

博士論文

Chemical synthesis and application of histone

H2A and H2B for epigenetic research

(エピジェネティクス研究に向けたヒストン

H2A ならびに **H2B** の化学合成と応用)

末岡 拓馬

1. 緒言

真核生物において、ゲノム DNA は核タンパク質と共にクロマチン構造を形成し、この動的変化によって遺伝子の発現が制御されている。クロマチンを構成する複合体の最小単位がヌクレオソームであり、DNA と 4 種類のヒストンタンパク質 (H2A, H2B, H3, H4) から成る。ヒストンはアセチル化・メチル化・リン酸化に代表される多様な翻訳後修飾を受け、それらがクロマチンの構造変化を促し、DNA 配列の変化を伴わない遺伝子制御、すなわちエピジェネティクスに深く関わっている (Figure 1)。したがって、翻訳後修飾の発見ならびにその機能を解明する研究が盛んにおこなわれてきた^{[1][2]}。

目的の翻訳後修飾が与える影響を正確に調べるにあたって、その修飾のみを有するヒストンを人工的に作製する技術が不可欠となる。そこで、導入する分子の種類や位置に制限の少ない化学的な全合成が近年注目されている。2011 年に H3 の化学合成が報告されたことを皮切りに、H2B, H3, H4 の合成が報告されてきた^[3]。人工的に作製されたヒストンを用いることで、質量分析実験や試験管内での生化学アッセイを通して分子レベルでのメカニズムを理解することが可能となる。これまでに翻訳後修飾が多数発見されている H3 ならびに H4 の研究が数多く進められてきたが、一方で H2A はこれまで化学合成が報告されていない。H2A, H2B の翻訳後修飾は H3, H4 と比較して数が少なく、ヌクレオソーム研究における主要な位置を占めてこなかったことが理由として挙げられる。

H2A は H2B と二量体を形成し、それを基本単位として細胞質から核への輸送、ヌクレオソーム形成や解離に関わっている^[4]。H2A-H2B 二量体はヌクレオソーム構造の外側に位置し、解離によって DNA が露出することが複製・転写などの現象に重要であることが明らかになってきた。H2A ならびに H2B が翻訳後修飾によってどのように働きを変えるのかを調べることは、ゲノムワイド解析が進展する中でより重要になっていくと考えられる。

本博士論文では、H2A, H2B 研究の新たなアプローチとして、タンパク質化学合成法を基盤とした研究について述べる。H2A ならびに H2B の合成手法を確立することで、特定の翻訳後修飾が有する機能を調べる事が可能となり、加えて H2A-H2B 二量体に関する統合的な研究が可能になるであろうと考えた (Figure 1)。以下の章で化学合成法ならびに合成したヒストンを用いた応用について記述する。

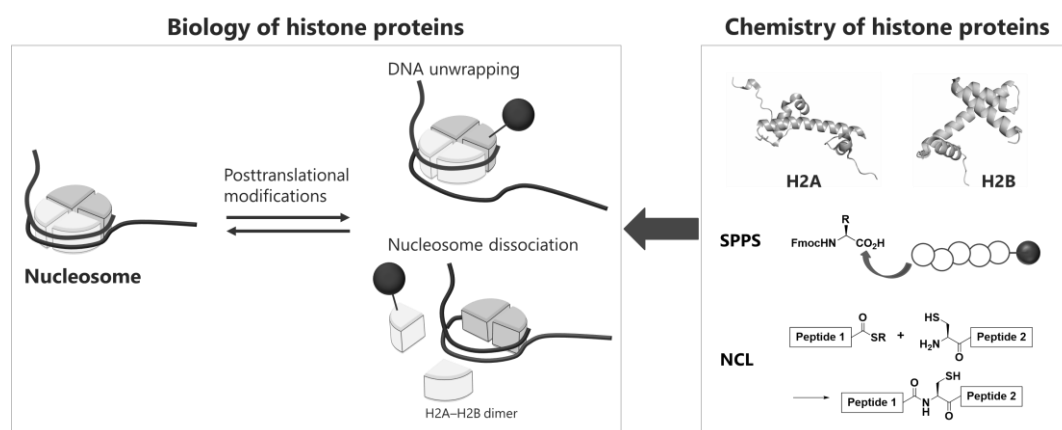
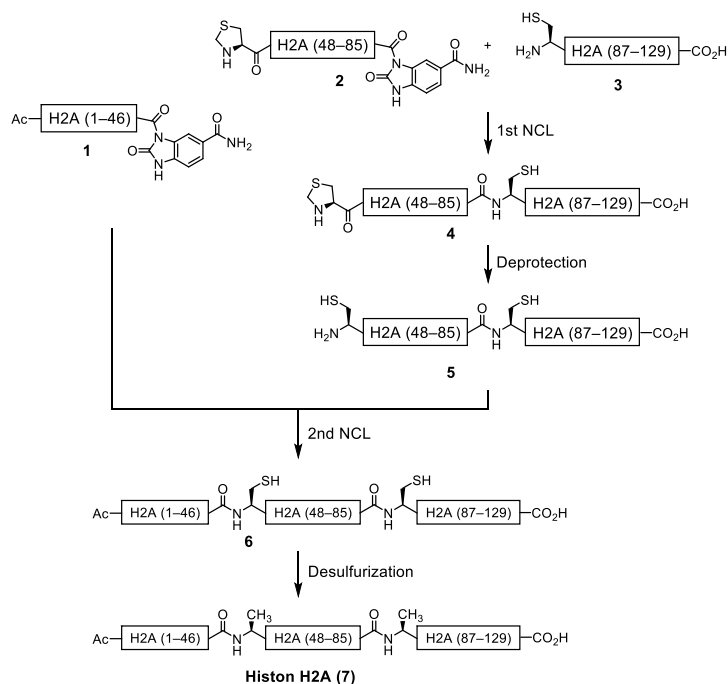


Figure 1. The approach in this thesis for the epigenetic research of histone proteins.

2. ヒストン H2A の化学合成と *in vitro* アッセイ、生細胞イメージングへの応用

H2A は 129 アミノ酸から成るタンパク質である。全長を化学合成するにあたって、ペプチド固相合成法 (SPPS) と native chemical ligation (NCL) 法を組み合わせる手法を採用した。NCL はシステインとチオエステル間でのアミド結合形成反応であり、ペプチドフラグメントを縮合し長鎖タンパク質の合成が可能となる。また、NCL 後にはシステイン残基が残存するが、H2A はシステインを持たないタンパク質であるため、脱硫反応によりシステインをアラニンへと変換することとした。合成ルートを検討した結果、全長を 3 分割し、各フラグメントを固相合成法にて合成したのちに、2 段階の NCL と脱硫反応を経



Scheme 1. Synthetic route of histone H2A.

て H2A を合成するスキームを考案した (Scheme 1)。フラグメント 1・2 のチオエステル生成については、*N*-acylbenzimidazolinone (Nbz) を活性官能基として利用した^[5]。続いて NCL 法によって各断片を C 末端側から連結した。フラグメント 2 の N 末端システインは自己重合を防ぐために保護基を導入し、1 段階目の NCL 後に one-pot で脱保護を行った。2 段階目の NCL ののち、システイン残基の脱硫反応を経て全長の H2A を世界に先駆けて化学的に合成することができた。反応の進行は HPLC と質量分析により確認した。

合成した H2A を、試験管内アッセイへと応用した。合成した H2A を用いて H2A-H2B 二量体、ヒストン 8 量体を再構成した結果、大腸菌発現により得られた H2A を用いた場合と同様に再構成可能であることが分かった。さらに、精製したヒストン 8 量体溶液に 145 bp から成る 601DNA を加えて透析することでヌクレオソームを再構成した。化学合成 H2A・大腸菌由来 H2A とともに同様にヌクレオソームを形成したことから、化学合成 H2A が試験管内での生化学アッセイに応用可能であることが明らかになった。

続いて化学合成ヒストンを生細胞イメージングに適用することを考え、蛍光色素であるフルオレセインを N 末端に結合した H2A を化学合成した。これをトランスフェクションによって HeLa 細胞に導入する方法を検討した。培地にフルオレセイン結合 H2A を混ぜインキュベートすると、H2A はエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれるものの、脱エンドソームには至らないと推測される結果が得られた。一方で、ビーズローディング法と呼ばれる手法を適用することで、一定量の H2A が核内へと移行することが確かめられた。

最後に、化学合成の利点を生かすために、遺伝子工学的手法では作製の難しい、複数種類の修

飾を有する H2A の合成と応用に取り組んだ。これまでに発見されている H2A の修飾の中から、Ser1 リン酸化、Lys75 ジメチル化、Lys119 アセチル化を選択し、3 種類の修飾を含む H2A を合成した。化学合成の有用性をデモンストレーションしたのちに、これらの修飾がヌクレオソーム構造に影響を与えるか確かめるため、ヌクレオソームの安定性を評価することとした。大腸菌発現 H2A、化学合成 H2A、修飾を含む化学合成 H2A の 3 種を用いてそれぞれヌクレオソームを再構成した。サーマルシフトアッセイによりヌクレオソームが崩壊する温度を測定したところ、どの H2A を用いても 65 °C 前後で変性が始まることが分かった。結晶構造との比較も加味し、導入した修飾はヌクレオソーム構造に影響を与えないと結論付けた。

本章では第一に、ヒストン H2A の化学合成を初めて報告した。また、合成された H2A が種々の試験管内アッセイに適用可能であること、生細胞内に導入可能であることを示した。以上の実験により、H2A を合成し、それを応用するまでの系を確立したと言える。

3. H2A チロシン 57 番目のリン酸化が H2A-H2B 二量体に与える影響の評価

ヒストン H2A の Tyr57 になされるリン酸化 (Y57ph) は、2014 年に初めて報告され、転写の伸長に関わることが示唆された^[6]。考えられているメカニズムの 1 つとして、Y57ph が H2B の脱ユビキチン化酵素を阻害し H2BK120 のユビキチン量を増大することで、ヒストンシャペロンである FACT による H2A-H2B 二量体の除去とそれに伴う RNA Polymerase II の伸長を促進することが挙げられる。一方で、結晶構造を確認すると、リン酸化が入るチロシン残基は H2B の C 末端側の α ヘリックスに隣接し、H2A-H2B 間の hand-shake motif の形成に重要なのではないかと考えられる。この修飾はヒストン-ヒストン相互作用に影響を与えると予想されるが、中でも H2A-H2B 相互作用を不安定化させる修飾は我々の知る限りでは報告されておらず、Y57ph の与える影響を明らかにすることは生物学的に重要な意義があるのではないかと考えた。

この修飾を調べるにあたって実際に Y57ph を持つ H2A を作製する必要があるが、リン酸化修飾であることと Y57 がヒストン H2A の fold domain に位置していることから、前章で述べた化学合成法が適切であると判断した。フラグメント 2 の合成時にリン酸化チロシンを導入し、前章と同様の合成ルートで Y57ph 含有 H2A を合成した。リン酸化チロシンは SPPS, NCL, 脱硫反応条件下で目立った副反応を起こすことはなく、質量分析により目的の生成物が確認された。

得られた Y57ph-H2A を用いて H2A-H2B 二量体の再構成を行った。サイズ排除クロマトグラフィーの結果から、Y57ph は高塩濃度下において二量体形成を阻害しないことが確認された。H2A-H2B 相互作用が Y57ph によって変化するかどうかを DSF 測定 (differential scanning fluorimetry, 蛍光色素である SYPRO Orange を用いた

サーマルシフトアッセイ) で確認した。塩濃度が 2 M の条件では、無修飾の二量体での T_m が 70 °C であったのに対して、Y57ph を有する二量体では 63 °C であった。塩濃度が 1 M, 250 mM

Table 1. T_m values (°C) of the H2A-H2B dimers

	2 M NaCl	1 M NaCl	0.25 M NaCl
H2A(recombinant)-H2B	70	62	50
H2A(synthetic)-H2B	71	62	51
H2A(Y57ph)-H2B	63	54	(37)*

*The fluorescence curve contains a high background at 15 °C.

の条件においても Y57ph の存在によって T_m が約 10 °C 下がる結果となった (Table 1)。このことから、Y57 のリン酸化によって H2A–H2B 相互作用が弱まることが明らかになった。また、塩濃度を変えることによって T_m 値が変化する傾向は、先行研究での H2A–H2B 二量体に対する DSC (differential scanning calorimetry) 測定の結果とおおむね一致することから、本実験手法がヒストン複合体の評価に有用であることが確認された。

続いて、Y57ph によって相互作用が弱められた H2A–H2B 二量体がヌクレオソームレベルでどのような安定性を示すのかを調べた。Y57ph-H2A を用いてヌクレオソームを再構成し、DSF による安定性評価を行って無修飾のヌクレオソームと比較した。無修飾のヌクレオソームでは 65° C 付近で複合体からヒストンが解離し蛍光量の増大が確認されたのに対し、Y57ph を有するヌクレオソームは 60 °C 前後から蛍光量が増大することが分かった。また、H3, H4 の変性温度は変化しておらず、Y57ph は H2A, H2B のみをヌクレオソームから解離しやすくすることが示された。

Y57ph の有無によるヒストン–ヒストン相互作用を明らかにしたので、ヒストン–DNA 相互作用の変化を確かめた。実験系として *micrococcal nuclease* (MNase) を用いた DNA 分解を検討した。MNase はヌクレオソーム DNA を残してリンカー DNA のみを分解するため、残存した DNA 長を比較することで Y57ph が DNA の巻き付きに影響しているかを評価することができる。リンカー部分を持つ 193 bp の 601DNA を用いて Y57ph 有り・無しそれぞれのヌクレオソームを再構成し、MNase を作用させたのちに *proteinase K* を加えてヒストンを分解し、残存した DNA 長を電気泳動にて観察した。結果、DNA 長は Y57ph によって変化しないことが明らかになり、ヒストン–DNA 相互作用には影響を及ぼさないと結論付けた。

本章では H2A の中でも生物学的に重要な修飾であると考えられる Y57 リン酸化に着目し、これが H2A–H2B 相互作用を不安定化することを見出した。また、ヌクレオソームからの H2A–H2B 二量体の解離を促進することも示された (Figure 2)。細胞内における H2A–H2B 間の二量体形成と解離については多くが未知の状態であり、本研究は翻訳後修飾がこうした状態変化に関わりうる最初の報告となった。

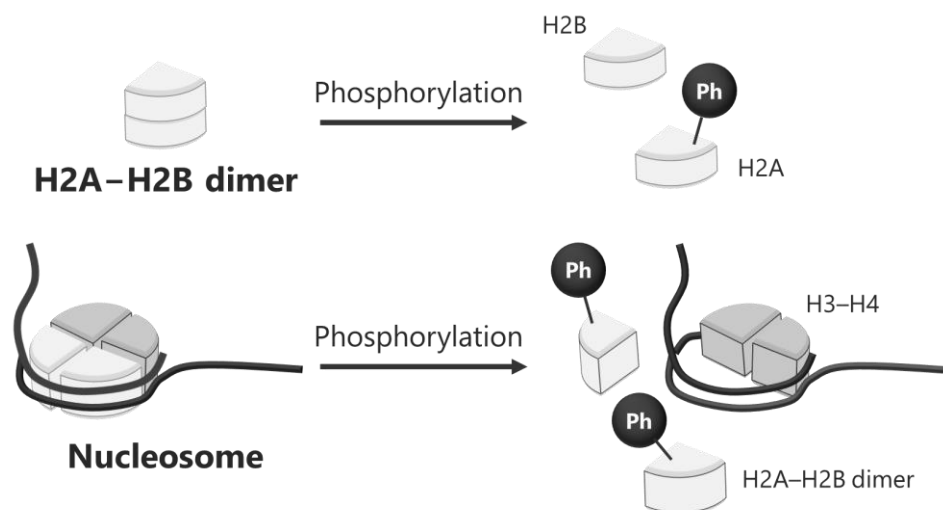


Figure 2. Destabilization of H2A–H2B dimer and nucleosome structure by Y57ph in H2A.

4. 分子内 FRET による二量体形成の検出を指向した H2B の化学合成

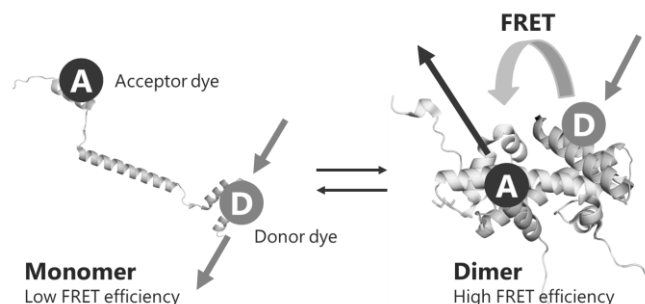


Figure 3. Schematic illustration of detection of the H2A-H2B dimerization via FRET mechanism.

ヒストン H2A と H2B は細胞内で二量体を形成し、それを基本単位としている。H2A と H2B は細胞質で翻訳されたのちに二量体を形成し、ヒストンシャペロンによって核内へ輸送される。この輸送は基本的に複製依存的に行われ、DNA 上に集積してヌクレオソーム形成がなされる。一方で、H2A と H2B との間にどのような平衡状態が存在するのかは明らかになっていない。これは、単量体・二量体の状態を可視化する

手法がなかったことが理由として挙げられる。

本章では、タンパク質の化学合成法を適用することで、ヒストンの分子内にタグを導入し、二量体の形成を検出することを考案した (Figure 3)。タンパク質の構造変化を捉える際に、2 種類の蛍光色素間のエネルギー移動である FRET (Förster resonance energy transfer) を利用し、蛍光スペクトルの変化から色素間の距離の変化を見積もる手法がしばしば用いられる。一次配列上では距離が離れており、二量体形成時に距離が近づく 2 つのアミノ酸残基に色素を導入することで、二量体形成時に分子内 FRET が生じる系の確立を目指すこととした。

ターゲットとして、バリエーションを多数持つ H2A のペアとなる H2B を選択した。全長を 4 フラグメントに分割し、ヒドラジド⁷⁾と Nbz 基を NCL に利用するルートを採用した。結晶構造から、色素を導入する 2 つのアミノ酸残基を選択し、これらの部位に直交的な官能基を導入した。固相合成、NCL、色素のラベリングを通して合成を行った。

続いて、得られた H2B を用いて H2A-H2B 二量体を再構成し、エネルギー移動が起きるか検証を行った。蛍光スペクトルを測定した結果、ドナー側の励起に対してアクセプター側の蛍光が強く観察され、FRET が起きていることが明らかになった。H2B のみの場合や、H2B が他のヒストンと共存している状態では強い FRET が観察されなかったことから、ここで確立した系は H2A-H2B の二量体形成を特異的に検出可能であることが示された。

5. 結言

本研究では、エピジェネティクス研究の推進を目的としてヒストン H2A ならびに H2B に着目し、固相合成法と NCL を組み合わせた化学合成を行った。H2A の全合成を初めて報告し、これが *in vitro*, *in cell* へ応用可能であることを示した。また、タンパク質化学合成法によりこれまで作製が難しかったリン酸化などの修飾を持つヒストンの合成が可能となったことで、H2A-H2B 二量体の安定性を変化させる修飾を見出した。本研究で示したボトムアップ的なアプローチは、ヒストンの生物学的研究における新しい基盤となり、今後さらなる応用へと展開することが可能であると期待される。

6. 参考文献

- [1] McGinty, R. K.; Tan, S. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2255.
- [2] Tan, M.; Luo, H.; Lee, S.; Jin, F.; Yang, J. S.; Montellier, E.; Buchou, T.; Cheng, Z.; Rousseaux, S.; Rajagopal, N.; Lu, Z.; Ye, Z.; Zhu, Q.; Wysocka, J.; Ye, Y.; Khochbin, S.; Ren, B.; Zhao, Y. *Cell* **2011**, *146*, 1016.
- [3] Maity, S. K.; Muhammad, J.; Brik, A. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 252–259.
- [4] Hammond, C. M.; Strømme, C. B.; Huang, H.; Patel, D. J.; Groth, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 141.
- [5] Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6851.
- [6] Basnet, H.; Su, X. B.; Tan, Y.; Meisenhelder, J.; Merkurjev, D.; Ohgi, K. A.; Hunter, T.; Pillus, L.; Rosenfeld, M. G. *Nature* **2014**, *516*, 267.
- [7] Fang, G.M.; Li, Y. M.; Shen, F.; Huang, Y. C.; Li, J. B.; Lin, Y.; Cui, H. K.; Liu, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7645.
- [8] Hayashi, G.; Kamo, N.; Okamoto, A. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 5918.

7. 発表論文

Publication related to the thesis

- (1) Hayashi, G.; **Sueoka, T.**; Okamoto, A. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4999–5002.
- (2) **Sueoka, T.**; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Biochemistry* **2017**, *56*, 4767–4772.
- (3) In preparation.

Publication not related to the thesis

- (4) Okamoto, A.; Sugizaki, K.; Yuki, M.; Yanagisawa, H.; Ikeda, S.; **Sueoka, T.**; Hayashi, G.; Wang, D. O. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 362–371.