

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2023

課題番号：19KK0179

研究課題名（和文）化学触媒ツールの開発を基軸としたヒストン修飾とDNA修復の相関解明

研究課題名（英文）Relationships between histone epigenetic modifications and DNA damage repair

研究代表者

金井 求（Kanai, Motomu）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・教授

研究者番号：20243264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：4量体ヌクレオソーム中のヒストンの特定のリジン残基に、アシル化修飾を導入する方法を確立し、高い選択性で4個のモノヌクレオソームのうち、PIP認識配列に近い1個のモノヌクレオソームの狙った位置のリジン残基に、高収率かつ高選択的にアセチル基を導入する方法を確立できた。dT₁ dU変異と同一ヌクレオソーム上にある二種類のリジン残基をそれぞれ選択的にアセチル化し、DNA修復効率に対する影響を調べた。その結果、実際に変異とアセチル化修飾の相対位置関係に依存して、DNA修復速度が変化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷修復は、さまざまな疾患に関連する重要な生物学プロセスであり、ヒストンのエピジェネティックな構造修飾がその効率に関連している。しかしながら、実際の染色体の構成ユニットである高次構造を持つオリゴヌクレオソームを用いて、これを検証することは、従来の技術では限定的であった。今回確立した技術は、日本側が開発した化学触媒と米国側が開発した酵素法を組み合わせたもので、今後、多くのヌクレオソーム関連研究に発展的に応用されていくものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We established a method to introduce acylation modification to specific lysine residues of histones in a tetrameric nucleosome. We selectively acetylated two types of lysine residues on the same nucleosome as the dT₁ dU mutation, and investigated the effect on DNA repair. As a result, we found that the DNA repair rate changed depending on the relative positions of the mutation and the acetylation modification.

研究分野：有機合成化学

キーワード：触媒 ヒストン DNA DNA修復 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命の遺伝情報を司る **DNA** は絶えず損傷の危険にさらされている。**DNA** ポリメラーゼによる複製ミスは正常状態の生命においても生じうるし、紫外線などの環境要因によっても **DNA** 損傷は引き起こされる。これらにより **DNA** 損傷を受けた細胞は、そのままでは細胞機能が低下して細胞老化に至るか癌化する。**DNA** 損傷が修復不可能なほど重大な場合にはアポトーシスによってその細胞は排除されるが、細胞はアポトーシスを引き起こす他に、**DNA** 損傷を修復する様々な機構を備えている。細胞の **DNA** 修復能力はその正常な機能の維持と、生命の健康の維持にとって極めて重要であり、細胞の **DNA** 修復機構を理解することは老化や癌などの疾病を防ぎ、健康を維持するために必須である。

2. 研究の目的

我々のヒストンアシル化触媒技術と共同研究先である **Sczepanski** 教授の損傷 **DNA** 導入ポリヌクレオソーム調製技術を融合し、**DNA** の特定の位置に特定の損傷を持ち、ヒストンの特定の位置に特定のアシル化修飾を持つポリヌクレオソームを調製する新手法を確立する。これを用いて、ヒストンの翻訳後修飾と **DNA** 修復機構の関係をポリヌクレオソームレベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

4 量体ヌクレオソーム中のヒストンの特定のリジン残基に、アシル化修飾を導入する方法を確立した。すなわち、**PIP** 認識配列を有する **DNA** を用いて、**4** 量体ヌクレオソームを再構成した。このとき、**Sczepanski** 教授の損傷 **DNA** 導入技術 **Plug-and-Play** 法を用いて、特定の位置のチミジン (**dT**) をウリジン (**dU**) に変異させた **DNA** を使用した。ヒストン修飾触媒として当研究室で開発した **PIP-DSH** あるいは **PIP-BAHA** を用い、**PIP** 認識配列近傍のヒストンリジン残基を選択的にアシル化した。**LC-MSMS** 法を用いてアシル化の選択性と収率を算出した。ここで合成した、**dT dU** 変異とヒストンアシル化をそれぞれ特定の位置に有する **4** 量体ヌクレオソームを用いて、**Uracil-DNA glycosylases (UDG)** と **AP endo-nuclease 1 (APE1)** の二つの酵素による **Base excision repair (BER)** の効率を **RI** 実験により調べた。

4. 研究成果

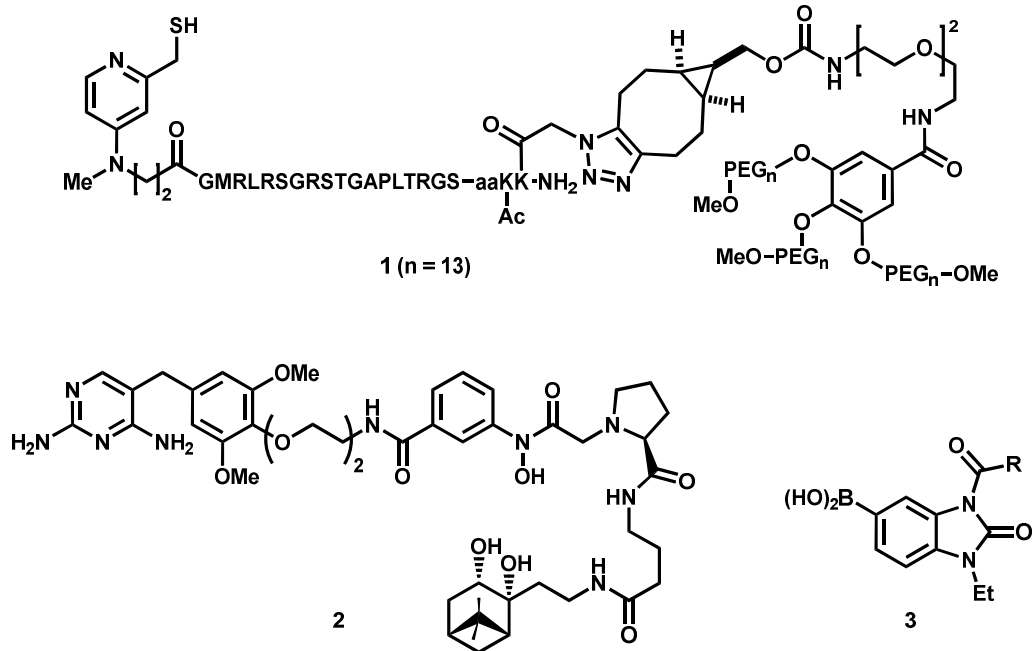
4 量体ヌクレオソーム中のヒストンの特定のリジン残基に、アシル化修飾を導入する方法を確立するのに苦労したが、最終的に高い選択性で **4** 個のモノヌクレオソームのうち、**PIP** 認識配列に近い **1** 個のモノヌクレオソームの狙った位置のリジン残基に、高収率かつ高選択的にアセチル基を導入する方法を確立できた。**dT dU** 変異と同一ヌクレオソーム上にある二種類のリジン残基をそれぞれ選択的にアセチル化し、**DNA** 修復効率に対する影響を調べた。その結果、実際に変異とアセチル化修飾の相対位置関係に依存して、**DNA** 修復速度が変化することを見出した。本成果は、オリゴヌクレオソームを用いて、**DNA** 損傷修復とヒストンエピジェネティック修飾との相関を調べた初めての研究で、現在論文を **Sczepanski** 教授と共著で執筆中である。

ヒストンに対するアシル化触媒に関しては、**LANA-DSH** が細胞内で機能しない理由を解析した。**FITC** 標識した **LANA** を合成し、細胞内に導入した後に回収、解析したところ、**LANA** が分解していることを見出した。天然アミノ酸で構成される **LANA** はプロテアーゼによって即座に分解を受けると考えられたため、細胞内でのヒストンアセチル化のためにはまず、細胞内で安定性な **LANA** リガンドの開発が必要であると考えた。そこで、ペプチドを安定化することが知られているポリエチレングリコール (**PEG**) 修飾に注目し、**3** 本の **PEG** が結合した **LANA** を設計した。また、**PEG** 鎖長によるプロテアーゼ耐性への影響を調べるため、**PEG** モジュールには重合度の異なる **4** 種類の **PEG** 鎖 (**PEG₁₅₀**, **PEG₅₅₀**, **PEG₇₅₀**, **PEG₂₀₀₀**) を持つものを合成した。また、**LANA** の **N** 末端に **FITC** による蛍光標識を行い (**PEG_x-LANA-FITC**)、以降の検討を行なった。**PEG-LANA-FITC** のプロテアーゼ耐性を調べるため、ヒト血清中での安定性を調べたところ、**PEG** 鎖が長いほどプロテアーゼ耐性が向上することを見出した。一方で、ゲルシフトアッセイを用いて再構成ヌクレオソームとの結合能を定量したところ、**PEG** 鎖が長いほどヌクレオソームとの結合が弱まることを見出した。次に、**PEG-LANA-FITC** を細胞内に導入し、細胞内局在を調べた。これらの分子は細胞膜を透過しないことが判明したため、化合物の導入には **Bead-loading** 法を用いている。その結果、触媒導入後 **60** 分後の細胞において、**PEG₅₅₀**、**PEG₇₅₀**、**PEG₂₀₀₀**-**LANA-FITC** が核に局在することを観察し、これらが細胞内で安定なヒストンリガンドであることが示唆された。また、これらの化合物の細胞内での挙動を経時的に観察し、これらの細胞内半減期がそれぞれ **1.2** 時間、**5** 時間、**12** 時間であることを見出した。また、**FRAP** 実験により、細胞内においても、**PEG** 鎖が長いほど **PEG-LANA** とヌクレオソームの結合親和性が低下することが示唆された。

以上の結果を受けて、**PEG-LANA** に触媒部位を繋げた **PEG-LANA-DSSMe** を合成し、細胞内ヒストンアセチル化反応を検討した。ドナーは細胞膜を透過するドナー **NAC-Ac** を用いた。触媒

国際共同研究強化 (B) 2

の導入には Bead-loading 法を用いたが、この方法は細胞ごとに導入できる触媒の量にばらつきが生じる問題があった。そこで、ローディングコントロールとしてデキストラン-ローダミンを触媒と同時に導入し、フローサイトメトリーを用いてローダミンシグナルを指標に細胞集団を選別し、導入された触媒の量と細胞内ヒストンアセチル化の収率の相関関係を解析した。その結果、PEG₅₅₀-LANA-DSSMe (触媒 1) が最適触媒であると判明し、本触媒を用いて最大 51% 収率でのヒストンアセチル化を達成した。PEG₅₅₀-LANA-DSSMe による細胞反応をおこない、ヒストン修飾レベルをウェスタンブロットで調べたところ、H2BK120 コピキチン化レベルが減少していることを見出した。これは、導入された化学触媒によって導入された H2BK120 アセチル基が保護基として働き、同じ残基に入るコピキチン化を阻害しているためと考えられる。



さらに触媒の活性向上を目指して、boronate-assisted hydroxamic acid (BAHA) 触媒システムを考案した (触媒 2)。本システムでは、触媒中のジオール基がアシルドナー中のホウ酸基と可逆的に結合し、アシルドナーから触媒ルイス塩基部位へのアシル基転移が加速される。これにより、触媒活性種の速やかな生成が可能となり、低濃度のアシルドナーを用いて効率的なリジン残基アシル化を達成できると考えた。検討の結果、触媒 2 とアシルドナー 3 を組み合わせることで、DSH に比較して約 2 桁触媒量を減量できることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Kawashima Shigehiro A., Kanai Motomu	4. 巻 0
2. 論文標題 Live Cell Synthetic Histone Acetylation by Chemical Catalyst	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chromosome Analysis	6. 最初と最後の頁 155 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2433-3_17	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 Kanai Motomu, Takeuchi Yuma	4. 巻 131
2. 論文標題 Catalysis medicine: Participating in the chemical networks of living organisms through catalysts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 133227 ~ 133227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2022.133227	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 Fujiwara Yusuke, Yamanashi Yuki, Fujimura Akiko, Sato Yuko, Kujirai Tomoya, Kurumizaka Hitoshi, Kimura Hiroshi, Yamatsugu Kenzo, Kawashima Shigehiro A., Kanai Motomu	4. 巻 118
2. 論文標題 Live-cell epigenome manipulation by synthetic histone acetylation catalyst system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 XX ~ YY
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2019554118	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 Nozaki Tamiko, Kanai Motomu	4. 巻 54
2. 論文標題 Chemical Catalysis Intervening to Histone Epigenetics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 2313 ~ 2322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.1c00144	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 Adamson Christopher, Kajino Hidetoshi, Kawashima Shigehiro A., Yamatsugu Kenzo, Kanai Motomu	4. 巻 143
2. 論文標題 Live-Cell Protein Modification by Boronate-Assisted Hydroxamic Acid Catalysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 14976 ~ 14980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c07060	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 Mizumoto Shinsuke, Xi Siqi, Fujiwara Yusuke, Kawashima Shigehiro A., Yamatsugu Kenzo, Kanai Motomu	4. 巻 15
2. 論文標題 Hydroxamic Acid Piperidine Conjugate is an Activated Catalyst for Lysine Acetylation under Physiological Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 833 ~ 839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201901737	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 Kajino Hidetoshi, Nagatani Tomomi, Oi Miku, Kujirai Tomoya, Kurumizaka Hitoshi, Nishiyama Atsuya, Nakanishi Makoto, Yamatsugu Kenzo, Kawashima Shigehiro A., Kanai Motomu	4. 巻 1
2. 論文標題 Synthetic hyperacetylation of nucleosomal histones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CB00029A	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 Mizumoto Shinsuke, Xi Siqi, Fujiwara Yusuke, Kawashima Shigehiro A., Yamatsugu Kenzo, Kanai Motomu	4. 巻 15
2. 論文標題 Hydroxamic Acid Piperidine Conjugate is an Activated Catalyst for Lysine Acetylation under Physiological Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry: An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 833-839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201901737	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7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 Chemical catalysis targeting biomacromolecules
3. 学会等名 21st Tetrahedron Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 Bioorthogonalなバイオチン-ストレプトアビジン相互作用が拓く ²¹¹ At-プレターゲティング技術
3. 学会等名 放射線科学研究機構キックオフシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体内の分子構造変換ダイナミズムに介入する化学触媒
3. 学会等名 イノベーション人材育成セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子構造変換ダイナミクスに介入する化学触媒
3. 学会等名 触媒学会 つくば地区講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 Hybrid Catalysis in Flasks and Living Organisms
3. 学会等名 Nagoya Medal Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体内化学秩序に動的に介入する触媒
3. 学会等名 化学会第102回春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Chemical catalysis targeting biomacromolecules
3. 学会等名 Chemical Biology of Epigenetic Modification, LMU Muenchen (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金井研HP https://gousei.f.u-tokyo.ac.jp/index.html</p>

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
研究分担者	山次 健三 (Yamatsugu Kenzo) (30646807)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教 (12601)	現・千葉大教授
研究分担者	川島 茂裕 (Kawashima Shigehiro) (40508115)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	藤村 亜紀子 (Fujimura Akiko) (80793091)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・特任研究員 (12601)	
研究分担者	山梨 祐輝 (Yamanashi Yuki) (40979150)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教 (12601)	

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