソーム修飾の意味を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 人工ヌクレオソームの化学的製造法の確立...ペプチドライゲーション法を確立して、コアヒストン 4 種類 (H2A, H2B, H3, H4) およびリンカーヒストン H1 の合成を行う。

(2) スーパーヌクレオソームの創出...原子による細胞機能制御の本質を見抜くために、天然にはない機能を付与した「スーパーヌクレオソーム」を化学合成する方法を確立する。

4. 研究成果

(1) 人工ヌクレオソームの化学的製造法の確立

パラジウム法の確立

タンパク質の化学合成は、様々な修飾や官能基を持つタンパク質を作り出すために不可欠な手法である。タンパク質の化学合成には、N 末端のシステイン (Cys) と C 末端のチオエステルの化学選択的反応を利用したネイティブ・ケミカル・ライゲーション (NCL) が広く用いられている。これまでは、全体の収率を向上させるために、また手間のかかる作業を避けるために、ペプチドセグメントをワンポットで複数回ライゲーションすることが求められてきた。しかし、ペプチドセグメントの N 末端の Cys に使用される保護基の中には、脱保護に必要な長い反応時間や、過酷な脱保護条件での望ましくない副反応のために、ワンポットライゲーションに適していないものがあった。そこで、N 末端の Cys の保護にアリルオキシカルボニル基を用いることで、ペプチドセグメントの効率的なワンポット・マルチプルライゲーションを開発した。この保護基は、パラジウム錯体を用いて NCL 条件下で 10 分以内に除去された。同時に、NCL 緩衝液中の試薬との配位子交換によるパラジウム錯体の活性化が進み、添加剤を必要としない次の NCL 反応が可能となった。これらの反応が混合物中で競合することを利用して、1 日でヒストン H2AX の全化学合成を高収率で達成したのが、初のワンポット 5 セグメントライゲーションである。今回開発したワンポット多重ライゲーション法は、大型タンパク質の効率的な化学合成を可能にし、様々な修飾を持つタンパク質の機能解明に貢献するものと期待される。

ルテニウム法の確立

多数の求核性官能基を持つタンパク質を化学合成するためには、上述のように多量のパラジウム錯体が必要であった。さらに、20kDa 以上の中サイズのタンパク質を合成する際には、煩雑な精製と分離の手順に時間がかかり、様々な装飾を施したタンパク質を入手することができなかった。われわれは、空気耐性のある有機ルテニウム触媒を用いて、ワンポットで複数のペプチドをライゲーションする方法を開発した。この方法は、従来のパラジウム錯体に比べて 50 倍以上の活性を示す。この有機ルテニウム錯体は、触媒量 (20mol%) の金属錯体を用いることで、過剰なチオール部位が存在する場合でも、タンパク質を迅速かつ定量的に脱保護することができた。今回開発した有機ルテニウム触媒を用いて、リンカーヒストン H1.2 やヘテロクロマチンタ

ンパク質 1 (HP1) など、リン酸化、ユビキチン化、シトルリン化、アセチル化などの部位特異的な PTM を有する 20kDa 以上のヘテロクロマチン因子を合成した。その結果、H1.2 の R53 をシトルリン化すると、DNA との静電的相互作用が低下し、ヌクレオソームとの結合親和性が低下することが明らかになった。さらに、HP1 の DNA 結合能を制御する鍵となるリン酸化領域を発見した。

(2) スーパーヌクレオソームの創出

ペプチドやタンパク質の部位特異的な化学修飾は、生物学的研究や創薬に不可欠な技術である。均質に修飾されたタンパク質を得るためには、固相ペプチド合成とペプチドライゲーションからなる化学的タンパク質全合成が有望な技術となっている。ネイティブケミカルライゲーションは、C 末端のチオエステルと N 末端の Cys 残基の化学的選択性を利用して、分割されたペプチドセグメントを連結させる、最も広く採用されているペプチドライゲーション技術である。配列中に Cys 残基を含まないタンパク質を合成するには、フリーラジカルによる脱硫で Cys 残基を Ala 残基に変換する方法が利用されている。しかし、脱硫の際に発生するラジカルは、アルキン部位や 拡張結合を持つ蛍光色素などの機能性分子の副反応を引き起こすことが多く、化学合成されたタンパク質への機能性分子の導入が制限されていた。

そこで我々は、異なるシリル基で保護されたアルキンをを用いて、機能性分子をペプチドやタンパク質に部位選択的に導入する方法を開発した。シリル基で保護されたアルキンは、フリーラジカルによる脱硫条件に耐え、立体障害の違いに基づいて直交的に除去することができるため、銅触媒によるアジド-アルキン環化付加反応によってペプチドを部位選択的に標識することができた。しかし、これらのシリル保護されたアルキンは、一般に Lys 残基や N 末端のアミノ基に取り込まれており、アミノ基を疎水性のシリル基で置換すると、ペプチドの水溶性が著しく低下する。さらに、Lys 残基の側鎖に機能性分子を導入した場合、リンカーの長さを微調整することができず、FRET アッセイのような距離に依存した分析への応用にはまだ問題があった。そこで、我々は、ジメチルエチルシリル (DMES) または t-ブチルジメチルシリル (TBS) で保護されたアルキンを有する 2 つの Fmoc-プロパルギルグリシン誘導体 (Fmoc-Pra(DMES)-OH または Fmoc-Pra(TBS)-OH) を開発し、標準的な固相合成法を用いて容易に導入することができた。これらの Fmoc-アミノ酸を用いて 19mer のペプチドを調製し、DMES 基と TBS 基を個別に脱保護することで、部位選択的なアジド-アルキン環化付加反応を達成した。シリル保護基の立体的な大きさの違いによる直交性は、ペプチドの化学選択的なラベル化を可能にした。これらのシリル保護アルキンを持つ Fmoc-アミノ酸は、創薬を促進する多様性の高いペプチドやタンパク質の生成に応用できると想定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiraogawa, T.; Candel, G.; Fukuda, R.; Ciofini, I.; Adamo, C.; Okamoto, A.; Ehara M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Photophysical Properties of Fluorescent Imaging Biological Probes of Nucleic Acids: SAC-Cl and TD-DFT Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Comput. Chem.	6. 最初と最後の頁 127-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcc.25553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Usami, K.; Xiao, K.; Okamoto, A.	4. 巻 7
2. 論文標題 Efficient Ketose Production by Hydroxyapatite Catalyst in a Continuous Flow Module	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Sustainable Chem. Eng.	6. 最初と最後の頁 3372-3377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssuschemeng.8b05574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izuta, S.; Yamaguchi, S.; Kosaka, T.; Okamoto, A.	4. 巻 2
2. 論文標題 Reversible and Photoresponsive Immobilization of Nonadherent Cells by Spiropyran-Conjugated PEG-Lipids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Appl. Bio Mater.	6. 最初と最後の頁 33-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.8b00656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi, S; Higashi, K.; Azuma, T.; Okamoto, A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Supramolecular Polymeric Hydrogels for Ultrasound-guided Protein Release	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnol. J.	6. 最初と最後の頁 1800530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biot.201800530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanase, M.; Nakatsu, K.; Cardos, C. J.; Konda, Y.; Hayashi, G.; Okamoto, A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cysteinyloxypropyl Imide (CPI) Peptide: A Highly Reactive and Easily Accessible Crypto-thioester for Chemical Protein Synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Sci.	6. 最初と最後の頁 5967-5975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9SC00646J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi, G.; Yanase, M.; Nakatsuka, Y.; Okamoto, A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Simultaneous and Traceless Ligation of Peptide Fragments on DNA Scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1246-1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.8b01655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A.	4. 巻 21
2. 論文標題 Chemical Synthesis of Cys-Containing Protein via Chemoselective Deprotection with Different Palladium Complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org. Lett.	6. 最初と最後の頁 8378-8382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b03152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jarzebska, N. A.; Yamaguchi, S.; Izuta, S.; Kosaka, T.; Yamahira, S.; Nagamune, T.; Okamoto, A.	4. 巻 7
2. 論文標題 Photo-responsive materials with strong cell trapping ability for light-guided manipulation of nonadherent cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomater. Sci.	6. 最初と最後の頁 4514-4518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9BM01200A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morihiro, K.; Okamoto, A.	4. 巻 39
2. 論文標題 A highly constrained nucleic acid analog based on -L-threosamine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 270-279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1666278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen, J.; Morihiro, K.; Fukui, D.; Guo, L.; Okamoto, A.	4. 巻 21
2. 論文標題 Live Cell Sensing of Telomerase Activity Using Hybridization-Sensitive Fluorescent Oligonucleotide Probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1022-1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Gosuke, Yanase Masafumi, Nakatsuka Yu, Okamoto Akimitsu	4. 巻 20
2. 論文標題 Simultaneous and Traceless Ligation of Peptide Fragments on DNA Scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1246 ~ 1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.8b01655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamo Naoki, Hayashi Gosuke, Okamoto Akimitsu	4. 巻 57
2. 論文標題 Triple Function of 4-Mercaptophenylacetic Acid Promotes One-Pot Multiple Peptide Ligation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 16533 ~ 16537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201809765	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sueoka Takuma, Koyama Kenta, Hayashi Gosuke, Okamoto Akimitsu	4. 巻 18
2. 論文標題 Chemistry Driven Epigenetic Investigation of Histone and DNA Modifications	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Chemical Record	6. 最初と最後の頁 1727 ~ 1744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tcr.201800040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamo Naoki, Hayashi Gosuke, Okamoto Akimitsu	4. 巻 54
2. 論文標題 Efficient peptide ligation between allyl-protected Asp and Cys followed by palladium-mediated deprotection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 4337 ~ 4340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8CC01965G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 小阪 高広、山口 哲志、泉田 森、岡本 晃充
2. 発表標題 感光性クリック試薬を用いた異種細胞位置制御技術の開発
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第31回サマースクール
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中津 幸輝、梁瀬 将史、林 剛介、岡本 晃充
2. 発表標題 タンパク質化学合成を指向したチオエステル前駆体CPI (CysteinyIprolyl imide) の設計と機能評価
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第31回サマースクール
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 聖、山口 哲志、小阪 高広、岡本 晃充
2. 発表標題 細胞内分子動態解析のための光活性化アルキンタグ
3. 学会等名 2019年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森廣 邦彦、Jiazhuo Chen, 福井 大介、Guo Lihao、岡本 晃充
2. 発表標題 ターンオン型蛍光プローブを用いたテロメラーゼ活性の生細胞内センシング
3. 学会等名 第41回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Inorganic reactions for analysis of epigenetically modified DNA
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 哲志、細金 剛、大橋 友紀、榊原 昇一、田端 和仁、野地 博行、岡本 晃充
2. 発表標題 細胞運理を志向した光溶解性ゲル充填マイクロウェルアレイ
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森廣 邦彦、Chen Jiazhuo、福井 大介、Guo Lihao、岡本 晃充
2. 発表標題 ターンオン型蛍光オリゴヌクレオチドプローブを用いたテロメラーゼ活性の生細胞内センシング
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小阪 高広、山口 哲志、泉田 森、岡本 晃充
2. 発表標題 1細胞間相互作用解析のための光誘導型クリック反応表面
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Chemical Reactions for Analysis of Epigenetically Modified DNA
3. 学会等名 Epigenetics & Bioengineering Coference (EpiBio 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小阪 高広、山口 哲志、泉田 森、岡本 晃充
2. 発表標題 光反応性クリック試薬を用いた細胞間相互作用解析手法の開発
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yamaguchi, Shin Izuta, Shinya Yamahara, Teruyuki Nagamune, Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Photo-responsive cell immobilization reagents for cell manipulation on solid phase
3. 学会等名 The 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimitsu Okamoto, Kunihiko Morihiko, Jiazhuo Chen, Daisuke Fukui and Lihao Guo
2. 発表標題 Live-Cell Sensing of Telomerase Activity
3. 学会等名 Asia 3 Roundtable of Nucleic Acid 2019 (A3RONA) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lihao Guo, Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 EXCITON-CONTROLLED FLUORESCENT NUCLEIC ACIDS FOR BIOIMAGING
3. 学会等名 PhotoIUPAC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gosuke Hayashi, Takuma Sueoka, Masafumi Yanase, Naoki Kamo, and Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Reaction design for highly efficient chemical protein synthesis
3. 学会等名 ACS Meeting 2019 Spring (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------