



| | |
|--------------|---|
| Title | Development of Small-Molecule Compounds for the Chemical Modulation of LSD1 Phosphorylation |
| Author(s) | Hu, Chenliang |
| Citation | 大阪大学, 2025, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/103242 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

| | |
|---|---|
| Name (Chenliang Hu) | |
| Title | Development of Small-Molecule Compounds for the Chemical Modulation of LSD1 Phosphorylation (LSD1を標的としたリン酸化制御化合物の開発) |
| <p>Abstract of Thesis</p> <p>Lysine-specific demethylase 1 (LSD1), as an essential epigenetic regulator, modulates gene expression through both its enzymatic demethylation activity and non-catalytic functions. While numerous LSD1 inhibitors have been developed for cancer therapy, growing evidence suggests that catalytic inhibition alone is insufficient to fully suppress its oncogenic functions. In particular, phosphorylation of LSD1 has emerged as a key regulatory mechanism that governs its subcellular localization, chromatin binding, and interactions with transcriptional complexes. Therefore, targeting the phosphorylation state of LSD1 offers an alternative route to modulate its activity and biological functions.</p> <p>This thesis explores a proximity-based chemical strategy to modulate the phosphorylation status of LSD1 by recruiting kinases or phosphatases using bifunctional small molecules.</p> <p>In the first part of the study, a series of chimeric compounds were synthesized by conjugating a selective LSD1 inhibitor to an AMP-activated protein kinase (AMPK) activator, with the goal of inducing site-specific phosphorylation of LSD1. Among them, compound 2-25g effectively promoted LSD1 phosphorylation in vitro, and suppressing the proliferation of MCF-7 breast cancer cells. Mechanistic investigations confirmed the formation of a ternary complex between LSD1 and AMPK in the presence of 2-25g. It is hypothesized that phosphorylation interferes with LSD1-mediated protein–protein and protein–RNA interactions, thereby disrupting oncogenic epigenetic assemblies and altering chromatin dynamics.</p> <p>In the second part of the study, dephosphorylation-inducing molecules were developed by coupling a Protein phosphatase 5 (PP5)-recruiting moiety with an LSD1-binding scaffold with different linker length. Among these, compound 3-19b reduced phosphorylation of LSD1 at Ser112 in MCF-7 cells. Functional assays demonstrated that 3-19b significantly inhibited cancer cell migration, as shown in a scratch-wound healing assay. This anti-migratory effect was further associated with a dose-dependent downregulation of β-catenin, implicating inhibition of the epithelial–mesenchymal transition (EMT) as a potential mechanism of action.</p> <p>Collectively, this work demonstrates the feasibility of chemically regulating LSD1 phosphorylation through enzyme recruitment, providing a versatile platform for modulating the non-catalytic functions of chromatin regulators. The compounds developed in this study may serve as useful chemical tools to probe the biological significance of LSD1 phosphorylation, and offer a conceptual advancement toward precision epigenetic therapeutics that target post-translational modifications rather than catalytic sites alone.</p> | |

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏名 (Chenliang Hu) | | |
|-------------------|-------|------|
| 論文審査担当者 | (職) | 氏名 |
| | 主査 教授 | 鈴木孝禎 |
| | 副査 教授 | 北條裕信 |
| | 副査 教授 | 樺山一哉 |

論文審査の結果の要旨

リシン特異的脱メチル化酵素1 (LSD1) は、重要なエピジェネティック調節因子として、酵素的脱メチル化活性と非触媒的機能の両方を通じて遺伝子発現を調節する。がん治療のために数多くのLSD1阻害剤が開発されてきたが、LSD1の触媒機能を阻害するだけでは、その発がん性機能を完全に抑制するには不十分であるという証拠が蓄積されている。一方で、LSD1のリン酸化は、その細胞内局在、クロマチン結合、および転写複合体との相互作用を制御する重要な調節メカニズムとして知られている。そこで学位申請者は、キナーゼまたは fosfotransferase をリクルートすることにより LSD1 のリン酸化状態を調節し、LSD1 の活性と生物学的機能を制御する手法の開発を行った。

まず、LSD1選択的阻害薬を AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 活性化剤と結合させることで、LSD1 の局所的リン酸化を誘導することを目的とした一連のキメラ化合物を設計・合成した。合成化合物の中で、化合物 2-25g は *in vitro* で LSD1 のリン酸化を効果的に促進し、MCF-7 乳がん細胞の増殖を抑制した。作用メカニズム解析を行ったところ、2-25g の存在下で LSD1 と AMPK の三量体複合体の形成が確認された。リン酸化が LSD1 介在のタンパク質間およびタンパク質-RNA 相互作用を妨げ、これにより腫瘍性エピジェネティック複合体を破壊し、クロマチン動態を変化させることが抗がんメカニズムの一つであると考えられた。

つぎに、タンパク質脱リン酸化酵素5 (PP5) をリクルートする化合物を LSD1 選択的阻害薬に結合させたキメラ化合物を脱リン酸化誘導剤として、設計、合成した。これらの合成化合物の中で、化合物 3-19b が MCF-7 細胞において LSD1 の Ser112 におけるリン酸化を減少させた。3-19b の薬理活性評価を行ったところ、3-19b が傷治癒アッセイにおいてがん細胞の移動を著しく抑制することが分かり、本化合物は乳がん転移阻害剤として有効であることが示された。この抗移動効果は、 β -カテニンの発現低下と相関し、上皮間葉移行 (EMT) の阻害がメカニズムの一つとして示唆された。

以上のように、リン酸化酵素/脱リン酸化酵素をリクルートすることにより、LSD1 のリン酸化を化学的に調節することで、LSD1 の活性を制御することの有効性が示された。本手法は他の酵素にも適用可能であり、一般性のある新たな酵素機能制御法となりうる。

本研究は膨大な実験量に基づく新規な LSD1 リン酸化制御剤の創製研究であり、本専攻の博士論文研究に相応しい業績である。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。