

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710181
 研究課題名（和文） エピジェネティクス制御を指向したヒストンテールペプチドライブラリの構築
 研究課題名（英文） Design and synthesis of histone tail polypeptide library
 研究代表者
 坂本 清志（SAKAMOTO SEIJI）
 東北大学・多元物質科学研究所・助教
 研究者番号：30335228

研究成果の概要：

本研究では様々なアミノ酸側鎖翻訳後修飾を位置特異的に施したヒストンテールポリペプチドライブラリの構築を行った。さらに、構築したライブラリを用いて、代表的クロマチン関連因子由来のプロモドメインやクロモドメインとの相互作用を解析した。また、得られた情報に基づき、ヒストン認識ドメインや人工の刺激応答部位を複合化した分割型 GFP を設計し、任意のタンパク質翻訳後修飾反応や外部刺激を特異的に検出可能な蛍光プローブを構築することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：生体機能関連物質・ポリペプチド・ライブラリ

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムシーケンス時代において、従来のセントラルドグマやメンデルの法則の例外に位置する「エピジェネティクス」機構の解明および制御が緊急かつ重要な研究題材となりつつある。エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列非依存的な遺伝情報記憶と遺伝子発現制御を意味し、生物の発生、細胞分化、細胞周期、癌化、種々の遺伝病、老化など様々な生命現象や疾患に関与しているこ

とが判明している。エピジェネティクスにおける代表的な制御機構として、ゲノム DNA 中のシトシン塩基メチル化や、ヒストンタンパク質の後成的修飾に基づくクロマチン高次構造変化等が示唆されている。なかでも、ヒストン N および C 末端に存在するヒストンテール（20～30 残基）におけるアセチル化、メチル化、リン酸化、ADP-リボシル化、ユビキチン化、SUMO 化等の翻訳後修飾はクロマチンを構成する種々の生体分子の組

成・分布に影響を与え、クロマチンモデリングならびに遺伝子発現チューニングにおいて重要な役割を果たしている（「ヒストンコード」仮説）。従って、エピジェネティクス制御機構の本質を理解するためには、H2A、H2B、H3 および H4 の各ヒストンテールにおける様々な翻訳後修飾やその組み合わせパターンが、クロマチン関連タンパク質との相互作用に与える効果を詳細かつ系統的に評価する必要がある。また、細胞内に存在する種々のヒストン修飾酵素やヒストンシャペロン等の活性、種類ならびにその経時的発現分布変化をタンパク質レベルで可視化し、モニタリングできれば、複雑に分化した各細胞機能を分子レベルで解析することが可能となる。しかしながら、分化前後の細胞内において、染色体あるいは染色体上の位置依存的にヒストンテール修飾パターンは複雑かつ多様な変化を示す。すなわち、ヒストンテール修飾の細胞表現型に及ぼす効果を定量的に計測分析するためには、試験管内クロマチン再構成や固定化細胞抗体染色等の従来法とは異なる新規のケミカル・バイオロジー的手法に基づく方法論の開発が必須と考えた。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえた基礎的研究として、本研究では様々なアミノ酸側鎖翻訳後修飾を施したヒストンテールポリペプチドライブラリの構築と基板上へのアレイ化を第一段階の目標とした。すなわち、クロマチンを構成するヒストンタンパク質である H3 および H4 の各ヒストンテールポリペプチド配列を基体として、種々の翻訳後修飾を位置特異的に施したペプチドライブラリを化学的に調製することを試みた。ライブラリの構築に化学法を用いることによって、既存の分子生物学的手法では困難な位置選択的なアミノ酸側鎖翻訳後修飾の導入が可能となる。次いで、クロマチン関連因子由来のドメインタンパク質との相互作用を解析し、各クロマチン関連因子に対する特異的認識およびリクルートに必要なファクターを分子レベルで見いだすことを目指した。最終的には、上記のスクリーニングにより得られた情報を基に、タンパク質翻訳後修飾反応等を特異的に検出可能な新規蛍光プローブの開発を目標とした。

3. 研究の方法

1) ヒストンテールライブラリの設計・合成と固相上への固定化

計画の第一段階としてヒストンテールライブラリの構築を行った。クロマチンを構成するヒストンタンパク質である H3 および H4 の各 N 末端に存在する 20~30 残基のペプチド配列をライブラリの基体として用

いた。ライブラリ中、翻訳後修飾が予想されている Lys、Arg、Ser 残基に対してアセチル化、モノメチル化、ジメチル化、トリメチル化、リン酸化等を系統的にした。ヒストンテールペプチドライブラリの調製にはスプリット法やスポット法等のペプチド固相化学合成法を採用し、各翻訳後修飾の位置特異的なアミノ酸側鎖上への導入が可能となった。実験においては、迅速なペプチドの調製を行うために、固相担体、カップリング試薬、側鎖保護基、反応条件等の最適化を行うことで、高純度なライブラリの獲得に成功した。また、得られた一連のヒストンテールペプチドをセルロースシート等に固定化することで、クロマチン関連因子認識ペプチドアレイ構築を行った。ペプチド固定化に関しては、リンカーの種類・長さ等を検討検討し、最適な方法を採用した。加えて、表面上へのペプチド導入量調節やブロッキング剤の最適化によって、標的クロマチン関連因子の非特異吸着挙動を抑制し、高感度・低バックグラウンド解析を可能とするヒストンテールペプチドアレイの開発を目指した。

2) クロマチン関連タンパク質由来各ドメインとヒストンテールペプチドとの相互作用解析

構築したヒストンテールペプチドライブラリを用いて、各ヒストンテール構造とクロマチン関連因子との相互作用を系統的に解析する。標的タンパク質として、複雑な要素を排除するために、高次構造が明確かつ安定なタンパク質もしくは既知の認識ドメイン構造を用いる。具体的には、heterochromatin protein 1 (HP1)、GCN5、Swi3p 等のクロマチン関連因子が有するクロモドメイン、プロモドメイン、SANT ドメイン等のポリペプチド部分構造をターゲットとした。標的タンパク質遺伝子は、主として酵母染色体 DNA もしくは cDNA ライブラリから発現用プラスミドベクター上へとクローニングした。親和性の定量的評価を可能とするため、標的タンパク質には蛍光色素によるラベル化を行い、ヒストン修飾様式およびその位置・組み合わせパターンが相互作用に及ぼす効果を系統的に評価した。

3) タンパク質翻訳後修飾・脱修飾反応を検出可能なタンパク質型蛍光プローブの開発

上記のスクリーニングにより得られたヒストンテールペプチド配列やクロマチン関連因子の情報を基に、任意のタンパク質翻訳後修飾・脱修飾反応を特異的に検出可能なタンパク質型蛍光プローブの開発を試みた。すなわち、クロモドメイン、プロモドメイン、PHD、SH2 ドメイン等の翻訳後修飾認識ドメインとその基質配列を導入した分割型

GFP を設計し、各修飾・脱修飾反応を特異的に検出可能なタンパク質型蛍光プローブの開発を試みた。

4. 研究成果

1) ヒストンテールライブラリの構築とクロマチン関連因子との相互作用解析

ヒストンタンパク質 H3 および H4 の各 N 末端に存在する 20~30 残基のペプチド配列中、アセチル化、メチル化、リン酸化等の翻訳後修飾を位置特異的に施したペプチドライブラリの構築に成功した。さらに、得られたヒストンテールペプチドを固相上に固定化したペプチドアレイ構築を達成した。また、蛍光色素でラベル化したクロモドメインやプロモドメインを用いた分析の結果、ヒストン修飾様式およびその位置・組み合わせパターンが相互作用に及ぼす効果に関する知見を得た。

2) タンパク質翻訳後修飾・脱修飾反応を検出可能なタンパク質型蛍光プローブの開発

クロモドメイン、プロモドメイン、PHD、SH2 ドメイン等の翻訳後修飾認識ドメインを複合化した分割型 GFP を設計することで、各修飾・脱修飾反応を特異的に検出可能なタンパク質型蛍光プローブの開発に成功した。また、得られた知見を進展させ、人工の分子認識部位や非天然機能団を分割型タンパク質に複合化することで、任意のゲスト分子存在下や特定波長の光照射等の外部刺激に応答可能な機能性タンパク質の開発にも成功した。

以上の成果の一部は、*J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 9574-9582 や *Chem. Lett.*, **37**, 582-583, 2008 に報告した。

5. 主な発表論文等

(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 11 件)

1. S. Sakamoto, Y. Araki, T. Wada, "Design of Photoactivable Split-GFP by Incorporation of A Photolabile Linker", *Peptide Science* 2008, 487-490, 2009, 査読有り.
2. K. Akagawa, H. Akabane, T. Fujiwara, T. Yamashita, S. Sakamoto, K. Kudo, "Resin-Bound Peptide Catalyzed Asymmetric Synthesis under Aqueous Conditions", *Peptide Science* 2008, 529-530, 2009, 査読有り.
3. K. Akagawa, H. Akabane, S. Sakamoto, K. Kudo, "Asymmetric transfer hydrogenation in aqueous media catalyzed by resin-supported peptide having polyleucine tether",

Tetrahedron: Asymmetry, **20**, 461-466, 2009, 査読有り.

4. M. Furutani, S. Sakamoto, K. Kudo, "Cyclo[His-His] Derived C2-Symmetric Diketopiperazine as Chiral Ligand for Asymmetric Diels-Alder Reactions", *Heterocycles*, **78**, 1171-1176, 2009, 査読有り.
5. S. Sakamoto, K. Kudo, "Supramolecular Control of Split-GFP Reassembly by Conjugation of β -Cyclodextrin and Coumarin Units", *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 9574-9582, 2008, 査読有り.
6. K. Akagawa, H. Akabane, S. Sakamoto, K. Kudo, "Organocatalytic Asymmetric Transfer Hydrogenation in Aqueous Media using Resin-Supported Peptide having Polyleucine", *Org. Lett.*, **10**, 2035-2037, 2008, 査読有り.
7. K. Murota, S. Sakamoto, K. Kudo, "Glucose Responsive Two-step Release of Hydrogel-Immobilized Protein", *Chem. Lett.*, **37**, 582-583, 2008, 査読有り.
8. S. Sakamoto, K. Kudo, "Construction of β -Cyclodextrin and Fluorophore Conjugated Split-GFP Whose Reassembly Is Accelerated by the Addition of Hydrophobic Guest Molecules", *Peptide Science* 2007, 455-458, 2008, 査読有り.
9. M. Kasahara, S. Sakamoto, K. Kudo, "Design and Characterization of Split-GFP Whose Reassembly Is Accelerated by Phosphorylation", *Peptide Science* 2007, 459-463, 2008, 査読有り.
10. K. Murota, S. Sakamoto, K. Kudo, "Reversible Immobilization of Protein into Hydrogel Using Designed Coiled-coil Peptides", *Chem. Lett.*, **36**, 1320-1321, 2007, 査読有り.
11. K. Murota, S. Sakamoto, K. Kudo, "Orientation Control of Self-stacking D,L-Alternating Cyclic Octa- α -peptide through Multiple Electrostatic Interactions", *Chem. Lett.*, **36**, 1070-1071, 2007, 査読有り.

[学会発表] (計 17 件)

1. 坂本清志, 寺内美香, 荒木保幸, 和田健彦, "外部刺激応答機能を持つ分割型 GFP 変異体を用いた高感度検出システムへの応用", 日本化学会第 89 春季年会. 2009 年 3 月 29 日, 船橋.
2. 寺内美香, 坂本清志, 荒木保幸, 和田健彦, "外部刺激応答型緑色蛍光タンパク質の合成と蛍光検出への応用", 日本化学会第 89 春季年会. 2009 年 3 月 29 日, 船橋.
3. 古谷昌太, 坂本清志, 工藤一秋, "Cyvlo[His-His]型キラル配位子を用いた銅触媒不斉 Diels-Alder 反応", 日本化学会第 89 春季年会. 2009 年 3 月 28 日, 船橋.

4. 遠藤絵梨子, 下司慶一郎, 坂本清志, 荒木保幸, 井上佳久, 和田健彦, “塩基部配向規制因子としてフェニルボロン酸を有するペプチドリボ核酸 (PRNA) の RNA 錯体形成解離の pH による制御”, 日本化学会第 89 春季年会. 2009 年 3 月 28 日, 船橋.
5. 小野寺恵子, 西尾明洋, 坂本清志, 荒木保幸, 井上佳久, 和田健彦, “アルギニンおよびセリン含有 α -ペプチドリボ核酸の合成と DNA・RNA との相互作用”, 日本化学会第 89 春季年会. 2009 年 3 月 28 日, 船橋.
6. 赤川賢吾, 坂本清志, 工藤一秋, “固相担持プロリル触媒を用いた分子内 Baylis-Hillman 反応”, 日本化学会第 89 春季年会. 2009 年 3 月 28 日, 船橋.
7. 村上愼, 荒木保幸, 坂本清志, 和田健彦, “レーザー励起による DNA-カチオン性ポルフィリン複合体の時間分解円二色性”, 日本化学会第 89 春季年会. 2009 年 3 月 28 日, 船橋.
8. 坂本清志, “外部刺激による緑色蛍光タンパク質の機能制御”, 第 11 回生命化学研究会, 2008 年 11 月 28 日, 水上.
9. 坂本清志, 荒木保幸, 和田健彦, “光によって活性化される分割型緑色蛍光タンパク質の設計”, 2008 年 10 月 29 日, 東京.
10. 赤川賢吾, 赤羽 創, 藤原巧真, 山下拓大, 坂本清志, 工藤一秋, “樹脂固定化ペプチドを用いる水系溶媒中での触媒的不斉合成”, 2008 年 10 月 29 日, 東京.
11. 坂本清志, 和田健彦, “外部刺激応答機能を持つ分割型緑色蛍光タンパク質変異体の設計”, 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008 年 9 月 18 日, 横浜.
12. 坂本清志, 工藤一秋, “ β -シクロデキストリンと蛍光色素を複合化した GFP 変異体の設計と半合成”, 日本化学会第 88 春季年会, 2008 年 3 月 28 日, 東京.
13. 坂本清志, 工藤一秋, “Construction of β -Cyclodextrin and Fluorophore Conjugated Split-GFP Whose Reassembly Is Accelerated by the Addition of Hydrophobic Guest Molecules”, 第 44 回ペプチド討論会, 2007 年 11 月 8 日, 富山.
14. 笠原睦美, 坂本清志, 工藤一秋, “Design and Characterization of Split-GFP Whose Reassembly Is Accelerated by Phosphorylation”, 第 44 回ペプチド討論会, 2007 年 11 月 8 日, 富山.
15. 坂本清志, 工藤一秋, “シクロデキストリン複合化緑色蛍光タンパク質の設計”, 第 22 回生体機能関連化学シンポジウム・若手フォーラム, 2007 年 9 月 30 日, 仙台.
16. 坂本清志, 工藤一秋, “ β -シクロデキストリンと蛍光色素を複合化した分割型 GFP 変異体の構築”, 第 22 回生体機能関連化学シンポジウム, 2007 年 9 月 29 日, 仙台.
17. 笠原睦美, 坂本清志, 工藤一秋, “タンパク質翻訳後修飾反応の検出を指向した分割型 GFP 変異体の構築”, 第 22 回生体機能関連化学シンポジウム, 2007 年 9 月 29 日, 仙台.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 清志 (SAKAMOTO SEIJI)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号: 30335228

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者