

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19492

研究課題名（和文）細胞内メチル化制御分子可視化のための蛍光プローブの開発と展開研究

研究課題名（英文）Development of fluorescence probe for visualization of in-cell methylation events

研究代表者

大高 章（OTAKA, Akira）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・教授

研究者番号：20201973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：蛍光発光による生体内反応可視化は重要な創薬基盤技術である。可視化すべき生体内反応としてメチル化があり、多くの生体現象に関与している。本研究では生体内メチル化反応の制御に関する酵素分子の機能を可視化する低分子蛍光プローブ分子を開発し、その応用展開を計ることを目的とした。検討の結果、メチル化反応を制御する酵素であるS-アデノシルホモシステイン（SAH）加水分解酵素（SAH hydrolase）の反応可視化を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内のメチル化反応は生体機能の恒常性維持に重要な働きをしており、メチル化の変調は各種疾患の発症に関与する。しかし、その重要性にも拘らず、メチル化現象を制御する酵素反応の可視化は達成されていない。そこで本研究はメチル化現象を細胞外から直接可視化するために必要とされる蛍光プローブ分子の開発を行うもので、細胞機能発現におけるメチル化の重要性解明に繋がり、その学術的意義は高い。さらに、将来的には各種疾患治療薬開発への道を拓くものであり、その社会的意義にも大きいものがある。

研究成果の概要（英文）：Fluorescence-imaging of in-cell reactions using organic compounds has advanced physiological analyses of cell functions. Imaging of the methylation events involved in a wide variety of functional regulations of cell has remained to be achieved. Attempted researches allows for visualization of SAH hydrolase activity which is closely associated with the methylation events.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生体内メチル化 蛍光プローブ分子 生体反応可視化 アデノシルホモシステイン

### 1. 研究開始当初の背景

DNA やヒストンに代表される生体分子のメチル化は、様々な生体イベントに関与しており、極めて重要な生体内反応である。この重要性にも拘らず、メチル化現象を可視化する方法論の開発は全く手付かずの状態であった。これは、メチル化や脱メチル化という生体内反応を、プローブ分子の発光に結び付けるための化学反応が見出されていなかったことに起因する。

### 2. 研究の目的

メチル化を司る SAM-MTase 3 による修飾反応は、がん、エピジェネティックな現象、さらにはウイルス、原虫増殖に深く関与する細胞内イベントである。そこで SAM-MTase 3 によるメチル化やこれを制御する他の酵素反応の高効率かつ細胞レベルでの可視化は、メチル化に関連した疾患を対象とする創薬の基盤技術となる。しかし、メチル化関連現象を可視化し得る低分子蛍光プローブ分子の開発は進んでいない。そこで本研究では生体内メチル化現象の制御に大きく関わっている酵素として、真核生物に広く存在する S-アデノシルホモシステイン (SAH) 加水分解酵素 (SAH hydrolase 1) を対象とし、その酵素機能の高効率かつ細胞レベルでの可視化に応用可能な低分子蛍光プローブ分子を開発し、その応用展開を計ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

メチル化は、図 1 に示すように、S-アデノシルメチオニン (SAM 2) をメチル基ドナーとして SAM-MTase 3 が触媒する反応であり、種々の制御がされている。さて、酵素反応により生じる S-アデノシルホモシステイン (SAH 4) は、SAM-MTase 3 を阻害する、すなわち SAH 4 の分解を司っている SAH hydrolase 1 を阻害すると SAH 4 の濃度上昇により生体内メチル化のキープレイヤーである SAM-MTase 3 の阻害につながる。このように SAH hydrolase 1 はメチル化の程度に影響を与える極めて重要な酵素である。さて、SAH hydrolase 3 の活性測定法として利用されている方法は、反応の結果生じたホモシステイン (HomoCys 5) やアデノシン 6 を定量するものであり、細胞系への適用が不可能である。In vitro 系においても生成物に構造類似の夾雑物が存在する場合、その信頼性は低いものとなる。このような状況下、SAH hydrolase 1 による反応の細胞内可視化を可能とする方法論が、応募者の従来の研究を基盤として構築可能であるとの着想を得た。SAH 4 から HomoCys 5 への反応は、S-アルキル体から SH 体への変換である。この S-脱アルキル化反応の可視化が従来の研究を基盤に可能であると考えた。

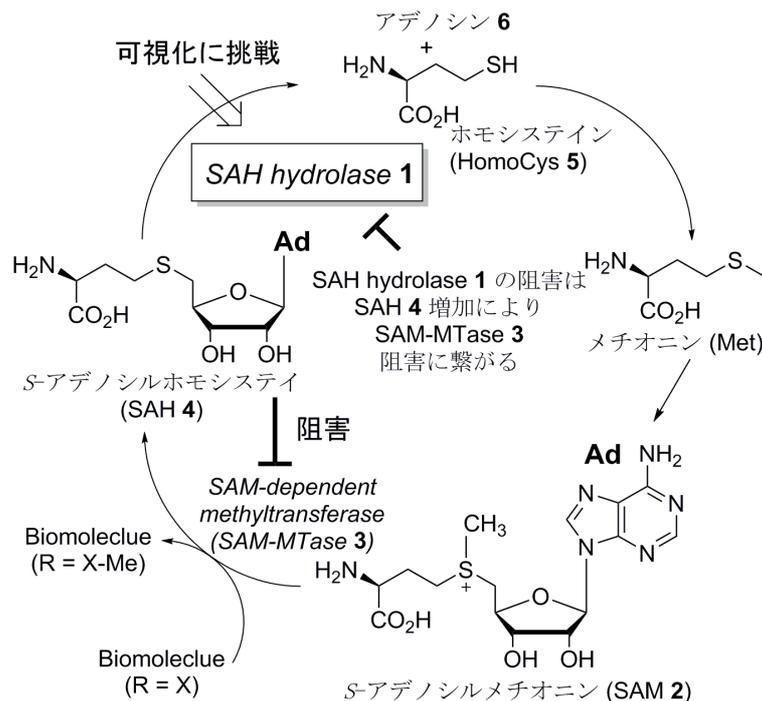


図 1 生体内メチル化に関する反応

本研究で利用する反応として図 2 に示した N-S アシル基転移反応の S-脱アルキル化による制御を用いる計画を当初立てた。我々は、これまでのタンパク質化学合成研究の過程でペプチドチオエステルの N-S アシル基転移反応を利用した合成法を確立してきた。図 2 に示した着想のコンセプトにおける化合物 8 から 9 への変換がまさにチオエステル合成に相当し、化合物 7 から 8 への SAH hydrolase による S-脱アルキル化反応を組み込み、本研究を提案した。

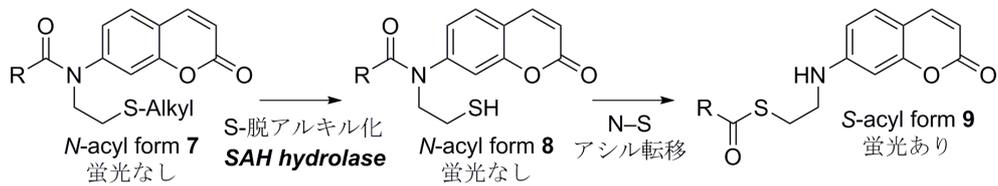


図2 着想のコンセプト

#### 4. 研究成果

上記図2で示した脱メチル化に伴いアシル転移が起こることで蛍光発光が期待できる SAH hydrolase 応答性蛍光プローブ分子の化学合成を行い、合成プローブ分子の酵素応答性について蛍光変化を追跡することで検討した。まず図3に従って当初予定した N-S アシル転移反応を基盤とするプローブ分子 14 の合成を行った。

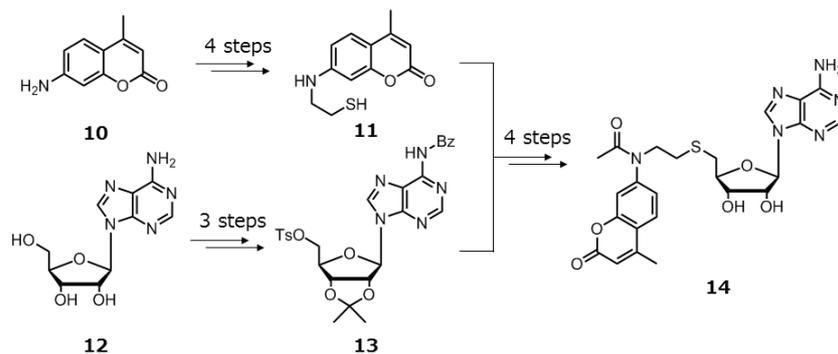


図3 プローブ分子 14 の合成の概略

プローブ分子 14 の酵素応答性 (ヒト及びトリパノソマ由来酵素) を検証したが、予想に反し、全く酵素応答性を示さないことが明らかとなった。そこで、分子のデザイン戦略として、図4に示すチラン形成を利用することとした。

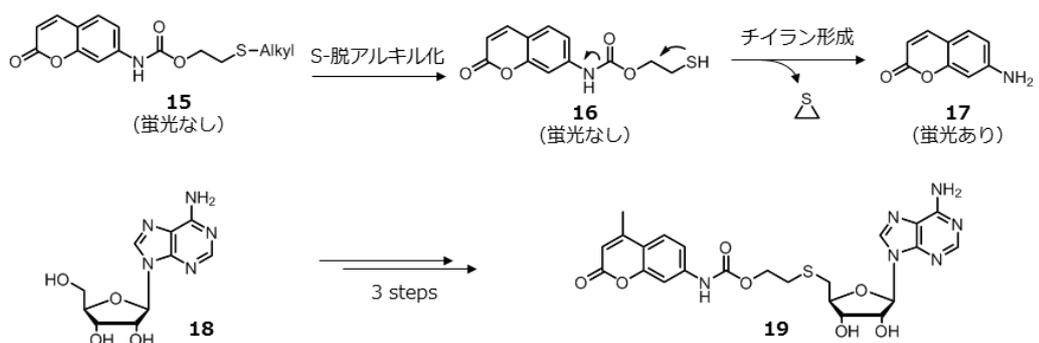


図4 チラン形成を利用した蛍光プローブ分子の設計概念とチラン型プローブ分子 19

またこれに基づいた蛍光プローブ分子 19 の合成を行い (図4)、その蛍光特性を N-S アシル転移型プローブ 14 と比較して検討した (図5)。

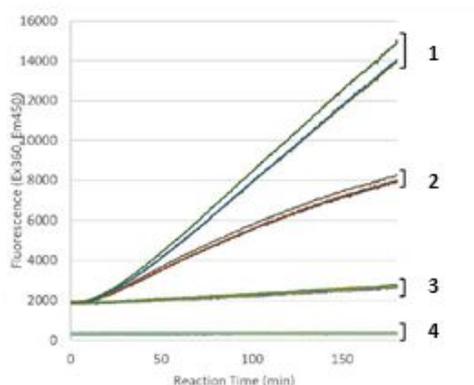


図5 プローブ分子 **14** および **19** の蛍光プローブ分子としての特性  
 1: **19** + Cys トリパノソーマ由来 SAH hydrolase; 2: **19** トリパノソーマ由来 SAH hydrolase; 3: **19** + Cys ヒト由来 SAH hydrolase; 4: **14**

チラン型プローブ分子 **19** について蛍光特性を精査したところ、ヒト由来酵素については、顕著な応答性は示さなかったものの、トリパノソーマ由来酵素については、その酵素活性を測定する蛍光プローブ分子として機能することを明らかにした。

生物種および構造によって基質として機能し得るかの差異は、図6に示すように酵素ポケットの構造が非常にタイトであることに起因するものと考えている。特に、ヒト酵素では、基質として受容性にかなりの制限があり、今後化合物デザインにおいて検討すべき事項である。

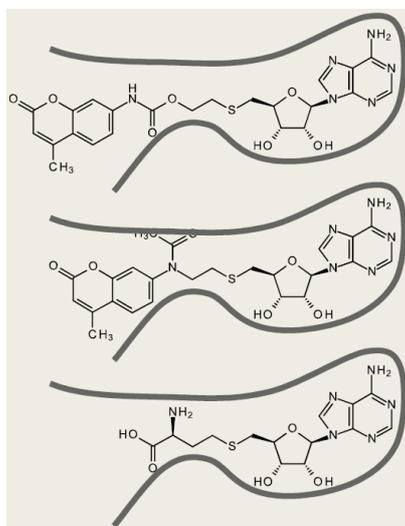


図6 基質結合サイトの模式図

当初の最終目標を達成するまでには至っていないが、SAH hydrolase の酵素活性を蛍光変化で追跡し得るプローブ分子の開発に成功した。これは、生体内メチル化現象に密接に関連する酵素の反応については初めての可視化成功例であり、今後の研究展開の指針となるものである。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- Inokuma, T.; Nishida, K.; Shigenaga, A.; Yamada, K.; Otaka, A. Direct Enantioselective Indolylolation of Peptidyl Imine for the Synthesis of Indolyl Glycine-Containing Peptides. *HETEROCYCLES* 査読有 97, **2018** 1269-1287. 10.3987/COM-18-S(T)86
- Mizuguchi, C.; Nakamura, M.; Kurimitsu, N.; Ohgita, T.; Nishitsuji, K.; Baba, T.; Shigenaga, A.; Shimanouchi, T.; Okuhira, K.; Otaka, A.; Saito, H. Effect of Phosphatidylserine and Cholesterol on Membrane-mediated Fibril Formation by the N-terminal Amyloidogenic Fragment of Apolipoprotein A-I. *Sci. Rep.* 査読有 8, **2018** 5497. 10.1038/s41598-018-23920-3
- Jichu, T.; Inokuma, T.; Aihara, K.; Kohiki, T.; Shigenaga, A.; Yamada, K.; Otaka, A. A recyclable hydrophobic anchor-tagged asymmetric amino thiourea catalyst. *ChemCatChem*. 査読有 10, **2018**

3402-3405. 10.1002/cctc.201800714

Yoshimaru, T.; Aihara, K.; Komatsu, M.; Matsushita, Y.; Okazaki, Y.; Toyokuni, S.; Honda, J.; Sasa, M.; Miyoshi, Y.; Otaka, A.; Katagiri, T. Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates antitumour activity for breast cancer therapeutics. *Sci. Rep.* 査読有 7, **2017** 1821.

10.1038/s41598-017-01951-6

Kohiki, T.; Kato, Y.; Nishikawa, Y.; Yorita, K.; Sagawa, I.; Denda, M.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Fukui, K.; Otaka, A. Elucidation of inhibitor-binding pocket of D-amino acid oxidase using docking simulation and N-sulfanylethylanilide-based labeling technology. *Organic & Biomolecular Chemistry* 査読有 15, **2017** 5289-5297. 10.1039/C7OB00633K

Kohiki, T.; Nishikawa, Y.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A. Chemical synthetic platform for chlorpromazine oligomers that were reported as photo-degradation products of chlorpromazine.

*Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 査読有 65, **2017** 1161-1166. 10.1248/cpb.c17-00692

[学会発表](計16件)

Shigenaga, A.; Morisaki, T.; Kohiki, T.; Denda, M.; Inokuma, T.; Otaka, A. Development of acyl transfer-based chemical biology tools for purification/selective labeling of target proteins. *5th International Symposium for Medicinal Sciences* 2019年03月22日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

Kohiki, T.; Kato, Y.; Denda, M.; Nishikawa, Y.; YORITA, K.; Sagawa, I.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Fukui, K.; Otaka, A. Development and application of novel protein labeling reagent SEAL. *10th International Peptide Symposium* 2018年12月06日、ROHM Theatre Kyoto and Miyakomesse (Kyoto)

森崎 巧也、重永 章、大高 章、SECmideを基盤としたターンオン型蛍光クリーバブルリンカーの開発 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 2018年11月10日、米子コンベンションセンター BIG SHIP 他(鳥取県米子市)

榊原 拓哉、猪熊 翼、重永 章、大高 章、山田 健一、非天然側鎖構造を有する -アミノリン酸の実用的不斉合成 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 2018年11月10日、米子コンベンションセンター BIG SHIP 他(鳥取県米子市)

金山 忠史、奥平 桂一郎、大川内 健人、清水 太郎、重永 章、大高 章、石田 竜弘、人工 HDL の化学的性状と体内動態への影響に関する検討 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 2018年11月10日、米子コンベンションセンター BIG SHIP 他(鳥取県米子市)

猪熊 翼、岡田 和貴、西田 航大、重永 章、大高 章、山田 健一、ペプチドイミンに対する不斉 1,2-付加を基盤とする非天然アミノ酸含有ペプチドの不斉合成 第44回反応と合成の進歩シンポジウム 2018年11月05日、市民会館シアーズホーム夢ホール(熊本県熊本市)

Kato, Y.; Maita, N.; Kohiki, T.; Kurosawa, S.; Nishikawa, Y.; Sagawa, I.; Denda, M.; Inokuma, T.; Shishido, Y.; YORITA, K.; Shigenaga, A.; Otaka, A.; Fukui, K. Combined approach of computation and enzymology to investigate novel D-amino acid oxidase inhibitors. *The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences joint with the 3rd Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine and the 28th Hot Spring Harbor Symposium* 2018年10月18日、Main Hall, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine in the Hospital Campus of Kyushu University (Fukuoka)

中西 雅之、古曳 泰規、重永 章、大高 章、田中 信忠、北出 幸夫、日野 真美、野元 裕、S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素の蛍光性基質の開発 第91回日本生化学会大会 2018年09月24日、国立京都国際会館(京都府京都市)

Inokuma, T.; Nishida, K.; Shigenaga, A.; Yamada, K.; Otaka, A. Novel methodology for the synthesis of-indolyl-glycine containing peptide via direct asymmetric Friedel-Crafts reaction to peptidyl imine. *35th European Peptide Symposium* 2018年08月27日、Helix Conference Centre (Dublin, Ireland)

森崎 巧也、中山 淳、難波 康祐、重永 章、大高 章、トレーサブルリンカー を用いた共有結合性低分子の標的同定 第50回若手ペプチド夏の勉強会 2018年08月06日、方広寺(静岡県浜松市)

安養寺 啓太央、粟飯原 圭祐、吉丸 哲郎、重永 章、片桐 豊雅、大高 章、がん抑制タンパク質 PHB2 からの創薬リード発掘 第50回若手ペプチド夏の勉強会 2018年08月06日、方広寺(静岡県浜松市)

榊原 拓哉、猪熊 翼、重永 章、大高 章、山田 健一、安定なイミンを用いた -アミノリン酸の実用的不斉合成 創薬懇話会 2018 in 志賀島 2018年06月21日、志賀島休暇村(福岡県福岡市)

加藤有介、古曳泰規、西川祐輔、佐川幾子、傳田将也、猪熊 翼、宍戸裕二、重永 章、大高 章、福井 清、DAO 分子表面に結合する阻害分子の計算科学的解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年12月07日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

古曳泰規、加藤有介、西川祐輔、頼田和子、佐川幾子、傳田将也、猪熊 翼、重永 章、福井 清、大高 章、N-S アシル基転移を基盤としたタンパク質ラベル化法を用いた D-アミノ酸化酵素阻害剤の結合サイト解明研究 第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本大学病院薬剤師会中国四国支部学術大会 2017 年 10 月 21 日、徳島大学蔵本キャンパス（徳島県徳島市）

Otaka, A. Development of anti-breast cancer stapled peptides targeting BIG3-PHB2 interaction. *AIMECS 2017* 2017 年 07 月 26 日、Melbourne Convention and Exhibition Centre(Melbourne, Australia)

YORITA, K.; Kurosawa, S.; Yoshida, Y.; Kashiwada, Y.; Sano, S.; Otaka, A.; Fukui, K. Screening of the effectors for human D-amino acid oxidase and the analyses of structure-activity relationships. *The 19th triennial International Symposium on Flavins and Flavoproteins* 2017 年 07 月 03 日、the Groninger Forum (Groningen, The Netherlands)

## 6 . 研究組織

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、研究者個人に帰属されます。