

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：34505

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14418

研究課題名(和文) 多様な修飾ヒストンのライブラリー化に向けた基本技術の開発

研究課題名(英文) Development of methods for preparing histones with various modifications

研究代表者

末武 勲 (Suetake, Isao)

甲子園大学・栄養学部・教授

研究者番号：80304054

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)：これまでに、タンパク質は化学修飾されることが知られている。その機能を分子的に理解するには、修飾されたタンパク質を用意する必要がある。近年、化学修飾が遺伝子発現など重要な機能に関与するとされ、しかも分子量が小さい核タンパク質であるヒストンに注目した。本研究計画中に、ユビキチン化ヒストンの合成法を確立した。この修飾ヒストンが、他のエピジェネティクス制御であるDNAメチル化を維持する活性を見出し、新制御系を報告することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで修飾タンパク質を用意して、タンパク質修飾の機能を調べるという研究は少なかった。その理由は、修飾タンパク質(特に、低分子蛋白質が修飾として導入される場合)を作成するのが難しいことによる。本研究成果で、目的のアミノ酸にユビキチン化修飾を導入することができる。そのため、その修飾の生理機に迫ることができ、私が報告した以外の新制御系も見出すことが出来ると考えている。さらに、これまで導入が容易である修飾と同時に導入することにより、さらに複雑な制御系を明らかにできうる基盤的技術を準備できたため、今後の修飾研究が大きく進むと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Proteins are posttranslationally modified. Post-translational modifications are known to be essential mechanisms to diversify their protein functions and dynamically coordinate their signaling networks. To reveal the molecular mechanisms how the modifications function, we tried to chemically prepare modified proteins. As the molecular weight is small and various modifications are reported, we focused histone, which is nuclear protein. We established a method to prepare histone H3 carrying ubiquitin analogue at specific amino acid. By using the modified histone H3, we found new epigenetic regulation that ubiquitinated histone H3 stimulated maintenance DNA methylation activity, via direct interaction, in vitro.

研究分野：生化学

キーワード：修飾ヒストン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに、生体分子が化学修飾されることにより、機能が制御されることが知られていた。特に、核タンパク質であるヒストンは修飾されることにより、遺伝子発現を促進あるいは抑制することが良く知られている。また、DNA も修飾されることが知られており、その主たる修飾は、シトシンのメチル化であり、一般に遺伝子発現抑制に関与することが知られている。これらヒストン修飾と DNA メチル化には、相互作用があることも推定されているが、それらの分子間に直接の相互作用があるか明らかでないことが多かった。そのため、化学修飾間の関連性が分子レベルで明らかでないことが多かった。

### 2. 研究の目的

DNA メチル化の制御に関して、正に機能する可能性があるヒストンの修飾がある DNA が巻き付くヒストンには 4 種 (H2A,H2B,H3,H4) あるが、中でもヒストン H3 のユビキチン化修飾が、DNA メチル化と関連することが知られていた。そこで、ヒストン H3 の特定のアミノ酸だけにユビキチン修飾を導入したユビキチン化ヒストンを有機合成により、合成する方法を確立し、DNA メチル化酵素に与える効果を調べた、またヒストン修飾は、ユビキチン化に限らず、様々な修飾が導入されることが知られているので、それら修飾を導入したヒストンを合成し DNA メチル化酵素活性に与える効果を調べた。このようにして、ヒストン修飾と DNA 修飾との間に直接的な関連性があるかを調べることにした。

### 3. 研究の方法

研究にあたり、研究分担者によって、修飾ヒストンの有機合成の系を立ち上げた。アセチル化、メチル化は比較的容易に合成できたが、特異的なアミノ酸にユビキチン化修飾を導入することは、工夫が必要であった。というのも、ユビキチン化タンパク質は、ユビキチン化ターゲット部位にシステインを導入し、S-S 結合でつなげる場合が多いが、DNA メチル化活性を測定するには、一定量の還元剤が必要だから、これまでの方法は利用できないのである。そこで、有機化学的にユビキチン化修飾を導入することにした。

### 4. 研究成果

ユビキチン化修飾は、チランリンカーを用いたイソペプチド類似構造を介して、連結させることにした(右図; 図中の丸印がユビキチンである)。これにより、還元剤存在下でもはずれることがなく、ユビキチン化が安定に維持できる系を構築することが出来た(文献 12)。

これを用いて、DNA メチル化を維持する酵素 (Dnmt1) の活性に与える効果を調べた(文献 5)。その結果、数 10 nM という低い濃度で、Dnmt1 活性を約 10 倍弱促進することを見出すと共に、酵素反応の

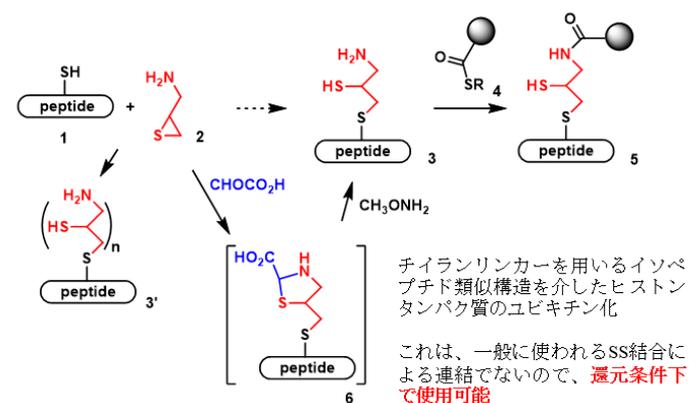
活性化エネルギーを下げることを見出しました。一方、ユビキチン化するアミノ酸の部位に応じて、その活性促進効果に差があることも報告しました。

さらに、共同研究の構造解析で、ユビキチン化ヒストンが Dnmt1 の構造を変化させ、触媒領域を OPEN にして、基質 DNA が反応しやすい状況を作り出していることが分かった。ユビキチン化ヒストンは、一旦形成された DNA メチル化模様を安定に維持させるのに関与することが分かった。

ユビキチンは分子量約 1 万弱であり、他の修飾に比べてかなり大きいので、この修飾自体が、核内 DNA がとる基本構造であるヌクレオソーム構造にどのような影響を与えるかを調べた。まず、ユビキチン化したヒストン全長分子を合成し、他の 3 種のヒストン、DNA と混合し、試験管内で核内の基本構造であるヌクレオソームが再構成できるかを調べた(業績 9)。結果として、正常に再構成できることが分かった。さらに、ヌクレオソームの性質について調べたが、大きな影響はなかった。そのため、ユビキチン化修飾が機能するためには、Dnmt1 のような結合因子が認識して、特定の機能をユビキチン化修飾の近傍に連れてくるのであろうと推察できる。

一方、ヒストンはユビキチン化以外にも、メチル化やアセチル化が導入される。そこで、メチル化ヒストン H3、アセチル化ヒストン H3 を合成し、Dnmt1 活性に対する効果をみた。非修飾のヒストン H3 は、高濃度で、Dnmt1 活性を阻害するものの、アセチル化するとそ

#### Formation of an isopeptide-mimetic linkage using a 2-aminomethylthiirane linker



の阻害効果がなくなることを見つけた。一方、メチル化の場合は、ヒストン H3 の阻害効果の解消を引き起こすことは無かった (業績 7)。

このように、本研究計画において、分子レベルで DNA メチル化酵素にヒストン分子上の化学修飾がどのように機能するかを調べる系を立ち上げると共に、特定の修飾に関してはその効果を報告することができた。

#### 5 . 主な発表論文等

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

Mishima Y, Brueckner L, Takahashi S, Kawakami T, Arita K, Oka S, Otani J, Hojo H, Shirakawa M, Shinohara A, Watanabe M, **Suetake I\***. (2017) RFTS-dependent negative regulation of Dnmt1 by nucleosome structure and histone tails. *FEBS J*. **284**, 3455-3469. (\*; corresponding author)

Kawakami T, Mishima Y, Hojo H, **Suetake I\***. (2017) Synthesis of Ubiquitylated Histone H3 Using a Thiirane Linker for Chemical Ligation. *J. Pep. Sci*. **23**, 532-538. (\*; corresponding author)

Kawakami T\*, Mishima Y, Kinoshita M, Lee, YH, **Suetake I** (2016) A thiirane linker for isopeptide mimetics by peptide ligation *Tetrahedron Letters* **57**, 2112–2115

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 3 件 )

1. Watanabe S, Mishima Y, Shimizu M, **Suetake I\***, Takada S\* (2018) Interactions of HP1 bound to H3K9me3 di-nucleosome by molecular simulations and biochemical assays. *Biophysical J*. **114**, 2336-2351. (\*; corresponding author)

2, Dawson EP, Lanza DG, Webster NJ, Benton SM, **Suetake I**, Heaney JD\*. (2018) Delayed male germ cell sex-specification permits transition into embryonal carcinoma cells with features of primed pluripotency. *Development* **145**, dev156612.

3, Sato K\*, Kunitomo Y, Kasai Y, Utsumi S, **Suetake I**, Tajima S, Ichikawa S, Matsuda A \*(2018) Mechanism-Based Inhibitor of DNA Cytosine-5 Methyltransferase by a SN Ar Reaction with an Oligodeoxyribonucleotide Containing a 2-Amino-4-Halopyridine-C-Nucleoside. *ChemBioChem* **19**, 865-872.

4, Hori Y, Otomura N, Nishida A, Nishiura M, Umeno M, **Suetake I**, Kikuchi K\*. (2018) Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe with Fluorogenic Switch for Live-Cell Imaging of DNA Methylation. *J Am Chem Soc*. **140**, 1686-1690.

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

6, Omori Y, Kubo S, Kon T, Furuhashi M, Narita H, Kominami T, Ueno A, Tsutsumi R, Chaya T, Yamamoto H, **Suetake I**, Ueno S, Koseki H, Nakagawa A, Furukawa T\*. (2017) Samd7 is a cell type-specific PRC1 component essential for establishing retinal rod photoreceptor identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, E8264-E8273.

7, Mishima Y, Brueckner L, Takahashi S, Kawakami T, Arita K, Oka S, Otani J, Hojo H, Shirakawa M, Shinohara A, Watanabe M, **Suetake I\***. (2017) RFTS-dependent negative regulation of Dnmt1 by nucleosome structure and histone tails. *FEBS J*. **284**, 3455-3469. (\*; corresponding author)

8, Kanada K, Takeshita K, **Suetake I**, Tajima S, Nakagawa A\*. (2017) Conserved threonine 1505 in the catalytic domain stabilizes mouse DNA methyltransferase1. *J. Biochem*. **162**, 271-278.

9, Kawakami T, Mishima Y, Hojo H, **Suetake I\***. (2017) Synthesis of Ubiquitylated Histone H3 Using a Thiirane Linker for Chemical Ligation. *J. Pep. Sci*. **23**, 532-538. (\*; corresponding author)

10, Kawasaki Y, Kuroda Y, **Suetake I**, Tajima S, Ishino F, Kohda T\*. (2017) A Novel method for the simultaneous identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine at single base resolution. *Nucl. Acids Res.* **45**, e24

11, Fukuzawa S\*, Takahashi S, Tachibana K, Tajima S, **Suetake I**\*. (2016) Simple and accurate single base resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine by catalytic oxidative bisulfite sequencing using micelle incarcerated oxidants *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 4254-4262 (\*; corresponding author)

12, Kawakami T\*, Mishimaa Y, Kinoshita M, Lee, YH, **Suetake I** (2016) A thiirane linker for isopeptide mimetics by peptide ligation *Tetrahedron Letters* **57**, 2112–2115

13, Kafer GR, Li X, Horii T, **Suetake I**, Tajima S, Hatada I, Carlton PM\*. (2016) 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability. *Cell Rep.* **14**, 1283-92.

〔学会発表〕(計 33 件)

1, 川上徹、三島優一、北條裕信、**末武勲** (2018) チイ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、3 月 20～23 日、日本大学理工学部 船橋キャンパス

2, **末武勲** (2018) 維持型 DNA メチル化酵素 (Dnmt1) の活性促進メカニズム、第 91 回日本生化学会大会 生化学会シンポジウム、9 月 25 日、国立京都国際会館

3, 有田恭平、石山玲、西山敦哉、中西真、川上徹、**末武勲** (2018) マルチプルモノユビキチン化ヒストン H3 が制御する DNA 維持メチル化の構造基盤、第 91 回日本生化学会大会 生化学会シンポジウム、9 月 25 日、国立京都国際会館

4, 荒田敏昭、三島優一、中澤重顕、佐藤和信、工位武治、川上徹、北條裕信、藤原敏道、宮田真人、**末武勲** (2018) スピンラベル ESR 法によるヘテロクロマチンタンパク質 HP1 の動的構造の研究、第 57 回電子スピンサイエンス学会年会、2018 年 11 月 1-3 日、北海道大学

5, 荒田敏昭、三島優一、中澤重顕、佐藤和信、工位武治、藤原敏道、**末武勲** (2018) スピンラベル ESR によるヘテロクロマチンタンパク質 HP1 の動的構造の研究、第 91 回日本生化学会大会、9 月 25 日、国立京都国際会館

6, 首浦武作志、田嶋正二、木村博信、**末武勲**、多田政子 (2018) クロマチン状態による Dnmt1 の de novo メチル化活性制御、第 12 回エピジェネティクス研究会、5 月 24-25 日、北海道立道民活動センター

7, 荒田敏昭、三島優一、中澤重顕、佐藤和信、工位武治、藤原敏道、**末武勲** (2018) スピンラベル ESR によるヘテロクロマチンタンパク質 HP1 の動的構造の研究、日本生物物理学会第 56 回年会、9 月 15-17 日、岡山大学

8, Kawakami T, Takazawa M, Mishima Y, Hojo H, **Suetake I** (2018) Chemical Synthesis of Ubiquitinated Histone H3、10th International Peptide Symposium、12 月 3-7 日、京都 みやこめっせ

9, **末武勲**、荒田敏昭、三島優一、中澤重顕、佐藤和信、工位武治、川上徹、北條裕信、藤原敏道、宮田真人 (2018) スピンラベル ESR 法によるヘテロクロマチンタンパク質 HP1 の動的構造の研究、第 41 回日本分子生物学会年会、11 月 28-30 日、パシフィコ横浜

10, **Suetake I** (2017) DNA methylation and histone modifications, 5th Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications, 5th AWEST 2017, June 18–21, at Awaji Yumebutai.

11, Kawakami T, Mishima Y, Hojo H, **Suetake I** (2017) Histone Ubiquitination via an Isopeptide Mimetic Structure by Using a Thiirane Linker、ペプチド学会、11 月 20 - 22 日、大阪府大

12, 西山敦哉、石山玲、佐伯泰、三島優一、川上徹、北條裕信、**末武勲**、有田恭平、中西真 (2017) DNA メチル化継承を制御するユビキチン・コード、第 90 回 生化学会 12 月 6

9日、神戸ポートアイランド

13, 石山玲, 西山敦哉, 松村るみ丞, 三島優一, **末武勲**, 中西真, 有田 恭平 (2017) DNA メチル化酵素とユビキチン化ヒストン H3 の構造生物学的研究、第 17 回 蛋白質科学会、2017 年 6 月 20~22 日、仙台国際センター

14, 川上徹, 三島優一, 北條裕信, **末武勲** (2017) チイ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ユビキチン化、第 17 回 蛋白質科学会、2017 年 6 月 20~22 日、仙台国際センター

15, Kawakami T, Mishima Y, Hojo H, **Suetake I** (2017) HISTONE UBIQUITINATION VIA AN ISOPEPTIDE MIMETIC STRUCTURE BY USING A THIIRANE LINKER, 第 54 回ペプチド討論会、11 月 20 22 日、大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス

16, 川上徹, 三島優一, 北條裕信, **末武勲** (2017) チイ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、第 90 回 生化学会、12 月 6 9 日、神戸ポートアイランド

17, 西山敦哉, 石山玲, 佐伯泰, 三島優一, 川上徹, 北條裕信, **末武勲**, 有田恭平、中西真、(2017) DNA メチル化継承を制御するユビキチン・コード、第 90 回 生化学会、12 月 6 9 日 神戸ポートアイランド

18, 三島優一, 川上徹, 北條裕信, 有田恭平, **末武勲** (2017) ユビキチン化ヒストンは、維持型メチル化酵素 Dnmt1 のメチル化維持活性を促進する第 90 回 生化学会、12 月 6 9 日 神戸ポートアイランド

19, **Suetake I**, Mishima Y, Watanabe S, Shimizu M, Takada S (2017) Isoform-specific binding properties of Heterochromatin protein 1, The 4th Awaji International Workshop on Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented, AWEST2016, June 19 – 22, Awaji Yumebutai International Conference Center

20, 高橋沙央里, **末武勲** (2016) DNA 脱メチル化制御機構の解析、第 16 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ、6 月 9 日、福岡国際会議場

21, 福沢世傑, 高橋沙央里, 橋和夫, 田嶋正二, **末武勲** (2016) 5 - ヒドロキシメチルシトシンの一塩基レベルでの検出法の開発日本化学会 第 96 春季年会、3 月 24 ~ 27 日同志社大学 京田辺キャンパス

22, 川上徹, 三島優一, 木下岬, 李映昊, **末武勲** (2016) 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ユビキチン化、第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日 千里ライフセンター

23, 三島優一, 岡翔太, 田嶋正二, **末武勲** (2016) 維持型メチル化酵素 Dnmt1 による再構成ヌクレオソーム内のヘミメチル DNA のメチル化特性、第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日 千里ライフセンター

24, 堀居拓郎, 森田純代, 木村美香, 寺脇直美, 木村博信, **末武勲**, 田嶋正二, 安部由美子, 畑田出穂 (2016) ES 細胞の多能性には Tet による Nr2f2 プロモーター領域の脱メチル化が必要である、第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日、千里ライフセンター

25, 福沢世傑, 高橋央里, 橋和夫, 田嶋正二, **末武勲** (2016) 5-ヒドロキシメチル化シトシンの 1 塩基レベルでの検出法の開発、第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日 千里ライフセンター

26, 金田健作, 竹下浩平, **末武勲**, Ronald Garvilles, 木村博信, 田嶋正二, 中川敦史 (2016) T1505 は W1512 を支えることにより Dnmt1 の触媒中心のメチル化シトシンの認識に寄与している、第 10 回エピジェネティクス研究会年会、5 月 19-20 日、千里ライフセンター

27, 金田健作, 竹下浩平, **末武勲**, Ronald Garvilles, 木村博信, 田嶋正二, 中川敦史 (2016) ゲノムメチル化模様を次世代細胞に継承する Dnmt1 の正確なメチル化反応に関する構造生物学的知見、第 16 回日本蛋白質科学会、6 月 9 日、福岡国際会議場

28, Kawakami T, Mishima Y, Kinoshita M, Lee Y, **Suetake I** (2016) A preparation of isopeptide mimetics by the peptide ligation using a thirane linker 第53回ペプチド討論会、10月26-28日、京都テルサホール

29, Kawakami T, Mishima Y, Kinoshita M, Lee Y, **Suetake I** (2016) A preparation of isopeptide mimetics by the peptide ligation using a thirane linker、第10回バイオ関連化学シンポジウム、9月7-9日、金沢

30, **末武勲**, 三島優一, 川上徹, 北條裕信 (2016) 維持型メチル化酵素 Dnmt1 のメチル化維持活性は、ヌクレオソーム構造により阻害される、第89回 生化学会、9月25-27日、仙台国際センター

31, 川上徹, 三島優一, 木下岬, 李 映昊, **末武勲** (2016) チイランリンカーを用いる急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 生化学会、9月25-27日、仙台国際センター

32, 三島優一, 川上徹, 北條裕信, **末武勲** (2016) 維持型 DNA メチル化酵素、Dnmt1、のメチル化活性のヌクレオソーム構造による阻害様式、第39回分子生物学会、11月30日 12月2日、パシフィコ横浜、

33, 韓龍雲, 山本れいこ, 柳道真帆, 三島優一, **末武勲**, 山田和弘, 原田慶恵 (2016) 分光学的手法によるクロマチンリモデリング因子の機能解析、第39回分子生物学会、11月30日 12月2日、パシフィコ横浜

〔図書〕(計4件)

1. **Suetake I**, Watanabe M, Takeshita K, Takahashi S, Carlton P. (2017) The molecular basis of DNA methylation. in DNA and Histone Methylation as Cancer Targets (Cancer Drug Discovery and Development), pp. 19- 51. Humana Press

2. **末武勲**, 三島優一、高橋沙央里、古川亜矢子 (2017) DNA メチル化酵素活性の解析、エピジェネティクス実験スタンダード 牛島俊和、真貝洋一、塩見晴彦(編集) pp. 85-94 . 羊土社

3, Tajima S, **Suetake I**, Takeshita K, Nakagawa A, Kimura H. (2016) Domain Structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA Methyltransferases. in DNA Methyltransferases-Role and Function: Jeltsch A and Jurkowska RA ed., pp. 63-86, Springer International Publishing Switzerland.

4. Tajima S, Kimura H, **Suetake I**. (2016) Establishment and maintenance of DNA methylation. in DNA replication Recombination, and Repair. Fumio Hanaoka and Kaoru Sugawara ed., pp. 489-516, Springer Japan.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：川上徹

ローマ字氏名：Toru Kawakami

所属研究機関名：大阪大学

部局名：蛋白質研究所

職名：准教授

研究者番号(8桁)：70273711