

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05316

研究課題名(和文) 修飾ヒストンの完全化学合成と非対称修飾ヌクレオソームの構築

研究課題名(英文) Synthesis of modified histones and its use for preparation of asymmetric nucleosomes

研究代表者

川上 徹 (Kawakami, Toru)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：70273711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドライゲーション法を基盤として、選択的に修飾されたヒストンを含むヌクレオソームを構築することを目的とし、翻訳後修飾を含む4種類のヒストンの化学合成を行うこととした。また、より効率の高いライゲーション法の開発も行うこととした。その結果、これまでの成果も含めて翻訳後修飾を含む3種類のヒストンの合成を行った。特に、小型タンパク質であるユビキチン修飾を含むヒストンの合成に成功し、その修飾によってDNAメチル化酵素が活性化することが判明した。1種類のヒストンの合成には着手できなかったが、同様の手法によって合成可能である。また、反応効率の高いライゲーション法を見出し、その応用を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子(DNA)は4種類のヒストンタンパク質からなる8量体に巻き付きヌクレオソームを構成する。これが連なった状態で細胞核に収納される。ヒストンやその関連タンパク質は種々の翻訳後修飾(化学修飾)を受けることで、構造変化やタンパク質間の相互作用を調整して、この遺伝子の発現制御を行っている。これらの修飾は非常に複雑であり、その機能は必ずしも解明されていない。これらの翻訳後修飾を受けたヒストンを選択的に化学合成できるようになれば、それらの機能の解明に非常に有用である。

研究成果の概要(英文)：Based on the peptide ligation method, we decided to chemically synthesize four types of histones, including post-translational modifications, with the aim of constructing nucleosomes containing selectively modified histones. We also attempt to develop a more efficient ligation method. As a result, we synthesized three types of histones including post-translational modifications, including the results so far. In particular, we succeeded in synthesizing histones containing ubiquitin modification, which is a small protein, and found that the modification activates DNA methyltransferase. Although the synthesis of one type of histone could not be started, it can be synthesized by the similar strategy. We have also found a ligation method with high reaction efficiency and are studying its application.

研究分野：ペプチド合成化学

キーワード：蛋白質 ライゲーション ヒストン 翻訳後修飾 ユビキチン DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

複雑なタンパク質の調製はその機能や構造を研究するために非常に重要であり、合成化学に要求されるテーマの1つである。遺伝子を収納するための足場となるタンパク質であるヒストンは非常に多様な翻訳後修飾を受けることが知られている。ヒストン H2A, H2B, H3, H4 のそれぞれ2分子で8量体を形成し、これにDNAが巻き付くことでヌクレオソームが形成され、これはクロマチンの基本単位である。ヒストンはC末端側にコアを形成するフォールド領域を、N末端側にフレキシブルなテール領域を有し、複数の部位にアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など多様な化学修飾を受ける。これらの修飾は可逆的であり、また、DNAの化学修飾とも関連し、クロマチンの構造変化や生体分子との相互作用を介して、遺伝子配列の変更を伴うことのないエピジェネティックな遺伝情報の発現制御に関与している。しかし、これらの翻訳後修飾は複雑でその組合せは多岐にわたっており、その本質的な理解には至っていない。

これらの研究では特定の部位を均一に修飾することが必須であるが、生化学的手法では確実に部位特異的に化学修飾を施したヒストンの調製が難しい。本研究では、ヒストンの化学合成によって、これらの翻訳後修飾の機能やクロマチンの構造に与える影響の解明に寄与することを目的とする。1つだけの修飾を有するヒストンは十分ではないが比較的多くの調製例が報告されてきている。しかし、複数の修飾を含むヒストンの合成例は限られており、機能解析も進んでいない。また、ヌクレオソームのコアは4種類のヒストンがそれぞれ2分子ずつからなるが、同一種類のヒストンが2分子同時に修飾される対称、あるいは1分子のみが、あるいは、2分子が別の種類の修飾を受ける非対称な状態が考えられる。非対称修飾ヌクレオソームの調製はごく限られており、その詳細はほとんどわかっていない。

これまで独自に開発したペプチドライゲーション法を用いて、修飾ヒストンの合成を行ってきた。その中で、小型タンパク質であるユビキチンによる修飾において天然型構造とは異なるがアナログ構造を簡便に調製する方法を開発し、ユビキチン化 H3 ペプチドアナログによって、本修飾が DNA メチル基転移酵素活性に大きく影響を与えることが判明した (1)。さらに、この H3 ユビキチン化には H3K9me3 化が必要であることもすでに報告されている。また、ヌクレオソームには4種類のヒストンがそれぞれ2分子ずつ含まれており対称的な構造であるが、部位特異的な修飾が起こると非対称性が現れることが考えられる。このヒストンの翻訳後修飾と機能の発現の一連のイベントの解明は非常に興味深い。複雑な修飾タンパク質の調製には化学合成が適しており、一連のヒストンの完全化学合成を行うこととした。また、そのためにはより一層のタンパク質合成法の効率化が必要である。

国外においていくつかのグループから徐々に修飾ヒストンの化学合成とそれを用いたヌクレオソームの研究に関する報告が見られる。特に、欧米のグループが精力的に修飾ヌクレオソームの研究を行っている。また最近、国内でも修飾ヒストンの化学合成の報告が現れ始めている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ペプチドフラグメントの縮合法いわゆるペプチドライゲーション法を基盤として、選択的に修飾されたヒストンを含むヌクレオソームを構築することを目的とし、そのために4種類のヒストンの完全化学合成を行い、さらに、非対称修飾ヌクレオソームの調製も視野に入れる。

これまでにペプチドチオエステルを合成ブロックとして用いる長鎖ペプチド合成法を開発してきた (2)。この研究の中で独自に自発的活性化ユニットである Cys-Pro エステル (CPE) 構造を見出している。この CPE ペプチドは修飾ペプチド調製に適した Fmoc 固相合成法によって効率よく合成することができ、中性緩衝液条件下で、ライゲーションに用いられるチオエステルへ変換される。この CPE ペプチドを合成ブロックとして用いて、これまでにトリメチル化リシンを含む H3, H4 の化学合成および半合成を行ってきた (3,4)。さらにより簡便効率的な合成法を開発し、複雑なタンパク質の化学合成に応用する。

本研究では、簡便かつ高収率な修飾ヒストンの合成法を確立し、4種類のヒストンの完全化学合成を行う。これまでに化学合成されたヒストンのみを用いてヌクレオソームが調製された例はなく、このヒストンライブラリーからヌクレオソームを構築し解析することによって、ヒストン修飾の俯瞰的な理解につながると考える。

## 3. 研究の方法

### (1) ユビキチン化ヒストンの効率的な合成法の開発

これまでにアナログ構造を有するユビキチン化ヒストン H3 の合成を行っている (5)。本研究では18番目のリシンを天然型構造でユビキチン化 (K18ub) した H3 の合成を行う。また同時に、天然型ユビキチン化ヒストンペプチドを調製し、DNA メチル基転移酵素の活性化に関して、アナログ構造と比較する。

### (2) 非対称修飾ヌクレオソームの形成法の開発

ヌクレオソームのコアは4種類のアミノ酸がそれぞれ2分子ずつからなる8量体である。そのため1分子のみが修飾される非対称の場合と2分子が同時に修飾される対称な場合が考えられる。より簡便にヌクレオソーム中で近い距離に存在する部位を架橋することでより簡便な非対称ヌクレオソームの構築法を提案する。

### (3) 効率的なライゲーション法の開発

ヒストンの完全化学合成を効率よく進行するためには、簡便で効率的な合成法が必須である。修飾ヒストンの調製を進めつつ、ライゲーション法の効率化を行う。

これまでにCPE構造を改良することで反応効率の改善に成功している(6)。しかし、Fmoc固相合成法で調製できる利点はあるもののアミドからチオエステルに変換するステップが必要なことから、反応速度の観点からは必ずしも満足できるものではない。反応効率を向上させる構造の探索し、より効率的なチオエステル等価体の開発を行う。

## 4. 研究成果

### (1) ユビキチン化ヒストンの効率的な合成法の開発

天然型構造ユビキチン化ヒストン H3 (H3K18ub) を合成するにあたり、図1に示すように、H3を3つのセグメントとユビキチン(Ub)に分割し、それぞれをライゲーションすることで合成に成功した(7)。その際、ユビキチン結合部位は既報のチアブリジン保護を導入した誘導体を利用した(8)。ユビキチン化H3はDNAの維持メチル化と関連し、これまでにユビキチン化アナログ体ペプチドを用いて、Dnmt1の酵素活性を向上させることが分かっていた(1)。今回天然型ユビキチン化ペプチドも調製し、天然型と非天然型アナログイソペプチド構造を比較すると天然型のほうが活性化の程度がやや小さいことが分かった。ユビキチン化アナログの調製は比較的容易であって、修飾の定性的な傾向を調べるためには実際に非常に便利である。一方で、定量的な詳細な検討には天然型が必要であることが示唆された。なお、最近PCNA-associated factor 15 (PAF15)のユビキチン化によってもDnmt1が活性化することが示され、それぞれのユビキチン化によるDnmt1の活性化はDNA複製の時期によって作用していることが示唆された(9)。

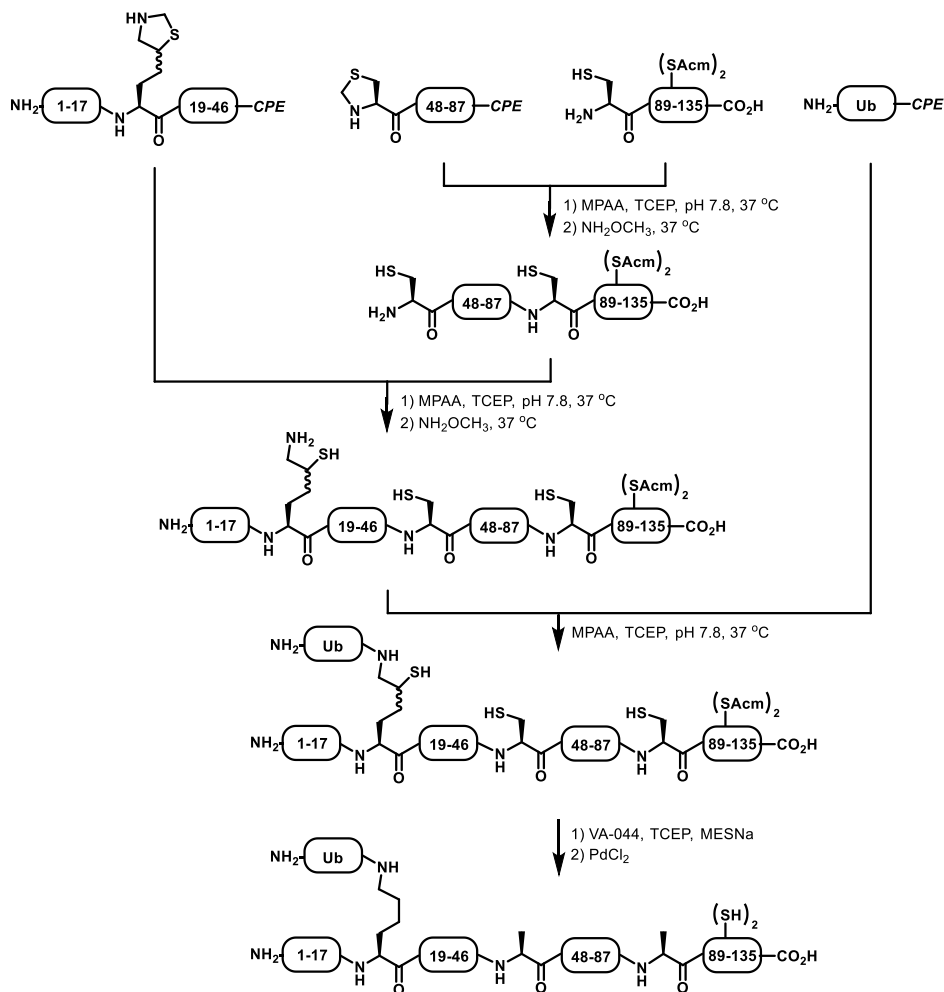


図1. K18ub ヒストン H3 の合成スキーム

### (2) 非対称修飾ヌクレオソームの形成法の開発

モデルペプチドを用いて 2 つの異なるペプチド鎖をリンカーを介して結合する方法を開発した。現段階ではモデルペプチドでの結果のため、詳細はここでは記載しない。

### (3) 効率的なライゲーシオン法の開発

CPE 構造を改良することで反応効率の改善に成功している。より効率的とするために検討した。その結果、Cys-Pro 間のコンフォメーションに着目し、その構造を変えることによって、反応部位、反応速度が異なることがわかった (図 2)。その一部を学会発表し、現在、論文にまとめるための追加実験を行っている。さらに、この結果を踏まえ、より反応効率が向上する構造を見つけることができたが、若干の副反応を伴うため現在その抑制のために検討を行っている。

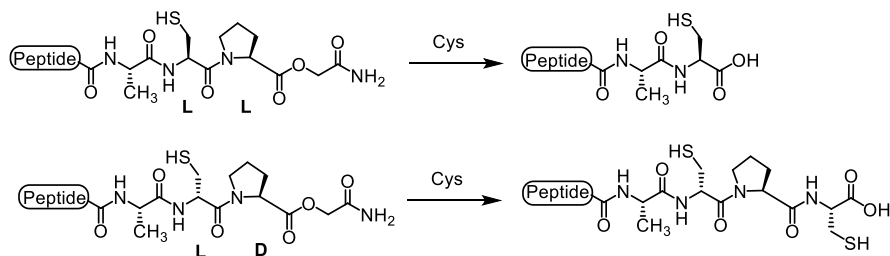


図 2. Cys-Pro の相対配置による反応部位の違い

また一方で、反応条件の効率化によって、O-GlcNAc 化ヒストン H2A の合成を行った (10)。100 残基を超えるヒストンなどのタンパク質の合成の多くの場合、3 つ以上の合成ブロックを用いて複数回のライゲーシオンを繰り返すことによって、全長配列のタンパク質を合成する。一般的にはライゲーシオン反応および末端の脱保護反応ごとに HPLC による精製を行う。そのために精製時間が必要であり、また、回収率の低下が問題となる。本合成においては、アリアルチオエステル、CPE、および NAC 法を用いて、4 つのペプチドセグメントをワンポットで縮合した。

また、クロマチン関連蛋白質である HP1 の半合成を進め、非変性条件下でのライゲーシオンに成功し (未発表)、構造解析に向けて準備を進めている。

上記のように、これまでにトリメチル化リシンをはじめとした修飾アミノ酸残基を含む H2A, H3, H4 の化学合成に成功している (3,4,10)。本研究期間内には達成できなかったが、残る H2B についても同様に合成可能と考えている。これらのヒストンの完全化学合成によって完全化学合成ヒストン 8 量体が可能となることを確信している。

### <引用文献>

- (1) S. Ishiyama, A. Nishiyama, Y. Saeki, K. Moritsugu, D. Morimoto, L. Yamaguchi, N. Arai, R. Matsumura, T. Kawakami, Y. Mishima, H. Hojo, S. Shimamura, F. Ishikawa, S. Tajima, K. Tanaka, M. Ariyoshi, M. Shirakawa, M. Ikeguchi, A. Kidera, I. Suetake, K. Arita, M. Nakanishi, 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* **2017**, *68*, 350-360.e7.
- (2) T. Kawakami, Peptide thioester formation via an intramolecular N to S acyl shift reaction for peptide ligation. *Top. Cur. Chem.* **2015**, *362*, 107-135.
- (3) T. Kawakami, Y. Akai, H. Fujimoto, C. Kita, Y. Aoki, T. Konishi, M. Waseda, L. Takemura, S. Aimoto, Sequential peptide ligation by combining the Cys-Pro ester (CPE) and thioester methods and its application to the synthesis of histone H3 containing a trimethyl lysine residue. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2013**, *86*, 690-697.
- (4) T. Kawakami, R. Yoshikawa, Y. Fujiyoshi, Y. Mishima, H. Hojo, S. Tajima, I. Suetake, Synthesis of histone proteins by CPE ligation using a recombinant peptide as the C-terminal building block. *J. Biochem.* **2015**, *158*, 403-411.
- (5) T. Kawakami, Y. Mishima, H. Hojo, I. Suetake, Synthesis of ubiquitylated histone H3 using a thiiirane linker for chemical ligation. *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 532-538.
- (6) T. Kawakami, A. Kamauchi, E. Harada, S. Aimoto, Enhancement in the rate of conversion of peptide Cys-Pro esters to peptide thioesters by structural modification. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 79-81.
- (7) T. Kawakami, Y. Mishima, M. Takazawa, H. Hojo, I. Suetake, Chemical synthesis of the ubiquitinated form of histone H3 and its effect on DNA methyltransferase 1. *J. Pept. Sci.* **2019**, *25*, e3200.
- (8) M. Haj-Yahya, K. S. Ajish Kumar, L. A. Erlich, A. Brik, Protecting group variations of  $\delta$ -mercaptolysine useful in chemical ubiquitylation. *Biopolymers (Pept Sci)* **2010**, *94*, 504-510.
- (9) A. Nishiyama, C. Mulholland, S. Bultmann, S. Kori, A. Endo, Y. Saeki, W. Qin, C. Trummer, Y. Chiba, H. Yokoyama, S. Kumamoto, T. Kawakami, H. Hojo, G. Nagae, H. Aburatani, K. Tanaka, K. Arita, H. Leonhardt, M. Nakanishi, Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1222.

- (10) Y. Asahina, T. Kawakami, H. Hojo, Glycopeptide synthesis based on a TFA-labile protection strategy and one-pot four-segment ligation for the synthesis of O-glycosylated histone H2A. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 1915-1920.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 A. Nishiyama, C. Mulholland, S. Bultmann, S. Kori, A. Endo, Y. Saeki, W. Qin, C. Trummer, Y. Chiba, H. Yokoyama, S. Kumamoto, T. Kawakami, H. Hojo, G. Nagae, H. Aburatani, K. Tanaka, K. Arita, H. Leonhardt, M. Nakanishi	4. 巻 11
2. 論文標題 Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15006-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Y. Mishima, L. Brueckner, S. Takahashi, T. Kawakami, J. Otani, A. Shinohara, K. Takeshita, R. G. Garvilles, M. Watanabe, N. Sakai, H. Takeshima, C. Nachtgael, A. Nishiyama, M. Nakanishi, K. Arita, K. Nakashima, H. Hojo, I. Suetake	4. 巻 25
2. 論文標題 Enhanced processivity of Dnmt1 by monoubiquitinated histone H3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 22-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12732	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 該当する

1. 著者名 T. Kawakami, Y. Mishima, M. Takazawa, H. Hojo, I. Suetake	4. 巻 25
2. 論文標題 Chemical synthesis of the ubiquitinated form of histone H3 and its effect on DNA methyltransferase 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Pept. Sci.	6. 最初と最後の頁 e3200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/psc.3200	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 Y. Asahina, T. Kawakami, H. Hojo	4. 巻 -
2. 論文標題 Glycopeptide synthesis based on a TFA-labile protection strategy and one-pot four-segment ligation for the synthesis of O-glycosylated histone H2A	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 1915-1920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.201801885	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11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Eri Sasakura, Hironobu Hojo, Toru Kawakami
2. 発表標題 Investigation on stereochemistry of cysteinyl prolyl ester (CPE) peptide for the formation of thioester
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toru Kawakami
2. 発表標題 Synthesis of Ubiquitinated Histone H3 and its Effect on DNA Methyltransferase 1
3. 学会等名 The 18th Akabori Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上 徹
2. 発表標題 ライゲーション法を基盤とする翻訳後修飾タンパク質の化学合成
3. 学会等名 蛋白質研究所セミナー「多角的な視点による蛋白質修飾の機能解明」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上 徹, 高澤雅也, 三島優一, 北條裕信, 末武 勲
2. 発表標題 ユビキチン化ヒストンH3の化学合成
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会, 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 徹
2. 発表標題 修飾ヒストンの化学合成
3. 学会等名 蛋白質研究所セミナー「化学によるタンパク質修飾の機能解明を目指して」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 徹, 三島優一, 高澤雅也, 北條裕信, 末武 勲
2. 発表標題 ユビキチン化ヒストンH3の化学合成とその効果
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 T. Kawakami, Y. Mishima, M. Takazawa, H. Hojo, I. Suetake
2. 発表標題 Chemical Synthesis of Ubiquitinated Histone H3 and Its Effect on DNA Methyltransferase 1
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 徹
2. 発表標題 修飾ヒストンの化学合成とその応用例
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Toru Kawakami, Masaya Takazawa, Yuichi Mishima, Hironobu Hojo, Isao Suetake
2. 発表標題 Chemical synthesis of ubiquitinated histone H3
3. 学会等名 The 10th international Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru Kawakami
2. 発表標題 Synthesis of Ubiquitinated Histone
3. 学会等名 The 17th Akabori Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toru Kawakami, Yuichi Mishima, Hironobu Hojo, Isao Suetake
2. 発表標題 A preparation of isopeptide mimetics by the peptide ligation using a thiirane linker
3. 学会等名 35th European Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------