

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510183

研究課題名（和文） FRETプローブによるヒストン修飾の時間空間的分析

研究課題名（英文） Spacio-temporal analysis of histone modification by FRET probes

研究代表者

田中 裕二郎（TANAKA YUUJIROU）

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部・准教授

研究者番号：00311613

研究成果の概要（和文）：FRET プローブ及び人工リジルエンドペプチダーゼを用いてヒストン修飾酵素活性を定量的に測定する全く新しい方法を開発し、これを用いて細胞内のヒストン修飾酵素活性を可視化する技術を確立した。

研究成果の概要（英文）：A new technique of visualization of histone modifying enzymes was established using FRET peptides and artificially engineered lysyl endopeptidases. The method was successfully employed to visualize intra-cellular histone modifying enzyme activity.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：分子生物学・生化学・ゲノム構造

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：クロマチン構造・ヒストン修飾・メチル基転移酵素・脱メチル化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ヒストン修飾は、ゲノムの安定性や細胞分化に伴うダイナミックな遺伝子発現制御に於いて重要な役割を果たしています。しかし、細胞内のどこで、細胞周期や発生段階の何時、ヒストンの様々な修飾が起こっているのかという事に関しては不明な点が多く残されています。今までにも、修飾ヒストンに対する特異的抗体を用いた免疫染色やクロマチン免疫沈降によってゲノム構造の解析がなされてきましたが、より直接的に細胞の中で起こりつつある現象を可視化する技術が求められていました。

(2)ヒストンのリジン残基は様々な酵素の標

的になります。一方、リジンを特異的に認識するエンドペプチダーゼの中には、非修飾リジンに比べアセチル化やプロピオン化によって活性が低くなるものが知られていました。即ち、リジルエンドペプチダーゼがリジンの修飾状態を調べる分子センサーとなる可能性を示唆しています。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、蛍光標識したペプチド基質とリジルエンドペプチダーゼを分子センサーとして、ヒストン修飾酵素活性を可視化する技術を確立することです。これにより、細胞単位で定量的にクロマチン動態を解析することが可能になります。

### 3. 研究の方法

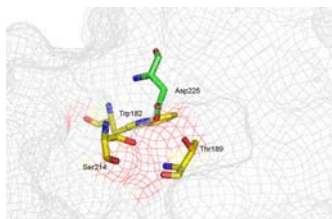
(1) リジン修飾の分子センサーとなるリジルエンドペプチダーゼ変異体の開発：リジルエンドペプチダーゼの基質結合ポケット (S1 ポケット) を構成するアミノ酸残基の側鎖に変異を導入することにより、基質への結合特性の異なる人工プロテアーゼを作成します。これにより、非修飾・モノメチル・ジメチル・トリメチル化リジンにそれぞれ選択性を有する酵素が得られると期待されます。

(2) リジン修飾酵素活性のプロープとなる FRET 標識ペプチドの開発：ヒストン由来のペプチドの両端に蛍光標識を導入し、ペプチド中央の (修飾) リジン残基を酵素で切断することによって Foerster Resonance Energy Transfer (FRET) 現象による蛍光強度の変化を指標とするプロープを作成します。吸光・発光波長の異なる蛍光標識を用いることにより、多重染色が可能になります。

(3) 細胞内のヒストン修飾酵素活性を可視化する技術の開発：固定した細胞標本にペプチドプロープを導入し、細胞内でヒストン修飾酵素反応を行った後、リジルエンドペプチダーゼによる「現像」操作を行います。

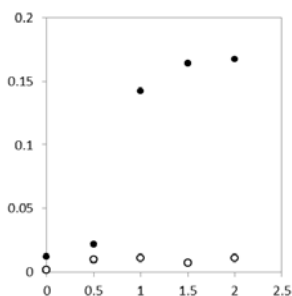
### 4. 研究成果

(1) リジン残基の修飾状態に感受性のある人工リジルエンドペプチダーゼを作成することに成功しました。特に、野生型ペプチダーゼは非修飾リジンばかりでなくモノメチル・ジメチルリジンにある程度の活性を有していますが、ジメチルリジンに殆ど活性を示さない誘導体を得ています。(図) リジルエンドペプチダーゼの S1 ポケットを構成するアミノ酸。

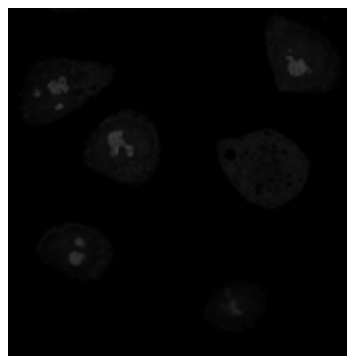


(2) 吸光・発光波長の異なる蛍光色素を用いて FRET 標識したペプチドプロープを合成することに成功しました。

(3) リジン残基の修飾状態に感受性の高い人工エンドペプチダーゼを分子センサーとして、ヒストン H3K4 に特異的なメチル基転移酵素 MLL の活性を定量することに成功しました。(図) 黒丸は通常反応、白丸は阻害剤であるホモシステイン存在下での反応を示します。横軸は MLL 酵素量、縦軸は蛍光強度。



(4) FRET ペプチドを用いて細胞内ヒストンメチル基転移酵素活性を可視化することに成功しました。



### 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 1 件)

Bioorg Med Chem. 2010, 18, 8158-66.  
Development of novel bisubstrate-type inhibitors of histone methyltransferase SET7/9. Mori S, Iwase K, Iwanami N, Tanaka Y, Kagechika H, Hirano T.

〔学会発表〕 (計 1 件)

平成 22 年 11 月 26 日 定量生物学の会第 3 回年会 (東京大学生産技術研究所)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ヒストン修飾酵素活性測定法

発明者：田中裕二郎

権利者：田中裕二郎

種類：特許

番号：(学内整理番号 P10-026)

出願年月日：出願準備中

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bgen/open.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 裕二郎 (TANAKA YUJIRO)

東京医科歯科大学・疾患生命科学研究部・准教授

研究者番号：00311613

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：