

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01933

研究課題名(和文) DNA結合性蛍光プローブによるHDAC活性のイメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of Imaging Method for HDAC Activity using DNA-binding Fluorescent Probe

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではがん、精神疾患等の疾患発症に関連する酵素、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の細胞内における活性を蛍光イメージングすることを目的とした。脱アセチル化に伴う電荷状態の変化により、DNAとの結合能が上昇し、蛍光上昇が見られる検出原理を利用し、蛍光プローブ構造の改変を行った。反応部分の基質に阻害剤の構造を導入することでHDACの反応選択性の拡張、基質を複数個導入することでシグナルturn-on比の改良を達成した。その結果、細胞核内に存在するHDAC活性の蛍光検出を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、薬剤の分子標的として注目されている。2006年にHDAC阻害剤が皮膚T細胞リンパ腫の治療薬として承認されて以降、数多くの阻害剤が開発され、研究が進められている。したがって、生細胞におけるHDACの活性を知ることは、その生理機能の理解だけでなく、薬剤開発においても非常に重要である。今回、細胞核内のHDAC活性を検出できたことで、環境変化における細胞内シグナルの変調を調べることや、疾患に対するHDAC阻害剤の細胞を用いた評価系に展開することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to develop fluorescence imaging of cellular histone deacetylase (HDAC) activity that involves in cancer and neurodegenerative diseases. The fluorescent probe increases DNA binding affinity and fluorescence intensity upon deacetylation of substrate. Modification of the probe structure by introduction of the substructure of HDAC inhibitor expanded the HDAC selectivity. We also improved turn-on ratio of the fluorescence signals by introducing multiple acetyllysine substrates. As a result, nuclear HDAC activity from HeLa cells was fluorescently detected using the modified fluorescent probe.

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 HDAC エピジェネティクス DNA結合

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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リジン残基におけるアセチル化は重要な翻訳後修飾であり、アセチル化酵素 (HAT)、脱アセチル化酵素 (HDAC) によって可逆的に制御されている。とりわけ HDAC による脱アセチル化は複数の遺伝子発現を抑制する方向に導いている。アセチル化の状態は細胞周期や発生、分化、外部環境により変化しており、細胞は HAT と HDAC の活性を時空間的に制御して遺伝子発現をエピジェネティックに調節していると考えられている。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、薬剤の分子標的として注目されている。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て以降、数多くの阻害剤が開発され、研究が進められている。したがって、生細胞における HDAC の活性を知ることは、その生理機能の理解だけでなく、薬剤開発においても非常に重要である。しかしながら、これまでに HDAC による脱アセチル化反応を直接追跡できる手法がなく、細胞内の HDAC 活性を蛍光イメージングした例はない。申請者は、蛍光プローブと DNA を用い、HDAC による酵素反応を蛍光追跡できる手法を開発した (M. Minoshima, *et al. Anal. Chem.* 2014, 86, 7925-7930)。この手法における蛍光プローブの化学構造は、基質部分であるアセチルリジンを含むペプチドと、DNA 結合時に蛍光が増大する DNA 結合色素で構成される。HDAC の脱アセチル化反応により電荷的に中性のアセチルリジンが正電荷のリジンへと変換される。その結果、蛍光プローブが正電荷を帯び、負電荷を有する DNA と強く相互作用し蛍光が上昇する (図 1)。合成した蛍光プローブを DNA 存在下で HDAC の一種である SIRT1 と反応させたところ、蛍光が大きく上昇することを見出し、脱アセチル化反応のリアルタイム追跡が可能となった。この手法では核内の DNA を利用することができるため、細胞内の活性検出においては核からの蛍光シグナルの変化として検出が可能と考えられた。

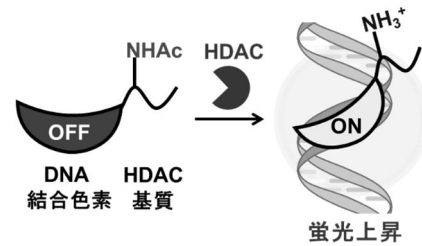


図 1. 蛍光プローブと DNA を用いた HDAC 活性検出法

2. 研究の目的

本研究ではがん、精神疾患等の疾患発症に関連する酵素、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の細胞内における活性を蛍光イメージングすることを目的とする。蛍光イメージングにあたり、HDAC の基質であるアセチルリジンと DNA 結合色素から構成される蛍光プローブを用いる。この蛍光プローブは基質の脱アセチル化に伴い、プローブの電荷状態が変化することで負電荷を有する DNA に結合し蛍光が上昇する性質を有している。本研究では以下の 3 つの項目について検討を進めた。

(1) 酵素と反応する基質部分の検討

HDAC は 4 つのクラスに分かれ、いくつかの種類が存在する。以前までに用いてきた基質部分のごく一部の HDAC としか反応が見られていなかった。そこで、基質部分の構造を検討し、より多くの種類の HDAC と反応するプローブを開発する。

(2) 蛍光プローブへの複数のアセチルリジンの導入

アセチルリジンの数を複数個導入することで、反応後、正電荷を帯びたリジンの数が増えることで DNA への結合能をさらに上昇し、蛍光シグナルを増大させることが可能である。そこで、複数個のアセチルリジンを基質に導入したプローブを開発する。

(3) 細胞核内の HDAC 活性の検出

(1)、(2) の結果を踏まえ、細胞核内の HDAC 活性の検出を行い、細胞イメージングによる活性検出を行う。

3. 研究の方法

(1) 酵素と反応する基質部分の検討

基質部分の検討として、HDAC の活性を効率よく抑制することが知られている阻害剤の構造を基質に導入し、新たな蛍光プローブを設計した。これまでに HDAC の阻害剤としてトリコスタチン A (TSA) や SAHA といった化合物が報告されており、これらは阻害能を示すアセチルリジンアナログの近傍に芳香環を有している。この部分は基質が結合するポケットの入り口に配置しており、周辺の疎水性のアミノ酸と相互作用していることが構造解析により示唆されている。そこで、アセチルリジンの近傍に芳香環を導入した新たな基質部分を設計、合成し、DNA 結合色素である BOXTO と繋げ、新たな蛍光プローブを合成した。各 HDAC を加え、反応性を蛍光測定と HPLC 分析により評価した。

(2) 蛍光プローブへの複数のアセチルリジンの導入

アセチルリジンを 2 つ、3 つ連続に基質へ導入したペプチドを固相合成し、DNA 結合色素である BOXTO と繋げ、プローブを合成した。合わせてリジンを 2 つ、3 つ連続に導入したプローブも合成した。DNA への結合能は融解温度の上昇によって評価し、蛍光検出における影響は実際

に酵素反応を行い評価した。

(3) 細胞核内の HDAC 活性の検出

細胞から HDAC を含む核フラクションを抽出し、プローブと反応し蛍光強度の変化を観察した。その後、培養細胞に蛍光プローブを添加し、核からの蛍光シグナルに変化が見られるかどうか蛍光顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) 酵素と反応する基質部分の検討

本年度では細胞内 HDAC 活性をイメージングするために、酵素と反応する基質部分の検討を行った。阻害剤の部分構造に着目し TSA に見られる N,N-ジメチルアミノベンゼンをアセチルリジンの C 末端側に導入した新規プローブを設計、合成した。この蛍光プローブを各 HDAC (HDAC1, 2, 3, 6, SIRT1) と反応させ、HPLC による生成物の分析を行った。このプローブは HDAC2, 3, 6, SIRT1 に対し反応性が確認できた。特に、これまでの基質構造では反応が見られなかった HDAC2 に対し高い反応性を示すことを発見した。また、DNA 存在下で酵素反応を行い、蛍光強度を測定したところ、反応性が確認された HDAC2, 3, 6, SIRT1 に対して蛍光の上昇を確認した。プローブを HDAC2 と反応させた前後の蛍光上昇比は 4 ~ 5 倍程度であり、HDAC2 の蛍光検出に成功した。DNA 結合色素の導入位置について検討したところ、酵素との反応性に若干の差は見られたものの、いずれも HDAC2 との反応後 1 時間程度で基質の消費を確認することができた。

(2) 蛍光プローブへの複数のアセチルリジンの導入

複数個のアセチルリジン、もしくはリジンを導入した蛍光プローブを合成した。DNA と混合し、融解温度の変化を測定した。アセチルリジンを導入したプローブでは DNA との相互作用がないため、融解温度はほとんど変化せず、複数個導入しても変化は見られなかった。一方で、リジンを導入したプローブでは、導入個数に応じて融解温度が約 10°C ずつ上昇した。この結果から、複数個のアセチルリジンの導入により、脱アセチル化反応後の DNA への相互作用の差を大きくできることが示された。続いて HDAC の一種である SIRT1 とプローブを反応し、DNA 存在下での蛍光強度を測定した。1 個導入したものは酵素反応後 6 倍程度の蛍光増大を示していたが、2 個、3 個と複数個導入することで、酵素反応後、28 倍の蛍光増大を示した (図 2)。したがって、HDAC 検出における turn-on 比を大きく向上することができ、これまでより短時間で SIRT1 活性を検出できることが明らかとなった。

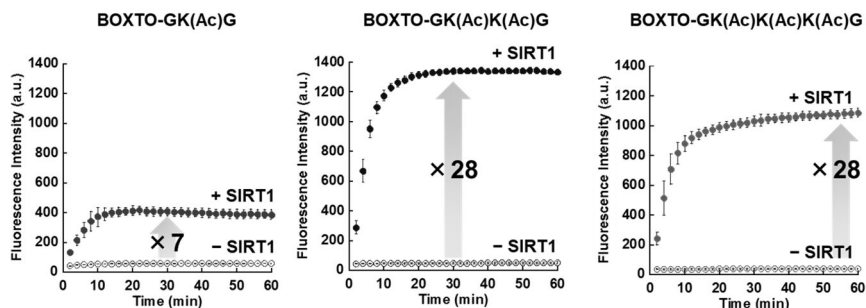


図 2. 複数のアセチルリジンを導入したプローブによる HDAC (SIRT1) 活性の評価

(3) 細胞核内の HDAC 活性の検出

HeLa 細胞から HDAC を含む核抽出液を調製し、(1) で開発した新たな基質を有するプローブと反応し、DNA 存在下での蛍光強度の変化を観察した。その結果、以前までのプローブでは見られなかった蛍光の上昇が見られた。実際に反応によるものかどうかを確認するために HPLC 分析を行ったところ、脱アセチル化体の生成が検出された。この結果から、新たに合成したプローブは細胞の核内の HDAC を検出できることが示された。この原因としては、基質部分の改変により検出可能な HDAC となったクラス I の HDAC2 が核内に豊富に存在していることに由来するものと考えられる。また、培養細胞に蛍光プローブを添加し、核からの蛍光シグナルに変化が見られるかどうか蛍光顕微鏡観察を行ったが、核からの蛍光シグナルは観察されなかった。プローブの核内への送達に問題があるものと考えられるため、今後はプローブの核送達を可能にするペプチドの導入等を進める予定である。

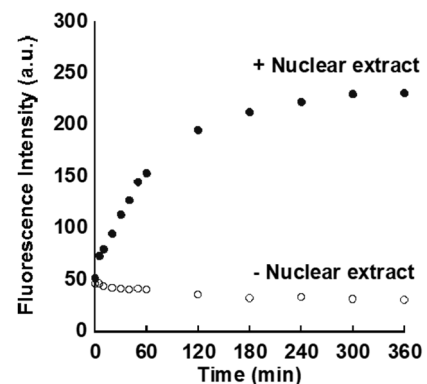


図 3. HeLa 核抽出液中の HDAC 活性の蛍光検出

本研究の遂行により、基質部位の改変により検出できる HDAC の種類を拡張し、核内の HDAC 活性を検出することに成功した。加えて、複数個のアセチルリジンの導入により蛍光検出における turn-on 比を向上し、より短時間で検出ができることを示した。今後、さらなるプローブの改良によって、細胞内での HDAC 活性のリアルタイム検出を達成し、環境変化におけるエピジェネティックなシグナルの変調をモニターすることや、疾患に対する HDAC 阻害剤の細胞ベースのスクリーニング系に展開することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Imoto Takuma, Kawase Akihiro, Minoshima Masafumi, Yokoyama Tatsushi, Bito Haruhiko, Kikuchi Kazuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Photolytic Release of a Caged Inhibitor of an Endogenous Transcription Factor Enables Optochemical Control of CREB-Mediated Gene Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 22 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b03568	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 Minoshima Masafumi, Kikuta Junichi, Omori Yuta, Seno Shigeto, Suehara Riko, Maeda Hiroki, Matsuda Hideo, Ishii Masaru, Kikuchi Kazuya	4. 巻 5
2. 論文標題 In Vivo Multicolor Imaging with Fluorescent Probes Revealed the Dynamics and Function of Osteoclast Proton Pumps	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1059 ~ 1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.9b00220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akazawa, Kazuki; Sugihara, Fuminori; Nakamura, Tatsuya; Matsushita, Hisashi; Mukai, Hiroaki; Akimoto, Rena; Minoshima, Masafumi; Mizukami, Shin; Kikuchi, Kazuya	4. 巻 57
2. 論文標題 Perfluorocarbon-based 19F MRI Nanoprobes for In Vivo Multicolor Imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed	6. 最初と最後の頁 16742-16747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie201810363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akazawa Kazuki, Sugihara Fuminori, Minoshima Masafumi, Mizukami Shin, Kikuchi Kazuya	4. 巻 54
2. 論文標題 Sensing caspase-1 activity using activatable 19F MRI nanoprobes with improved turn-on kinetics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11785 ~ 11788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8cc05381b	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 Kikuta Junichi, Shirazaki Mai, Sudo Takao, Mizuno Hiroki, Morimoto Akito, Suehara Riko, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya, Ishii Masaru	4. 巻 2
2. 論文標題 Dynamic Analyses of the Short-Term Effects of Different Bisphosphonates Using Intravital Two-Photon Microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 362 ~ 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm4.10057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura Yoshinobu, Kikuta Junichi, Kishi Yuika, Hasegawa Tetsuo, Okuzaki Daisuke, Hirano Toru, Minoshima Masafumi, Kikuchi Kazuya, Kumanogoh Atsushi, Ishii Masaru	4. 巻 77
2. 論文標題 In vivovisualisation of different modes of action of biological DMARDs inhibiting osteoclastic bone resorption	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1219 ~ 1225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2017-212880	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 Masafumi Minoshima, Kazuya Kikuchi	4. 巻 28
2. 論文標題 Development of fluorescent probes for bone imaging in vivo -Fluorescent probes for intravital imaging of osteoclast activity-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Calcium	6. 最初と最後の頁 187-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) ClCa1802187191	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 Ryota Sato, Jun Kozuka, Masahiro Ueda, Reiko Mishima, Yutaro Kumagai, Akimasa Yoshimura, Masafumi Minoshima, Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi	4. 巻 139
2. 論文標題 Intracellular Protein Labeling Probes for Multicolor Single-molecule Imaging of Immune Receptor-adaptor Molecular Dynamics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 17397-17404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b08262	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 Masafumi Minoshima, Kazuya Kikuchi	4. 巻 22
2. 論文標題 Photostable and Photoswitching Fluorescent Dyes for Super-resolution Imaging.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00775-016-1435-y	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 M. Minoshima, K. Kikuchi	4. 巻 -
2. 論文標題 hotostable and Photoswitching Fluorescent Dyes for Super-resolution Imaging	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Inorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00775- 016-1435-y	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14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 蓑島維文、大森雄太、菊地和也
2. 発表標題 機能性蛍光プローブを用いた骨溶解に関与する分子動態のin vivoイメージング
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蓑島維文、大森雄太、菊地和也
2. 発表標題 pH感受性蛍光プローブによる破骨細胞プロトンポンプ動態のin vivo観察
3. 学会等名 第27回バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 袁島維文、岨 稔康、菊地和也
2. 発表標題 発蛍光プローブを用いた可逆なタンパク質標識法の開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 袁島維文、大森雄太、菊地和也
2. 発表標題 pH感受性赤色蛍光プローブによる破骨細胞プロトンポンプ動態の生体イメージング
3. 学会等名 第13回日本ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 袁島維文、大森雄太、菊田順一、石井 優、菊地和也
2. 発表標題 pH感受性赤色蛍光プローブを用いた破骨細胞プロトンポンプ動態のイメージング
3. 学会等名 第13回分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minoshima, Masafumi; Omori, Yuta; Kikuchi, Kazuya
2. 発表標題 Intravital imaging of osteoclast V-ATPase function with pH-activatable red fluorescent probe
3. 学会等名 World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森雄太、前田拓樹、蓑島維文、菊地和也
2. 発表標題 pH感受性赤色蛍光プローブによる破骨細胞V-ATPase動態の生体内リアルタイムイメージング
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蓑島維文、佐藤亮太、小塚 淳、熊谷雄太郎、水上 進、菊地和也
2. 発表標題 蛋白質ラベル化プローブを用いた細胞内タンパク質の多色1分子イメージング
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第12回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蓑島維文
2. 発表標題 クロマチン修飾酵素の活性を検出する化学プローブ
3. 学会等名 第九回「光塾」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蓑島維文、大森雄太、前田拓樹、菊田順一、石井 優、菊地和也
2. 発表標題 pH感受性赤色蛍光プローブを用いた生体内破骨細胞活性リアルタイムイメージング
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 第12回総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蓑島維文、立松結花、松本哲明、菊地和也
2. 発表標題 DNA結合性蛍光プローブによるHDAC活性検出手法の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Masafumi Minoshima, Yuka Tatematsu, Tetsuaki Matsumoto, Kazuya Kikuchi
2. 発表標題 Development of DNA-binding fluorescent probe for detection of histone deacetylase activity
3. 学会等名 EMBO Conference 2016: Chemical Biology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 立松結花、蓑島維文、菊地和也
2. 発表標題 蛍光プローブとDNAを用いたHDAC活性検出法の開発
3. 学会等名 第25回日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大森雄太、前田拓樹、蓑島維文、菊地和也
2. 発表標題 生体内破骨細胞活性を検出するpH感受性赤色蛍光プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第97春季年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----