

Title	ヒストン修飾酵素の活性を検出する蛍光プローブの開発と応用
Author(s)	堀, 雄一郎; 菊地, 和也
Citation	大阪大学低温センターだより. 2012, 158, p. 9-13
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/3621">https://hdl.handle.net/11094/3621</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# ヒストン修飾酵素の活性を検出する 蛍光プローブの開発と応用

工学研究科 †堀 雄一郎（内線7925）

菊地 和也

† E-mail: horiy@mls.eng.osaka-u.ac.jp

## 1. はじめに

ヒストン\*の化学修飾は、クロマチン\*の構造変化を引き起こすことで遺伝子発現を制御する重要な役割を担っている。この修飾反応のうち、ヒストンに存在するリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基をアセチル化・脱アセチル化する反応は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）・ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）という酵素によってそれぞれ触媒される<sup>[1]</sup>。これらの酵素は、遺伝子発現の制御を通して、細胞の増殖・分化・恒常性の維持に深く関与することが知られている<sup>[2,3]</sup>。特に、HDACは癌や生活習慣病、中枢神経疾患にも関わり、医薬品の主要な標的酵素となっていることから、医学・創薬の分野で極めて大きな注目を集めている<sup>[2,4]</sup>。一方で、その重要性にも関わらず、HDACの活性を簡便・迅速に測定する手法は限られているのが現状である。現在知られているHDAC活性検出法としては、抗体や放射性同位体を用いる方法があげられる<sup>[5,6]</sup>。抗体を用いる免疫学手法は検出に洗浄操作などの多段階のステップを要するという問題があり、放射性同位体による手法は多段階ステップの操作が検出に必要なことに加え放射性分子の取り扱いに制限がある。近年では、ペプチドに蛍光色素をつないだ蛍光プローブが開発されており、HDAC活性を蛍光強度の上昇で検出できるようになっている<sup>[7]</sup>。しかしながら、このプローブの問題は、HDACとの反応のみでは活性を検出できず、HDACとの反応後プローブのプロテアーゼ処理を蛍光検出に必要とすることである。このため、HDAC活性を直接検出することができない。

我々は、これらの問題を解決することを目的として、一段階の操作で簡便にHDACの活性を蛍光検出することのできる合成プローブの開発を行った。

## 2. HDAC蛍光プローブの設計

我々は、分子設計を行ううえで、脱アセチル化反応に伴う化学的変化のなかでも、基質であるアセタミドと反応産物であるアミンの求核性の違いに着目した。基本的かつ重要な点は、アセタミドは求核性がほとんどないのに対し、酵素反応により生成するアミンは求核性が高いということであ

---

\*この印の付いている語は、後に「用語説明」があります。

る。このことから、分子内に求電子性の官能基が存在すると酵素反応後にのみ、アミンによる分子内求核反応が引き起こされると考えた。このとき、蛍光色素に求電子性官能基を組み込み、アミンと反応することで蛍光特性が変化するように分子設計しておけば、HDAC活性を検出できると期待したわけである。即ち、HDAC反応前は、不活性なアセタミドのため色素部位とは反応しないが、酵素反応によりアミンが生成すると求核性が上昇し色素部位と反応することで色素の蛍光特性が変化すると考えた(図1)。

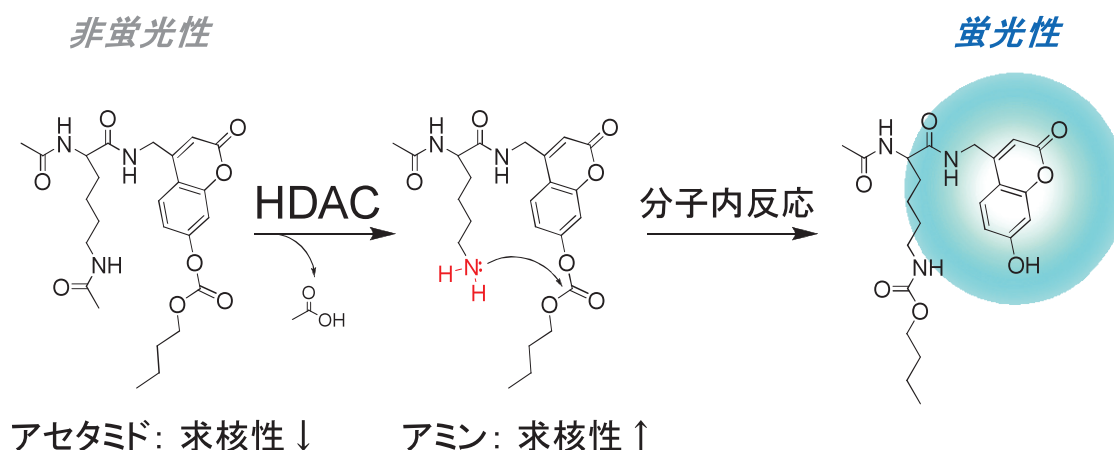


図1. 新規蛍光プローブによるHDAC活性の検出原理。

具体的には、アセチルリジンからなる基質構造をHDACの基質部位として、7-ヒドロキシクマリンを蛍光色素部位として組み込んだ分子を設計した。さらに、酵素反応後に生成するアミンと反応するように、7-ヒドロキシクマリンの7位のヒドロキシ基を求電子性反応基である炭酸エステルに変換した。ここで重要なことは、7位を炭酸エステル化したクマリンは非蛍光性となることである。また、予測どおり酵素反応が起こり生成したアミンとこの色素の炭酸エステル部位が反応した場合、炭酸エステルは分解され7-ヒドロキシクマリンが生成し蛍光性となると考えられる。我々は、この蛍光プローブ(KAc-CCB)を化学合成した。

### 3. 分子内反応のHPLC解析

設計したプローブが酵素と反応し、実際に分子内反応を引き起こすかをHPLCにより解析した。まず、酵素反応の前に予備実験として、アセチルリジンのかわりに通常のリジンをもつ分子K-CCB(酵素反応産物に相当する分子)を合成し、この分子内で求核反応が進行するかを調べた。その結果、K-CCBのピークが一定時間後に減少し、新たなピークが保持時間22分付近に出現した(図2a)。その溶出液をESI-MSにより解析したところ、このピーク由来の分子は分子内求核反応産物であることが示された。このことから、K-CCBの分子内でアミンと色素の炭酸エステル部位が反応することが明らかとなった。次に、酵素反応の解析をHPLCにより行った。HDACの一種であるHDAC3とプローブKAc-CCBを混合した静置したところ、複数の新しいピークが現れた(図2b)。ESI-MSの結果から、17分付近のピークはプローブのアセチルリジンが脱アセチル化されたもので

あり、22分付近のピークは前述した分子内反応産物と同じ分子であった。また、これ以外にも炭酸エステルの加水分解により生じたピークが得られた。一方、KAc-CCBを酵素非存在下で緩衝液中で静置し解析したところ、酵素存在下で見られた脱アセチル化体や分子内反応産物は検出されなかった。したがって、アセチルリジンのアセタミドは反応性が低く分子内反応を引き起こさなかったと考えられる。以上の結果から、KAc-CCBは、HDACと反応し脱アセチル化され分子内反応を引き起こしたと考えられた。

#### 4 . HDAC活性の蛍光検出と阻害実験への応用

実際に、HDAC活性をKAc-CCBの蛍光強度の上昇により検出できるかを検討した。HDAC3とKAc-CCBを緩衝液中で反応させ、蛍光スペクトルを測定したところ、時間経過とともに蛍光強度の上昇が確認された。一方、HDAC3非存在下では、プローブの蛍光強度の上昇は見られたもの

の、酵素存在下における蛍光強度の上昇がより酵素非存在下のときと比べ有意に大きかった。このことから、KAc-CCBは、HDAC活性を蛍光検出することのできるプローブであることが示された。HPLC解析の結果とあわせると、KAc-CCBは、HDACと反応し基質部位であるアセチルリジンが脱アセチル化されアミンが生成し、そのアミンと色素部位の分子内反応が自動的に起こることで、蛍光性の7-ヒドロキシクマリンが生じたと考えられる。

KAc-CCBはHDAC活性を簡便に測定することができることから、HDAC阻害剤の効果を調べるのに応用できると考えられる。そこで、HDAC阻害剤存在下でHDAC活性によるKAc-CCBの蛍光強度の上昇が抑制されるかを検討した。HDAC3の阻害剤であるApicidin存在下で、KAc-CCBとHDAC3を反応させたところ、蛍光強度の上昇の顕著な抑制が見られた。この蛍光強度変化は、KAc-CCB単独で蛍光強度変化を測定した場合とほぼ同程度であった。このことから、阻害剤によって、KAc-CCBとHDAC3の酵素反応が阻害され、KAc-CCBの蛍光強度の上昇が抑制されたと考えられる。

以上の結果からKAc-CCBを利用することで、HDAC阻害剤の効果を簡便に調べることができ

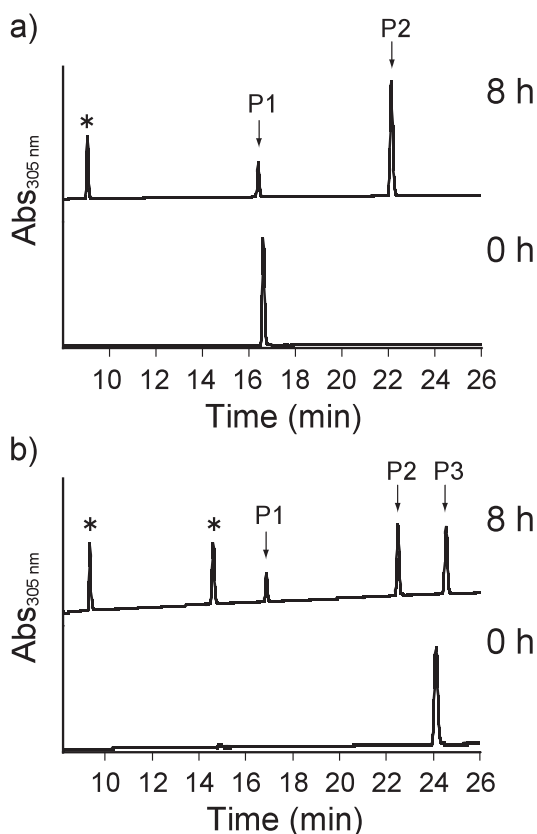


図2 . HPLCによる分子内反応と酵素反応の解析。a) K-CCBの分子内反応の経時解析。保持時間17分 (P1) 及び22分 (P2) 付近のピークは、それぞれ原料及び分子内反応産物。b) KAc-CCBのHDAC3による酵素反応の経時解析。保持時間24分 (P3)、17分 (P1) 及び22分 (P2) 付近のピークは、それぞれ原料、脱アセチル化体、及び分子内反応産物。\* は原料もしくは脱アセチル化体の加水分解反応産物。検出波長：305 nm。

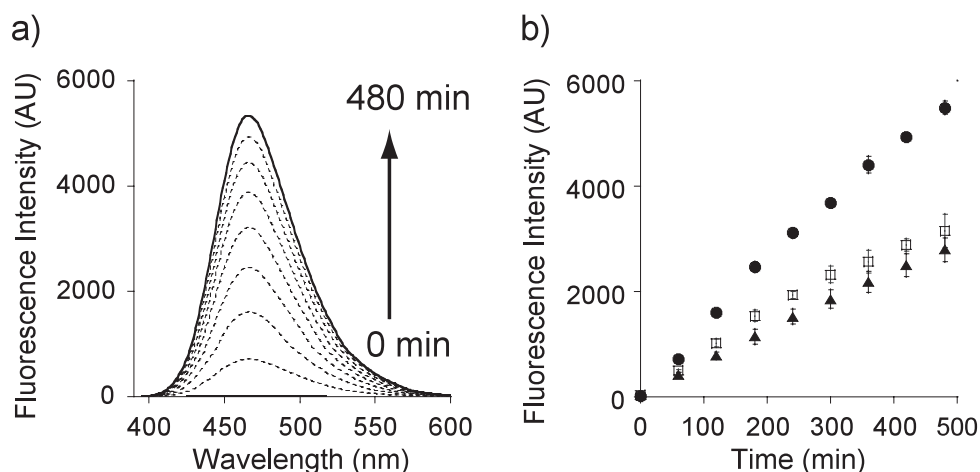


図3 . KAc-CCBによる酵素活性の蛍光検出。a) HDAC3存在下におけるKAc-CCBの蛍光スペクトルの時間変化。b) 酵素反応に伴うKAc-CCBの蛍光強度の時間変化。印、印及び印は、それぞれHDAC3存在下、非存在下、及びHDAC3・阻害剤存在下におけるKAc-CCBの蛍光強度の時間変化。励起波長：338 nm、蛍光波長：466 nm。

とが示された。

## 5 . おわりに

ゲノム情報が明らかとなっている現在では、ヒストン修飾というゲノムに記述されていない生命情報がどのように書き込まれ読み出されているか、そしてそれらがどのように制御されているかを解明することが生命科学の重要課題となっている。これまでは、主に分子生物学の手法により研究がなされてきたが、ヒストン修飾に記された未知の生命情報を解読するうえで、新しいアプローチに基づいた手法の登場が求められている。

我々は、混ぜるだけという一段階の操作でHDAC活性を検出することのできる小分子蛍光プローブの開発を行った。本プローブは、HDACの機能を迅速かつ簡便に調べることができ、ヒストンの脱アセチル化の役割を調べるのに魅力的なツールといえる。また、HDACは、先にも述べたように癌をはじめとした様々な疾病との関わりが深く、特に創薬の分野において、効率的なHDAC活性の評価法の開発が望まれている。本プローブは、検出操作のシンプルさからHDACに作用する医薬品のハイスループットスクリーニングに応用可能であると考えられ、医薬品開発を加速させると期待される。

将来の課題は、酵素非存在下でのバックグラウンド蛍光を抑制させ、より高感度なHDAC検出プローブを設計することである。また、ヒストン修飾は、脱アセチル化のみならずリン酸化/脱リン酸化など多くの化学反応を受けることが知られているものの、その役割が詳細には理解されていない。一方で、これらの反応は酵素により触媒されるが、化学反応であることに違いはない。本研究では、化学反応の基本的性質に着目することで、化学原理に基づいた新しいプローブの開発につながった。したがって、脱アセチル化以外のヒストン修飾反応を検出する技術開発において、化学のアプローチがパワーを発揮すると言えるであろう。

今後、これらの修飾反応も視野に入れながらヒストン修飾の機能解明につながる新しい化学ツールの開発を行っていきたい。

## 参考文献

- [ 1 ] B. C. Smith, J. M. Denu, *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1789, 45-57.
- [ 2 ] O. Witt, H. E. Deubzer, T. Milde, I. Oehme, *Cancer Lett.* 2009, 277, 8-21.
- [ 3 ] M. C. Haigis, D. A. Sinclair, *Annu. Rev. Pathol.*, 2010, 5, 253-295.
- [ 4 ] L. Zeng, R. Chen, F. Liang, H. Tsuchiya, H. Murai, T. Nakahashi, K. Iwai, T. Takahashi, T. Kanda, S. Morimoto, *Geriatr. Gerontol. Int.* 2009, 9, 7-15.
- [ 5 ] B. R. Stockwell, S. J. Haggarty, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* 1999, 6, 71-83.
- [ 6 ] J. M. Sun, V. A. Spencer, H. Y. Chen, L. Li, J. R. Davie, *Methods* 2003, 31, 12-23.
- [ 7 ] D. Wegener, F. Wirsching, D. Riester, A. Schwienhorst, *Chem. Biol.* 2003, 10, 61-68.

## 用語解説

### ヒストン

細胞核に存在する塩基性蛋白質で、DNAと結合することで、非常に長いDNAを核内に収納する役割を持っている。また、ヒストンとDNAの相互作用は、遺伝情報の発現制御にも関与する。

### クロマチン

真核細胞の核内にあり、ヒストンなどの蛋白質とDNAが結合した構造体。クロマチンの構造は、ヒストンの化学修飾反応により変化し、遺伝子発現を活性化・不活性化する。