



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第1694号
学位記番号	第340号
氏名	國枝 一輝
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	阻害剤スクリーニングを志向したPAD活性検出蛍光プローブの開発
論文審査担当者	主査： 中川 秀彦 副査： 樋口 恒彦， 中村 精一， 牧野 利明

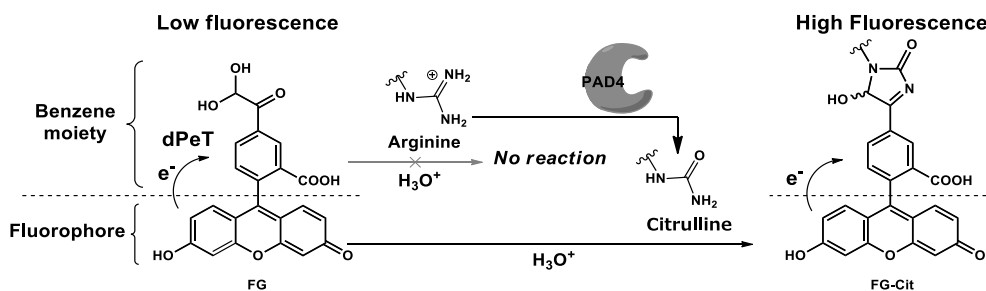
氏名	くにえだ かずき 國枝 一輝
学位の種類	博士（薬科学）
学位の番号	薬博第 340 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	阻害剤スクリーニングを志向した PAD 活性検出蛍光プローブの開発
論文審査委員	(主査) 教授 中川 秀彦 (副査) 教授 樋口 恒彦・教授 中村 精一・教授 牧野 利明

### 論文内容の要旨

Peptidyl Arginine Deiminases (PADs)は生体内でペプチド性アルギニン側鎖のシトルリン化を触媒する酵素である。この反応はアルギニン残基の翻訳後修飾の 1 種として注目を集めており、転写過程のエピジェネティックな制御や免疫応答、多分化能の維持への関連が示唆されている。シトルリン化はわずかな分子量の変化にも関わらず、グアニジノ基の正電荷の消失とそれに伴う疎水性の上昇によりタンパク質の folding や機能などのダイナミックな変化を引き起こす点で非常に興味深く、PADs は魅力的かつ新たな創薬標的であると考えられる。このことから疾患治療薬開発を志向した PAD 活性検出系が開発されてきた。しかし、PAD 活性を簡便かつ高感度に検出できる評価系はこれまでに存在しなかった。

当研究室ではフェニルグリオキサール構造が酸性条件化でシトルリンと特異的に環化反応を起こすことに注目し、d-PeT 機構の制御による新規シトルリン検出 turn-on 型蛍光プローブ (Flu-Glyoxal; FG)を開発した (Scheme 1)。しかし、FG は蛍光団であるフルオレセインが酸性条件下において環化消光を引き起こすため、中和操作が不可欠であった。加えて、反応前の FG 自身の蛍光を完全には抑制できていないため、未反応のプローブのバックグラウンド蛍光が強く検出感度が低いという問題点があった。これらの問題点を解決するため、フルオレセインの構造展開による高感度プローブの開発を行った。

また、本評価系は PADs の共通基質として汎用されている Bz-Arg-OEt (BAEE)を用いることから、代表的な PAD アイソザイムである PAD4 に限らず他の PAD アイソザイムにも適用可能だと考えられる。そこで PAD アイソザイムの網羅的スクリーニングに応用可能な評価系への展開も視野に研究に着手した。



Scheme 1. Schematic illustration of our strategy for detection of citrulline by FG.

## 1. シトルリン検出蛍光プローブ FG の高度化

前述の FG の問題点のうち特に酸性条件下におけるフルオレセインのスピロ環化に伴う消光は、FG の 2 位カルボキシル基をエステル化することで抑制できると考え、FGME を設計・合成し、シトルリンとの環化生成物 FGME-Cit も合成した (Figure 1)。

合成した FGME を 20%TFA 水溶液中、L-citrulline と共に 37 °C で 2 時間インキュベーションしたところ、酸性条件下において高濃度のシトルリン存在下で蛍光増大が観測された (Figure 2)。一方、FG においては過剰量の L-citrulline 存在下においても蛍光増大は確認されなかった。

続いて PADs の人工基質である BAEE を用いて、PAD4 の酵素反応によって産生されたシトルリン化体を FGME で検出可能であるか検討した。PAD4 および BAEE を Tris buffer 中、37 °C で 30 分間インキュベーションした後に、FGME と TFA を添加し産生されたシトルリン化体の検出を試みた。その結果、産生されたシトルリン化体すなわち PAD4 活性を有意な蛍光増大で検出可能であることが示された (Figure 3)。一方、その蛍光上昇は PADs 阻害剤である Cl-amidine を添加することで抑制された。これらの結果から、FG のカルボキシル基をメチルエステル化した FGME は酸性条件下においてもスピロ環化が起こらないため、酸性条件下でも PAD4 活性を検出することが可能であった。即ち、FG を用いた PAD4 活性の評価系の場合に必須であった中和操作を FGME の使用により省略でき、評価系の簡便化が実現された。既存の PAD4 活性の検出系である ELISA 法、アンモニアガス検出法、蛍光プローブを用いた二段階酵素反応による検出法はそれぞれコスト、再現性、偽陽性という問題点が挙げられることから、FGME を用いた PAD4 活性検出系は簡便でケミカルスクリーニングに適用可能な点で優位性があると考えられる。

しかし、FGME を用いた評価系では FG と比較し、シトルリン誘導体との反応後の蛍光増大が弱いことも明らかになった。この蛍光増大の減弱化が何に起因するかを解明するために、FGME 及び FGME-Cit の光学特性評価を行った (Figure 4, Table 1)。

FGME の吸光スペクトルを FG と比較したところ、わずかな長波長シフトが認められたことから FGME ではベンゼン環部位における電

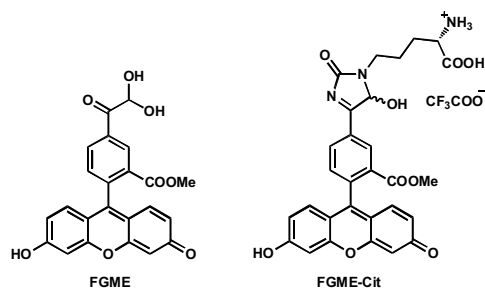


Figure 1. The structures of FGME and FGME-Cit

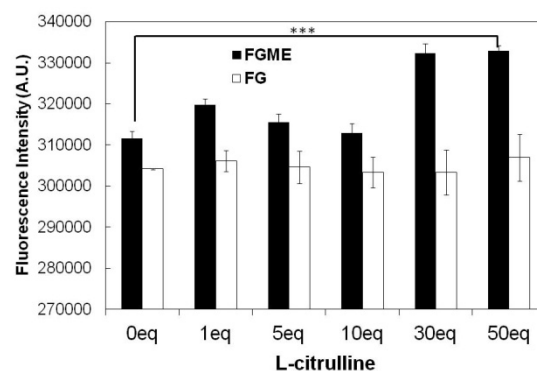


Figure 2. Fluorescence detection of L-citrulline with FGME and FG using a plate reader. (ARVOX5) ex. 450 nm, em. 535 nm. \*\*\* $p < 0.005$  ( $n = 3$ )

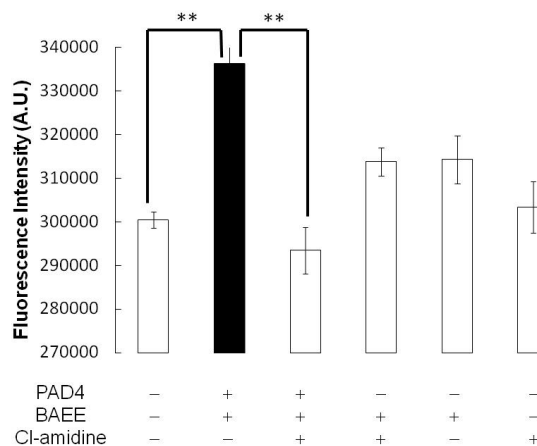


Figure 3. Enzymatic reaction between FGME and PAD4. Fluorescence intensity was measured with a plate reader (ARVOX5). ex. 450 nm, em. 535 nm, \*\* $p < 0.01$  ( $n = 3$ )

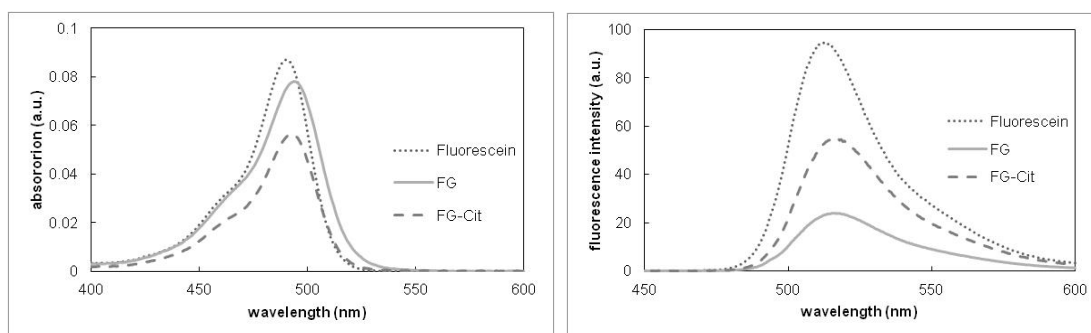


Figure 4. Absorption and fluorescence spectra of 1  $\mu$ M fluorescein (measured in 0.1 N NaOH solution containing 0.1% DMSO), FGME, and FGME-Cit (measured in sodium phosphate buffer (pH 7.4)).  $\lambda_{ex} = 493$  nm.

子密度の低下に伴う LUMO エネルギーの低下が示唆されたが、d-PeT 機構による消光効率は **FG** と同程度であった。一方で、環化生成物である **FGME-Cit** の蛍光量子収率は **FG-Cit** よりも低下していた。これらの結果から、**FGME** のベンゼン環部位の電子密度が低下しすぎたため、シトルリンと反応し **FGME-Cit** に誘導されても完全に d-PeT 機構による消光が解消できていない可能性が考えられた。従って、電子密度を調節しベンゼン環部位の LUMO エネルギーレベルを反応前後どちらにおいても最適化する必要性が示唆された。

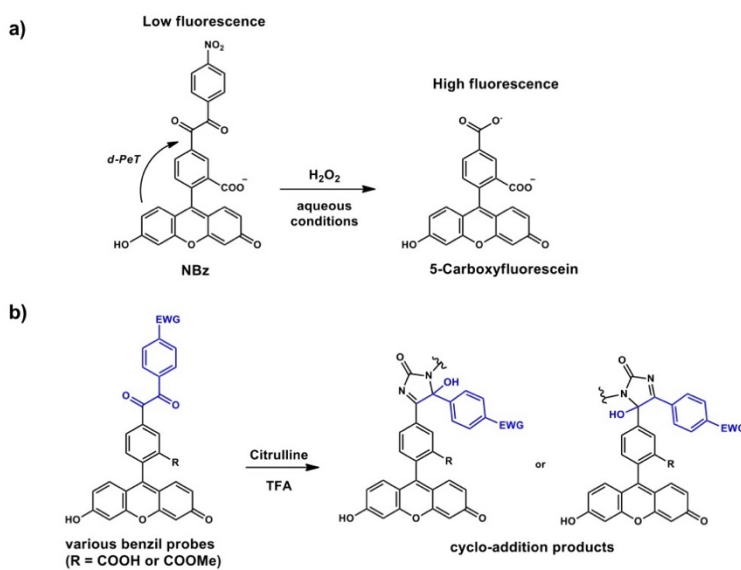
**Table 1.** Photochemical properties of fluorescein, **FGME** and **FGME-Cit** <sup>[a]</sup>

	$\Phi_{FL}$	$\lambda_{max}$	$\lambda_{em}$	$\varepsilon (\times 10^4 / M \cdot cm)$
<b>Fluorescein</b>	0.850	490 nm	512 nm	8.63
<b>FG</b>	0.171	494 nm	514 nm	7.58
<b>FG-Cit</b>	0.656	494 nm	516 nm	6.01
<b>FGME</b>	0.183	497 nm	520 nm	3.80
<b>FGME-Cit</b>	0.491	496 nm	522 nm	4.82

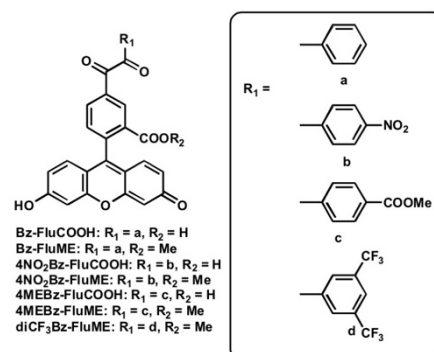
[a] Data were measured in sodium phosphate buffer (pH 7.4). For determination of  $\Phi_{FL}$ , fluorescein in 0.1 N NaOH ( $\Phi_{FL} = 0.85$ ) was used as a fluorescence standard.

## 2. Benzil 型シトルリン検出蛍光プローブの開発と PADs 活性検出

d-PeT 機構を作動原理とする off/on 型蛍光プローブ **FGME** はケミカルスクリーニングに適応可能な簡便さを有しているが、その検出感度には前項に示した課題があることが判明した。その要因として glyoxal 構造の高い求電子性に起因する水和物の生成が考えられた。水和物へ誘導されるとベンゼン環部位の電子密度が上昇するため、d-PeT 機構による消光が非効率化し、プローブ自身のバックグラウンド蛍光が抑制されなくなる。その解決策としてベンゼン環部位とキサンテン部位の電子密度のチューニングが考えられるが、フルオレセイン上の構造展開可能な部位が限定的であるため容易ではない。そこで、2011 年に長野らが報告した過酸化水素プローブ **NBz** (*J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 10629) に着目した (Figure 5a)。**NBz** は d-PeT 機構によりプローブの蛍光が効率的に抑制されていることに加え、フェニルグリオキサール同様の 1,2-dicarbonyl (benzil) 構造を有する。この benzil 部位が glyoxal 部位同様、酸性条件下でシトルリン特異的に環化反応を引き起こすことを期待した。benzil 構造では、glyoxal 構造に比較してカルボニル炭素の求電子性が低下することが懸念されたが、末端芳香環への置換基導入の容易さから電子求引性置換基を導入することで、反応部位であるカルボニル炭素の電子密度を低下させることができればシトルリンとの反応性を高められると予測した (Figure 5b)。

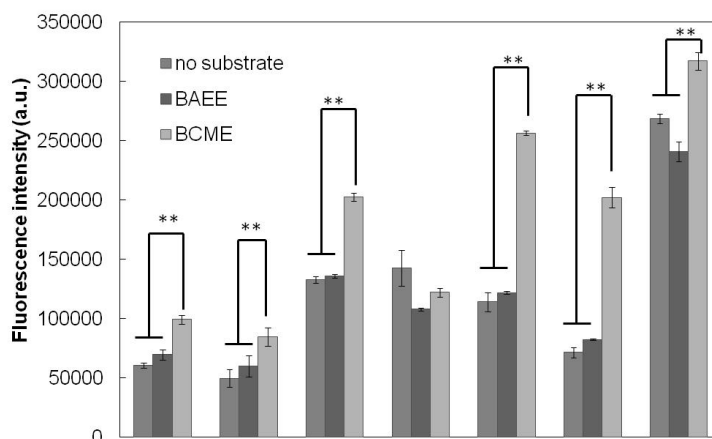


**Figure 5.** a) Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) probe, **NBz**, utilizing benzil moiety as an  $H_2O_2$  reactive site. b) Proposed reaction of benzil-type fluorescence probes with electron-withdrawing group (EWG) and cyclo-addition product.

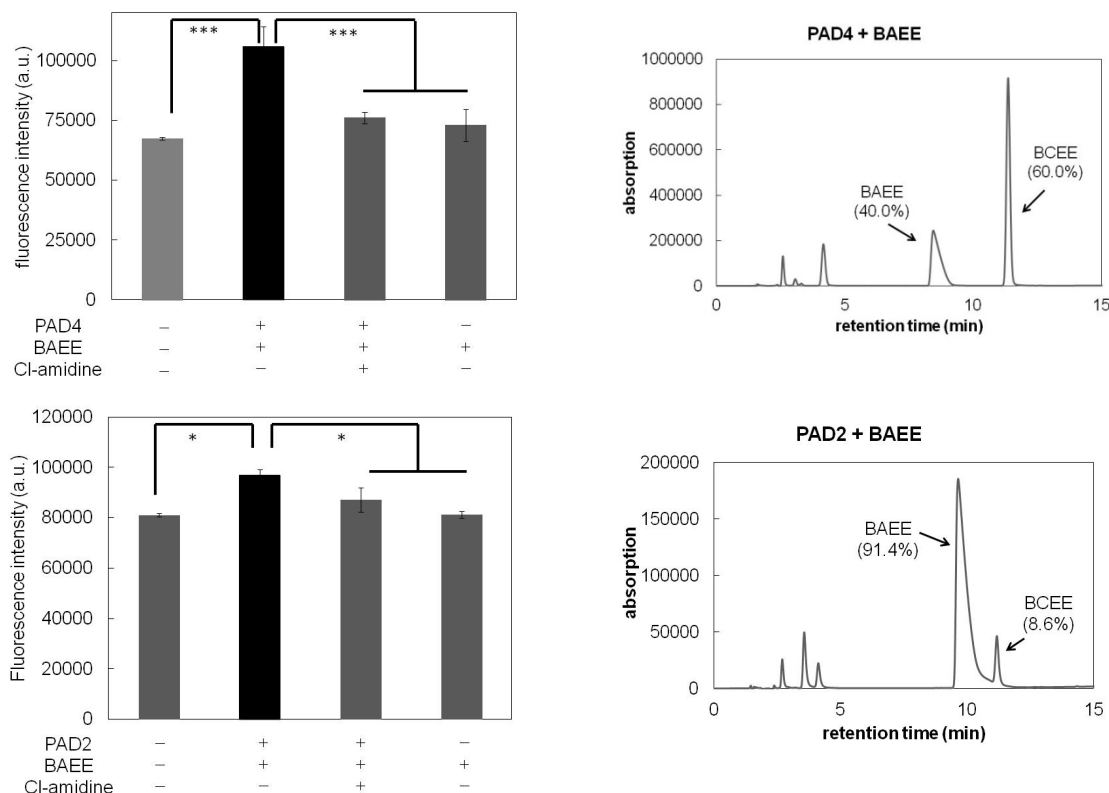


**Figure 6.** Synthesized benzil probes

まず、電子求引性置換基を導入した 7 種類の benzil 型プローブを合成し、光学特性評価を行った (Figure 6)。いずれのプローブも期待通り d-PeT 機構による十分な消光が認められ、シトルリンとの反応前後で蛍光増大が惹起されれば off/on 型蛍光プローブとして機能しうることが示唆された。続いて、合成したプローブとシトルリンとの反応性を評価した。プローブと *N*-benzoyl-L-citrulline methyl ester (BCME) を 20%TFA 緩衝液中、50°C でインキュベーションした結果、時間依存的な環化生成物の生成が HPLC で確認された。また、2 時間インキュベーション後の反応溶液の蛍光強度を測定すると、6 種類のプローブで蛍光強度の増大が認められた (Figure 7)。この蛍光増大は PADs の人工基質である BAEE と酵素なしでインキュベーションした際には確認されなかったことから、benzil 型プローブを用いることで PADs によるシトルリン化は蛍光増大を指標に検出可能であることが示唆された。中でもバックグラウンド蛍光が低く、反応前後での蛍光増大が大きい 4MEBz-FluME を最適な PAD 活性検出プローブとして選定した。4MEBz-FluME は BCME 濃度依存的に蛍光増大を示したことから、PAD 活性の検出に適していると考えられた。



**Figure 7.** A solution (50  $\mu$ L) of each fluorescence probe (5  $\mu$ L, 1 mM solution in DMSO, final concentration; 100  $\mu$ M) and BCME (10  $\mu$ L, 100 mM solution in TFA, final concentration; 20 mM) in PAD buffer (35  $\mu$ L) or BAEE (10  $\mu$ L, 100 mM solution in PAD buffer, final concentration; 20 mM) in PAD buffer (25  $\mu$ L) and TFA (10  $\mu$ L) was incubated at 50  $^{\circ}$ C for 2 hr. After the time lapse, fluorescence intensity was measured with a plate reader (ARVOX5). The results are mean  $\pm$  s.e.m. from three experiments.  $**p < 0.01$  by Bonferroni correction.



**Figure 8.** Detection of PAD4 and PAD2 activity with 4MEBz-FluME. The enzymatic reaction was conducted in PAD buffer (100 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 20 mM BAEE, PAD4 (as provided in the PAD4 assay kit purchased from Cayman Chemical, without dilution) and 10  $\mu$ M Cl-amidine; total volume was 20  $\mu$ L) at 50  $^{\circ}$ C for 1 h. TFA (10  $\mu$ L), 1 mM 4MEBz-FluME (5  $\mu$ L, final concentration 100  $\mu$ M) and PAD buffer (15  $\mu$ L) were added and the mixture was incubated at 50  $^{\circ}$ C for 2 h. Fluorescence intensity was measured with a plate reader (ARVOX5). The results are mean  $\pm$  s.e.m. from three experiments.  $***p < 0.005$ ,  $*p < 0.05$ , after Bonferroni correction. Generation of BCME after the enzymatic reaction of BAEE with PAD4 for 1 hr. 60% of BAEE and with PAD2 for 1 hr. 8.6% of BAEE were found to be citrullinated before addition of 4MEBz-FluME.

次に、**4MEBz-FluME** を用いて PAD 酵素反応により産生されたシトルリン化体を検出可能であるか評価した。人工基質 **BAEE** と PAD4 を 50°C で 1 時間インキュベーションしたのち、TFA を添加し反応溶液を酸性にした。その後、**4MEBz-FluME** を加えさらに 2 時間インキュベーション後、蛍光強度をプレートリーダーで測定した。その結果、**BAEE** 及び PAD4 存在下で、有意な蛍光増大が認められ、また PAD 阻害剤である **C1-amidine** を共存させると蛍光増大は抑制された (Figure 8)。**4MEBz-FluME** を添加する前の酵素反応溶液を HPLC にて分析した結果、60%の **BAEE** がシトルリン化を受けていることが確認され、得られた蛍光強度は先に測定した **4MEBz-FluME** の濃度依存性の結果と概ね一致することが示された。**BAEE** は PAD4 のみの基質ではなく他のアイソザイムの共通の基質でもあるため、続いて同様の条件で PAD2 が産生したシトルリン化体が検出可能であるか評価した。その結果、PAD2 を用いた条件では有意な蛍光増大が認められた一方で、PAD4 を用いた場合に比べ蛍光強度が低下した (Figure 8)。その理由として、PAD2 による **BAEE** のシトルリン化能が PAD4 よりも低く、PAD2 により産生されたシトルリン化体が少ないことが予想された。実際、HPLC による酵素反応解析の結果、シトルリン化体の生成率は 8.6%であった。産生されたシトルリン化体量と **4MEBz-FluME** の蛍光増大の濃度依存性を鑑みると、PAD2 活性検出時の蛍光増大は合理的な値であると考えられた。以上の結果より、**4MEBz-FluME** のバックグラウンド蛍光の低さと反応前後での蛍光強度変化の大きさから、**FGME** と比較し、より高感度な PAD 活性検出を達成した。この高感度化により、単一のプローブで様々な PAD アイソザイム活性の検出が可能となり、各アイソザイムが関連する疾患治療薬開発のためのケミカルスクリーニングに役立つことが期待される。

### 3. 総括

本研究では、当研究室で開発された **FG** の問題点であった酸性条件下でのスピロ環化による消光をメチルエステル化した **FGME** を開発することにより抑制し、酸性条件下における PAD4 活性検出を可能とし、ケミカルスクリーニングに耐え得る評価系を構築することに成功した。

また、benzil 構造を有するフルオレセイン誘導体がシトルリンとの特異的環化反応を鍵とする off/on 型蛍光プローブとして機能することを見出した。この誘導化に伴い、d-PeT 機構の効率化とシトルリンとの反応性向上を達成し、PAD4 だけでなく、よりシトルリン化活性の低い PAD2 活性の簡便な検出系構築にも成功した。

本評価系を用いた大規模ケミカルスクリーニングにより、既知の PAD 阻害剤とは異なる骨格を有する候補化合物の探索が実施可能となる。また、使用する酵素を変更するだけで各アイソザイムの活性が簡便に評価できるため、複数の PAD アイソザイムの阻害剤を網羅的に探索することも容易であり、それらが関連する疾患の治療薬創製の一助となることが期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

翻訳後修飾はタンパク質の機能を制御する重要な過程であり、それらの修飾反応はそのほとんどが種々の酵素によって担われている。Peptidyl Arginine Deiminase (PAD) もその 1 つであり、分子量の変化をほとんど伴わずタンパク質表面の電荷を変化させる。これによりタンパク質の構造等が大きく変化することからタンパク質機能を制御する重要な因子の 1 つといえ、創薬標的として興味深い。

國枝一輝は、Peptidyl Arginine Deiminase (PAD) 活性検出蛍光プローブの開発研究において、阻害剤スクリーニングに適したプローブ開発のための分子設計、化学合成及び機能評価を行い、スクリーニング評価系の測定条件を簡便化し、さらに検出感度の向上を実現して、酵素活性の異なる複数の PAD アイソザイムで利用可能な PAD 活性検出蛍光プローブの開発に成功した。

上記内容による本論文は、博士 (薬科学) 授与に値すると認める。