

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2023

課題番号：19KK0197

研究課題名（和文）特殊アミノ酸を駆使したエピジェネティック制御酵素可視化蛍光プローブの開発

研究課題名（英文）Fluorescent imaging probes for epigenetic enzymes with specialized amino acids

研究代表者

中川 秀彦（Nakagawa, Hidehiko）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・教授

研究者番号：80281674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,200,000円

研究成果の概要（和文）：エピジェネティック酵素の1種であるSIRTアイソザイムについて、独自蛍光プローブの開発を進めた。多様なペプチド配列および蛍光消光団を組み合わせたペプチドプローブライブラリの構築を行った。これらはSIRTの各アイソザイムに対して異なる反応性を示し、そのうちの1つはSIRT3に優位な反応性を示すことが判明した。またSIRT2に良好な反応性を示すプローブを用いてケミカルスクリーニングを行い、SIRT2の脱ミリストリル化を効果的に阻害する阻害剤の同定に成功した。環状化戦略と一部D体置換を採用し細胞系で良好なSIRT2選択的酵素阻害活性を示す化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティック制御は近年大きな注目を集めている遺伝子発現及び細胞制御機構の1つであり、生命維持の基本的機構に関わると共に、多くの疾患に関連することが明らかになりつつある。エピジェネティック制御酵素の活性検出蛍光プローブの開発は、選択的阻害剤など有用な研究ツール及び治療薬候補の開発に資する。本研究の成果は、生命機能の解明や疾患治療法の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a proprietary fluorescent probe for SIRT isozyme, a type of epigenetic enzyme. A peptide-based probe library was constructed by combining various peptide sequences and fluorescent quenchers. These probes showed different reactivity to each isozyme of SIRT, and one of them showed predominant reactivity to SIRT3. Chemical screening using probes that showed good reactivity to SIRT2 was also performed to identify inhibitors that effectively inhibit demyristoylation of SIRT2. By employing a cyclization strategy and partial D-isomer substitution, we found compounds that exhibit good SIRT2 selective enzyme inhibitory activity in cellular systems.

研究分野：創薬化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ エピジェネティクス イメージング ケミカルバイオロジー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティック制御は近年大きな注目を集めている遺伝子発現・細胞機能制御機構の1つであり、生命維持の基本的機構に関わると共に、多くの疾患に関連することが明らかになりつつある。エピジェネティック制御の解析においてイメージング技術の研究は進んでおらず、生細胞の秩序を維持したままエピジェネティック制御の時間的・空間的状态を観察することは依然として難しい。

エピジェネティック制御酵素の1種であるHDACやSIRTは、基質タンパク質のアセチル化されたリシン残基のアセチル基加水分解を触媒する酵素群である。この酵素活性を検出する検出薬やすでに市販されているが、市販薬はペプチド切断酵素と組み合わせて用いる2段階検出法を採用しており、生細胞での活性検出には適さない。菊地ら(*J Am Chem Soc* 2012, 134, 14310-14313)は、脱アセチル化により生じた遊離アミノ基が蛍光団脱保護反応を進行させる仕組みを利用して、HDAC活性の1段階検出法を開発した。これにより活性検出の簡便化を実現したが、自発分解によるバックグラウンド信号増加のため細胞系への適用には依然として困難があった。研究代表者のグループは、SIRTが脱アセチル化のみならず、ミリスチル化などのアシル基修飾に対して、脱アシル化活性を触媒することに着目した。アシル基のサロゲートとして消光団を導入することで、SIRTアイソザイムの1つであるSIRT6の脱アシル化活性に特異的な1段階蛍光プローブの開発に成功した。さらに、このプローブをもとに、細胞系に利用可能なSIRTおよび2活性検出蛍光プローブへと発展させ、細胞内のSIRT活性をイメージングすることに世界で初めて成功した(*ChemBioChem*, 2016, 17, 1961-1967)。

SIRTアイソザイムの機能は一部解明されているものの、アイソザイムの違いによるエピジェネティック制御への影響の違いについては理解が進んでいるとは言いがたい。この点で、多様なSIRTアイソザイムに対応した活性検出蛍光プローブとそれを用いた阻害剤探索は、SIRT機能の解明に有用であるといえる。

### 2. 研究の目的

本研究では、エピジェネティック制御酵素、特にSIRT、の活性検出蛍光プローブの検討を行い、SIRTアイソザイムに対応した酵素活性検出蛍光プローブを開発することを目的とした。さらに、それらのプローブを用いて、SIRT活性阻害剤のスクリーニングと同定を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) SIRT1/2、3、5、6 特異的ペプチド性蛍光プローブの開発

研究代表者が開発したSIRT6特異的蛍光プローブで採用した消光団およびその誘導体の消光団を含む非天然アミノ酸を化学合成し、これを用いて多様なペプチド配列を有するSIRT活性検出蛍光プローブを複数種類合成した。ペプチド配列及び消光団構造が異なる蛍光プローブを種々合成することで、SIRTアイソザイム特異的蛍光プローブの開発を目指した。ペプチド配列のN末端及びC末端に蛍光団を結合し、リシン残基側鎖アミノ基に消光団をアミド結合で導入することで、FRET (Förster 蛍光共鳴エネルギー移動) 現象を利用した蛍光プローブを設計した。SIRTアイソザイムによって蛍光プローブのリシン残基側鎖アミド結合が加水分解されると、FRET現象が解消され、蛍光団の蛍光が回復し、活性検出できる仕組みを意図した(図1)。

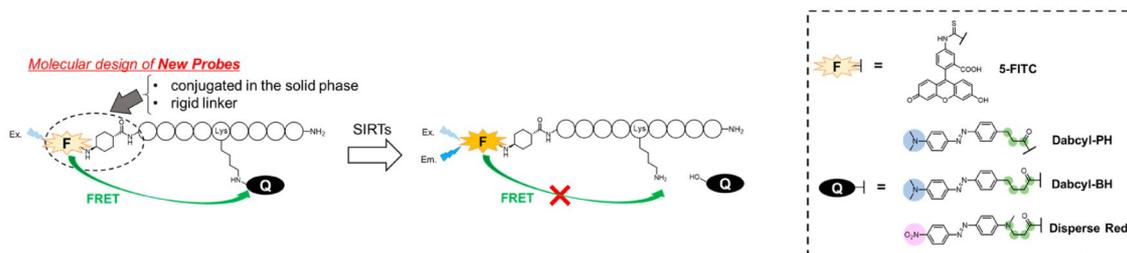


図1\_SIRTアイソザイム活性検出プローブの分子設計 (*ACS Med Chem Lett* 2021, 12, 617-624 より改変引用)

#### (2) 蛍光プローブを用いたケミカルスクリーニング

前項で開発したプローブのうち、SIRT2に特異性を示す蛍光プローブを用いて、東京大学創薬機構が保有するケミカルライブラリーから抽出した9600化合物に対してケミカルスクリーニングを実施した。通常のケミカルスクリーニングの手順に従い、プライマリースクリーニングを行なったのち、セカンドスクリーニングで用量依存性を確認した。

(3) 蛍光プローブの配列に基づいたペプチド性阻害剤の開発  
 開発した蛍光プローブの SIRT アイズイム特異性を検討する中で、消光団リンカー構造を工夫することで同じペプチドが阻害剤として機能することを見出した (*J Med Chem* 2019, 62, 5434-5452)。これに基づいて、ペプチド配列とリシン残基側鎖のアシル基構造を工夫することで、より効果的な阻害剤が取得できるか検討した。さらに細胞への適用を考慮して、得られたペプチド阻害剤を環状化し、細胞系で阻害活性を示すか、検討した。

#### 4. 研究成果

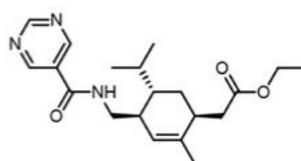
(1) SIRT1/2、3、5、6 特異的ペプチド性蛍光プローブの開発  
 リシン側鎖に消光団を導入した非天然アミノ酸と固相合成法を用いて、ペプチド部分を合成したのち、蛍光団を導入することで多様な SIRT 活性蛍光検出プローブを 11 種類合成した。これらの蛍光プローブを用いて、SIRT1~7 の活性検出を試みたところ、プローブごとに異なる応答性を示した (表 1)。その結果プローブごとに応答性が大きく異なることが判明した。

表 1\_合成した蛍光プローブの SIRT アイズイムに対する応答性

	SIRT1	SIRT2	SIRT3	SIRT4	SIRT5	SIRT6	SIRT7
SFP3	13.84	5.89	2.20	1.03	1.08	3.60	1.04
13	11.99	5.45	4.00	0.93	1.07	1.33	1.03
14	10.90	4.72	5.45	0.92	1.03	1.05	1.01
15	19.74	6.68	6.55	1.12	1.02	1.04	1.07
16	4.79	1.85	1.92	1.14	1.11	1.07	1.04
17	4.76	1.92	1.96	1.11	1.09	1.05	1.01
18	14.23	12.04	12.48	1.11	1.06	2.21	1.00
19	14.74	10.34	27.23	1.04	1.07	2.55	1.09
20	5.85	6.97	26.71	1.25	1.15	1.19	1.05
21	8.86	5.64	26.18	1.20	1.05	3.36	0.99
22	5.00	3.83	12.31	1.18	0.99	3.51	1.01
23	6.06	4.06	14.07	1.20	1.07	9.38	1.04

(*ACS Med Chem Lett* 2021, 12, 617-624 より改変引用)

(2) 蛍光プローブを用いたケミカルスクリーニング  
 蛍光プローブ 18 を用いて SIRT2 阻害剤のケミカルスクリーニングを行なった。東京大学創薬機構から提供された 9600 種の化合物に対してケミカルスクリーニングを実施したところ、3 種のヒット化合物が得られた。セカンドスクリーニングで用量依存性を確認したところ、化合物 C が良好な用量依存性を示し、天然基質であるミリスチル化ペプチドの加水分解に対しても良好な阻害能を示した。



Compound C

(3) 蛍光プローブ群のペプチド配列をもとに開発したペプチド性阻害剤を N 末端と C 末端をアミド縮合する手法で環状化した環状ペプチドを合成した。合成した環状ペプチドを細胞系に適用したところ、チェックポイントタンパク質である BubR1 の分解促進が観察された。BubR1 は K668 がアセチル化された状態ではユビキチンプロテアソーム系で分解されることが知られており、環状ペプチドにより脱アセチル化が阻害され、分解促進されたと考えられた。また、環状ペプチド性阻害剤の構成アミノ酸を一部 D 体に置換することで分解酵素に対する安定性が増すことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawaguchi Mitsuyasu, Nakajima Yuya, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 80
2. 論文標題 Development of Sirtuin Fluorescence Probes and Medicinal Chemistry Research Targeting SIRT Family	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 831 ~ 842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaisi.80.831	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishiuchi Kan'ichiro, Nagumo Akiho, Kawaguchi Mitsuyasu, Furuyashiki Honoka, Nakagawa Hidehiko, Hirose Dai	4. 巻 104
2. 論文標題 Stereochemistries of Mariannamides C and D, Two Lipohexapeptides, Isolated from Mariannaea elegans NBRC102301	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 1822 ~ 1822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-22-14728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawaguchi Mitsuyasu, Furuse Yuri, Ieda Naoya, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Development of Nucleoside Diphosphate-Bearing Fragile Histidine Triad-Imaging Fluorescence Probes with Well-Tuned Hydrophobicity for Intracellular Delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 2732 ~ 2742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.2c01273	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Yuya, Kawaguchi Mitsuyasu, Ieda Naoya, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 12
2. 論文標題 A Set of Highly Sensitive Sirtuin Fluorescence Probes for Screening Small-Molecular Sirtuin Defatty-Acylase Inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 617 ~ 624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.1c00010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Mitsuyasu, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 2274
2. 論文標題 Live-Cell Imaging of Sirtuin Activity Using a One-Step Fluorescence Probe	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 155 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1258-3_14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Yuya, Kawaguchi Mitsuyasu, Ieda Naoya, Nakagawa Hidehiko	4. 巻 12
2. 論文標題 A Set of Highly Sensitive Sirtuin Fluorescence Probes for Screening Small-Molecular Sirtuin Defatty-Acylase Inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 617 ~ 624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.1c00010	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuyasu Kawaguchi, Naoya Ieda, and Hidehiko Nakagawa	4. 巻 62
2. 論文標題 Development of Peptide-Based Sirtuin Defatty-Acylase Inhibitors Identified by the Fluorescence Probe, SFP3, That Can Efficiently Measure Defatty-Acylase Activity of Sirtuin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 5434-5452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.9b00315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古屋敷帆乃花、川口充康、家田直弥、中川秀彦
2. 発表標題 細胞膜透過型ペプチド性 SIRT2 阻害剤の開発と細胞障害性評価
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋雄哉、川口充康、家田直弥、中川秀彦
2. 発表標題 Sirtuin脱アシル化阻害剤のスクリーニングに適用可能なケミカルプローブ群の開発
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会 第21回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋雄哉、川口充康、家田直弥、中川秀彦
2. 発表標題 Sirtuin脱脂肪酸アシル化阻害剤開発を指向した蛍光プローブ群の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋雄哉、川口充康、家田直弥、中川秀彦
2. 発表標題 Sirtuin脱ミリスチル化阻害剤のスクリーニングに適用可能なケミカルプローブ群の開発
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>名古屋市立大学 大学院薬学研究科 薬化学分野  <a href="http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ykg/Yakka/index.html">http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ykg/Yakka/index.html</a>          名古屋市立大学 大学院薬学研究科 薬化学分野  <a href="http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ykg/Yakka/index.html">http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ykg/Yakka/index.html</a>          名古屋市立大学大学院薬学研究科薬化学分野  <a href="https://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/iyaku/yakka.html">https://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/iyaku/yakka.html</a>          研究室Webサイト  <a href="https://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/iyaku/yakka.html">https://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/iyaku/yakka.html</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川口 充康  (Kawaguchi Mitsuyasu)  (10735682)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師    (23903)	
研究分担者	家田 直弥  (Ieda Naoya)  (00642026)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師    (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Pennsylvania		