

平成 22年 5月18日現在

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

研究成果の概要（和文）：修飾ヒストン合成法の開発を目的とし、修飾アミノ酸の大量合成法の検討、修飾アミノ酸含有ヒストンテイルの合成を実施した。修飾ヒストンテイルを用いた研究からメチル化酵素複合体の活性発現機構の解析を行い、従来提案されている機構は再考されるべきとの結論を得た。全長ヒストン合成法について検討し、目的とした全長 9Lys(Me<sub>3</sub>)ヒストン H3 の分子質量を観測することが出来た。さらなる合成効率の向上を目的として合成法の再検討を実施した。

研究成果の概要（英文）：To establish synthetic methods of histone H3 tail and modified histone H3, we searched methods for modified lysine synthesis, chemical synthesis of modified lysine-containing histone H3 tails, and chemical synthesis of full sequence histone H3. Synthetic modified histone H3 tails contributed to the biochemical elucidation of polycomb repressive complex 2. 9Lys(Me<sub>3</sub>)-histone H3 was also synthesized.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
総計	15,800,000	4,740,000	20,540,000

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. 研究開始当初の背景

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かった。

ところが、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手法が開発され、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。そこで、生命科学の発展に寄与することの出来る修飾ヒストン合成法を開発することとした。

## 2. 研究の目的

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*-アセチル化リシン、*N*-モノメチル化リシン、*N*-ジメチル化リシン、*N*-トリメチル化リシン、*N*<sup>o</sup>-モノメチル化アルギニン、リン酸化セリン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とともに、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。

## 3. 研究の方法

本研究では有機化学的手法に基づき、まず、修飾ヒストン H3 の N 末端部位（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*-アセチル化リシン、*N*-モノメチル化リシン、*N*-ジメチル化リシン、*N*-トリメチル化リシン、*N*<sup>o</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。その結果を基に多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。これと平行して、修飾された全長ヒストンの化学的合成法の開発を行う。

## 4. 研究成果

(1) 修飾ヒストンの合成に必要とされる保護修飾アミノ酸の合成：Fmoc ペプチド合成法による *N*-アセチル化リシン、*N*-モノメチル化リシン、*N*-ジメチル化リシン、*N*-トリメチル化リシンを合成した。

(2) 修飾ヒストンテイルの合成：修飾ヒストンテイルの合成条件を確立し、修飾ヒストン H3(1-43)-Cys-Pro-OCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> (ARTKQTARKS TGGKAPRKQL ATKAA RKSAP ATGGVKKPHR YRP-Cys-Pro-OCH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, K9: Me<sub>0</sub>, Me, Me<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>) を合成した。さらに、蛍光ならびにビオチン標識された修飾ヒストンテイルを合成した。

(3) 修飾ヒストンテイルの標識体の調製と核内蛋白質並びに DNA との相互作用解析：

修飾状態の差異、特に K 9 のメチル化状態の差異は、遺伝子の発現に変化をもたらすことが知られている。(2) で合成したヒストンテイルや、それらの C 末端部位にビオチンと蛍光体を導入したものを用い、ヒストン H3K27 メチル化酵素の特定のリシン残基依存的な活性促進効果の解明を行った。ヒストン H3K27 をメチル化酵素複合体 (PRC2) の活性

には、3 因子 (Ezh2, Suz12, Eed) が必要であるとされているが、Suz12 の一部を改変すると Ezh2 と Suz12 だけでヒストン H3K27 のメチル化修飾活性があることを明らかにし、この系を用いてヒストン H3K9 のメチル化修飾価数依存的な活性促進効果を明らかにした。以上の結果は、Eed がメチル化修飾を認識して PRC2 のメチル化活性を促進するという従来から提案されている機構は再考されるべきとの結論を得た。

また、合成ペプチドを用い、メチル化修飾ペプチドの新たな分析手法を提案することが出来た。すなわち、これまで、蛋白質のメチル化状態を調べるには、リシン残基をプロピオニル化し、トリプシンなどで酵素消化して得られるペプチド断片を質量分析装置により解析する手法などが用いられてきた。メチル化した合成ペプチドを用いて検討した結果、リシン残基のメチル化修飾によってリシルエンドペプチダーゼ (Lys-C) による酵素消化が阻害されることを見出した。この知見を利用すれば、ヒストンに限らず、生体内でリシン残基がメチル化された蛋白質を Lys-C で酵素消化し、得られたペプチド断片を質量分析装置により解析すれば、比較的簡便にメチル化修飾部位とメチル化価数の同定が可能となることを明らかとした。

(4) 修飾ヒストンテイルのチオエステル体の調製法の検討：ペプチドの末端に Cys-Pro エステル (CPE 基) を導入しておくこと、図 1 に示す反応経路に従ってペプチドチオエステルを調製できるという方法を我々は開発し、この方法に基づいてヒストンペプチドのチオエステルを調製することとした。まず、通常の Fmoc 固相法でペプチドを調製し、ペプ

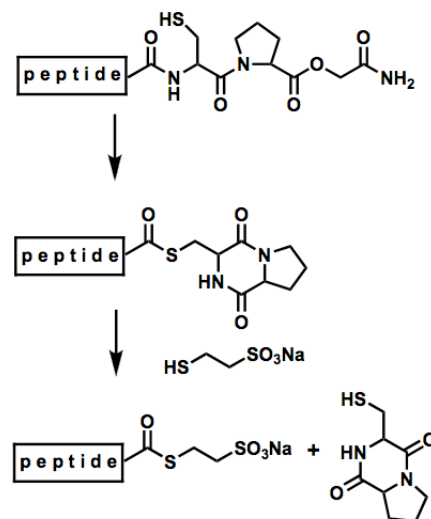


図1 ペプチドC-末端にCPE基を有するペプチドのペプチドチオエステルへの変換反応

チド鎖の伸長操作終了後、N-S アシル基転位反応により、アミド結合をチオエステルへと変換した。溶媒、pH、C末端時ペプチドの構造等について、チオエステルへの至適変換条件を探索した。その結果、pH7.5-8.0の緩衝液中でHSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na存在下、室温2日で70%の収率でペプチドチオエステルが得られることが明らかとなった。しかし、チオエステルを形成しているアミノ酸が一部ラセミ化することとも判明した。

(5) 発現ヒストン部分ペプチド、Met-histone H3(14-135)、のヒストン合成用ブロックへの誘導とハイブリッド法による全長修飾ヒストンの合成：ヒストン H3 ではアミノ末端部分（ヒストンテール）に修飾がある。その部分を化学的に調製し、それ以外の部分を組換え蛋白質として生物学的に調製して、それぞれを縮合することによって、効率的に修飾ヒストンを調製するルートの開発を試みた。

大腸菌を用いて、Met-histone H3(14-135)のN-末端にHis-tag\_Factor Xa siteが結合した組み換え蛋白質（His-tag\_Factor Xa site-Met-histone H3(14-135)）を調製した。このものを部位特異的加水分解酵素であるFactor Xaで処理してHisタグを除去し、Dixon法により末端アミノ基のカルボニル基へ変換、側鎖アミノ基へのBoc基の導入、α-ケトアシル基の除去というプロセスを通して、チオエステル法に用いることの出来る合成ブロックを調製する計画を立てた。しかし、Factor Xaでの処理の際に、目的部位以外にArg128位で切断されたペプチドが観測された。また、逆相HPLCでの精製でも収率が低く、効率的な合成ブロックの調製は困難であると判断し、この合成計画を断念した。

(6) 修飾された全長ヒストンの合成法の開発：申請者らの開発した拡張型ライゲーション法と、自発的チオエステル生成ユニットであるCPEユニットを用い、9Lys(Me<sub>3</sub>)-ヒストンH3の全合成を図2に示す経路に従って試みた。

まず、合成ブロックである histone H3(1-33)-CPE (1), N末端アミノ基に3,4-dimethoxy-2-mercaptobenzyl(Dmmb)基とFmoc基が、C-末端にCPE基が導入された histone H3(34-95) (2)、並びに histone H3(98-135) (3)をFmoc固相法で調製した。合成ブロック2と3をpH8の水溶液中でnative chemical ligation法により縮合し、Fmoc, Dmmb-histone H3(34-135) (4)を得た。この中間体をピペリジン処理することによりFmoc基を除去したのち、拡張型ライゲーション法により合成ブロック1と縮合させ中間体5を得た。5を単離することなくトリフルオロメタンスルホン酸含有トリフルオロ酢酸で処理し、Dmmb基とBoc基を除去した。

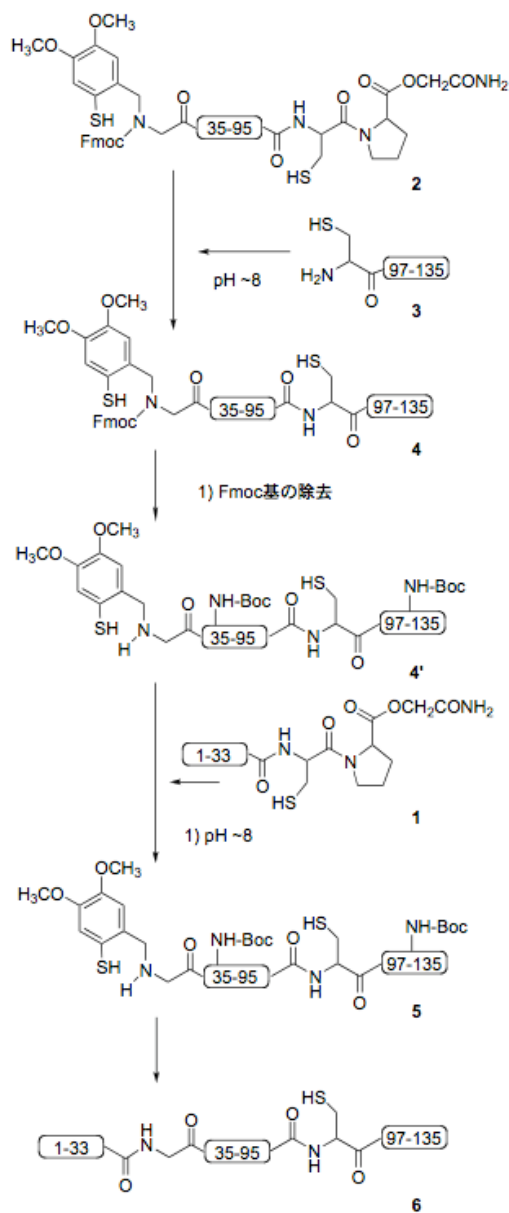


図2 自発的チオエステル生成ユニットであるCPE基をもつ合成ブロックを用いnative chemical ligation法と拡張型ライゲーション法を組み合わせた9Lys(Me<sub>3</sub>)-histone H3の全合成経路

その結果、収率は低いものの目的とする[Lys(Me<sub>3</sub>)<sup>9</sup>]-histone H3(1-135) (6)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。(図3)しかし、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。

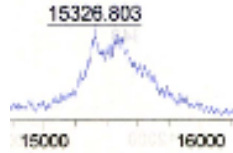


図3 [Lys(Me<sub>3</sub>)<sup>9</sup>]- histone H3(1-135)の分子質量 (計算値: 15316.8)

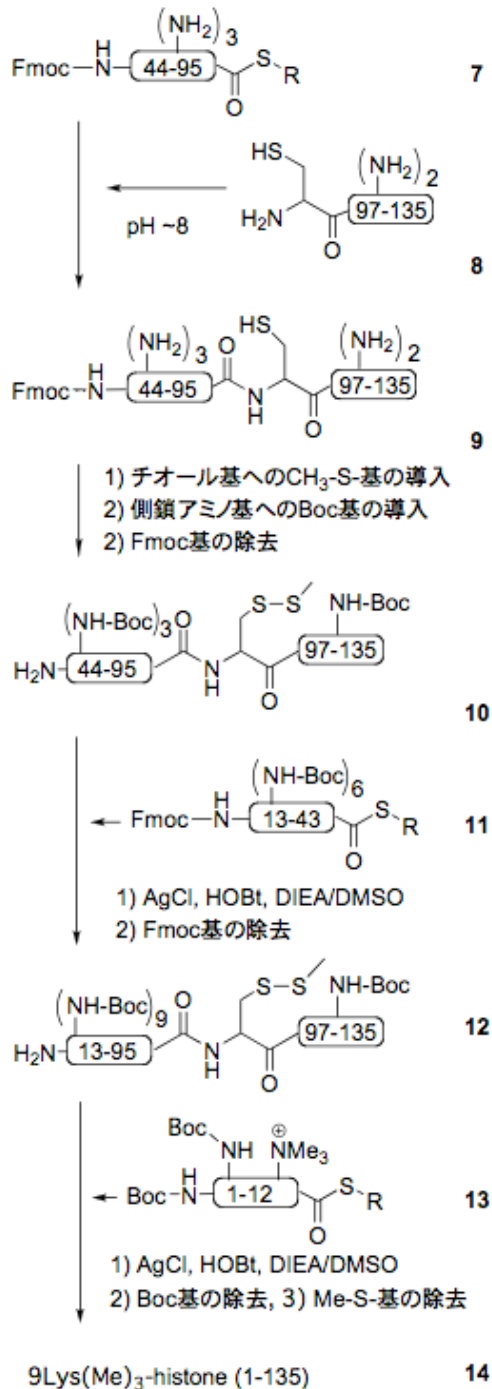


図4 native chemical ligation法とチオエステル法を組み合わせた修飾ヒストン全合成経路

そこで、図4に示す経路により、合成ブロックとしてペプチドチオエステルを、縮合法として native chemical ligation 法とチオエステル法を組み合わせ、9位がLys(Me<sub>3</sub>)となった全長ヒストンの再合成に挑戦することとした。

Fmoc-histon H3(44-95)チオエステル(7)とhiston H3(96-135)(8)を native chemical ligation 法で縮合させる。その生成物であるFmoc-histon H3(44-135)(9)のチオール基を適切な保護基で保護し、側鎖のアミノ基にBoc基を導入したのち、Fmoc基を除去して、側鎖保護H-histon H3(44-135)(10)とする。これにFmoc-histon H3(13-43)チオエステル(11)をチオエステル法で縮合させて、Fmoc-histon H3(13-135)とし、Fmoc基を除去してH-histon H3(13-135)を得る。このものとBoc-9Lys(Me<sub>3</sub>)-histone(1-12)チオエステル(13)をチオエステル法で縮合し9位Lys(Me<sub>3</sub>)-histone(1-135)の合成を目指した。

まず、このプロセスで全長ヒストンの合成を可能とするためには、histone H3(44-135)(9)中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を見出す必要があった。探索の結果、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。

現在、化合物10までの合成条件を確立することが出来た。また、合成ブロック11,13の調製も完了している。

(7)合成全長ヒストンのヌクレオソームへの導入: 田嶋らの方法により、全長ヒストンのヌクレオソームへの導入実験を行い、転写効率の変化を生化学的手法により解析する予定であったが、全長ヒストンが合成できず、実施できなかった。

## 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16件)

① Sakiko Shimizu, Saburo Aimoto, Toru Kawakami, Formation of Peptide Thioesters by an *N* to *S* Acyl Shift Reaction at the Cysteinylyl Prolyl Cysteine Position, *Peptide Science* 2009, 153-154 (2010) 査読有

② Toru Kawakami, Sakiko Shimizu, Saburo Aimoto, Synthesis of Peptide Thioesters Based on an *N* to *S* Acyl Shift Reaction, *Peptide Science* 2009, 79-80 (2010) 査読有

③ Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Synthesis of Peptide Thioester, by the Cysteinylyl Prolyl Ester (CPE) Method, *Peptide Science* 2008, 171-172 (2009) 査読有

④ Toshiaki Hara, Akira Tainosho, Toru Kawakami, Saburo Aimoto, 2-Nitrobenzylcarbamate-type Photocleavable Linker Having Fmoc-aminoalkoxy Group: Preparation and Application to Peptide Purification, *Peptide Science 2008*, 199-201 (2009) 査読有

⑤ Yuichi Akai, Lisa Takemura, Yuko Aoki, Masazumi Waseda, Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Methylthio Groups for Thiol Protection that realize the Sequential Ligation by Native Chemical Ligation followed by Thioester method, *Peptide Science 2008*, 201-201 (2009) 査読有

⑥ Akira Tainosho, Toshiaki Hara, Ken'ichiro Nakamura, Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Peptide Purification Using The Selective Reaction Between Aminooxy Group and Isothiocyanate Group, Followed by Edman Degradation, *Peptide Science 2008*, 205-207 (2009) 査読有

⑦ Ken'ichiro Nakamura, Tomoki Kanao, Tomoya Uesugi, Toshiaki Hara, Takeshi Sato, Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Synthesis of peptide thioesters via an *N-S* acyl shift reaction under mild acidic conditions using an *N*-4,5-dimethoxy-2-mercaptobenzyl auxiliary group, *J. Peptide Sci.*, **15**, 731-7 (2009) 査読有

⑧ 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

⑨ Toru Kawakami, Saburo Aimoto, The Use of a Cysteinylyl Prolyl Ester (CPE) Autoactivating Unit in Peptide Ligation Reactions, *Tetrahedron*, **65**, 3871-3877 (2009) 査読有

⑩ Hisao Fujimoto, Chieko Kita, Akira Tainosho, Yuichi Akai, Lisa Takemura, Hitomi Kanda, Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Synthesis of a Partial Sequence of Site-Specifically Methylated Histone H3  
*Peptide Science 2007*, 209-210 (2008) 査読有

⑪ Ken'ichiro Nakamura, Hiroaki Mori, Toru Kawakami, Hironobi Hojo, Yoshiaki Nakahara, Saburo Aimoto, Peptide Thioester Synthesis via an Auxiliary-Mediated *N-S* Acyl Shift Reaction in Solution *Int. J. Peptide Res. Therapeutics*, **13**, 191-202 (2007) 査読有

⑫ Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Sequential Peptide Ligation by Using a Controlled Cysteinylyl Prolyl Ester (CPE) Autoactivating Unit, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 1903-1905 (2007). 査読有

⑬ Toru Kawakami, Ken'ichiro Nakamura, Saburo Aimoto, Polypeptide Synthesis via the *N*- to *S*-Acyl Shift Reaction, *Peptides 2006*,

198-199 (2007) 査読有

⑭ Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Peptide Ligation Using a Building Block Having a Cysteinylyl Prolyl Ester (CPE) Autoactivating Unit at the Carboxy Terminus, *Chem. Lett.*, **36**, 76-77 (2007). 査読有

⑮ Toru Kawakami, Ken'ichiro Nakamura, Saburo Aimoto, Peptide ligation thinvolves an intramolecular *N* to *S* acyl shift reaction, *Peptide Science 2006*, 29 (2006)

⑯ Ken'ichiro Nakamura, Toru Kawakami, Hironobi Hojo, Yoshiaki Nakahara, Saburo Aimoto, *N-S* acyl shift reaction on peptide backbone and its application to preparation of peptide thioesters, *peptide Science 2006*, 42 (2006)

[学会発表] (計 19 件)

① 原 利明、田結 莊 明、川上 徹、相本 三郎、2-ニトロベンジルカルバメイト型光分解リンカーを用いる化学合成ペプチドの精製、日本化学会第90回春季年会、2010.3.27、近畿大学、東大阪市

② 清水 咲子、相本 三郎、川上 徹、Cys-Pro-Cys 部位における *N-S* アシル基転位反応を利用したペプチドチオエステルの合成、日本化学会第90回春季年会、2010.3.27、近畿大学、東大阪市

③ Isao Suetake, Saburo Aimoto, Yuko Aoki, Kyoichi Isono, Toru Kawakami, Hiroshi Kimura, Akihiko Koseki, Yuichi Mishima, Osamu Nishimura, Shoji Tajima, Makoto Watanabe, Histone H3K9 trimethylation stimulates the histone H3K27 methylation activity of PRC2 bypassing Eed, Keystone symposium, 2010.1.20, Sagebrush Inn and Conference Center, Taos, New Mexico

④ Toru Kawakami, Sakiko Shimizu, Saburo Aimoto, Synthesis of Peptide Thioesters Based on an *N* to *S* Acyl Shift Reaction, 第46回ペプチド討論会、2009.11.5、北九州国際会議場、北九州市

⑤ Sakiko Shimizu, Saburo Aimoto, Toru Kawakami, Formation of Peptide Thioesters by an *N* to *S* Acyl Shift Reaction at the Cysteinylyl Prolyl Cysteine Position, 第46回ペプチド討論会、2009.11.5、北九州国際会議場、北九州市

⑥ 三島 優一、磯野 協一、青木 優子、川上 徹、渡辺 真、木村 宏、西村 紀、相本 三郎、古関 明彦、田嶋 正二、末武 勲、ポリコーン群蛋白質複合体PRC2によるH3K27メチル化の新たな活性調節機構、第82回日本生化学会、2009.10.23、神戸ポートアイランド

⑦ 赤井 優一、早稲田 真澄、青木 優子、竹村 梨沙、川上 徹、相本 三郎、メチル

チオ基をチオール保護基として用いるネイティブケミカルライゲーション法とチオエステル法による連続ライゲーション法、日本化学会第89春季年会、2009.3.29、千葉

⑧田結荘 明、原利明、中村健一郎、川上 徹、相本 三郎、アミノオキシ基とイソチオシアネート基の選択的化学反应とそれに続くエドマン分解を利用したペプチドの精製、第45回ペプチド討論会、2008.10.30、東京

⑨赤井 優一、竹村 梨沙、青木 優子、早稲田 真澄、川上 徹、相本 三郎、ネイティブケミカルライゲーション法とチオエステル法の併用を可能にするチオール保護基としてのメチルチオ基の利用、第45回ペプチド討論会、2008.10.30、東京

⑩Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Synthesis of Peptide Thioester by the Cysteinyl Prolyl Ester (CPE) Method、第45回ペプチド討論会、2008.10.30、東京

⑪原利明、田結荘 明、川上 徹、相本 三郎、Fmoc-アミノプロピルオキシ基を導入した2-ニトロベンジルカルバメイト型リンカーの合成とペプチド精製への応用、第45回ペプチド討論会、2008.10.29、東京

⑫Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Peptide thioester preparation and peptide ligation using cysteinyl prolyl ester (CPE) autoactivating unit、30th European Peptide Symposium、2008.9.1、ヘルシンキ

⑬赤井 優一、藤本 久雄、竹村 梨沙、田結荘 明、喜多 知恵子、神田 仁美、川上 徹、相本 三郎、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、2008.3.27、東京

⑭原利明、田結荘明、藤本大樹、川上 徹、相本三郎、 $\alpha$ -ケトアシル基の形成と切断を鍵反応とするペプチド精製法の開発、日本化学会第88春季年会、2008.3.27、東京

⑮藤本 久雄、喜多 千恵子、田結荘 明、赤井 優一、竹村 梨沙、神田 仁美、川上 徹、相本 三郎、部位特異的に修飾されたヒストンH3部分配列の合成、第44回ペプチド討論会、2007.11.8、富山市

⑯Toru Kawakami, Ken' ichiroh Nakamura, Hisao Fujimoto, Saburo Aimoto, N to S Acyl Shift Reaction in Peptide Ligation、4th international Peptide Symposium、2007.10.23、オーストラリア・ケアンズ

⑰Saburo Aimoto, PEPTIDE THIOESTER SYNTHESIS BY AN ON-RESIN AUXILIARY-MEDIATED N-S ACYL SHIFT REACTION、Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Applications、2007.10.19、オーストラリア・ポートダグラス

⑱Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Peptide

Ligation via the N to S Acyl Shift Reaction、Chemical Protein Synthesis Meeting、2007.10.18、オーストラリア・ヘロン島

⑲Toru Kawakami, Saburo Aimoto, Peptide Ligation via the In-Situ Transformation of an Amide into a Thioester at a Cysteine Residue、20th American Peptide Society Symposium、2007.6.27、カナダ・モン트리オール

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

田嶋 正二 (TAJIMA SHOJI)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号：50132931  
川上 徹 (KAWAKAMI TORU)  
大阪大学・蛋白質研究所・准教授  
研究者番号：70273711  
末武 勲 (SUETAKE ISAO)  
大阪大学・蛋白質研究所・准教授  
研究者番号：80304054