

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790127

研究課題名（和文）新規蛍光プローブを利用した、ヒストンメチル化酵素阻害剤スクリーニング系の開発

研究課題名（英文）Development of the method for screening histone methyl transferase inhibitors utilizing the novel fluorescent probe.

研究代表者

森 修一（MORI SHUICHI）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・特任助教

研究者番号：00467630

研究成果の概要（和文）：

ヒストンメチル化酵素(HMT)は各種生命現象に関わっており、その阻害剤は薬剤候補分子として期待されている。当研究では HMT 阻害剤開発に有用な、安価で簡便な HMT 活性の評価手法を開発した。HMT はヒストン蛋白質のリジン残基をメチル化するが、我々はリジンとメチル化リジンの化学的性質の違いを識別することで、メチル化リジンの量を測定することに成功した。さらに、より感度の高いメチル化リジン定量法の開発を目指し、この化学的性質の違いを蛍光応答によって検出することを試みた。

研究成果の概要（英文）：

Histone methyltransferase (HMT) plays important roles in physiological conditions. Selective inhibitors of HMT are expected as potent drug candidate. In this study, we developed the inexpensive and easy method to evaluate the HMT activity, which is helpful in developing the HMT inhibitors. We succeeded in estimating the amount of methylated lysine which is the product of HMT-catalyzed reaction, by discriminating the difference of chemical property-between of lysine and of methylated lysine. Furthermore, we tried to develop the method for highly sensitive detection of methylated lysine based on the fluorescent response reflecting the chemical property of methylated lysine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：エピジェネティクス、ヒストンメチル化酵素、SNAr 反応、蛍光プローブ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒストンメチル化酵素 (HMT) は、ヒストンタンパク質のメチル化を触媒する酵素であり、各種生命現象や疾患との関連が示唆されている。HMT には様々なサブタイプが存在するが、サブタイプごとに修飾するリジン残基の位置が異なっており、それぞれの修飾位置によって遺伝子発現に様々な影響を与

えていると考えられている。HMT の生理作用の詳細な解明のためには、それぞれの HMT の選択的な阻害剤が有用なケミカルツールとなりうるが、その開発例は限られている。それらの開発例の多くは HMT の活性評価に ELISA を用いているが、用いる抗体が高価である、抗体の状態によって結果に差異が生じてしまうなどの問題点があり、より安価で簡

便な HMT の活性評価手法が望まれている。

## 2. 研究の目的

以上の背景を基に、当研究では抗体などのタンパク質を用いない HMT の新規活性評価法を開発し、HMT 阻害剤のスクリーニング系に応用することを目的とした。具体的には以下の3つに分類される

### (1) リジンとメチル化リジンを化学的に識別する反応系の探索

アミノ基の定量法である TNBS 法を基に、リジンとメチル化リジンの各種ニトロベンゼン誘導体に対する  $S_NAr$  反応における反応性の差に着目し、リジン、メチル化リジンにおける反応性の差が最も大きくなるような条件の探索を行う。

### (2) 新規蛍光プローブの開発

(1)において得られた知見を基に、リジンとメチル化リジンを識別することができる蛍光プローブの開発を行う。

### (3) HMT 阻害剤スクリーニング系の構築

開発した蛍光プローブを利用して、HMT の新規活性測定法の開発、さらには HMT 阻害剤のスクリーニング系の構築を行う。具体的にはヒストンの部分ペプチドを基質として使い、HMT によってメチル化されたリジンの割合を蛍光プローブによって算出できるような評価系を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) リジンとメチル化リジンを化学的に識別する反応系の探索

N 末端アミノ基を保護した、Cbz-Lys-OH(1)、Cbz-Lys(Me)-OH(2)をモデル基質として使い、様々な構造を持つニトロベンゼン誘導体(3)との  $S_NAr$  反応について、その反応初速度を比較した。反応は重溶媒中で行い、 $^1H-NMR$  によって反応を追跡し、反応速度を測定した。また、それぞれの反応生成物(4,5)を別途合成し、それらの吸光度測定を行った。

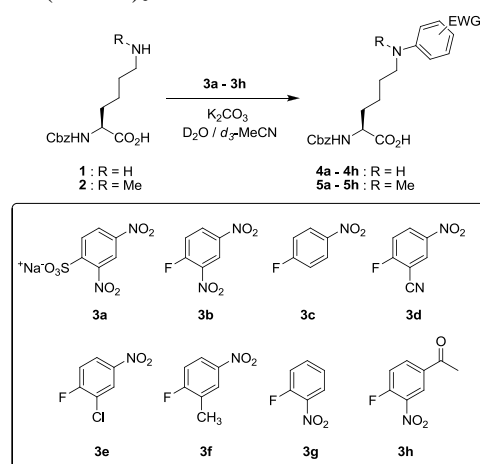
### (2) 新規蛍光プローブの開発

得られた知見を基に、メチル化リジンを選択的に認識する蛍光プローブの開発を行った。具体的には、ニトロベンゼン部位と蛍光色素である BODIPY を結合させた分子群を設計・合成した。これらは電子密度の低いニトロベンゼン部位の影響で蛍光をもたないが、ニトロベンゼンにリジンのアミノ基が求核攻撃することによって、ニトロベンゼン部位の電子軌道エネルギーが上昇し、蛍光強度が増加することを意図して設計した。

## 4. 研究成果

### (1) リジンとメチル化リジンを化学的に識別する反応系の探索

1、2 をモデル基質として使い、求電子剤として 3a-3h の 8 種類のニトロベンゼン誘導体を用いた際の  $S_NAr$  反応について、その反応初速度を比較した。その結果、1、2 の反応速度はニトロベンゼン誘導体の構造に大きく影響を受け、脱離基としてスルホン酸を用いた基質 3a においては、1 選択的に反応が進行した一方、脱離基としてフッ素を用いた場合は、2 選択的に反応が進行した。脱離基としてフッ素を持つ 3b-3h においては、芳香環上の置換基の種類が 2 の選択性の大きさに影響を与えることが明らかとなった。特に 4-fluoro-3-nitroacetophenone (3h) は反応選択性が高く、2 との反応速度は 1 の約 17 倍であった(Table 1)。



Scheme 1 1,2 を基質として  $S_NAr$  反応

Table 1 各求電子剤 (3a-3h) を用いた際の 1,2 の反応速度 ( $V_1$ ,  $V_2$ ) の比較

求電子剤	3a	3b	3c	3d
温度 (°C)	60	20	60	20
$V_1$ (mM/min)	0.098	5.0	0.002	0.13
$V_2$ (mM/min)	0.0013	38	0.018	1.5
$V_2/V_1$	0.013	7.5	9.0	12

求電子剤	3e	3f	3g	3h
温度 (°C)	20	60	60	20
$V_1$ (mM/min)	0.022	0.0037	0.012	0.19
$V_2$ (mM/min)	0.044	0.00028	0.041	3.2
$V_2/V_1$	2.0	0.77	3.4	17

これら  $S_NAr$  反応の反応性検討については、研究計画当初の予定よりも多くの時間を割いて行った。過去の研究においてアミンの  $S_NAr$  反応については、求電子剤として 1-Chloro-2,4-nitrobenzene を用いた際に、一級

アミンよりも二級アミン選択的に反応が進行することが示されているが、今回のように、求電子剤の構造が選択性に及ぼす影響を検討した例はなく、有機反応論的にも大変興味深い結果が得られたものと思われる。

## (2) 吸光度を利用したメチル化リジンの検出

(1)で検討した  $S_NAr$  反応における、生成物 (**4a-4h**, **5a-5h**)を別途合成し、それらの吸光度測定を行った。その結果、求電子剤として **3h** を用いた際の生成物である **4h**, **5h** は、そのスペクトル波形が大きく異なることがわかり、**4h** と **5h** は 350 nm 付近の吸光度において 13 倍の差があることが示された。(Figure 1)

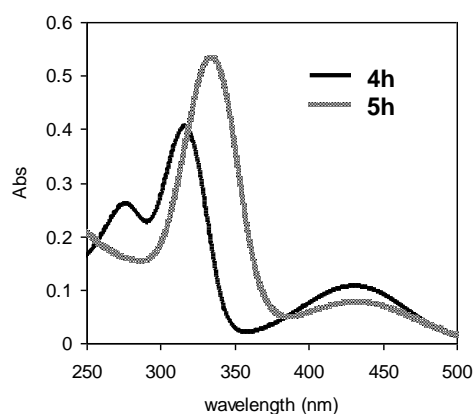


Figure 1 炭酸塩バッファー中における **4h**, **5h** の UV スペクトル

ここで、**1**, **2** の **3h** に対する反応速度の差 (17 倍) と、反応生成物の 350 nm における吸光度の差 (13 倍) を利用することによって、**1** と **2** の割合を算出できるのではないかと考えた。そこで、**1, 2** を任意に混合した系に対して **3h** を反応させ、一定時間ごとに反応を停止させた後で吸光度測定を行った。

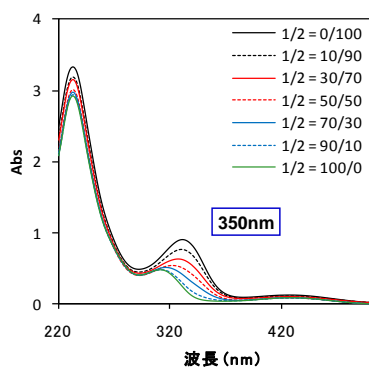


Figure 2 反応 30 分後の吸光スペクトル

上記スペクトルの 350 nm における吸光度の値から、**1** と **2** を任意に混合した系の両者の割合を算出することに成功した (Table 2)。

Table 2 吸光度による **1, 2** の混合率の算出

実際の混合比 (%)	吸光度によって算出した混合比 (%)		
	反応時間		
	15 min	20 min	30 min
0	1.3	1	0.2
10	11	12	9
30	30	31	29
50	51	55	44
70	63	76	61
90	85	101	81
100	100	100	100

以上より、リジンとメチル化リジンの化学的性質の差 ( $S_NAr$  反応における反応選択性、生成物の吸光度の差) を利用することによって、メチル化リジンを定量することに成功した。

## (3) $S_NAr$ 反応の選択性を利用した蛍光プローブの開発

より高感度な検出法の開発を目指して、 $S_NAr$  反応の検討によって得られた知見を基に、メチル化リジンを選択的に検出可能な蛍光プローブの創製を目指した。(1)において最も **2** 選択性が高かった **3h** を基に、蛍光色素である BODIPY を骨格とした分子を設計した (Figure 3)。設計した分子は、電子の軌道エネルギーが低いニトロベンゼン部位を持つため、光によって励起された一重項電子がニトロベンゼン部位に移動することによって蛍光が消光されることが期待される (*d*-PET 機構)。これに対して、リジンのアミノ基が  $S_NAr$  反応で置換されると、ニトロベンゼン部位の軌道エネルギーが大きくなることで *d*-PET 機構が解消され、蛍光が回復するようになると考えられる。**3h** を基にした部位を導入することで、メチル化リジン選択的に置換反応と蛍光回復が生じるような蛍光プローブの創製が可能であると思われる。以上の設計を基に、BODIPY の 2 位、6 位に 4 種類の置換基をもつ蛍光プローブ **6a-6d** と、それらにリジンと同様のアルキルアミノ基を置換させた **7a-7d**, **8a-8d** の合成を試みた。

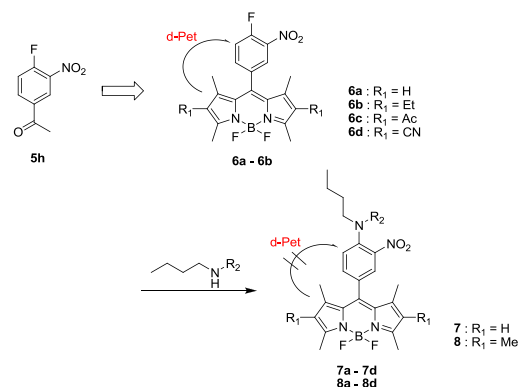


Figure 3 蛍光プローブの設計

**6a**、**6b** とそれらのアミン置換体は、酸クロライドを経由する BODIPY 合成法で合成することができた。これらの蛍光スペクトル測定を行ったところ、**6a**、**6b** は、ニトロベンゼンを持たない BOIPY(**9**)と比較して蛍光強度が非常に小さく、期待通りに *d*-PET 機構が作用していることが示唆された。しかしながら、これらにアミノ基を導入した **7a**、**7b**、**8a**、**8b** も蛍光強度は非常に低いことが分かった (Figure 4)。

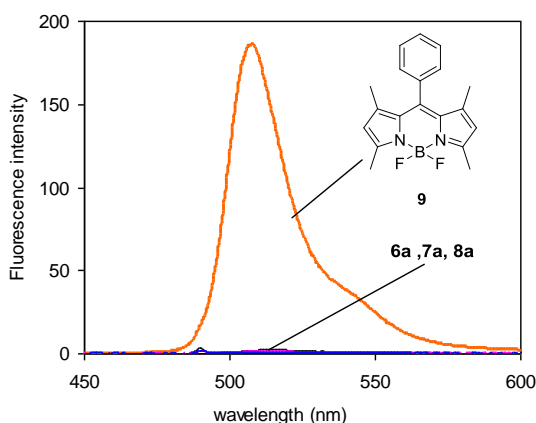


Figure 4 合成したプローブの蛍光スペクトル

この結果は、BODIPY 部分と比較してニトロベンゼン部位の電子軌道エネルギーが小さすぎるために、アミノ基が置換されても *d*-PET 現象が十分に解消されなかったためと考えられる。BODIPY 部分とニトロベンゼン部分の軌道エネルギー順位差が小さくなれば、*d*-PET 現象の解消が起こりやすくなると考え、BODIPY 部分に電子吸引基を持つ **6c**、**6d** を設計し、複数の合成ルートで合成を試みたが、これらを得ることは出来なかった。

そこで現在、新しい分子設計に基づく蛍光プローブの合成を行っている。具体的には BODIPY のメソ位からフェニル基のリンカーを介してニトロベンゼン部位をアミド結合で連結した分子群である。これらの系統的な合成法が確立されれば、BODIPY 骨格 2 位、6 位の置換基の種類によって、蛍光の ON/OFF を調整することが可能になると考えている。

#### (4) 研究全体の総括

研究の進展の中で、 $S_NAr$  反応におけるリジン、メチル化リジンの反応性の差異、反応性生物 **4h**、**5h** の吸光度の差異など、学術面・応用面において大変興味深い現象が観察されたため、当初の予定とは異なり、蛍光プローブやスクリーニング系構築への展開に進む前に、これらの基礎的知見を詳細に検討した。その結果、 $S_NAr$  反応の一級アミン、二級アミンの選択性に及ぼす、求電子剤の構造の影響など、重要な知見を得ることができた。

$S_NAr$  反応は有機化学における基礎的な反応であるにも関わらず、非芳香族の求核置換反応と比べて反応性における理解度は十分であるとは言えない。今回得られた知見は、有機反応論的側面においてもその波及効果は大きいものと考えられる。

蛍光プローブの開発や、スクリーニング系の構築においては、研究機関内には当初の計画通りには進展できなかった。これらに関しては、(3)で述べた新しく設計した蛍光プローブを基に、今後一年を目処に成果を出していきたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Discrimination between lysine and N- $\epsilon$ -methyllysine using  $S_NAr$  reactions : Shuichi Mori, The 2nd HD Physiology International Symposium, Jun, 29, 2013, Tokyo.
- 2)  $S_NAr$  反応を利用したリジン・メチル化リジンの識別 : 藤原敬士, 日本ケミカルバイオロジー学会第八回年会, 2013 年 6 月 19 日~21 日, 東京
- 3)  $S_NAr$  反応を利用したリジン・メチル化リジンの識別 : 高口明日香, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日, 横浜
- 4) リジンとメチル化リジンの  $S_NAr$  反応における反応性の検討 : 日本薬学会第 133 年会, 2012 年 3 月 30 日, 札幌

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 修一 (SHUICHI MORI)

東京医科歯科大学学生体材料工学研究所  
特任助教

研究者番号 : 00467630