

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750371

研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素活性を検出するプローブの開発

研究課題名(英文) Development of fluorescent probes for detection of histone deacetylase activity

研究代表者

蓑島 維文 (MINOSHIMA, Masafumi)

大阪大学・工学研究科 ・助教

研究者番号：20600844

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)：エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与するヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)活性を検出できる蛍光プローブの開発を行った。DNAとの相互作用変化に着目し、核染色色素とHDAC基質を連結したペプチドを設計、合成した。本蛍光プローブをDNA存在下、HDACと反応させることでDNA結合能の上昇に伴い蛍光強度が増大する結果が得られた。本手法により簡便な操作で迅速にHDAC活性を検出できることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, fluorescent probes were developed for detecting histone deacetylase (HDAC) activity involved in epigenetic gene expression. We designed and synthesized peptide conjugates between nuclear staining dye and HDAC substrates based on the control of DNA interaction upon deacetylation. Reaction of the probes with HDAC in the presence of DNA resulted in fluorescence enhancement in concomitant with the increase of DNA binding affinity. Our method demonstrated rapid detection of HDAC activity with a one-pot procedure.

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 ヒストン脱アセチル化酵素 DNA

1. 研究開始当初の背景

核内に存在するヒストンタンパク質の翻訳後修飾は DNA-ヒストンの複合体であるクロマチンの機能を調節し、遺伝子発現の制御に関わる重要な役割を果たしている。ヒストンのリジン残基におけるアセチル化は代表的な修飾であり、アセチル化酵素 (HAT) によるアセチル化、脱アセチル化酵素 (HDAC) による脱アセチル化によって可逆的に制御されている。ヒストンのアセチル化はクロマチン構造をゆるませ、遺伝子の転写活性化に働いている一方、HDAC による脱アセチル化はクロマチン構造を凝縮し複数の遺伝子発現を抑制する。加えて、HDAC はがんや神経変性疾患などの病態において高発現していることが知られており、異常な遺伝子の機能発現と関連していることが指摘されている。そのため、近年 HDAC を標的とした阻害剤はがん・精神疾患治療における治療薬として注目されており、薬剤開発が積極的に行われている (Arrowsmith, C. H. *et al. Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 384-400)。実際に 2006 年に HDAC 阻害剤である SAHA (vorinostat) が皮膚 T 細胞リンパ腫の治療薬として承認された。この他にもいくつかの HDAC 阻害剤が臨床段階まで進んでいる。

上記の通り HDAC は生理的に重要な機能を持った酵素であり、阻害剤の開発といった創薬の観点からも重要な標的であるため。その活性の簡便迅速な検出法が強く求められている。蛍光プローブを利用した活性検出法は高感度かつ使いやすい点で優れた手法である。しかしながら、HDAC は脂肪族アミン由来のアセチルリジンを基質としているため、酵素反応によって蛍光色素の電子状態が直接制御されるものではない。したがって低分子蛍光プローブ開発で使われる、光誘起電子移動に基づいた分子設計ができない。そのため現在までにアセチルリジンに対する抗体を使った手法や、HDAC 反応後、別の酵素で処理によって間接的に検出する手法が主に用いられており、市販化されている。だがこれらの方法では検出までに多段階の操作が必要であるため、簡便迅速な検出ができない。また、酵素反応の進行をリアルタイムで追跡することができないという課題があった。

これらの課題を一挙に解決できる新たな検出法の開発を目指し、申請者は HDAC によるリジン残基の電荷状態の変化に着目した。HDAC で触媒される反応により、ヒストンの電荷的に中性なアセチルリジンは正電荷を持ったリジンへと変換される。この電荷状態の変化は、負電荷を有する DNA との相互作用を強めることで、クロマチンの構造変化を引き起こし、凝縮することが示唆されている。この点を踏まえ、申請者は HDAC 活性を脱アセチル化反応による蛍光プローブの DNA 結合能の変化として検出できるのではないかと考えた (図 1)。

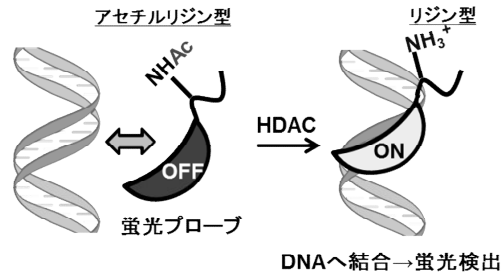


図 1. DNA 結合能の変化を利用した HDAC 活性蛍光検出法の概念図。三日月形の部分は核染色色素を示す。

2. 研究の目的

本研究ではがんや精神疾患の発症に関わる酵素、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の活性を簡便・安定に蛍光検出する手法を開発する。脱アセチル化によるリジン残基の電荷状態と、それに伴う DNA 結合能の変化に着目し、核染色色素を用いた蛍光プローブを設計・合成する。合成した蛍光プローブと HDAC の酵素反応を行い、活性検出が可能かどうかを評価する。加えて in vitro で阻害剤のスクリーニング手法を確立する。本研究の遂行により、がんや神経変性疾患の治療薬として注目されている HDAC 阻害剤の薬剤開発へ貢献する。

3. 研究の方法

HDAC 活性を DNA 結合能変化として検出できる蛍光プローブの開発を行った。本研究で開発する蛍光プローブは DNA との結合能に依存した蛍光特性を示す核染色色素を用い、酵素の基質となるアセチルリジン残基を含んだペプチドを連結した化合物を設計した。核染色色素としては DNA への結合で数百倍の蛍光上昇が見られるチアゾールオレンジ (TO) またその誘導体である BOXTO を選択した。酵素反応基質としては天然のヒストンタンパク質 (ヒストン H3, H4 の N 末端部分) に見られるアセチルリジンを含む配列から選択した。TO 誘導体は +1 の電荷を有しているため、電荷を調節するために基質の C 末端には負電荷を持つカルボキシ基を導入した。アセチルリジンを持つペプチドではトータルの電荷が 0 となっているが、脱アセチル化によってリジンが生じ +1 へと電荷状態が変換されることで DNA との相互作用が強まることを期待した。

本研究で開発するプローブは HDAC による脱アセチル化反応に伴い、電荷状態が変化する。従って合成した各プローブの電荷状態の差が、DNA の結合能にどの程度影響するのかを調べる必要がある。そこで、脱アセチル化反応後の生成物であるリジンを有するペプチドも比較対照として合成し、DNA 存在下での蛍光測定を行い、リジン・アセチルリジンを含むペプチドの蛍光強度の比が大

きくなるように色素、基質配列、両者の間のリンカーにおいて分子設計を検討した。HDAC の蛍光検出に関しては、蛍光プローブに対し DNA 存在下酵素反応を行った後に蛍光強度の変化を観察した。蛍光プローブ、および DNA の濃度については最適な検出条件になるよう検討した。また高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって生成物の分析し反応効率を調べた。

4. 研究成果

設計した HDAC 検出用蛍光プローブとなるペプチド化合物を合成した。基質部分であるペプチド配列を Fmoc 固相法によって伸長し、有機合成によって供給された色素部位を固相上で連結させて目的の化合物を合成した。固相からの切り出し後、HPLC による精製を行い、化合物を純度良く容易に得る手法を確立した。

蛍光プローブの構造を最適化するために、色素、リンカー、基質の各部位において検討を行った。まず色素としては上述した DNA 結合色素である TO とその誘導体である BOXTO を用いた。それぞれリジン・アセチルリジンを含む化合物として合成し、安価に入手可能な子ウシ胸腺 DNA (ctDNA) と混合して蛍光強度を測定したところ、アセチルリジンに比べてリジンを基質として有する化合物において色素由来の 545 nm 近辺の蛍光が増大していることを観察した。この結果が DNA 結合能の増大に由来しているものかどうかを調べるため、各化合物を ctDNA と混合し、円二色性 (CD) スペクトルを測定した。すると ctDNA 存在下リジンを有する化合物において、色素由来の吸収帯である 500 nm 近辺に DNA 結合に由来する誘起 CD を示すシグナルが現れた。これらの結果より、アセチルリジンからリジンへの電荷状態の変化によって、DNA との相互作用の向上、および蛍光強度の増大を引き起こすことが示された。また、色素部分の比較においては TO よりも BOXTO を用いた方がアセチルリジンからリジンへの変換に伴う蛍光シグナルの差をより大きくできるという結果が得られた。これは BOXTO が DNA のマイナグルーブに結合する一方、TO は塩基対間にインターカレーションする DNA 結合様式の違いによるものと考えられる。色素とペプチド基質をつなぐリンカーについても同様の検討を行い、アルキル鎖の鎖長の数が 1 より 5 の場合により蛍光強度を大きくできることが分かった。加えて、基質部分の検討を行ったところ、単にアセチルリジンのみを基質にするより、隣接する残基にヒストン H4 配列に存在する電荷を持たないアミノ酸であるグリシンを導入することで蛍光シグナルの差を保ちつつ、蛍光強度をより大きくできることを見出した。以上の結果より、HDAC 活性検出に適した蛍光プローブとして BOXTO-GK(Ac)G を選択した (図 2)。

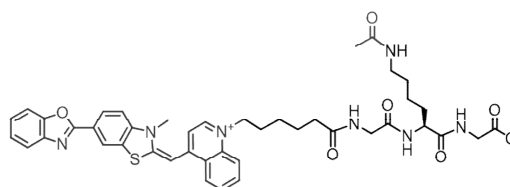


図 2 蛍光プローブ BOXTO-GK(Ac)G の構造

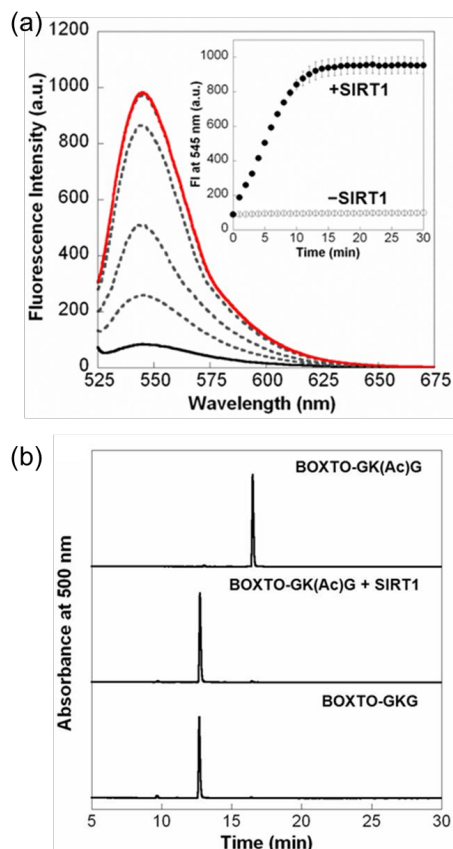


図 3 . (a) BOXTO-GK(Ac)G を用いた SIRT1 活性のリアルタイム蛍光検出 (励起波長: 520 nm)。 (b) 脱アセチル化生成物の HPLC による分析結果。

この蛍光プローブを使い、HDAC の蛍光検出を試みた。DNA が入った反応用バッファーに蛍光プローブである BOXTO-GK(Ac)G、クラス III に属する HDAC である SIRT1 とその補酵素である NAD⁺を混合後、蛍光スペクトルを測定した。すると酵素添加直後から 8 倍程度まで蛍光強度が上昇し、15 分ほどで飽和した (図 3 a)。一方で HDAC を加えていない条件では蛍光強度の上昇は見られなかった。この結果より、酵素を加えるだけの操作で HDAC の反応を蛍光の増大により検出できることを示した。加える ctDNA の濃度としては蛍光プローブに対して 25 倍 (塩基対換算) の量が最適であり、この条件では HDAC の活性に影響がないことを市販のキットを用いることで確認した。

また、HDAC と反応後、各反応時間において反応溶液をサンプリングし、生成物を HPLC により分析した。その結果、反応時間

経過に伴って、BOXT0-GK(Ac)G から基質の脱アセチル化体である BOXT0-GKG への生成が確認された (図 3 b)。酵素非存在下では反応は進行しておらず、その他分解等に由来する副生成物の産生も見られなかったことから、本蛍光プローブは脱アセチル化を特異的に検出できるものと考えられる。また、HPLC での分析結果から反応物であるアセチル化体と生成物である脱アセチル化体とのピーク面積強度を定量し、その比から各 k 反応時間における反応物の生成率を求めた。蛍光測定から算出した生成率の結果と比較すると、両者がよく一致していることが分かった。この結果は本検出系が HDAC の反応を直接蛍光で追跡できることを示している。この理由としては、脱アセチル化した後の蛍光プローブが速やかに DNA と結合するため、酵素反応のステップが検出系の律速段階として観測できるからであると考えられる。この知見を利用して、HDAC 酵素反応の速度解析を行ったところ、SIRT1 の k_{cat} および K_m をそれぞれ $1.42 (\pm 0.06) \times 10^{-1} (s^{-1})$, $1.35 (\pm 0.18) \times 10^{-6} (M)$ と求めることができた。本手法は直接混合後の蛍光強度を測定するだけでよいから、簡便な速度解析が可能であるとされる。

最後に、本手法が HDAC 阻害剤の評価に応用できるかどうかを検討した。阻害剤として知られている EX-527 および Nicotinamide を使い、蛍光プローブ BOXT0-GK(Ac)G、ctDNA を用いて阻害剤アッセイを行った。その結果、濃度依存的な阻害曲線が得られ、50% 阻害濃度 IC_{50} が EX-527 で $0.34 \mu M$, Nicotinamide で $99 \mu M$ と得られた (図 4)。これらの値は文献で示されている値の範囲と合致しており (N. Khan *et al. Biochem. J.* **2008**, *409*, 581)、阻害剤評価として信頼性に足るものと思われる。加えて、本検出手法は一段階の操作、30 分の酵素反応で結果が得られるため、既存の方法より迅速に HDAC 阻害剤の性能を評価できることが期待される。

以上のことから、本研究では HDAC 活性を一段階の操作で簡便に検出可能な蛍光プローブの開発に成功した。特に DNA に相互作用する色素の結合能の変化に着目し、脱アセチル化反応によって大きな蛍光増大が見られる蛍光プローブの分子設計を見出した。DNA 相互作用の変化を利用した酵素活性の検出はこれまでに例がなく、DNA 結合色素の新たな適用の可能性を示したといえる。加えて、本検出法では酵素反応を直接追跡可能であり、阻害剤評価も 1 時間以内で迅速に行うことができることを示した。本研究における蛍光検出はハイスループットなスクリーニングに適用可能であるため HDAC 阻害剤の開発に有用なツールになるものと考えられる。今後は検出可能な HDAC の種類の拡大、及び生細胞でのイメージングに取り組んでいきたい。

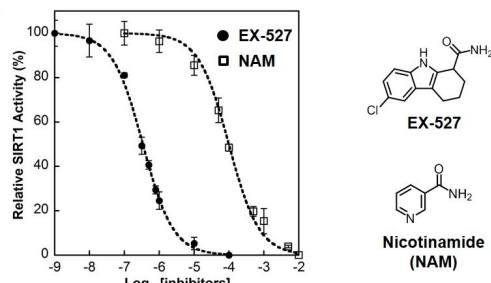


図 4 . 本検出法を用いた SIRT1 阻害剤アッセイの結果。

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 4 件)

1. M. Minoshima & *K. Kikuchi, “Chemical Probes for Elucidating Histone Deacetylase Function”, *Anal.Sci.*, **31**, 287-292 (2015).

(査読有)

DOI: <http://doi.org/10.2116/analsci.31.287>

2. M. Minoshima, T. Matsumoto & *K. Kikuchi “Development of Fluorogenic Probe based on a DNA Staining Dye for Continuous Monitoring of the Histone Deacetylase Reaction”, *Anal. Chem.*, **86**, 7925-7930 (2014). (査読有) DOI: [10.1021/ac301677v](https://doi.org/10.1021/ac301677v)

[学会発表] (計 10 件)

1. Masafumi Minoshima, Yuka Tatematsu, Tetsuaki Matsumoto, Kazuya Kikuchi, “Development of DNA-binding Fluorescent Probe for Detection of Histone Deacetylase Activity”, Heiderberg, Germany, EMBO Conference Chemical Biology 2016, 2016. 9. 1.

2. 蓑島維文、立松結花、松本哲明、菊地和也 「DNA 結合性蛍光プローブによる HDAC 活性検出法の開発」、京都、第 11 回ケミカルバイオロジー学会、2016. 6. 16.

3. 蓑島維文、立松結花、松本哲明、菊地和也 「蛍光プローブと DNA を用いたヒストン脱アセチル化酵素の検出」、熊本、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2015. 9.10

4. Masafumi Minoshima, Tetsuaki Matsumoto, Kazuya Kikuchi, “Development of Fluorogenic System for Detection of Histone Deacetylase Activity Using DNA Binding Dye”, Andover, NH, USA, Gordon Research Conference (Bioorganic Chemistry), 2014. 6. 11.

[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

袁島 維文 (MINOSHIMA, Masafumi)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：20600844

(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

()