

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870186

研究課題名(和文) ヒストンコード研究の基盤となる多様な修飾を有するヌクレオソーム構築法の開発と応用

研究課題名(英文) Development of a platform for histone-code research by setting nucleosomes with various modifications

研究代表者

林 剛介 (Hayashi, Gosuke)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40648268

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)：本研究では、エピジェネティクス研究における重要な研究対象である「ヒストンコード仮説」にアプローチするための化学的研究基盤の作製を行った。具体的には、クロマチン構造の重要構成単位である、コアヒストンH2AおよびH2B、またリンカーヒストンH1の完全化学合成をペプチド固相合成法とNative Chemical Ligation(NCL)法を組合せることで達成した。また、化学合成ヒストンがヌクレオソームおよびクロマトソーム形成能を持つことを確認し、さらには核内に局在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We developed a chemical platform for approaching “histone code hypothesis”, that is one of the most important issues in epigenetics research. Total chemical synthesis of core histone H2A, H2B, and linker histone H1, all of which play essential roles in gene regulation and chromatin integrity, have been achieved by solid-phase peptide synthesis (SPPS) and native chemical ligation (NCL). The chemically-synthesized histones showed comparable ability to form nucleosome and chromatosome in vitro. Furthermore, we introduced dye-labelled H2A into HeLa cells and observed that the synthetic histone protein successfully localized into nucleus.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ヒストン エピジェネティクス タンパク質化学合成 Native Chemical Ligation 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

DNA 配列解析技術の進歩により様々な生物のゲノム配列が解読され、バイオインフォマティクスの進歩により遺伝子の数や位置をより簡単に推定できるようになってきた近年、「細胞は何故単一の DNA 配列から多様な機能・構造を持つ異なった形態を創り出せるのか?」という普遍的な疑問に答えるべく、「エピジェネティクス」という分野が立ち上がり世界中の人員・研究資金を巻き込みながら破竹の勢いで研究が進んでいる。この疑問に対する答えは、単純化すれば「細胞内で発現する遺伝子群が細胞の状態によって異なるから」なのだが、この現象に関する分子メカニズムやドライビングフォースは未だに未解明の部分が多い。細胞が細胞内で発現する遺伝子の種類を変化させるためには、単一遺伝子レベルで考えるとその遺伝子の発現を ON/OFF 制御する必要がある。「DNA のメチル化と脱メチル化」は、ほぼ全ての生物に共通する遺伝子制御の仕組みであるが、ヒトを含む真核生物においては、DNA のメチル化だけで遺伝子発現の制御を理解することは難しく、ヒストンタンパク質と DNA の複合体であるヌクレオソームを構成単位として形成されるクロマチン構造の変化を捉えることが、遺伝子発現調節のメカニズム理解に不可欠だと考えられている。この構造変化を誘起するための“着火剤”がヒストンへの化学修飾であり(ヒストンコード仮説)、その種類は図1に示すように、メチル化、アセチル化、リン酸化等多岐にわたる(Dhall and Chatterjee ACS Chem.Biol.2011)。これらの化学修飾がヌクレオソームの構造・機能に及ぼす影響を試験管内で再構築したヌクレオソームを用いたボトムアップアプローチによって解明することを目指した研究が始まっているが(Fierz and Muir et al. Nat.Chem.Biol. 2012)、生体内に存在するヌクレオソームのバリエーション(つまり化学修飾のパターン)が多様なのに対し、現在再構築できるヌクレオソームの種類は限られている。

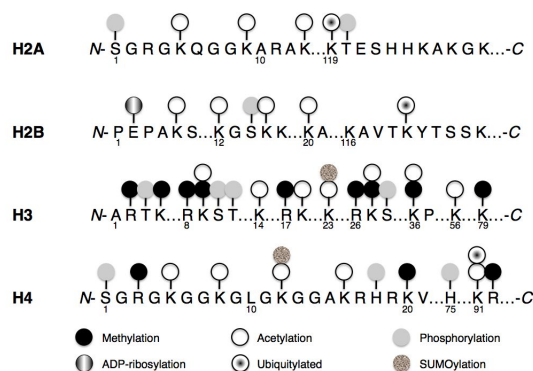


図1 4種類のヒストンにおける化学修飾の種類と位置

2. 研究の目的

真核生物の遺伝子発現は、「エピジェネティック制御」と呼ばれる DNA やヒストンの可逆的化学修飾を介した転写制御機構によって緻密に調節されている。最近ではヒストンの化学修飾がメチル化やアセチル化にとどまらず、計10種類以上存在することが明らかになってきた。また、これらの多様な修飾パターンはヒストン上に単一で存在する訳ではなく同時多発的に存在することがわかっている。これらの化学修飾がクロマチン構造・機能に及ぼす影響を研究するために、ヌクレオソームを試験管内で人工的に構築する研究が始まっているが、複数の化学修飾を持ったヌクレオソームを汎用的に構築する方法は未だにない。そこで本提案研究では、化学修飾の数・種類に制限のないヌクレオソーム構築法を確立することを第一目的とする。さらには構築したヌクレオソームを用いてヒストンの化学修飾が DNA との相互作用に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

今日までに構築されてきたヌクレオソームの例として、Jason Chin らは、遺伝暗号拡張法を用いて大腸菌にアセチル化されたリシンを翻訳合成によって導入し、アセチル化ヒストンを含むヌクレオソームを作製している( Neumann et al. Nat.Chem.Biol.2008 )。一方、Tom Muir らは、固相合成によって作製した化学修飾含有ヒストン N 末端配列と大腸菌に翻訳させた C 末端側配列を Native Chemical Ligation によって連結することで、N 末端に修飾の入ったヌクレオソームの試験管内構築に成功している( Chatterjee and Muir J.Biol.Chem.2010 )。これらはエピジェネティクス研究において重要な役割を果たしているが、上述のように、未だに複数種類の化学修飾を任意のアミノ酸に同時に導入可能なヌクレオソーム構築法は存在しない。そこで本提案研究では、遺伝暗号リプログラミングを応用した試験管内翻訳合成法と有機化学的手法であるペプチド固相合成法を組み合わせることで、多様な化学修飾に適応可能な4種類のヒストンタンパク質(H2A、H2B、H3、H4)合成法の確立を第一目的と

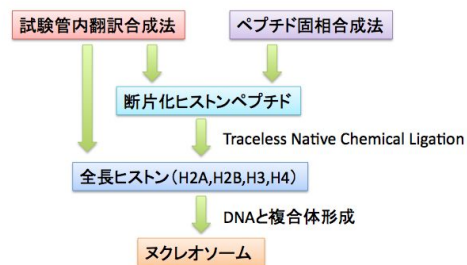


図2 本提案研究におけるヌクレオソーム構築の行程

して研究を行う。ヌクレオソーム構築の概要としては、試験管内翻訳合成によって全長ヒストンを合成する方法、あるいは翻訳合成あるいは固相合成によってヒストンを断片化したペプチドを合成した後に「Traceless Native Chemical Ligation 法」を用いて連結させる手法を用いて全長ヒストン 4 種類を合成し、その後 DNA と複合体形成をすることで行う (図 2)。

#### 4. 研究成果

##### ヒストン H2A の化学的全合成および生細胞イメージングへの応用

ヒストンは細胞内で DNA との複合体であるヌクレオソーム構造を形成する。ヌクレオソームが連なったポリヌクレオソームと関連タンパクとがクロマチン構造を形成し、ダイナミックにその形態を変化させている。その動態変化と遺伝子発現パターンは密接に関連していると考えられており、構造変化の駆動力の一つとしてヒストンの翻訳後修飾が挙げられる。ヌクレオソーム上での翻訳後修飾は細胞周期の制御や、DNA の複製・転写の制御に関わり、その一方で細胞質での翻訳後修飾は核内への輸送シグナルとして作用していることが示唆されている。しかし、この細胞質での翻訳後修飾の機能は未だに多くが解明されていない。また、この機能解析のために必要な標識タグや修飾アミノ酸などの分子を部位特異的に導入することは、従来の研究方法では困難であった。

本研究では、ペプチド固相合成法とケミカルライゲーション法を用いてヒストンタンパクを化学的に合成し、その挙動を細胞内で追跡することを目標とする。我々はヒストン H2A に着目し、アラニン残基を指標として全長を 3 個の断片に分割して各々を固相合成法によって合成した。続いてネイティブケミカルライゲーション法によって各断片を連結し、システイン残基の脱硫反応を経て H2A を合成した。この手法により、アセチル化・メチル化・リン酸化の修飾が自在に導入できることを確認した。

加えて、蛍光色素を標識した H2A を合成し、その後に細胞への導入を試みた。合成ヒストンが細胞内でどのような挙動を示すかイメージングを行った。

##### ヒストン動態解析を指向したヒストン H2B の化学的全合成

メチル化、アセチル化、リン酸化などのヒストンの翻訳後修飾はリーダーやヒストンシヤペロンなどとの結合だけでなくヌクレオソームの安定性を変化させることで遺伝子発現制御に深く関わっている。研究が進んで生物学的意義が明らかになってきているものもあるが、他のほとんどの翻訳後修飾にお

いてはその機能、役割は未知のままである。これらを研究するためには目的の位置に目的の修飾が導入されたヒストンを用いる必要がある。しかし主流である大腸菌に発現させる方法では、得られる翻訳後修飾の種類や数に限りがあり、蛍光色素やビオチンなどの導入も難しい。一方、ペプチド固相合成法を応用した化学合成法では導入できる修飾の数や種類は飛躍的に高まり、翻訳後修飾の研究に適している。一度に合成できるペプチドの長さには制限はあるが、1994 年に Kent らによって報告された Native Chemical Ligation 法を用いることでペプチドフラグメント同士の連結が可能である。

本研究で着目したのは、H2A/H2B ダイマー形成の平衡状態の翻訳後修飾による変化である。ダイマーの安定性を検討した報告は過去にあるが、それらは塩濃度やバリエーションでの変化をみており、翻訳後修飾の影響は調べられていない。また、細胞内でダイマーの安定性を研究することも大きな意義があるため、*in vitro*、*in vivo* 両方で機能する系として、ダイマーとモノマーの平衡を FRET 効率の変化により可視化する系を考えた。

H2A/H2B ダイマー形成の平衡状態を可視化するために、FRET ペアが導入された H2B を化学合成する。翻訳後修飾のない H2B でダイマーやヌクレオソームを組むことを確認した後、翻訳後修飾が導入された H2B を合成する予定である。

##### 全長ヒストン H1 の化学的全合成法の確立

コアヒストンにおける翻訳後修飾は、様々なものが発見されており、その機能についての研究が活発に行われている。近年では、タンパク質の全化学合成方法が発展し、バーコード DNA と組み合わせることで、様々な翻訳後修飾を持つヌクレオソームライブラリの構築も達成され、修飾による認識タンパクとの相互作用の違いの研究も可能になった。一方でヒストンには、ヌクレオソームと相互作用し高次クロマチン構造の形成に関与するリンカーヒストン H1 (以下 H1 と呼ぶ) も存在する。昨年はドデカヌクレオソーム内における H1 の位置についての電子顕微鏡画像がとられ、その機能の重要性も示唆された。H1 もコアヒストンと同様に多様な翻訳後修飾を持つことが MS 解析によって明らかになっているが、その機能についての研究は未だ不明な点が多い。そこで、私は化学合成 H1 を作製し、様々な翻訳後修飾や自在な機能を組み込むことで高次クロマチン構造の形成に与える H1 の機能解明に取り組むことを考えた。しかし H1 はコアヒストンよりも 100 残基程度大きなサイズを持ち、化学合成方法は報告されていない。そこで、最初のステップとして H1 の化学合成法の確立に取り組んだ。ターゲットとしては H1.4 に注目した。H1 の化学合成にはヒドラジドを用いた

Native Chemical Ligation と脱硫反応を利用しており、また配列の特徴から 4 種類のフラグメントからの合成が可能であることを示した。更に、大腸菌由来のリコンビナントヒストン及び 601 DNA を利用することでクロマトソームの再構成も行い、化学合成 H1.4 がヌクレオソームと相互作用する能力を有していることの確認を行うことにも成功した。

#### 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 2 件)

Yamamoto, K.; Chikaoka, Y.; Hayashi, G.; Sakamoto, R.; Yamamoto, R.; Sugiyama, A.; Kodama, T.; Okamoto, A.; Kawamura, T. Middle-down and chemical proteomic approaches to reveal histone H4 modification dynamics in cell cycle, *Mass Spectrometry* in press 2015

Hayashi, G.; Sakamoto, R.; Okamoto, A. 2-oxazoline formation for selective chemical labeling of 5-hydroxylysine, *Chemistry – An Asian Journal* 10, 1138-1141. 2015

[学会発表](計 14 件)

坂元亮介、林剛介、岡本晃充  
「化学合成リンカーヒストン H1 を用いたエピジェネティクス研究への展開」  
第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会  
2015 年 5 月 25、26 日  
学術総合センター 一橋講堂(東京都千代田区)

末岡拓馬、林剛介、岡本晃充  
「ヒストン H2A の化学的合成と細胞内イメージングへの応用」  
第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会  
2015 年 5 月 25、26 日  
学術総合センター 一橋講堂(東京都千代田区)

榊原大輔、林剛介、岡本晃充  
「エピジェネティクス研究を指向したヒストン H2B の化学合成」  
第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会  
2015 年 5 月 25、26 日  
学術総合センター 一橋講堂(東京都千代田区)

坂元亮介、林剛介、岡本晃充  
「エピジェネティクス研究に向けたリンカーヒストン H1 の化学合成」  
日本化学会 第 95 春季年会(2015)  
2015 年 3 月 26 日(木)~29 日(日)  
日本大学 理工学部船橋キャンパス(千葉県

船橋市)

末岡拓馬、林剛介、岡本晃充  
「ヒストン H2A の化学合成と生細胞イメージング」  
日本化学会 第 95 春季年会(2015)  
2015 年 3 月 26 日(木)~29 日(日)  
日本大学 理工学部船橋キャンパス(千葉県船橋市)

榊原大輔、林剛介、岡本晃充  
「エピジェネティクス研究を指向したヒストン H2B の化学合成」  
日本化学会 第 95 春季年会(2015)  
2015 年 3 月 26 日(木)~29 日(日)  
日本大学 理工学部船橋キャンパス(千葉県船橋市)

石橋真帆、林剛介、岡本晃充  
「プロテオミクス解析を指向した酸化反応による翻訳後修飾ヒドロキシリシンの濃縮法の開発」  
日本化学会 第 94 春季年会(2014)  
2015 年 3 月 27 日(木)~30 日(日)  
名古屋大学 東山キャンパス(愛知県名古屋市)

林剛介、末岡拓馬、岡本晃充  
「ヒストン H2A の化学合成とエピジェネティクス研究への応用」  
第 8 回バイオ関連化学シンポジウム  
2014 年 9 月 11 日(木)~13 日(土)  
岡山大学 津島キャンパス(岡山県岡山市)

末岡拓馬、林剛介、榊原大輔、岡本晃充  
「生細胞イメージングを指向したヒストン H2A・H2B の化学合成」  
第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会  
2014 年 5 月 25 日(日)~27 日(火)  
東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)

梁瀬将史、林剛介、岡本晃充  
「プロテオミクス解析を可能にするヒドロキシチロシン含有タンパク質の選択的濃縮」  
第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会  
2014 年 5 月 25 日(日)~27 日(火)  
東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)

坂元亮介、林剛介、岡本晃充  
「オキサゾリン形成反応を利用する翻訳後修飾ヒドロキシリシンの検出方法の開発」  
日本化学会 第 94 春季年会(2014)  
2015 年 3 月 27 日(木)~30 日(日)  
名古屋大学 東山キャンパス(愛知県名古屋市)

末岡拓馬、林剛介、岡本晃充  
「ヒストン H2A の人工的合成と細胞内イメ

ーシングへの応用」

日本化学会 第 94 春季年会 (2014)  
2015 年 3 月 27 日 (木) ~30 日 (日)  
名古屋大学 東山キャンパス (愛知県名古屋市)

榊原大輔、林剛介、岡本晃充  
「細胞への応用を指向したヒストン H2B の  
化学合成」  
日本化学会 第 94 春季年会 (2014)  
2015 年 3 月 27 日 (木) ~30 日 (日)  
名古屋大学 東山キャンパス (愛知県名古屋市)

梁瀬将史、林剛介、岡本晃充  
「ボロン酸エステル形成を利用した翻訳後  
修飾ヒドロキシチロシンの化学的検出」  
日本化学会 第 94 春季年会 (2014)  
2015 年 3 月 27 日 (木) ~30 日 (日)  
名古屋大学 東山キャンパス (愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等  
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/okamoto/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 剛介 (HAYASHI, Gosuke)  
東京大学・大学院工学系研究科・助教  
研究者番号：40648268

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：