

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22245

研究課題名(和文)ミニ染色体モデルの化学合成と機能解析

研究課題名(英文)Synthesis and function analysis of mini-chromosome model

研究代表者

岡本 晃充 (Okamoto, Akimitsu)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：60314233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1)ミニ染色体モデルの化学合成...連結するDNAユニットの合成まで完成した。DNAユニット2種類あり、各々Widom601DNA配列を含めた。ユニットの末端は突出末端になっており、制限酵素に対応した配列を有する。

(2)ミニ染色体モデルに含まれる機能性ヒストンの化学合成...大気中でも安定な有機ルテニウム触媒を用いて、ワンポットで複数のペプチドを連結する方法を開発した。有機ルテニウム触媒は、従来のパラジウム錯体に比べて50倍以上の活性を示した。この有機ルテニウム触媒を用いて、リン酸化、ユビキチン化、シトルリン化、アセチル化などの部位特異的な翻訳後修飾を有するヘテロクロマチン因子を合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミニ染色体モデルを創出する方法を確立することに意義がある。任意の配列を含む染色体構造を人工的に作ることはまだ可能になっていない。この方法が確立できれば、簡便に目的の配列や人工的な機能性修飾を含むミニ染色体モデルを獲得することが可能になり、飛躍的に染色体機能研究が進むと考えられる。また、ミニ染色体モデルを創出することにより、細胞内DNA本来の構造や反応に関わる情報を獲得できるようになる。

研究成果の概要(英文)：(1) Chemical synthesis of the mini-chromosome model... We have completed the synthesis of the DNA units to be connected. There are two types of DNA units, each containing the Widom601 DNA sequence, and the units have protruding ends with sequences corresponding to restriction enzymes.

(2) Chemical synthesis of functional histones in mini-chromosome models... We developed a one-pot method for connecting multiple peptides using organoruthenium catalysts that are stable in air. The organoruthenium catalyst was 50 times more active than the conventional palladium complex. Using this organoruthenium catalyst, we synthesized heterochromatin factors with site-specific post-translational modifications such as phosphorylation, ubiquitination, citrullination, and acetylation.

研究分野：生物有機化学

キーワード：化学合成 クロマチン DNA ヒストン ペプチド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

物質生産細菌などの目的の機能や性質を含有する細胞を確実に獲得するためには、まず生物機能をゲノムレベルで理解する必要があり、人工的に創出したゲノムモデルを用いて検討を重ねなければならない。しかし、これまでのゲノム DNA 研究では、何の修飾もない裸の DNA 分子を用いて研究されてきた。実際の細胞の中の DNA は、染色体構造の中でヘテロクロマチン構造を有しており、一部ほどけたオープンクロマチン領域でもそこにはタンパク質が結合して DNA 分子が丸裸でいることは稀だと考えられる。したがって、研究代表者がこれまで細胞内 DNA のエピゲノム研究を進めていく中で、真の DNA 機能を明らかにするためには、ミニ染色体モデルを作製して、これを用いて研究する必要性に気が付いた。したがって、研究代表者は、DNA とともに機能化ヒストンタンパク質を含めたミニ染色体モデルを合成するべきであり、そうして初めて、真のゲノム機能の解析と理解が可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、長鎖 DNA の反応解析に存在する構造上の問題点を解消してゲノム機能研究への発展を誘起するために、人工的なミニ染色体モデルの作製とその作製の要素技術を構築することを目指す。さらに、獲得したミニ染色体モデルを用いて、構造解析と化学反応解析を進めて、生物機能における染色体構造の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ミニ染色体モデルの化学合成...ヌクレオソームライゲーションの方法を確立する。そのために、末端に 20bp の突出末端を含む 193bp 長単位で Widom601DNA を合成する。制限酵素で切断された突出末端を有し、異なる制限酵素で切断された両端構造にすることによって、自己集合を防ぐ。ヒストンオクタマーと共にヌクレオソームを構成する(ただし、ヌクレオソーム構成能および安定性が配列によって異なることを事前に確認する)。

(2) ミニ染色体モデルに含まれる機能性ヒストンの化学合成...ペプチド連結のための金属触媒を検討する。特に、触媒反応でワンポット合成が可能になるような有機金属錯体を探索する。得られた金属錯体を用いて、複数のエピジェネティック修飾を含む人工ヒストンの化学合成をおこなう。さらに、DNA と形成される複合体の熱的安定性について議論する。

### 4. 研究成果

#### (1) ミニ染色体モデルの化学合成

ゲノムは、本来、DNA 成分だけで構成されているのではなく、これをコンパクトに折りたたむタンパク質成分が一体となって機能していることを忘れてはならない。DNA とともに機能化ヒストンタンパク質を合成して初めて、真のゲノム機能の制御と解析が可能になる。一方、長鎖 DNA の作成では DNA ライゲーションが用いられるが、思わぬミスハイブリダイゼーションによるライゲーションエラーが問題になっている。また、合成中の長鎖 DNA は外的要因によって不安定な状態に曝露されている。そこでゲノム合成ビルディングブロックとして、あらかじめ 200bp 長 DNA を用いてヌクレオソームを作成する。これらに対して好熱性細菌から採取されたリガーゼによる連結反応を順次行うことによって、クロマチンパッキングされた状態の長鎖ゲノム DNA を作製する。今回は、連結する DNA ユニットの合成まで完成した。DNA ユニット 2 種類あり、各々 Widom601DNA 配列を含めた。ユニットの末端は突出末端になっており、制限酵素 BstXI や DraIII に対応した配列を有する。現在、ヌクレオソームを作成して、ライゲーション反応の検討を進めている。

#### (2) ミニ染色体モデルに含まれる機能性ヒストンの化学合成

有機金属化合物のユニークな反応性を利用したタンパク質科学への応用が注目されている。近年、遷移金属錯体を用いたタンパク質の全化学合成法が開発され、部位特異的な翻訳後修飾を有する様々なタンパク質の製造が可能となった。しかし、多くの求核性官能基を持つタンパク質を化学反応させるためには、一般に大量の金属錯体が必要であった。さらに、20kDa 以上の中サイズのタンパク質を合成する際には、煩雑な精製と分離の手順に時間がかかり、様々な装飾を施したタンパク質を入手することができなかった。今回研究を進めることにより、大気中でも安定な有機ルテニウム触媒を用いて、ワンポットで複数のペプチドを連結する方法を開発した。有機ルテニウム触媒は、従来のパラジウム錯体に比べて 50 倍以上の活性を示し、触媒量 (20mol%) の金属錯体を用いることで、過剰なチオールが反応溶液中に存在する場合でも、タンパク質を迅速かつ定量的に脱保護することができた。この有機ルテニウム触媒を用いて、リンカーヒストン H1.2 やヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) など、リン酸化、ユビキチン化、シトルリン化、アセチル化などの部位特異的な翻訳後修飾を有する 20kDa 以上のヘテロクロマチン因子を

合成した。その結果、H1.2 の R53 をシトルリン化すると、DNA との静電的相互作用が低下し、ヌクレオソームとの結合親和性が低下することが明らかになった。さらに、HP1 の DNA 結合能を制御する鍵となるリン酸化領域を発見した。今回開発したルテニウム化学は、PTM や非天然アミノ酸を含む、生物学的・医学的に重要なさまざまなタンパク質の調製を容易にしてくれると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiraogawa, T.; Candel, G.; Fukuda, R.; Ciofini, I.; Adamo, C.; Okamoto, A.; Ehara M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Photophysical Properties of Fluorescent Imaging Biological Probes of Nucleic Acids: SAC-Cl and TD-DFT Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Comput. Chem.	6. 最初と最後の頁 127-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcc.25553	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 Usami, K.; Xiao, K.; Okamoto, A.	4. 巻 7
2. 論文標題 Efficient Ketose Production by Hydroxyapatite Catalyst in a Continuous Flow Module	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Sustainable Chem. Eng.	6. 最初と最後の頁 3372-3377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssuschemeng.8b05574	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 Izuta, S.; Yamaguchi, S.; Kosaka, T.; Okamoto, A.	4. 巻 2
2. 論文標題 Reversible and Photoresponsive Immobilization of Nonadherent Cells by Spiropyran-Conjugated PEG-Lipids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Appl. Bio Mater.	6. 最初と最後の頁 33-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.8b00656	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 Yamaguchi, S; Higashi, K.; Azuma, T.; Okamoto, A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Supramolecular Polymeric Hydrogels for Ultrasound-guided Protein Release	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnol. J.	6. 最初と最後の頁 1800530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biot.201800530	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 Yanase, M.; Nakatsu, K.; Cardos, C. J.; Konda, Y.; Hayashi, G.; Okamoto, A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cysteinyloxypropyl Imide (CPI) Peptide: A Highly Reactive and Easily Accessible Crypto-thioester for Chemical Protein Synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Sci.	6. 最初と最後の頁 5967-5975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9SC00646J	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 Hayashi, G.; Yanase, M.; Nakatsuka, Y.; Okamoto, A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Simultaneous and Traceless Ligation of Peptide Fragments on DNA Scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1246-1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.8b01655	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 Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A.	4. 巻 21
2. 論文標題 Chemical Synthesis of Cys-Containing Protein via Chemoselective Deprotection with Different Palladium Complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org. Lett.	6. 最初と最後の頁 8378-8382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b03152	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 Jarzebska, N. A.; Yamaguchi, S.; Izuta, S.; Kosaka, T.; Yamahira, S.; Nagamune, T.; Okamoto, A.	4. 巻 7
2. 論文標題 Photo-responsive materials with strong cell trapping ability for light-guided manipulation of nonadherent cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomater. Sci.	6. 最初と最後の頁 4514-4518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9BM01200A	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 Morihiro, K.; Okamoto, A.	4. 巻 39
2. 論文標題 A highly constrained nucleic acid analog based on -L-threosamine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 270-279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1666278	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 Chen, J.; Morihiro, K.; Fukui, D.; Guo, L.; Okamoto, A.	4. 巻 21
2. 論文標題 Live Cell Sensing of Telomerase Activity Using Hybridization-Sensitive Fluorescent Oligonucleotide Probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1022-1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900555	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12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 小阪 高広、山口 哲志、泉田 森、岡本 晃充
2. 発表標題 感光性クリック試薬を用いた異種細胞位置制御技術の開発
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第31回サマースクール
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中津 幸輝、梁瀬 将史、林 剛介、岡本 晃充
2. 発表標題 タンパク質化学合成を指向したチオエステル前駆体CPI (CysteinyIprolyl imide) の設計と機能評価
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第31回サマースクール
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 聖、山口 哲志、小阪 高広、岡本 晃充
2. 発表標題 細胞内分子動態解析のための光活性化アルキンタグ
3. 学会等名 2019年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森廣 邦彦、Jiazhuo Chen, 福井 大介、Guo Lihao、岡本 晃充
2. 発表標題 ターンオン型蛍光プローブを用いたテロメラーゼ活性の生細胞内センシング
3. 学会等名 第41回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Inorganic reactions for analysis of epigenetically modified DNA
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 哲志、細金 剛、大橋 友紀、榊原 昇一、田端 和仁、野地 博行、岡本 晃充
2. 発表標題 細胞運理を志向した光溶解性ゲル充填マイクロウェルアレイ
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 森廣 邦彦、Chen Jiazhuo、福井 大介、Guo Lihao、岡本 晃充
2. 発表標題 ターンオン型蛍光オリゴヌクレオチドプローブを用いたテロメラーゼ活性の生細胞内センシング
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 小阪 高広、山口 哲志、泉田 森、岡本 晃充
2. 発表標題 1細胞間相互作用解析のための光誘導型クリック反応表面
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 Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Chemical Reactions for Analysis of Epigenetically Modified DNA
3. 学会等名 Epigenetics & Bioengineering Coference (EpiBio 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小阪 高広、山口 哲志、泉田 森、岡本 晃充
2. 発表標題 光反応性クリック試薬を用いた細胞間相互作用解析手法の開発
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yamaguchi, Shin Izuta, Shinya Yamahara, Teruyuki Nagamune, Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Photo-responsive cell immobilization reagents for cell manipulation on solid phase
3. 学会等名 The 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCChE2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimitsu Okamoto, Kunihiko Morihiko, Jiazhao Chen, Daisuke Fukui and Lihao Guo
2. 発表標題 Live-Cell Sensing of Telomerase Activity
3. 学会等名 Asia 3 Roundtable of Nucleic Acid 2019 (A3RONA) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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