

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560412

研究課題名(和文) ヒストン翻訳後修飾パターンの複数同時検出を可能とするタンパク質プローブ分子の創成

研究課題名(英文) Design of Detection System for Histone Modification Patterns Using Split-Proteins

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：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、エピジェネティクスに基づく遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている。以上の背景を踏まえ、分割型GFPフラグメントに対し、高次構造既知のヒストン翻訳後修飾認識ドメインを複合化することで、ヒストンテールペプチド上の特定翻訳後修飾パターンを特異的に検出可能な蛍光タンパク質型プローブの構築を達成出来た。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that the posttranslational modifications on histone tails modulate the chromatin structure and function. Therefore, the development of a highly sensitive and specific detection system for histone modification patterns will provide new insights into intricate epigenetic mechanisms. In this study, we attempted to construct a fluorescent detection system for histone modification patterns by utilizing split-GFP. In the strategy to generate split-GFP that reassembles in response to a particular histone modification, chromatin related domains were conjugated to split-GFP fragments. We envisioned that the reassembly and functional recovery of split-GFP would be promoted only in the presence of histone tail molecules possessing particular modification patterns.

研究分野：生物有機化学

キーワード：エピジェネティクス ヒストンテール 翻訳後修飾 分割型タンパク質 GFP ルシフェラーゼ バイオプローブ

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。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られる。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本申請課題では、生細胞内に存在する様々なヒストン翻訳後修飾パターン(ヒストンコード)の検出を可能とする新規蛍光および発光タンパク質型プローブ分子を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質型プローブ分子構築における基本的方法論として、人工的に切断した分割型タンパク質の再構成反応を利用した。具体的には、分割型緑色蛍光タンパク質類縁体や分割型ルシフェラーゼ等をタンパク質側の基体として用い、分割されたタンパク質フラグメントに対し、様々なヒストン翻訳後修飾認識ドメインの複合化を試みた。分子設計上、ヒストン翻訳後修飾認識ドメインの複合化によって、特定の修飾パターンを持つヒストンタンパク質分子存在下においてのみ、分割型タンパク質の再結合反応の進行とヒストン翻訳後修飾パターン特異的に依存した蛍光・発光機能の回復が期待できる。以上の設計原理に基づき、任意のヒストン翻訳後修飾パターンを蛍光および発光タンパク質由来のシグナル強度を指標として特異的に検出・定量可能な分子認識システムの構築を行った。

4. 研究成果

分割型GFP(Split-GFP)を基体タンパク質として用い、新規蛍光インディケーター的设计と構造・機能最適化を行った。今回の実験では、Waldoらによって見いだされた214位分割型GFP変異体(GFPopt)[S. Cabantous, *Nature Methods.*, **3**, 845 (2006)]やBystroffらの分割型円順列変異体(t7SPm)[Y. Huang, *Biochemistry*, **48**, 929 (2009)]等を利用した。蛍光プローブ分子設計にあたっては、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ヒストン翻訳後修飾認識ドメインを

選択し、分割した蛍光タンパク質フラグメントに複合化を行った。具体的には、heterochromatin protein 1 (HP1)、GCN5、PHD、等が持つクロモドメイン、プロモドメイン、SANT ドメイン等のヒストン翻訳後修飾認識ドメインをGFP NおよびC末側断片に対して複合化することで、任意のヒストン翻訳後修飾後パターンを特異的に認識し、蛍光を発するタンパク質型プローブの構築を行った。また、クロマチンを構成する主要ヒストンタンパク質である H2A、H2B、H3 および H4 の各N末端に存在する20~30残基の配列を基体として用い、ヒストンテール配列中の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施したヒストンテールペプチドライブラリの構築にも成功した。さらに、構築した分割型蛍光タンパク質は、ターゲットとなる翻訳後修飾パターンを持つヒストンテールペプチド存在下においてより高い蛍光強度を示すことを確認した。

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 6 件)

1. Seiji Sakamoto, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, “Design of Protease-Activable Cyclic Peptide Nucleic Acid”, *Peptide Science* 2014, 287-288 (2015).
2. Seiji Sakamoto, Anna Hugo, Mika Terauchi, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, “Design of A Sensing System for Caspase-3 Activities Using A Combination of Split-Luciferase and Split-Intein”, *Peptide Science* 2013, 387-388 (2014)

3. Seiji Sakamoto, Mika Terauchi, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, “Design and Semi-Synthesis of Photoactivable Split-GFP by Incorporation of A Photocleavable Functionality”, *Peptide Science*, **100**, 773-779 (2013).
4. Seiji Sakamoto, Mika Terauchi, Anna Hugo, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, “Creation of A Caspase-3 Sensing System Using A combination of Split-GFP and Split-Intein”, *Chem. Commun.*, **49**, 10323-10325 (2013).
5. Makoto Murakami, Yasuyuki Araki, Seiji Sakamoto, Yoshiki Hamada, Takehiko Wada, “Remarkable Enhancement of Sensitivity with the Second Generation of Elliptically Polarization-detected Circular Dichroism Spectroscopy”, *Chem. Lett.*, **42**, 261-261 (2013).
6. Seiji Sakamoto, Mika Terauchi, Anna Hugo, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, “Design and Preparation of A Dual-Protease Biosensor for Two Different Caspase Activities Using Split-GFP”, *Peptide Science* 2012, 283-284 (2013).

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 坂本清志, 荒木 保幸, 和田 健彦, 「プロテアーゼによって活性化可能な環状化ペプチド核酸の構築」, 第 95 回日本化学会春季年会, 千葉, 2015 年 3 月 26-29 日
2. Seiji Sakamoto, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, “Design of Protease-Activable Cyclized Peptide Nucleic Acid ”, *The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2014)*, Kita-Kyushu, Japan (2014.11.5-7).
3. Seiji Sakamoto, Yasuyuki Araki, and Takehiko Wada, “Design of Protease- Activable Cyclic

Peptide Nucleic Acid ”, *The 51st Japanese Peptide Symposium*, Tokushima, Japan (2014.10.22-24).

4. 坂本清志, 寺内美香, Anna Hugo, 荒木保幸, 和田健彦, 「分割型タンパク質を用いたプロテアーゼ活性検出システムの構築」, 第24回バイオ高分子シンポジウム, 東京, 2014年7月24-25日

5. 坂本清志, 寺内美香, Anna Hugo, 荒木保幸, 和田健彦, 「分割型ルシフェラーゼを用いたプロテアーゼ活性検出システムの構築」, 第94回日本化学会春季年会, 名古屋, 2014年3月27-30日

6. Seiji Sakamoto, Anna Hugo, Mika Terauchi, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, “Design of A Sensing System for Caspase-3 Activities Using A Combination of Split-Luciferase and Split-Intein”, *APIPS 2013 4th Asia-Pasific Peptide Symposium*, Osaka, Japan (2013.11.6-8).

7. Seiji Sakamoto, Anna Hugo, Mika Terauchi, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, “Design of A Caspase Sensing System Using Split-Luciferase and Split-Intein”, *International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan*, Sendai, Japan (2013.9.28-30).

8. 坂本清志, Anna Hugo, 寺内美香, 荒木保幸, 和田健彦, 「分割型タンパク質と分割型インティンを活用したプロテアーゼ活性検出システムの設計」, 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 名古屋, 2013年9月27-29日

9. Seiji Sakamoto, Anna Hugo, Mika Terauchi, Yasuyuki Araki, Takehiko Wada, “Creation of Simultaneous Dual-Color Sensing System for Independent Caspase Activities using Split-Fluorescent Proteins”, *NIH Tohoku*

University JSPS Symposium, Sendai, Japan (2013.5.9-10).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：