

研究報告書

『エピヌクレオソーム』の精密な再構成による遺伝子発現制御解析

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 梅原 崇史

1. 研究のねらい

ヒトをはじめとする真核生物の遺伝情報は、クロマチン構造で凝縮したゲノム DNA を鋳型として発現する。そのため、個体の発生・分化や環境変化に応じてゲノム DNA から遺伝子が適切に発現する過程において、個々の遺伝子の DNA 領域がそれぞれ異なるクロマチン凝縮状態におかれ、その変化を通じて遺伝子発現が制御される。このクロマチンの凝縮状態は、最も微視的には凝縮の最小単位であるヌクレオソームコア粒子の化学修飾状態の相違として検出・制御される。すなわち、ヌクレオソームを構成するコアヒストンの個々のサブユニット・残基における翻訳後修飾(アセチル化、メチル化等)およびヌクレオソーム DNA 上の CpG シトシンの修飾(メチル化、ヒドロキシメチル化等)の有無によってクロマチンの凝縮構造が変化し、その結果として遺伝情報発現の出力が規定される。クロマチン凝縮を制御する分子機構は、断片的な修飾ペプチドをヌクレオソーム中のヒストンテイル領域に見立てた構造生物学・生化学などで研究されているものの、純化した再構成ヌクレオソーム系において個々のエピジェネティック情報が果たす役割の定量的な解析はほとんど進んでいなかった。その理由は、エピジェネティック情報を精密に導入したヌクレオソーム(エピヌクレオソーム)を正確・均一・高純度・大量に再構成することが技術的に困難なことによる。

本研究は、このような「エピヌクレオソーム」の試験管内再構成技術を通して、生体内の修飾状態を反映した真正なエピジェネティック情報を含むヒトヌクレオソームの高次凝縮構造を試験管内で精密に再構成し、個々のエピジェネティック情報がクロマチンの高次凝縮構造の制御に果たす役割を定量的な検出を通して理解することを目指した。この目的のため、本研究では(A)「エピヌクレオソーム」の調製技術の開発、(B)「エピヌクレオソーム」の物性の理解、(C)「エピヌクレオソーム」の反応の理解、の3項目を解析課題に設定した。これらの解析により、ヌクレオソームコア粒子以上の階層性において、ヒトのクロマチン凝縮構造がエピジェネティックな化学修飾を通じて制御される分子機構の一端を定量的に理解するとともに、それらの「エピヌクレオソーム」の物性変化が遺伝子発現制御に至る分子機構を定量的に解析するための研究基盤を確立することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、ヒトをはじめとする真核生物のエピジェネティック情報がクロマチンの凝縮や遺伝子発現の制御に与える影響を定量的に理解するため、「エピヌクレオソーム」に関する(A)調製技術の開発、(B)物性の理解、(C)反応の理解、の3種類の観点から研究を行った。本研究の主要な成果として、遺伝子発現の活性化に関わるヒストン H4 テイルの 4 カ所のリジン

をアセチル化したヌクレオソームコア粒子の再構成とその構造・機能解析を通して、H4 テイルのアセチル化がコア粒子の構造には全く影響を与えずに、ヌクレオソームのビーズ同士のヒストンテイル・DNA 間の相互作用を特異的に弱めることを原子分解能で初めて明らかにした(論文1)。このクロマチンの物性に基づいて、真核生物の細胞核内におけるクロマチン繊維の自己凝縮・自己脱凝縮の制御分子機構モデルが提唱された。また、このヒストンの特定残基にアセチルリジンを精密に導入する蛋白質の合成技術は、クロマチンの特定状態を特異的に認識するモノクローナル抗体の評価(論文2)や作製(特許出願1)にも応用可能であることを示した。蛋白質の合成技術については、ヒストン以外のエピジェネティクス制御蛋白質(論文3)やRNA 転写酵素群(論文4)にも適用することで、技術上の有用性を示した。また、ヒストンの翻訳後修飾を標的としたエピジェネティクスの制御については、ヒストンのリジン残基のアセチル化修飾だけでなく、そのメチル化修飾による制御も重要である。本研究では、「エピヌクレオソーム」の調製技術開発の一環として、蛋白質の任意の複数残基にモノメチルリジンを残基特異的に導入する技術を開発した(論文5)。この技術は今後、様々なエピジェネティック情報を組み合わせた「エピヌクレオソーム」の再構成研究に展開できると期待される。さらに「エピヌクレオソーム」の反応の理解については、クロマチン DNA からの遺伝子発現を経時的かつ定量的に測定する技術基盤の確立がこれまで必要だった。本研究では、「エピヌクレオソーム」を転写反応の鋳型として、蛍光相関法により遺伝子発現産物の量を経時的に検出する新しいクロマチン転写解析系を確立した。

(2) 詳細

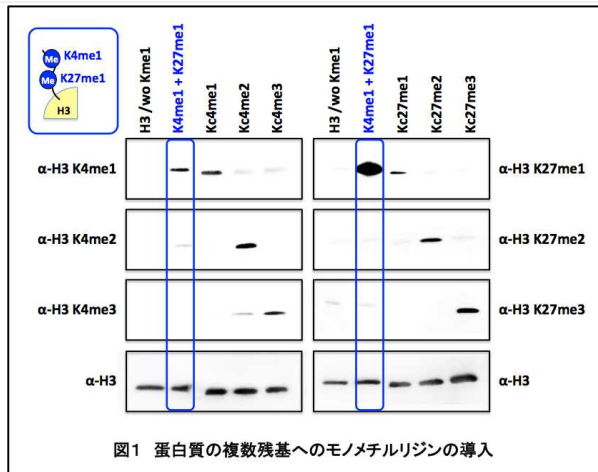
研究テーマA「エピヌクレオソームの精密な再構成技術の開発(調製技術の開発)」

真核細胞の核内においてゲノム DNA はヒストン八量体と 145-147 塩基対の DNA から構成されるヌクレオソームを基本単位とするクロマチン構造を形成している。このヌクレオソーム中のヒストンの N 末端テイル領域は外部から様々な翻訳後修飾を受け、クロマチンの凝縮に影響を与えることが知られている。そこで本研究では、このようなエピジェネティックな翻訳後修飾を残基特異的に導入したヒストンの合成技術を開発することにより、「エピヌクレオソーム」を利用したクロマチンの構造・機能研究に資することを目的とした。

(A-1) 蛋白質への残基特異的なモノメチルリジンの導入技術の開発

これまでの蛋白質工学の技術開発において、蛋白質の特定の複数の残基にアセチルリジンを特異的に導入する技術は開発できていたが、複数の残基にモノメチルリジンを導入する蛋白質合成は達成できていなかった。そこで本研究では、ヒストン H3 を標的としてエピジェネティックな制御を受ける Lys4 および Lys27 にモノメチルリジン(Kme1)を導入する技術を開発した。最初に全長ヒストン H3 をコードする遺伝子の Lys4 および Lys27 をアンバーコドンに置換した cDNA を鋳型として、この2残基に Boc-モノメチルリジンを導入する蛋白質合成を検討した。この際、転写翻訳反応は大腸菌の無細胞抽出液を用いた透析膜反応系で行った。各種条件検討の結果、翻訳終結因子 RF1 を欠失した大腸菌株由来の S30 抽出液を用いた系において Boc-モノメチルリジンを残基特異的に導入した全長ヒストン H3 蛋白質を最も効率よく合成することができた。この方法で H3 蛋白質の大量合成後に TFA 溶液で脱 Boc 反応を行い、目

的とする Lys4 と Lys27 の位置に残基特異的にモノメチルリジン(Kme1)が導入したヒストン H3 を合成したことを質量分析およびウェスタンブロット法により確認した(図1)。これらの解析により、ヒストン H3 等の蛋白質の複数残基にモノメチルリジンを残基特異的に導入する技術を確認した(論文5)。この技術開発を達成できたことから、研究テーマAはおおむね計画目標を達成した。



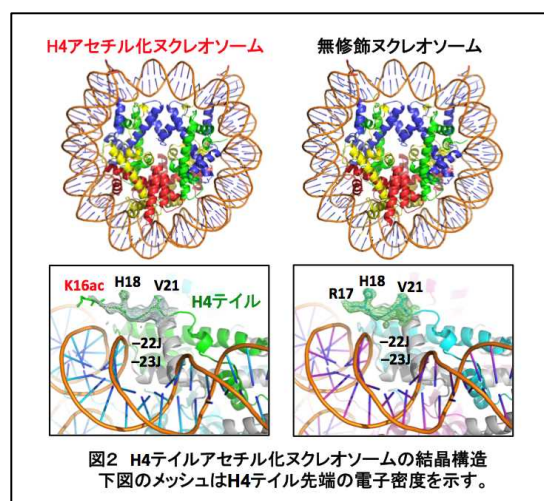
(A-2) アセチル化ヒストン蛋白質を利用したエピゲノム検出分子の開発

ヒストンH4 テイルの Lys5 および Lys8 の両リジンをアセチル化した H4 蛋白質を抗原として、両修飾リジンの存在を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を開発した(特許出願1)。この抗体の認識特異性は、修飾ヒストンおよび修飾ヒストンテイルペプチドに対する結合特異性のみでなく、抗体 Fab 断片の結晶構造解析においても検証した。この抗体を用いて ChIP-seq 解析(クロマチン免疫沈降・塩基配列決定)を行うことにより、がん細胞における活性エピゲノムの局在を特定化した。これらの結果から、「エピヌクレオソーム」の調製技術はエピゲノムモデルの再構成のみでなく、ChIP-seq グレードのモノクローナル抗体の開発にも寄与することを見出した。なお、蛋白質への修飾リジン導入技術については、特定の修飾パターンを認識するモノクローナル抗体群の評価にも有用であることを見出した(論文2)。このような抗体の評価や新規抗体の開発は当初計画から派生した研究成果であり、研究テーマAは予想外に進展した。

研究テーマB「エピヌクレオソームを利用したクロマチン物性の理解(物性の理解)」

[研究テーマA]で技術開発した生化学合成・再構成が可能な「エピヌクレオソーム」のうち、ヒストン H4 の N 末端 テイルの4箇所のリジン(Lys5/Lys8/Lys12/Lys16)をアセチル化したヌクレオソームコア粒子を再構成してその物性を解析した。解析手法は、1) X 線結晶構造解析、2) 生化学的な自己凝縮アッセイ、3) 生化学的な結合アッセイの3種類を用いた。

X 線結晶構造解析については、上記の H4-Lys5/Lys8/Lys12/Lys16 アセチル化ヌクレオソームと無修飾ヌクレオソームをそれぞれ3結晶ずつ解析を行い、それぞれ 2.4 Å および 2.2 Å 分解能で立体構造を決定した(図2)。この構造を比較した結果、H4 のテイルアセチル化はヌクレオソーム形成に影響を与えず、ヌクレオソームの再構成に用いた 147 塩基対



DNA の全長の電子密度が検出できた。またヒストン八量体の構造についても、そのテイル領域を含めて、無修飾ヌクレオソームと基本的に同様であることが判明した(図2)。このことから、ヒストン H4 のテイルアセチル化はヌクレオソームの形成・維持に関して構造的には影響を与えないことが示唆された。また、後成的な翻訳後修飾を予め導入する本法による再構成ヌクレオソームが、細胞核内における後成的修飾ヌクレオソームの状態を反映していることが示唆された(論文1)。

次に、解析した N=3 の結晶構造群について、原子レベルでの安定性を比較することを目的として、ヌクレオソーム DNA の各塩基、およびヒストンの各残基における温度因子を比較した。その結果、ヒストンについては、ヌクレオソーム同士のヒストンテイル・ヒストン酸性パッチ間の結合領域を含めて有意な影響を受けた残基がN末端およびC末端の一部の残基を除いて存在しないことがわかった。その一方、ヌクレオソーム DNA については、自己の H4 のヒストンテイルに近接する領域(superhelical location; SHL -1.5)および隣接するヌクレオソームの H4 テイルに近接する領域(SHL +5.5)において、H4- Lys5/Lys8/Lys12/Lys16 アセチル化ヌクレオソームで有意に高い温度因子が観測された(図3)。また、生化学的な自己凝縮アッセイから、H4 テイルのアセチル化の数に依存して自己凝縮が妨げられることを見出した。さらに、アセチルリジン結合蛋白質の1種である TAF1 プロモドメインとの結合解析から、TAF1 プロモドメインはアセチル化に依存しない基礎的なヌクレオソーム結合能を持つことを見出した。これらの成果から、クロマチン繊維が束形成・解離する過程において、ヒストン H4 テイルのアセチル化はヌクレオソームコア粒子のビーズ構造に全く影響を与えないこと、ヒストンテイル・DNA 間の相互作用を特異的に弱めること、アセチル化認識蛋白質の TAF1 プロモドメインが、無修飾のヌクレオソームコア粒子に結合してアセチル化修飾の認識前に前段階の相互作用を形成しうることを見出した。このことにより、アセチル化「エピヌクレオソーム」およびそのクロマチン繊維が自己凝縮・自己脱凝縮する制御分子モデルの一端を提唱することができた(論文1)。この結果、研究テーマBは計画目標を完全に達成した。

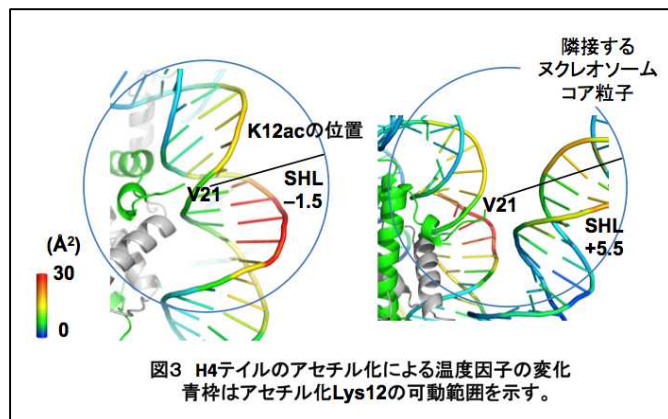


図3 H4テイルのアセチル化による温度因子の変化
青枠はアセチル化Lys12の可動範囲を示す。

研究テーマC「エピヌクレオソームを利用した遺伝子発現制御機構の理解（反応の理解）」

ヒストンのアセチル化やメチル化等の翻訳後修飾は、クロマチンからの遺伝子発現の活性化・不活性化を規定するが、従来の転写解析では細胞由来の修飾混合ヒストンが用いられるなど、クロマチンの個々のアセチル化修飾やその組合せの意義を定量的に解析することが困難だった。そこで本テーマでは、残基特異的にアセチル化を導入したヒストン H4 を含むヒストン八量体と、5S 遺伝子カセットを含む DNA を用いることで、精密なりジンアセチル化を含む di-nucleosome を試験管内再構成した。さらに転写産物の経時的な定量検出を目的として、蛍光相関法による転写産物の検出技術開発を進めた(岡部弘基博士との共同研究)。

蛍光プローブがハイブリダイズできる人工配列を 5S 遺伝子の塩基配列中に挿入することにより、再構成「エピヌクレオソーム」からのクロマチン転写産物量を蛍光相関法によってリアルタイム検出する系を確立した。本テーマについては現在も進行中であるが、研究計画に沿った研究成果が得られる見通しが立った。

3. 今後の展開

本研究成果のうち、[研究テーマA]については、開発した「エピヌクレオソーム」の調製・再構成技術を用いてエピジェネティクス制御蛋白質の機能評価や新規のエピゲノム検出分子の開発への展開が期待される。また、エピジェネティクスの組合せ修飾を持つ「エピヌクレオソーム」の調製技術開発など、エピゲノムを精密に再構成する技術基盤の確立が期待される。[研究テーマB]については、今回明らかにしたアセチル化ヌクレオソーム構造の実データを用いた分子動力学計算との連携や、クロマチンの 30nm ファイバー様構造などの上位階層のクロマチン繊維を創る研究への展開等が期待できる。[研究テーマC]は現在も技術開発中のテーマであるが、本さがけ領域内の研究者やデバイス開発グループとの連携を通して、ヒトのエピゲノムを鋳型とする反応の定量的な理解を目指した中・長期的な新分野の確立が期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

・研究目的の達成状況

本研究で設定した3テーマのうち、[研究テーマA]の「調製技術開発」については、おおむね計画目標を達成できた。本テーマでは、ヒストン H3 等の蛋白質の任意の複数残基にモノメチルリジンを導入する技術を開発して、さがけ研究期間内に論文発表した。本テーマで当初計画の予想外に進展した成果としては、合成した蛋白質を抗原としてヒストン H4 の Lys5 と Lys8 の両アセチル化を特異的に認識するモノクローナル抗体を開発・出願した点が挙げられる。この抗体を利用することにより、疾患細胞のエピゲノムの新たな局面の解析に展開することができた。[研究テーマB]の「物性の理解」については、当初予想していなかった研究成果が得られたが、計画目標としてはこれを完全に達成した。本テーマでは、ヒストンのアセチル化でクロマチンがどのように脱凝縮するのか？の疑問について結晶構造解析と生化学解析を組み合わせることで明確な結論が得られ、この成果をさがけ研究期間内に論文発表した。[研究テーマC]の「反応の理解」については、ほぼ計画した研究成果が得られる見通しが立った。特に本さがけ領域内での共同研究を通して、蛍光相関分光法で試験管内における遺伝子発現反応をリアルタイム測定する新規技術の開発につながった点に意義があると考えられる。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究実施体制としては、さがけ研究者と1-2名の研究補助者および大学院学生1名の体制で行った。研究開始から終了までこの体制に変更はなく、研究補助者も適宜補充できて遅滞なく研究を行えたことから、ほぼ計画通り実施できた。研究費の執行については、大型機器の購入計画・実施はなく、主に研究の遂行に必要な消耗品費と研究補助者の謝金に計画通り充てることができた。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

近年、エピゲノムの個々の修飾異常はがんや生活習慣病をはじめとする様々な疾患と関連

することが示唆されている。本研究のうち、精密な「エピヌクレオソーム」の調製技術(研究テーマA)はエピゲノムの生化学的な解析基盤を提供する点でライフサイエンスの応用分野への波及効果が期待される。本研究でも特許出願を1件実現しているが、当該技術はエピゲノムの「再現」だけでなく、その「検出」にも有用性が期待されており、開発した抗体はエピゲノム関連疾患の原因の究明やその診断等に利用されることが期待される。このような「エピヌクレオソーム」の再構成研究は世界的に見ても研究例が少なく、エピゲノム制御蛋白質の評価や創薬のための基盤技術としても社会的に波及効果があると期待される。一方、本研究のうち、「エピヌクレオソーム」の物性と反応の理解については、ヒトのクロマチンや染色体の制御機構の再構成を通して理解するための基礎的な研究である。これらの研究は、主として基礎生物学上の発見を通して国民の知の向上に資することが期待される。

(2) 研究総括評価

ヒストンH3などのタンパク質に任意の複数残基にモノメチルリジンを導入する技術を開発し、その技術を用いて、合成したタンパク質を抗原として、ヒストンH4のLys5とLys8の両アセチル化を特異的に認識するモノクローナル抗体を開発した。また、転写活性化に関わるヒストンH4テイルの4個所のリジンをアセチル化したヌクレオソームコア粒子の構造・機能を解明したことにより、アセチル化「エピヌクレオソーム」およびそのクロマチン繊維が自己凝縮・自己脱凝縮する制御分子モデルを提唱している。このようにこの分野に化学合成の技術を取り入れ、独創的なエピヌクレオソームの構造解析研究を進展させていることを高く評価したい。タンパク質の任意の残基にトリメチルリジンを導入する技術開発では、後藤佑樹研究者と、また、真核遺伝子発現のリアルタイム解析系では、岡部弘基研究者との共同研究を積極的に行い、領域内を活性化させた功績も大きい。

以上の成果である抗アセチル化ヒストンH4抗体を特許出願して、その応用を企業と進めているとのこと、評価します。

今後は生命科学として重要性の高いエビジェネティックな生物現象を、生命科学の研究者と連携して、解明していただきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. *Wakamori, M., *Fujii, Y., Suka, N., Shirouzu, M., Sakamoto, K., #Umehara, T., #Yokoyama, S. Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation. **Scientific Reports** 5: 17204. doi: 10.1038/srep17204, 2015.
2. Hayashi-Takanaka, Y., Maehara, K., Harada, A., Umehara, T., Yokoyama, S., Ohkawa, Y., Obuse, C., Nozaki, N., Kimura, H. Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. **Chromosome Res.** 23 (4): 753-766, 2015.
3. Nagaoka, K., Hino, S., Sakamoto, A., Anan, K., Takase, R., Umehara, T., Yokoyama, S., Sasaki, Y., Nakao, M. Lysine-specific demethylase LSD2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic cells. **Mol. Cell. Biol.** 35 (7): 1068-1080, 2015.

4. Higo, T., Suka, N., Ehara, H., Wakamori, M., Sato, S., Maeda, H., Sekine, S.I., Umehara, T., Yokoyama, S. Development of a hexahistidine-3 × FLAG-tandem affinity purification method for endogenous protein complexes in *Pichia pastoris*. **J. Struct. Funct. Genomics** 15 (4): 191-199, 2014.
5. *Yanagisawa, T., *Takahashi, M., Mukai, T., Sato, S., Wakamori, M., Shirouzu, M., Sakamoto, K., #Umehara, T., #Yokoyama, S. Multiple site-specific installations of N^ε-monomethyl-L-lysine into histone proteins by cell-based and cell-free protein synthesis. **Chembiochem** 15 (12): 1830-1838, 2014.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発明者: 梅原崇史, 若森昌聡, 蓑田亜希子, 坂本健作, 松田貴意, 横山茂之

発明の名称: 抗アセチル化ヒストン H4 抗体

出願人: 科学技術振興機構

出願日: 2015年8月28日(非公開希望)

出願番号: 特願 2015-169223

(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)

主要な学会発表:

1. Umehara, T. et al. Structure-based development of epigenetics-regulating inhibitors and 'Epi-nucleosomes'. 7th International Conference on Structural Genomics. Sapporo, Japan. July 31, 2013.
2. Umehara, T. et al. Synthesis of histone proteins containing multiple and site-specific monomethyl-lysines. FASEB Science Research Conference on Biological Methylation: Regulation of Chromatin, Epigenetics, and Disease. Nassau, Bahamas. July 07, 2014.
3. Umehara, T. et al. Functional and structural analyses of H4-acetylated nucleosome core particles. 11th EMBL Conference of Transcription and Chromatin. Heidelberg, Germany. August 24, 2014.
4. Umehara, T. et al. Effect on nucleosomal structure by lysine acetylation of the histone H4 tails. 40th Naito Conference on Epigenetics - From Histone Code to Therapeutic Strategy. Sapporo, Japan. September 16, 2015.
5. Umehara, T. Structure-based development of inhibitors for epigenetic targets. Cambridge Workshop Series: Epigenetics in Drug Discovery. Cambridge, UK. January 26, 2016.

受賞:

平成 26 年度 理化学研究所 横浜事業所 所長賞