

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K13099

研究課題名（和文）ヒストン脱アセチル化/脱メチル化蛍光プローブによるスクリーニング及びイメージング

研究課題名（英文）Fluorescence screening and imaging by chemical probes for detecting histone deacetylases/demethylases activity

研究代表者

菊地 和也（KIKUCHI, Kazuya）

大阪大学・工学研究科 ・教授

研究者番号：70292951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではヒストンの化学修飾に関与するリジンデメチラーゼ（KDM）活性を検出する蛍光プローブの開発を目的とした。この蛍光プローブはKDMによって脱メチル化が起こると求核性を有するリジンが生成し、分子内エステル転移反応を引き起こすことで蛍光性を持ったクマリンが生成する。合成した蛍光プローブをKDMと反応させることで蛍光強度の上昇が見られ、世界で初めて一段階操作で検出するプローブの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Fluorescent probes were developed for detection of lysine demethylase (KDM) activity. This fluorescent probe produced a fluorescent coumarin upon lysine demethylation by utilizing the intramolecular transesterification mechanism. As results, KDM activity was successfully detected with a single-step manipulation for the first time. The probe will be useful for understanding the role of KDM and contribute to development of drugs targeting KDM activity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ ヒストン脱メチル化酵素 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

ヒストンの化学修飾は、クロマチンの高次構造を変化させることで、遺伝子発現を制御する重要な役割を担っている。特に、これまでに精力的に研究されてきた化学修飾は、ヒストンのアセチル化とメチル化である。これらの化学修飾は、細胞の増殖や分化に深く関与することが知られており、その酵素活性の異常は、癌や生活習慣病、中枢神経疾患など多岐に渡る疾患を引き起こすことが知られている。ヒストンのアセチル化状態は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)とヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の二つの酵素により厳密に制御されている。HATはヒストン中のリジンのアセチル化を触媒し遺伝子発現を促進する作用を持つのに対し、HDACはその逆反応である脱アセチル化を触媒し遺伝子発現を抑制する。一方、ヒストンのメチル化は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)及びリジンデメチラーゼ(KDM)により制御されている。ヒストンのアセチル化とは対照的に、メチル化修飾が導入されるヒストンのアミノ酸残基によって遺伝子発現が促進または抑制されるかが決定される。例えば、ヒストンH3のK4のメチル化は遺伝子発現を促進するが、K9のメチル化は抑制的に作用する。これらの酵素の活性を制御することは、癌などの疾患に対して治療効果が期待されることから、ヒストン修飾酵素を標的とした医薬品開発が大きな注目を集めている。実際に、HDACの阻害剤は、抗癌作用を示し臨床応用もなされている。ヒストン修飾酵素に関する生理的役割や医薬品開発においては、その酵素活性を簡単に評価できる実験系の構築が極めて重要である。

HDACやKDMの酵素活性の測定は、古典的には放射性同位体や抗体を用いた手法によりなされる。一方、放射性同位体は使用区域に制限があることや、抗体は高価であること、また、両手法共に、多段階の操作を必要とし簡便さに欠けることが問題であるといえる。近年では、HDACについては、ペプチドに蛍光色素をつないだ活性検出プローブが市販されている。しかしながら、このプローブは、反応部位であるアセチルリジンが色素に直接結合している必要があり、このことが、酵素活性に影響を与える可能性が懸念されている。また、この方法による酵素活性の検出には、プローブとHDACを反応させた後、蛋白質分解酵素を加える必要があることも改良を必要とする点であった。一方、KDMに関しては、ペプチドプローブは市販されていない。これは、KDMの認識配列特異性が高く、HDACペプチドプローブのように蛋白質分解酵素を作用させる原理を応用できないためである。これらの問題から、簡便・迅速かつ蛋白質分解酵素のようなものを加えずに、これらの酵素の活性を検出するプローブの開発が期待されていた。

### 2. 研究の目的

これまで、生物学的・医学的重要性にも関わらず、HDACやKDMと直接反応し蛍光検出する実用的なプローブは開発されてこなかった。これは、基質である脂肪族アミンの脱アセチル化や脱メチル化という極めて小さな化学変化を共役系を介さずに蛍光色素の蛍光特性を変化させることが非常に困難なためである。HDACに関しては、最近になり、我々のグループが一段階操作により、簡便にHDAC活性を検出する蛍光プローブの開発に成功した。このプローブは、アセチルリジンが蛍光色素に直接結合しておらず、蛋白質分解酵素のようなものを添加する必要もなく、前述の問題を世界で初めて解決した。

本研究では、HDAC活性を検出する原理を精査し応用することで、KDM活性を一段階操作で、検出する蛍光プローブを開発する。

### 3. 研究の方法

以前の研究で、HDAC活性を一段階操作で検出するプローブの開発を行っており、その検出原理は、以下の通りである。

検出原理のポイントは、脱アセチル化反応に伴う化学的変化のなかでも、基質であるアセタミドと反応産物であるアミンの求核性の違いである。ポイントは、アセタミドは求核性がほとんどないのに対し、酵素反応により生成するアミンは求核性が高いということである。つまり、分子内に求電子性官能基が存在すると酵素反応後にのみ、アミンによる分子内求核反応が引き起こされる。このとき、蛍光色素に求電子性官能基を組み込み、アミンと反応することで蛍光特性が変化するように分子設計をしておけば、HDAC活性を検出できるわけである。即ち、HDAC反応前は、不活性なアセタミドのため色素部位とは反応しないが、酵素反応によりアミンが生成すると求核性が上昇し色素部位と反応することで色素の蛍光特性が変化することになる。

具体的なプローブの構造は、HDACの基質部位として、アセチルリジンを含むヒストンペプチドを蛍光色素部位として、7-ヒドロキシクマリンから構成される。さらに、酵素反応後に生成するアミンと反応するように、7-ヒドロキシクマリンの7位のヒドロキシ基を求電子性反応基である炭酸エステルを組み込んでいる。ここで重要な点は、7位を炭酸エステル化したクマリンは非蛍光性となることと、酵素反応が起こり生成したアミンとこの色素の炭酸エステル部位が反応した場合、分子内エステル転移反応が起こり炭酸エステルは分解され7-ヒドロキシクマリンが生成し蛍光性となることである。この結果、プローブは酵素反応により脱アセチル化されると蛍光性となり、酵素活性を検出できる。

そこで、本原理をKDM活性の検出に応用する。KDMの基質として、ジメチルリジン

及びトリメチルリジンを選択した。ジ(トリ)メチルリジンの側鎖は求核性に乏しく、7位に炭酸エステルを持つクマリンがプロープ分子内に存在しても、エステル転移反応は促進されないと考えられる。これに対し、ジ(トリ)メチルリジンが KDM により脱メチル化され生成するモノメチルリジンやメチル基が完全に取り除かれたリジンは、求核性があり、分子内エステル転移反応を引き起こすと考えられる。その結果、酵素反応前は、非蛍光性であるプロープが、脱メチル化により蛍光性となり、蛍光性となると考えられる(図1)。

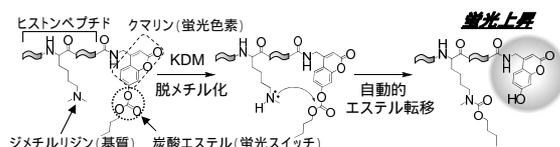


図 1. 分子内エステル転移反応を利用した KDM 活性の検出原理。

そこで、ジ(トリ)メチルリジンを持つヒストンペプチドに7位に炭酸エステルを持つクマリンを組み込んだプロープ分子を合成し、エステル転移反応及び酵素反応について検討した。

#### 4. 研究成果

まず、H3K4 及び H3K9 がトリメチル化もしくはジメチル化されたリジンを持つペプチドに炭酸エステル化クマリンを組み込んだペプチドプロープを合成した。前者のプロープは JARID1 を、後者のプロープは JMJD2 を標的としている。また、これらのプロープが脱メチル化されたモノメチルリジン及び非メチル化リジンをそれぞれ含有するペプチドプロープについても合成した。

まず、JARID1 を標的としたペプチドプロープについて検討した。酵素反応により脱メチル化が起こった時生成するモノメチルリジンを含有するペプチドプロープが、分子内エステル転移反応を引き起こすかを検討した。プロープを緩衝液に溶かした直後、及び1時間インキュベートした後の試料を HPLC とエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) によって解析した。HPLC では、原料とは異なる保持時間に蛍光性のピークが確認された。このピークを分取し ESI-MS で解析すると、分子内エステル転移反応産物であることが示された。

次に、酵素反応について検討した。JARID1 には、複数のサブタイプが存在し、JARID1A~D が知られている。これらの酵素は、トリメチル化リジンを脱メチル化し、モノメチル化リジンを生成することが知られている。トリメチル化リジンを含むプロープと JARID1A~D が反応し、脱メチル化リジンを産生するかを HPLC 及び ESI-MS で検討

した。その結果、脱メチル化産物が生成していないことが判明した。そこで、使用している酵素が活性を失っている可能性を確認するため、ヒストン蛋白質と反応させ、脱メチル化が起こるかどうかをウェスタンブロットで検証した。その結果、全てのサブタイプの JARID1 が、ヒストン蛋白質を脱メチル化することが判明した。以上の結果より、JARID1 は、酵素活性はあるものの、作成したペプチドプロープとは酵素反応が起こらないことが分かった。

次に、JMJD2 を標的としたペプチドプロープについて検討した。JMJD2 は、トリメチル化及びジメチル化された H3K9 をモノメチル化リジンにまで脱メチル化する酵素である。この酵素は、Fe(II)と 2-oxoglutarate を補因子として脱メチル化反応を触媒することが分かっている。JMJD2 は、癌を初めとした疾患に関わることが分かっており、その生理的・病理的役割を明らかにする上でも、酵素活性を検出する技術を開発することは極めて重要である。JMJD2 にも、JARID1 の時と同様に、複数のサブタイプが存在し、JMJD2A~E が報告されている。この中でも酵素活性の高い JMJD2E に着目し、検討を進めた。

まず、酵素反応が起こった後に生成すると考えられるモノメチル化リジンを含むプロープのエステル転移反応について検討した。プロープを緩衝液に溶かしインキュベートした後に、HPLC 及び ESI-MS により解析した。HPLC 解析の結果、インキュベート後に新たにピークが現れ、ESI-MS で解析した結果、分子内エステル転移反応が起こっていることが明らかになった。

次に、ジメチル化リジンを含むプロープと JMJD2E を反応させ、HPLC を用いて解析した(図2)。原料を示すピークを、酵素と反応させてから 15 分後に ESI-MS で解析すると、ジメチル化リジンに加えモノメチル化リジンを含むプロープの  $m/z$  が観測された。このことから、プロープは、JMJD2E により脱メチル化されることが示された。また、脱メチル化されても、HPLC では、同じ保持時間を示すことが分かった。これは、メチル基一つが取り除かれても疎水性が大きく変化しなかったためであると考えられる。また、原料及び脱メチル化体を示すピークは、時間の経過とともに、消失し、原料とは異なる保持時間にピークが現れた。このピークの保持時間は、前述のモノメチル化リジンを含むプロープの分子内エステル転移反応産物と一致した。更に、このピークを ESI-MS で解析すると、分子内エステル転移反応産物の  $m/z$  を示すことが分かった。この分子内エステル転移反応がモノメチル化リジンにより引き起こされていることを確認するために、MALDI-TOF MS/MS 測定を行った。その結果、エステル転移がモノメチル化された H3K9 に起こっていることが明らかとなった。

以上の結果から、プローブは、JMJD2E と酵素反応により脱メチル化されることで、ジメチル化リジンがモノメチル化リジンとなり、クマリンの炭酸エステルと分子内エステル転移反応を引き起こすことが分かった。

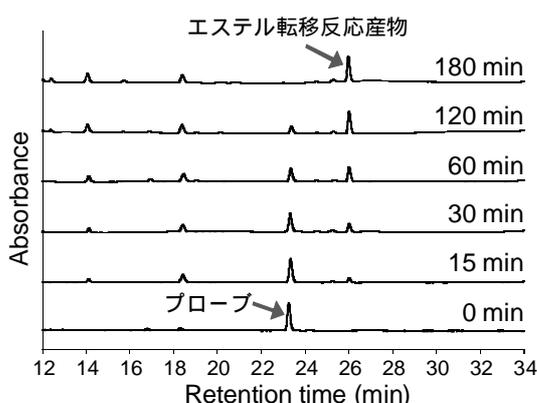


図 2. プローブと JMJD2E の酵素反応の HPLC 解析。

最後に、ジメチル化リジンを含むプローブを用いて、JMJD2E の酵素活性を蛍光検出できるかを検討した。プローブを JMJD2E と混合し、蛍光強度を測定した。その結果、JMJD2E を添加しない時に比べ、大きな蛍光強度の上昇が観測された。また、JMJD2E を熱失活したものとプローブを混合した時は、このような蛍光強度の上昇は確認されなかった。以上の結果から、プローブは、JMJD2E の酵素活性を蛍光強度の変化によって検出したといえる。更に、脱メチル化阻害剤をプローブと JMJD2E の反応溶液に加えたところ、蛍光強度の上昇が抑制されることが分かった。これらのことから、本プローブを用い

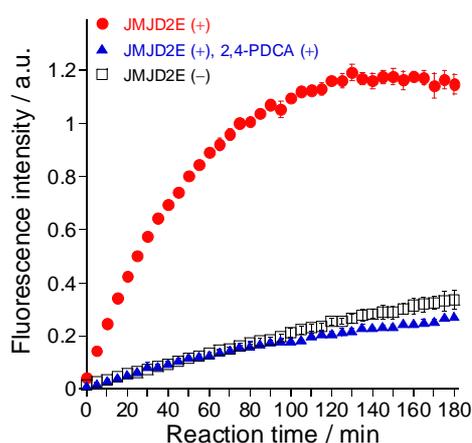


図 3. JMJD2E の酵素反応のプローブによる蛍光検出。赤丸、青三角、四角のトレースは、それぞれ、プローブに酵素を添加したとき、プローブに酵素と脱メチル化阻害剤 2,4-PDCA を加えたとき、酵素を加えなかったときの蛍光強度の変化を示す。

て、脱メチル化阻害剤の効能を調べることができていることが分かった。

以上をまとめると、本研究では、世界で初めて、ヒストン脱メチル化酵素の活性を一段階操作で検出するプローブの開発に成功した。このプローブは、リジンの脱メチル化が酵素により引き起こされると、分子内に組み込んだクマリンの炭酸エステルと分子内エステル転移反応を引き起こす。クマリンは、このエステル転移反応前は、非蛍光性であるが、反応後は蛍光性となる。この結果、プローブは、ヒストン脱メチル化酵素の活性を蛍光強度の上昇で捉えることができたといえる。本プローブは、ヒストン脱メチル化酵素の生理的役割を調べるうえで、有用であり、この酵素を標的とした医薬品開発にも貢献すると期待される。

## 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 6 件)

1. S. Mizukami, M. Kashibe, K. Matsumoto, Y. Hori, \*K. Kikuchi, “Enzyme-triggered compound release using functionalized antimicrobial peptide derivatives”, *Chem. Sci.* (2017). (査読有) DOI: 10.1039/C6SC04435B

2. S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki, \*K. Kikuchi, “Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-glycosylation in Intracellular Trafficking”, *Nat. Chem. Biol.*, 12, 853-859 (2016). (査読有) DOI: 10.1038/nchembio.2156

3. H. Maeda, T. Kowada, J. Kikuta, M. Furuya, M. Shirazaki, S. Mizukami, M. Ishii, \*K. Kikuchi, “Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity and Motility Using Designed Small Molecular Probe”, *Nat. Chem. Biol.*, 12, 579-585 (2016). (査読有) DOI: 10.1038/nchembio.2096

[学会発表](計 25 件)

K. Kikuchi (invited), “Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity Using BODIPY Based Two Photon Excitation Probes”, *The 8<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC VIII)*, Auckland, New Zealand, Dec 5-9 (2016).

K. Kikuchi (invited), “Intracellular Protein Labeling by Functional Probes with Tunable Chemical Switches”, *Molecular Sensors & Molecular Logic Gate 2016*, Bath, U.K., Jul 24-28 (2016).

K. Kikuchi (invited), “Real-time Intravital Imaging of pH Variation Associated with Osteoclast Activity Using BODIPY Based Two Photon Excitation Probes”, *ICPP-9, 9th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines*, Nanjing, China, Jul 3-8 (2016).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊地 和也 (KIKUCHI, Kazuya)

大阪大学大学院・工学研究科・教授

研究者番号：25220207

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )