

論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏 名 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、この動的变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。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。

4 種のヒストンの中でも H2A は H2B と二量体を形成し、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。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。

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に着目した。

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と期待される。

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、ペプチド断片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。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 と脱硫反応を経て H2A を合成するスキームを考案した。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。続いて NCL 法によって各断片を C 末端側から連結した。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。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。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応用可能であること、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。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、このチロシン残基は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、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。

得られたY57ph-H2Aを用いてH2A-H2B二量体の再構成を行った。そののちに、H2A-H2B相互作用がY57phによって変化するかどうかを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。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二量体に対する安定性測定の結果とおおむね一致することから、本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、同様の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。

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。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。

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

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手法が述べられている。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、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。