

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12761

研究課題名(和文)ケミカルエピゲノミクスを指向したタンパク質メチル化可視化プローブ・阻害剤の開発

研究課題名(英文)Development of the chemical detectors and inhibitors for protein methylation toward chemical epigenomics

研究代表者

五月女 宜裕 (Sohtome, Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・研究員

研究者番号：50431888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質メチル化は、環境に应答してダイナミックに変動する可逆的な修飾である。メチル化されたタンパク質を同定するためには、一般にメチル化リシン残基に特異的な抗体が必要である。このメチル化抗体はその作成が困難であるため、他の翻訳後修飾反応と比較しメチローム解析は遅れている。そこで本研究では、1) 抗体を用いずにタンパク質メチル化を検出する方法論の構築、更には、2) その検出系を用いてタンパク質阻害剤を探索する手法を開発することを目指した。

研究成果の概要(英文)：Protein methylation is a reversible modification that varies dynamically in response to the environment. In order to identify methylated proteins, antibodies specific for methylated lysine residues are generally required. Since this methylated antibody is difficult to prepare, the methylome analysis has been relatively neglected as compared with other post-translational modification reactions. In this study, we aimed to 1) develop a methodology to detect protein methylation without using antibody, and to 2) explore protein inhibitors using the detection system.

研究分野：有機合成化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：エピゲノム タンパク質メチル化 検出プローブ 阻害剤 プロテオーム 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

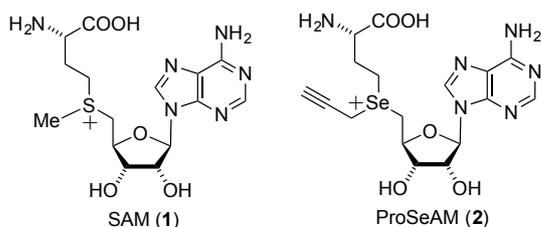
タンパク質メチル化は、環境に応答してダイナミックに変動する可逆的な修飾である。例えば、ヒストンメチル化は、転写を司るクロマチン構造の変化に重要な役割を果たし、これにより多彩な生命現象が制御されることが明らかにされている。また、非ヒストンタンパク質のメチル化反応も生命現象の制御に重要な役割を果たす例も次第に明らかになりつつある。しかしながら、メチル化修飾を受けるタンパク質の全体像の理解や、メチル化の生理的機能等に関しては究明の途上にある。

2. 研究の目的

一般に、プロテオーム解析では、翻訳されたタンパク質を広く認識する pan 抗体を用いて修飾タンパク質を濃縮することが起点となる。一方、効率的なメチル化タンパク質の pan 抗体は作成することが困難であるため、他の翻訳後修飾反応と比較し、非ヒストンタンパク質を含めたメチローム解析は、十分な研究が行われていない。そこで本研究では、i) 抗体を用いずにタンパク質メチル化を検出する方法論の構築、更には、ii) その検出系を用いてタンパク質阻害剤を探索する手法を開発することを目指した。

3. 研究の方法

生体でのタンパク質メチル化反応では、S-adenosylmethionine (SAM: **1**) がメチル源として用いられる。そこで、我々の研究グループは、抗体法に変わる手法として、SAM 誘導体をラベル試薬として用い、メチローム解析を進めてきた。この手法では、細胞抽出液中のタンパク質メチル化酵素が SAM 誘導体を認識した場合、基質タンパク質をラベル化することが可能となる。数種の SAM 誘導体を合成し、そのタンパク質に対するラベル化効率を検討した結果、Luo 及び Weinhold により開発された propargylic Se-adenosyl-L-selenomethionine (ProSeAM: **2**) が最も効率高くタンパク質にプロパルギル基を導入できることが分かっている。これらの知見をもとに、本研究では以下の戦略で研究を推進した。



(1) ProSeAM の合成・精製法の改良

これまでに、ProSeAM (**2**) は動物細胞抽出液を用いて約 300 のタンパク質基質をプロパルギル化できることを示した (*PLOS ONE*, **2014**, *9*, e105394.)。しかしながら、本

化合物は不安定であり、合成及び精製法に改善の余地が残されていた。分解により生じる副生成物は、一部のタンパク質メチル化を阻害してしまう。すなわち、プロテオームワイドでメチル化解析を行うためには、高純度な ProSeAM (**2**) を供給する必要がある。そこで本研究では、Luo らの合成法を参考として (I. R. Bothwell, M. Luo, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3056.)、まずその合成及び精製法の改良を行なった。

(2) 阻害剤プロファイリングへの展開

タンパク質メチル化反応の複雑なシステムを制御するための基礎研究として、特定のタンパク質メチル化酵素のサブタイプを選択的に認識するメチル化阻害剤の開発が求められている。しかしながら、従来のタンパク質メチル化阻害剤開発研究では、精製された『1 酵素-1 基質-1 サイト』のメチル化を指標に、阻害剤の構造最適化が進められる。このアプローチでは阻害剤の酵素/基質選択性を十分に議論することはできない。この問題点を本質的に革新させ、未だ阻害剤の開発されていない新規ターゲットを見出すための方法論の開拓を目指した。すなわち、我々の検出技術を阻害剤評価系へと展開させ、我々の有する独自のタンパク質メチル化阻害剤の標的タンパク質を解析した。

4. 研究成果

(1) ProSeAM の合成・精製法の改良

まず、ProSeAM (**2**) の合成及び精製について詳細な検討を行ない、高純度な ProSeAM (**2**) を再現性よく供給できるようになった。特に、極性の高い反応中間体を Sep-Pak[®]あるいは逆相 HPLC を用いて精製することが重要であった。ProSeAM (**2**) は、塩基あるいは中性条件下において、容易に分解してしまうことも分かった。0.1%TFA 含有移動相を用いて、逆相 HPLC カラムにより精製した後、分解を抑制するために、凍結乾燥機を用いて水を除去することで、ProSeAM (**2**) を得ることが可能となった。この合成法、精製法を用いて供給した ProSeAM (**2**) は、*in vitro* 実験においてラベル化効率が向上していることも確認できた。

(2) 阻害剤プロファイリングへの展開

モデル実験として、我々が合成した数種のエピジチオジケトピペラジン (ETP) 型メチル化阻害剤について、ProSeAM (**2**) を用いた ii-i) ゲル解析、ii-ii) LC/MS-MS 解析によるプロファイリングを行なった。

① ゲル解析

培養細胞由来のタンパク質可溶画分に対して、ProSeAM (**2**) とともに解析対象の ETP 型メチル化阻害剤を加えて反応させた。その後、クリック反応を用いて ProSeAM

(2) によりプロパルギル化された修飾タンパク質にビオチンタグを導入し、さらにストレプトアビジン-HRP で検出した。阻害剤を加えていないサンプルと、加えたサンプルとのラベル化効率を比較することで、ユニークなタンパク質基質選択性を有するETP型メチル化阻害剤を見いだすことができた。特に、ヒストンバンド/非ヒストンバンドの阻害比を定量することで、非ヒストン選択的に作用する ETP 型メチル化阻害剤を見いだした。

② LC/MS-MS 解析

本解析では、ProSeAM (2) を用いるプロパルギル化、クリック反応によるビオチンの導入、ストレプトアビジンビーズで精製、消化酵素で断片化を行い、更に LC/MS-MS 解析を行なった。ゲル解析により見出した非ヒストン選択的に作用する ETP 型メチル化阻害剤を解析した結果、これまでに報告例のないユニークな基質及び官能基選択性を見いだすことができた。

更には、新たに創出した ETP 型阻害剤の *in vitro* での IC₅₀ 値を算出し、また生細胞でのメチル化阻害活性についても知見を得た。これらの研究を通じて、到達目標として設定した非ヒストンタンパク質の新規阻害剤のプロトタイプを創出できたと考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 11 件)

招待講演

1. “分野、研究室の垣根を超えた異分野融合型有機合成化学” 五月女宜裕, 中堅・若手リーダーのためのYUGOKAFE NExT, 千代田区, 東京 (2018年2月17日)
2. “特異な不斉空間制御を可能とする有機触媒・遷移金属錯体触媒” 五月女宜裕, 進化学技術推進協会、先端化学・材料技術部会、高選択性反応分科会、千代田区, 東京 (2018年2月8日)
3. “ケミカルエピゲノムの新展開” 五月女宜裕, 新領域研究グループ『精密物質変換のための分子空間化学』2017シンポジウム, 山形市, 山形県 (2017年9月4日)
4. “Chemical Strategies to Control Chiral Environments Constructed by Molecular Catalysts and Enzymes” Yoshihiro Sohtome, The 3rd RIKEN-Academia Sinica Joint Conference: Focus on Chemistry and Chemical Biology, 和光市, 埼玉 (2017.3.29-30)
5. “Synthetic Strategies to Control and Analyze Protein Methylation” Yoshihiro Sohtome,

RIKEN Symposium on Chemistry and Biochemistry of Epigenetic Regulation, 和光市, 埼玉 (2017.1.19)

6. “Symbiosis between molecular catalysis and chemical epigenetics” Yoshihiro Sohtome, 14th RIKEN Interdisciplinary Exchange Evening, 和光市, 埼玉 (2016.10.6)
7. “Exploring chemical strategies to control and analyze protein methylations”, Yoshihiro Sohtome, Joaquin Barjau, Shinya Fujishiro, Kosuke Dodo, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Tadahiro Shimazu, Yoichi Shinkai and Mikiko Sodeoka, Frontiers in Chromatin Biology and Chemical Epigenetics/Epigenomics, PacificChem 2015 (2015.12.15-20).

一般発表

8. “ProSeAMを用いるケミカルメチローム解析及びタンパク質メチル化阻害剤探索”, 五月女宜裕, 島津忠広, Barjau Joaquin, 藤城信哉、赤壁麻依、寺山直樹、闔闔孝介、伊藤昭博、吉田稔、眞貝洋一、袖岡幹子、日本ケミカルバイオロジー学会 第12回年会、札幌市、北海道 (2017.6.7-9)
9. “Exploring Histone Methyltransferase Inhibitors based on Structural Development of Chaetocin” Yoshihiro Sohtome, Shinya Fujishiro, Kosuke dodo, Eriko Iwasa, Yuiou Teng, Yoshitaka Hamashima, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Mikiko Sodeoka, International Symposium for RIKEN Epigenetics Program 2016, 和光市, 埼玉 (2016.2.15-16)
10. “Uncovering protein methylation with a selenium based S-adenosyl-methionine analog” Tadahiro Shimazu, Barjau Joaquin, Yoshihiro Sohtome, Mikiko Sodeoka, Yoichi Shinkai, International Symposium for RIKEN Epigenetics Program 2016, 和光市, 埼玉 (2016.2.15-16)
11. “Exploring nonhistone lysine methylation with a selenium based S-adenosyl-methionine analogue” Tadahiro Shimazu, Barjau Joaquin, Yoshihiro Sohtome, Mikiko Sodeoka, Yoichi Shinkai, 第40回内藤コンファレス, 札幌市, 北海道 (2015.9.16)

[図書] (計 1 件)

島津忠広、五月女宜裕、袖岡幹子、眞貝洋一メチル化酵素の新規標的分子の網羅的解析” 実験医学別冊 エピジェネティクス実験スタンダード: もう悩まない! ゲノム機能制御の読み解き方, 379-388, (2017), 羊土社, 査読無

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五月女 宜裕 (SOTHOME Yoshihiro)
国立研究開発法人理化学研究所・袖岡有機
合成化学研究室・研究員
研究者番号： 5 0 4 3 1 8 8 8

(2) 研究分担者

島津 忠広 (SHIMAZU Tadahiro)
国立研究開発法人理化学研究所・眞貝細胞
記憶研究室・専任研究員
研究者番号： 1 0 6 1 8 7 7 1