

研究終了報告書

「有機化学を基盤としたエピゲノム修飾ヌクレオソーム再構成技術の確立」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：林 剛介

1. 研究のねらい

真核生物の遺伝子は、ヌクレオソームと呼ばれる DNA と 4 種類のヒストンタンパク質の複合体を基本単位として構成されている。ヒストンタンパク質には、メチル化やアセチル化、リン酸化やユビキチン化など様々な翻訳後修飾(エピゲノム修飾)が施されることでヌクレオソームの状態が変化し、複製や転写など細胞活動にとって必要不可欠なプロセスが制御されていると考えられている。しかし、ヒストンの翻訳後修飾の種類やパターンは多種多様で未だに生物学的意義が未解明な修飾が多く存在する。そこで我々の研究グループでは、有機化学の手法でタンパク質を作製する「タンパク質化学合成法」を用いて翻訳後修飾が部位特異的に導入されたヒストンなどのエピジェネティクス関連タンパク質を作製し、その機能を解析することを目的とした。翻訳後修飾以外にも、蛍光色素など機能性分子を導入したタンパク質を合成し、新たな生化学的実験評価系の構築も目的とした。また、本研究で利用する技術「タンパク質化学合成法」自体が発展途上の技術であり、アミノ酸数の多い高分子量タンパク質や疎水性の高い膜タンパク質など、未だに化学合成が困難な標的が数多く存在する。また培養細胞を用いた遺伝子工学的手法よりもその合成には時間もコストもかかり、その操作も容易ではないため、タンパク質を調製する方法論としては、未だに一般的な手法になっていないのが現状である。そこで本研究では、タンパク質化学合成法の技術革新を達成することも重要な研究目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

タンパク質化学合成法は 20 種類のタンパク質性アミノ酸以外の多様な非タンパク質性アミノ酸の導入を許容するため、リボソーム合成では作ることが困難な翻訳後修飾含有タンパク質や鏡像異性体天然タンパク質などの人工タンパク質を作ることができる。タンパク質化学合成法は、1) ペプチド断片を作製するペプチド固相合成、2) 合成したペプチド断片を順次連結するペプチド連結反応、という 2 つのステップからなる。ペプチド連結反応として最も汎用される反応が NCL (Native Chemical Ligation) と呼ばれる連結反応であり、N 末端にシステイン残基を持つペプチドと C 末端にチオエステル構造を有するペプチドが水中の温和な条件で効率よく連結するため、非常に利用価値の高い連結法である。しかし、2022 年現在においても、タンパク質の化学合成は容易ではなく、特に高分子量タンパク質を効率的に作製可能な技術の開発が求められている。そこで本研究では、上述の研究目標を達成するために、タンパク質合成法を進化させる新たな方法論の創出、またその新手法を用いてエピジェネティクスに重要な修飾を持つヒストンやその他の核内タンパク質の合成を行った。

本さきがけ研究において開発したタンパク質化学合成技術の概要としては、1) アルデヒド捕捉剤を用いたチアゾリジンの連続的脱保護によるワンポットペプチド連結反応(研究テーマ

A、代表論文 1)、2)ルテニウム触媒を用いた Alloc 基の連続的脱保護によるワンポットペプチド連結反応(研究テーマ B、代表論文 2)、3)チアゾリジン構造を基軸とした新規ペプチドチオエステル合成法(研究テーマ C、代表論文 3)、4)新規アリル系システイン保護基を利用した連結方向可変型ワンポットペプチド連結反応(未発表)、5)核酸相互作用を利用したペプチド連結反応によるタンパク質合成法(未発表)、などがある。

本さきがけ研究で化学合成したヒストンやその他エピジェネティクス関連タンパク質は、述べ 20 種類以上にのぼり、タンパク質の種類としては、4 種類のコアヒストン H2A、H3B、H3、H4 に加えてリンカーヒストン H1、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 α 、維持メチル化因子 PAF15 などの合成を達成している。導入した修飾の種類は、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化などの翻訳後修飾に加えて、蛍光色素であるフルオレセイン、ローダミン、チアゾールオレンジ、などがある。これらの修飾タンパク質は、生化学解析や構造解析へ応用され、翻訳後修飾の機能やヒストンタンパク質の構造ダイナミクスの一端を明らかにした(研究テーマ B,D,E など)。

(2) 詳細

研究テーマ A「チアゾリジンの連続的脱保護によるワンポットペプチド連結法の開発とユビキチン化ヒストンの化学合成」(代表論文 1)

タンパク質化学合成法では、標的タンパク質が大きくなると連結すべきペプチド断片の数が増え、繰り返し NCL を行う必要が出てくるが、NCL 後にその都度精製操作(主に HPLC で行う)を行うと合成収率が低下し、また合成に必要な作業時間が膨大になる、という問題が存在する。そこで我々の研究グループでは、精製操作を経ずに複数のペプチド断片を連結することができる「ワンポットペプチド連結反応」の開発を行ってきた。本研究テーマでは、新たなワンポットペプチド連結法として「チアゾリジン」保護基に着目した方法を開発した。チアゾリジンは弱酸性 pH 下で加水分解を受け、システインとホルムアルデヒドへと分離することが予想されたことから、効率の良いホルムアルデヒド補足剤を開発することで、チアゾリジンの脱保護が達成されると考えた。新規のアルデヒド補足剤として 4 種類を合成し、N 末端にチアゾリジン構造を有するペプチドを用いてその脱保護効率を調べたところ、pH4.5 の環境下で s4 が最も効率よく脱保護を進行させることが明らかとなり、s4 を用いてチアゾリジン脱保護反応の pH 依存性を調べたところ、pH7 以上では脱保護効率が顕著に低く、ペプチド連結反応系中

では脱保護反応が抑制されることが示された(図 1)。最終的には、この反応を利用して、4 つのペプチド断片をワンポットで連結し、ユビキチン化されたヒストン H2A.Z の化学合成に成功した。

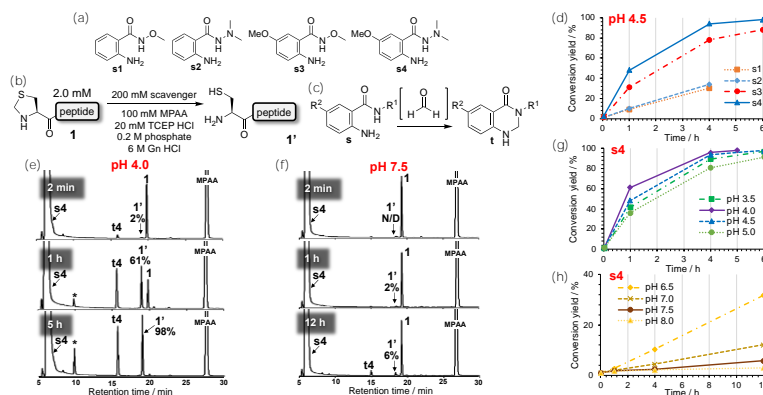


図 1 新規ホルムアルデヒド補足剤によるチアゾリジン脱保護反応

研究テーマ B「ルテニウム錯体を用いた効率的ペプチド連結反応によるヘテロクロマチン因子の化学合成」(代表論文 2)

さきがけ研究開始以前の 2018 年に報告したワンポットペプチド連結法では、Pd (パラジウム) 錯体を用いて Alloc (アリルオキシカルボニル) 基を NCL 反

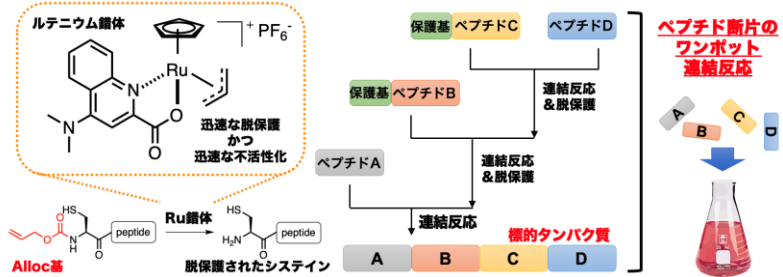


図 2 Ru 錯体を用いたワンポットペプチド連結反応の概要

応系中で高効率に脱保護する反応を開発し、5 つのペプチド断片を精製せずに連続して連結することに成功した。しかし、Pd 錯体はペプチドに対して過剰量加える必要があり、錯体自体の反応性の低さや Pd 錯体によるペプチドの凝集などがしばしば問題となった。そこで本研究テーマでは、Pd 錯体よりも活性が高く触媒量 (ペプチドに対して過少量) で Alloc 基の脱保護が可能な新たな金属錯体として Ru (ルテニウム) 錯体に着目して研究を推進した (図 2)。10 種類の Ru 錯体を合成して評価したところ、複数の高活性錯体が見いだされた。その中の一つである Ru-4 を用いてリンカーヒストン H1 (212 アミノ酸) の化学合成を行った結果、5 つのペプチド断片から収率 23% で全長ヒストンを得ることに成功した。その全工程数は 7 工程 (NCL4 回、Alloc 脱保護 3 回) であり、各反応の平均収率は 80% 以上であった。また 200 アミノ酸以上のタンパク質をワンポットで合成した初めての例となった。リンカーヒストンに加えて、ヘテロクロマチンタンパク質である HP1 α (191 アミノ酸) の化学合成にも同様の方法で成功しており、これらのタンパク質の翻訳後修飾解析が可能となった。その結果、ヒストン H1 のリン酸化 (S172ph) がクロマトソームを不安定化することを明らかにし、また HP1 α の N 末端テールのリン酸化 (S11,12,13,14ph) が DNA との結合能を低下させることを明らかにした。

研究テーマ C「新規チオエステル前駆体を用いた H3K56Ac の化学合成」(代表論文 3)

ペプチド連結反応である NCL を行うには C 末端にチオエステル構造を有するペプチドの合成が必要不可欠であるが、汎用的なペプチド固相合成である Fmoc 固相合成法ではチオエステルペプチドの合成効率が悪い、という問題が存在する。本研究テーマでは、Fmoc 固相合成に適応可能なチオエステル前駆体を新たに設計・合成することで、タンパク質化学合成の方法論を進化させることができると考えた。我々はチオエステル前駆体として、CP-Thd-Ile 構造を見出した (図 3)。この Thd (チアゾリジノン) 構造は、Fmoc 固相合成後に固相上でシステイン残基から容易に誘導でき、また、pH の変化によって迅速かつ定量的にジケトピペラジン (DKP) チオエステルへと変換される性質を持つ。既存の N-S アシルシフト型チオエステル前駆体の中では最も早くチオエステルへ変換し、かつ C 末端アミノ酸の影響もほ

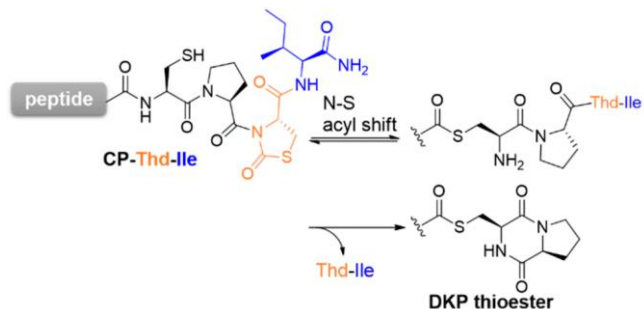


図 3 CP-Thz-Ile チオエステル前駆体からチオエステルへの変換

とんど受けないことが明らかとなった。最終的にこの CP-Thd チオエステル前駆体を用いて、ヒストン H3K56Ac の化学合成を達成した。

研究テーマ D「H3 の N 末端アセチル化が H1 のヌクレオソーム結合に与える影響の解析」

リンカーヒストン H1 のヌクレオソームへの結合(クロマトソーム形成)は、ヘテロクロマチン形成などのクロマチン構造変化に必要不可欠だと考えられている。本研究テーマでは、ヒストン H3 の N 末端領域(ヒストンテール)のアセチル化がヌクレオソームに結合したリンカーヒストン H1 に与える影響について解析を行った。まず、大腸菌発現で作製した H3 の C 末端領域と、我々のグループにおいて化学合成したアセチル化を有する N 末端領域を NCL によって連結させ、3 種類の異なるアセチル化修飾パターンを有する H3 の合成を行った。その後、合成した H3 を用いてヌクレオソーム再構成を行い、H1 のヌクレオソームへの結合状態を H1-CTD(C-terminal domain) のコンパクトさを FRET 解析することにより評価した。その結果、N 末端がアセチル化された H3 では、H1 の FRET 効率が減少した(図 4)、つまり結合状態の H1-CTD のコンパクトさがキャンセルされる、ということが明らかとなった。つまり H3 は、その N 末端アセチル化を通じて何らかのクロマチン構造の制御に関わっていることが示唆された。本研究は、Rochester 大学の Hayes 教授グループ及び東京大学の胡桃坂教授グループとの共同研究であり、2020 年に論文報告を行った。

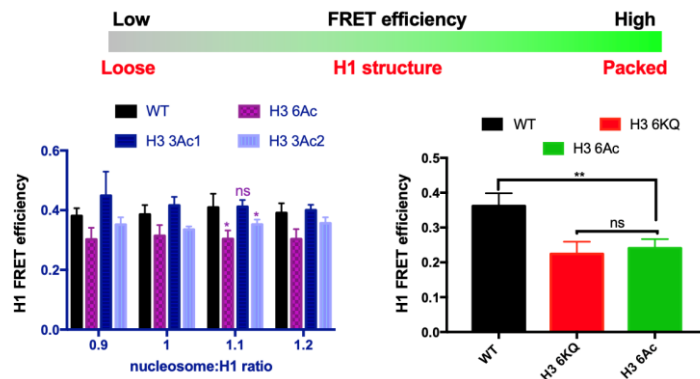


図 4 H3 アセチル化が H1 構造に及ぼす影響の FRET 解析

研究テーマ E「ヌクレオソーム動態を可視化する蛍光 Turn-on 型ヒストンの合成と評価」

ここでは、DNA と相互作用することで蛍光を発するチアゾールオレンジ色素を導入したヒストンを化学合成し、ヌクレオソーム動態をリアルタイムに可視化することを目指した(図 5)。チアゾールオレンジを有するヒストンは、ヒストン単体やヒストン複合体(H2A/H2B ダイマーや H3/H4 テトラマー等)では蛍光を発しないが、ヌクレオソーム構造を取るとチアゾールオレンジが DNA と相互作用することで蛍光を発することが予想される。このように、ヌクレオソーム状態を選択的に可視化できる「蛍光 Turn-on 型ヒストン」の創成が可能になると考えた。我々は、ヒストン H2A を 3 つのペプチド断片に分割して合成することとした。チアゾールオレンジの導入位置は、ヌクレオソーム形成時に

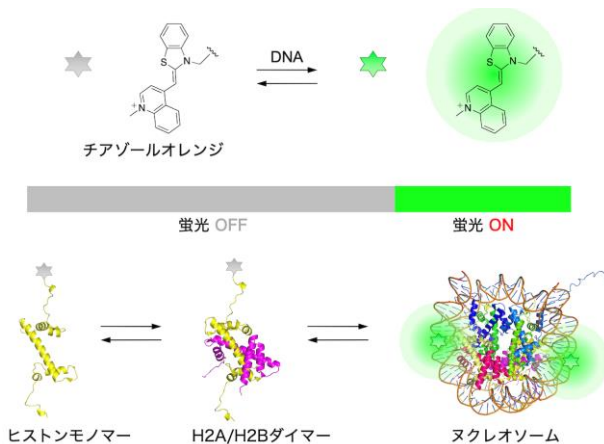


図 5 蛍光 Turn-on 型ヒストンによるヌクレオソーム形成の可視化

ンカーDNAの付近に配置させるため、H2AのC末端領域(119番目のリシンの位置)へ導入することとした。まず、3つのペプチド断片を「パラジウム錯体を用いたワンポット連結法」を用いて全長H2Aを合成し、脱硫反応(システインからアラニンへの変換反応)を経て、目的のチアゾールオレンジが導入されたH2Aを得た。得られたH2Aを用いてH2A/H2Bダイマーやヒストンオクタマー、ヌクレオソームを試験管内で再構成し、蛍光強度を比較したところ、ヌクレオソーム形成時に顕著に蛍光発光が増大することが示された。

研究テーマF「シロイヌナズナ由来のメチル化修飾ヒストンH3の半合成」

さきがけ3期生の越阪部晃永博士との領域内共同研究として、ヒストン修飾を認識するリーダータンパク質の新たなスクリーニング系を立ち上げるプロジェクトをスタートした。その一環で、トリメチル化されたリシン残基を含むシロイヌナズナ由来ヒストンH3K4me3およびH3K9me2の半合成(化学合成ペプチドと大腸菌発現ペプチドを連結させる方法)を行った(図6)。NCLを行う際、固相合成(SPPS)で作製したH3K4me3・H3K9me2ペプチドのチオエステル部位に「チオコリン」を用いた。チオコリンは、チオール化合物の中では不快臭が少なく、かつ通常のアシルチオールよりもpKaが低いため、高い反応性が期待された。実際に、チオコリンチオエステルの合成に成功し、大腸菌発現で作製したC末端断片(越阪部さんから提供)と反応させることで、連結産物が得られ、脱硫反応(CysからAlaへ変換する反応)を経て、目的のヒストンH3の合成に成功した。

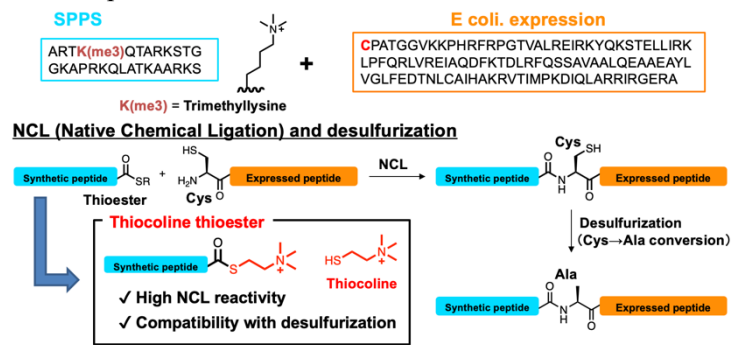


図6 メチル化ヒストンH3の半合成スキーム

3. 今後の展開

2022年11月の時点で、化学合成が完了しているが機能解析がこれからのタンパク質が複数存在する(例えば、ユビキチン化されたPAF15タンパク質やヒストンH3、メチル化されたヒストンH3など)。また、現在合成途中のタンパク質も複数存在する(アセチル化されたヒストンH3やメチル化されたH3、ユビキチン化されたヒト由来ヒストンH2Aなど)。本さきがけ研究の期間終了後にも引き続き研究を推進し、これらの合成タンパク質を活用して構造解析や生化学解析によってその機能が明らかとなるはずである。

また、本さきがけ研究で開発したタンパク質合成技術は、ヒストンなどのエピジェネティクス関連タンパク質に限らず多様なタンパク質の合成に利用可能であるため、今後はエピジェネティクス関連タンパク質以外の重要タンパク質の合成にも使用される。特に医薬品への応用が来される低分子化抗体の化学合成については、我々のグループでも精力的に取り組んでおり、「化学合成タンパク質医薬品」という新たなモダリティが、この10年程度のタイムスパンで社会実装される日がやってくることを大いに期待しており、またこの分野の発展に我々の技術が貢献できると信じている。

4. 自己評価

化学合成で作製する翻訳後修飾含有タンパク質は、さきがけ研究開始前に予想していたよりも

領域内外の研究者からのニーズが大きく、当初の予定よりもかなり多種類のタンパク質を化学合成することとなった。また、それに伴って新たなペプチド連結技術などを創出することができたことから、期待以上の成果が得られたと言える。一方で、DNA の化学合成やヌクレオソームの生化学解析などの実験は当初の予定通り進めることが叶わなかった。しかし、領域内には核酸化学やヌクレオソーム解析の専門家がいるため、個人で進めるよりも共同研究で進める方がはるかに効率的だと気付かされた。これにより、我々の専門であるペプチド・タンパク質化学の研究に打ち込むことができ、専門分野の研究を予定よりも発展させることができたと感じている。

実際に研究を推進する際には、名古屋大学内の複数の学生さんの協力を得ながら良い研究体制が構築できたと考えている。また、本さきがけ研究費によって、ペプチド自動合成機や HPLC 装置など、タンパク質化学合成研究を進める上で必要不可欠な機器類を拡充させることができたと感じており、研究の発展に資する無駄のない研究費執行が行えたと感じている。

タンパク質化学合成技術は、遺伝子工学的には作ることでできない人工タンパク質の合成が可能であるという点において革新的技術のシーズであると言えるが、その基盤技術であるペプチド連結反応において現状世界最高効率の方法論を創出することができた。本技術はライフサイエンス研究や創薬研究への影響が大きく、製薬業界を中心に経済への波及効果が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 14件

1. Nakatsu, K.; Okamoto, A.*; Hayashi, G.* (co-corresponding author); Murakami, H.* Repetitive Thiazolidine Deprotection Using a Thioester-Compatible Aldehyde Scavenger for One-Pot Multiple Peptide Ligation. *Angewandte Chemie International Edition*. 2022, 61, e202206240.

ペプチド N 末端チアゾリジン構造をシステインに変換可能な新規化合物 AMDBH (アルデヒド捕捉剤)を開発し、この変換反応を利用した新規ワンポットペプチド連結反応を開発した。AMDBH は従来のアルデヒド捕捉剤よりもチオエステルの分解を抑制できることが明らかとなった。AMDBH を利用したワンポットペプチド連結反応により、ユビキチン化ヒストン H2A のワンポット合成を達成した。

2. Kamo, N.; Kujirai, T.; Kurumizaka, H.; Murakami, H.; Hayashi, G.* (co-corresponding author); Okamoto, A.* Organoruthenium-Catalyzed Chemical Protein Synthesis to Elucidate the Functions of Epigenetic Modifications on Heterochromatin Factors. *Chemical Science*. 2021, 12, 5926-5937.

ルテニウム錯体によるペプチド N 末端 Alloc 基の脱保護反応を利用して 200 アミノ酸前後のタンパク質 (212 アミノ酸からなるヒストン H1.2 および 191 アミノ酸からなるヘテロクロマチンタンパク質 HP1 α) をワンポットペプチド連結反応による合成に成功した。200 アミノ酸以上のタンパク質のワンポット合成は世界初であり、異なる翻訳後修飾パターンを有する H1.2 および HP1 α を計 9 種類合成し、翻訳後修飾が及ぼす影響を明らかにした。

3. Nakatsu, K.; Yanase, M.; Hayashi, G.* (co-corresponding author); Okamoto, A.* Fmoc-Compatible and Sequence-Independent Peptide C-Terminus Alkyl Thioester Formation

Using Cysteinypropyl Imide. *Organic Letters*. 2020, 22, 4670-4674.

ペプチド連結反応である NCL (Native Chemical Ligation) において利用可能な「ペプチドチオエステル」の新たな前駆体を開発した。Cys-Pro-Cys 配列から誘導される Cys-Pro-Thd (thiazolidinone) 構造は迅速にチオエステルへと変換可能であり、N-S アシルシフト型チオエステル前駆体の中では最も効率よくチオエステルへと変換可能であることが明らかとなった。この CPThd ペプチドを用いてヒストン H3 の化学合成を達成した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 5 件 (特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(招待講演) 第 12 回 ABC-InFO 「タンパク質全合成を可能にするペプチド連結の化学」(2022 年、Youtube オンライン配信)

(受賞) 第 40 回有機合成化学奨励賞 (2021 年、有機合成化学協会)

(著作物) 「タンパク質化学合成を加速させるペプチド連結反応の化学 ～タンパク質を化学で創る時代を目指して～」 化学と工業 ～飛翔する若手研究者～ (2020 年、日本化学会)

(受賞) 若い世代の特別講演賞 (2020 年、日本化学会)

(受賞) 田辺三菱製薬研究企画賞 (2020 年、有機合成化学協会)

(受賞) 日本ペプチド学会奨励賞 (2019 年、日本ペプチド学会)

※その他さきがけ研究期間中に、招待講演 22 件、著作物 9 件