



Title	Fluorogenic Probes to Detect Activity of Histone-modifying Enzymes
Author(s)	馬場, 玲輔
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/52153">https://hdl.handle.net/11094/52153</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 馬 場 玲 輔 )

## 論文題名

Fluorogenic Probes to Detect Activity of Histone-modifying Enzymes  
(ヒストン修飾酵素の活性を検出する発蛍光プローブの開発)

## 論文内容の要旨

ヒストンに存在するリジン残基はヒストン修飾酵素によって、アセチル化、メチル化、ユビキチン化など、様々な翻訳後修飾を受けることが知られている。それらの修飾は、クロマチン構造の変化や転写因子の呼び込みなどを誘発し、エピジェネティックに遺伝子発現を制御している。特に、リジンの脱アセチル化反応、脱メチル化反応はそれぞれヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)、ヒストンリジン脱メチル化酵素 (KDM) によって触媒されている。これらの酵素は、シグナル伝達や細胞周期、細胞恒常性の制御において重要な役割を果たしている。また、HDAC、KDM活性の異常は癌や糖尿病、免疫障害など、様々な疾患の発病に影響を与えることが知られており、医薬品開発の標的酵素として近年注目を集めている。このため、HDAC、KDMの機能を解明することは、生命科学や医学、創薬分野における重要な課題の一つであり、その酵素活性を検出・評価できるツールの開発が強く求められている。

これまでHDAC、KDM活性を評価するために、放射性同位体でラベル化された基質や、蛍光ペプチド基質、抗体、質量分析法などが用いられてきた。しかしながら、放射性同位体は取り扱いに制約があり、またその他の手法においても多段階の操作を必要とするため、その簡便性には問題点があった。特にKDM活性の検出については、脱メチル化反応を直接捉える蛍光プローブはこれまでに全く報告されていない。HDAC及びKDMが癌・疾患治療の標的として重要な酵素であるにも関わらず、その活性を簡便に検出できる技術は未だ確立していないと言える。

本博士論文では、HDAC、KDM活性を検出する新たな発蛍光プローブの開発について述べる。序論、第1章～第3章、結論及び展望により構成される。

まず第1章では、HDAC活性を検出する発蛍光プローブの開発について述べる。まず、HDACによる基質リジンの脱アセチル化反応がリジン側鎖に求核性アミノ基を生成する点に着目し、その反応を発蛍光応答へ変換する原理を初めて考案した。具体的には、リジン側鎖の求核性アミノ基と蛍光色素であるクマリン誘導体に導入した炭酸エステル間で自動的な分子内エステル転移反応が進行し、クマリンの蛍光が回復した。この発蛍光原理を用いることで、酵素とプローブを混合するのみのワンステップの操作でHDAC活性を蛍光検出することに初めて成功した。

第2章では、発蛍光スイッチとしての分子内エステル転移反応が、リジンとクマリン誘導体の間に様々な長さのアミノ酸配列を導入しても進行することを明らかにした。最大で9アミノ酸という長いスペーサーを有していても反応が進行することを示した。これにより、酵素の基質特異性を考慮した多様なプローブデザインが可能であることが示唆された。また、リジンとクマリン誘導体の間に導入するアミノ酸スペーサーの数を最適化することで、分子内転移反応速度の高速化を達成した。これにより、HDAC活性をより迅速に蛍光検出でき、阻害剤の効果を定量的に評価できることを示した。

第3章では、KDM活性を検出する発蛍光プローブの開発に関して述べる。KDMは基質であるメチル化リジン残基だけでなく、その周辺アミノ酸配列を正確に認識することで酵素活性を示す。第2章で得られた結果から、KDMのその高い基質特異性に合わせた長いアミノ酸配列と、分子内エステル転移反応を用いた発蛍光原理を組み合わせることで、酵素活性が蛍光検出できると考えた。開発したプローブはKDMと混合するだけでその蛍光が上昇した。また、KDM阻害剤を添加した場合では、その蛍光が大きく抑制された。このように、長距離での分子内エステル転移反応を用いた発蛍光スイッチにより、KDM活性を直接的、かつワンステップの操作で蛍光検出することに初めて成功した。

結論では、以上の結果について総括し、今後の展望について記した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 馬 場 玲 輔 )			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	菊地 和也
	副 査	教授	福住 俊一
	副 査	教授	伊東 忍
	副 査	教授	高井 義造
	副 査	教授	渡部 平司
	副 査	教授	兼松 泰男
	副 査	教授	金谷 茂則
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本博士論文では、ヒストン修飾酵素の中でも医薬品開発の標的として重要視されている、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）、及びヒストン脱メチル化酵素（KDM）の活性を検出する発蛍光プローブの開発について述べる。序論、第1章～第3章、結論及び展望により構成される。</p> <p>第1章では、HDAC活性を検出する発蛍光原理とプローブ開発について述べる。まず、HDACによる基質リジンの脱アセチル化反応がリジン側鎖に求核性アミノ基を生成する点に着目し、その反応を発蛍光応答へ変換する原理を考案した。具体的には、リジン側鎖のアミノ基と蛍光色素であるクマリン誘導体に導入した炭酸エステル間で自動的な分子内エステル転移反応が進行することで、消光していたクマリンの蛍光が回復する。この発蛍光原理を用いることで、酵素とプローブを混合するのみのワンステップ操作でHDAC活性を蛍光検出することに初めて成功した。</p> <p>第2章では、上記の分子内エステル転移反応が、リジンとクマリンの間に様々な長さのアミノ酸配列を導入しても進行することを明らかにした。最大で9アミノ酸という長いスペーサーを導入しても転移反応が進行することを示した。これにより、酵素の基質特異性を考慮した多様なプローブデザインが可能であることが示唆された。また、導入するアミノ酸スペーサーの数を最適化することで、分子内転移反応速度の高速化を達成した。これにより、HDAC活性をより迅速に蛍光検出でき、阻害剤の効果を定量的に評価できることを示した。</p> <p>第3章では、KDM活性を検出する発蛍光プローブの開発に関して述べる。KDMは基質であるメチル化リジン残基だけではなく、その周辺アミノ酸配列を厳密に認識することで酵素活性を示す。第2章で得られた結果から、KDMのその高い基質特異性に対応した長いアミノ酸配列と、分子内エステル転移反応を用いた発蛍光原理を組み合わせることで、酵素活性が蛍光検出できると考えた。開発したプローブはKDMと混合するだけでその蛍光が上昇した。また、KDM阻害剤を添加した場合は、その蛍光が大きく抑制された。このように、長距離での分子内エステル転移反応を用いた発蛍光スイッチにより、KDM活性を直接的、かつワンステップの操作で蛍光検出することに初めて成功した。</p> <p>以上のように、本論文は医薬品開発の重要な標的酵素であるHDAC、及びKDMの活性を「混合するだけ」の操作で検出できる発蛍光プローブを世界で初めて開発した。HDAC、KDM活性を迅速にモニタリングできるだけでなく、それらの酵素に対する阻害剤の効果を評価できるため、今後は医薬品開発の新規ツールとして実用的な応用が期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。</p>			