



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

名古屋市立大学学位論文

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

平成 30 年度（2019 年 3 月）

名古屋市立大学大学院薬学研究科
創薬生命科学専攻 精密有機反応学
（指導：樋口恒彦教授）

國枝 一輝

本論文は、2019 年 3 月、名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 中川 秀彦 教授
副査 樋口 恒彦 教授
中村 精一 教授
牧野 利明 教授

2. 本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

- (i). Kazuki Kunieda, Hiromasa Yamauchi, Mitsuyasu Kawaguchi, Naoya Ieda, and Hidehiko Nakagawa
Development of a fluorescent probe for detection of citrulline based on photo-induced electron transfer
Bioorg. Med. Chem. Lett., 28, 969–973 (2018).
- (ii). Kazuki Kunieda, Mitsuyasu Kawaguchi, Naoya Ieda, and Hidehiko Nakagawa
Development of highly sensitive fluorescence probe for citrulline utilizing benzil moiety and detection of PAD activity
Bioorg. Med. Chem. Lett. 29, 923–928 (2019).

3. 本論文の基礎となる研究は、中川秀彦 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科で行われた。

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 序論	5
2-1 シトルリン	5
2-1-1 シトルリンとは	
2-1-2 シトルリンの生合成と代謝	
2-2 ペプチド性アルギニン脱イミノ化酵素 (Peptidyl arginine deiminase; PAD)	8
2-2-1 PAD アイソザイムの特徴	
2-2-1-1 PAD1	
2-2-1-2 PAD2	
2-2-1-3 PAD3	
2-2-1-4 PAD4	
2-2-1-5 PAD6	
2-2-2 PAD4 の遺伝子制御	
2-2-3 PAD と NET (neutrophil extracellular traps)	
2-2-4 PAD と疾患	
2-2-4-1 関節リウマチ	
2-2-4-2 多発性硬化症	
2-2-4-3 がん	
2-2-4-4 アルツハイマー病	
2-3 PADs に対する基質特異性	19

2-4	PAD 阻害剤	20
2-4-1	可逆的阻害剤	
2-4-2	不可逆的阻害剤	
2-5	PAD 活性検出法	22
2-5-1	ELISA 法	
2-5-2	アンモニア検出法	
2-5-3	酵素反応を利用した trun-on 型蛍光プローブによる検出法	
2-6	研究目的	24
第 3 章	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	25
3-1	d-PeT 機構制御に基づいた PAD 活性検出プローブの高度化	25
3-1-1	Flu-Glyoxal (FG) の分子設計	
3-1-2	FG を用いた PAD4 活性検出	
3-1-3	フルオレセインの分子内スピロ環化平衡	
3-1-4	FGME の合成	
3-1-5	FGME を用いたシトルリン検出	
3-1-6	FGME の光学特性評価	
3-1-7	酸性条件下における FGME の光学特性評価	
3-1-8	小括	
3-2	アイソザイム非依存的な PAD の網羅的活性検出を志向した benzil 型蛍光プローブの開発	40
3-2-1	d-PeT 機構制御型蛍光プローブ FGME の問題点	
3-2-2	d-PeT 機構制御に基づいた turn-on 型過酸化水素検出蛍光プローブ	
3-2-3	Benzil 型シトルリン検出蛍光プローブの分子設計	
3-2-4	Benzil 型シトルリン検出蛍光プローブの合成	
3-2-5	中性条件下における benzil 型プローブの光学特性	
3-2-6	酸性条件下における benzil 型蛍光プローブのスペクトル測定	
3-2-7	シトルリンと benzil 型プローブの反応性評価	

- 3-2-8 シトルリン誘導体 **BCME** と benzil 型プローブの反応性評価
- 3-2-9 **4MEBz-FluME** のシトルリン濃度依存性
- 3-2-10 **4MEBz-FluME** を用いた PAD4 活性検出
- 3-2-11 **4MEBz-FluME** を用いた PAD2 活性検出
- 3-2-12 **4MEBz-FluME** を用いた **CI-amidine** の PAD4 阻害濃度の算出
- 3-2-13 小括

第 4 章 結語	61
第 5 章 実験の部	62
参考文献	71
謝辞	78

本文中の以下の用語及び試薬は、下記のように略記した。

°C	degrees Celsius
ABAP	antibody-based assay for PAD activity
Ac	acetyl
ACPA	anti-cyclic citrullinated peptide antibody
AD	Alzheimer's disease
ADI	arginine deiminase
ARG1	arginase-1
ASA	argininosuccinic acid
ASL	argininosuccinate lyase
ASS	argininosuccinate synthetase
ATP	adenosine triphosphate
BAA	<i>N</i> ^α -benzoyl-L-arginine amide
BAEE	<i>N</i> ^α -benzoyl-L-arginine ethyl ester
BCEE	<i>N</i> ^α -benzoyl-L-citrulline ethyl ester
BCME	<i>N</i> ^α -benzoyl-L-citrulline methyl ester
Bz	benzoyl
calcd.	calculated
CARM1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CAT1	cationic amino acid transporter 1
CBP	CREB-binding protein
CCP	cyclic citrullinated peptide
cm	centimeter
d	doublet
δ	chemical shift in parts per million downfield from tetramethylsilane
Da	dalton
dba	dibenzylideneacetone
DDAH	dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase
DIPEA	diisopropylethylamine
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl 1-4-aminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
d-PeT	donor-excited photoinduced electron transfer

DTT	1,4-dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Em	emission
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ESI	electrospray ionization
ETS	early tumor shrinkage
EWG	electron-withdrawing group
Ex	excitation
g	gram(s)
GADD	growth arrest and DNA damage
GFAP	glial fibrillary acidic protein
h	hour
HAT	histone acetyltransferase
HDAC	histone deacetylase
HL	human promyelocytic leukemia
HOMO	highly occupied molecular orbital
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometry
HRP	horseradish peroxidase
HSP90	heat shock protein 90
Hz	hertz
IC ₅₀	inhibitory concentration 50
<i>J</i>	coupling constant (in NMR spectrometry)
JMJD6	jumonji domain-containing protein 6
L	litter
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
m	milli
M	molar (moles per liter)
m	multiplet (in NMR spectrometry)
m/z	mass-to-charge ratio
MBP	myelin basic protein
MCF-7	michigan cancer foundation-7
Me	methyl
min	minute(s)
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	multiple sclerosis

MS	mass spectrometry
n	nano
<i>n</i>	normal
NADPH	dihydronicotine adenine dinucleotide phosphate
NETs	neutrophil extracellular traps
NLS	nuclear localization signal
NMR	nuclear magnetic resonance
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
OTC	ornithine trans carbamylase
P. T.	proton transfer
PAD	peptidyl arginine deiminase
PBS	phosphate buffered salts
pH	potential of hydrogen
Pol II	ribonucleic acid polymerase II
ppm	part(s) per million
PRMT1	protein arginine methyltransferase 1
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
quant.	quantitative yield
RA	rheumatoid arthritis
ROS	reactive oxygen species
rt	room temperature
s	singlet
s.e.m.	standard error of the mean
STAT1	signal transducers and activator of transcription
t	triplet
TEA	triethylamine
TFA	trifluoroacetic acid
TG	Tokyo Green
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TMS	tetramethylsilane
TSS	transcript start site
UV	ultraviolet
v/v	volume/volume

第1章 緒言

Peptidylarginine deiminases (PADs) は、生体内でペプチド性アルギニン残基を脱イミノ化してシトルリンを産生する反応を触媒する酵素である。この反応はタンパク質のアルギニン残基の翻訳後修飾の1種であり、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報告されている。シトルリン化は反応前後での分子量の変化がわずかであるにも拘わらず、アルギニン側鎖のグアニジノ基の正電荷を消失させ疎水性を上昇させるため、タンパク質のフォールディングや機能の制御等、ダイナミックな変化を引き起こす点で興味深く、PADs は魅力的かつ新しい創薬標的と考えられている。このような背景から疾患治療薬開発を志向した PADs 活性検出系が開発されてきたが、いずれの検出系にも克服すべき課題が残されていた。例えば、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットを用いた活性検出系は、抗体を用いるため PADs 活性を感度良く検出可能であるが、高価であり大規模なケミカルスクリーニングを行う目的に利用することは現実的でない。また、シトルリン化で副生するアンモニアガスを検出する手法では、揮発性かつ高反応性であるアンモニアガスを再現性良く検出することが困難である。さらに、トリプシンによる切断を利用した off/on 型蛍光プローブでは偽陰性となる化合物が生じる、すなわち PAD 阻害剤を見落としてしまう恐れがある。このように 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誘導体が酸性条件下でシトルリンと特異的に環化反応を起こすという知見に着目し、この反応を蛍光プローブの消光原理である donor-excited photoinduced electron transfer (d-PeT) 機構と組み合わせた新規シトルリン検出蛍光プローブ (**Flu-Glyoxal; FG**) を開発してきた。しかし、**FG** で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、反応溶液の中和操作が不可欠であった。加えて、グリオキサール部位の求電子性が非常に高く容易に水和物へと変換されるため、水和に起因する d-PeT 機構の非効率化が起これ、バックグラウンド蛍光を抑制することができなかった。そのため、未反応のプローブのバックグラウンド蛍光により検出感度が低下する問題点があった。これらの問題点を解決するため、構造展開による高感度化プローブの開発を行った。

開発する評価系には PADs の共通基質として汎用されている *N*^α-benzoyl-L-arginine ethyl ester (**BAEE**) を用いることから、代表的な PADs アイソザイムである PAD4 に限らず、シトルリン化活性を有する他の PADs アイソザイムにも適用可能と考えられる。そこで、PAD アイソザイム阻害剤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入れ、研究に着手した。

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位カルボキシ基をエステル化することで抑制可能と考え、**FG** のメチルエステル(**FGME**)を設計・合成した。**FGME**を用いると、酸性条件下での蛍光

測定が可能となり、中和操作を省略できることで作業工程の簡便化に成功した。

FGME を用いた **PAD4** 活性検出系は簡便な操作性を有しているが、水和物の生成によって **d-PeT** 機構による消光が非効率化され、バックグラウンド蛍光が増大していた。そこでグリオキサール同様に 1,2-ジカルボニル構造を有する **benzil** 型蛍光プローブが効率的な **d-PeT** 機構制御による消光を引き起こすという知見に着目した。様々な電子求引性置換基を導入した **benzil** 型プローブを合成し、光学特性と反応性の観点から最適化を行った。最適化したプローブ **4MEBz-FluME** はシトルリン濃度依存的な蛍光増大を示し、酵素反応により産生されたシトルリン化体すなわち **PAD4** 活性を検出可能なことが示された。また、この評価系は **PAD4** だけでなく、よりシトルリン化活性が乏しい **PAD2** 活性の評価にも適用可能であることが示された。

さらに **4MEBz-FluME** を用いた阻害活性の検出およびスクリーニング系としての質を反映する指標である Z' 値を算出し、本評価系がスクリーニング系として十分な質と信頼性を有していることを明らかにした。

なお、本研究内容について以下の学術雑誌、学会にて発表した。

誌上発表

- 1 Kazuki Kunieda, Hiromasa Yamauchi, Mitsuyasu Kawaguchi, Naoya Ieda and Hidehiko Nakagawa
Development of a fluorescent probe for detection of citrulline based on photo-induced electron transfer
Bioorg. Med. Chem. Lett. 28, 969–973 (2018).
- 2 Kazuki Kunieda, Mitsuyasu Kawaguchi, Naoya Ieda and Hidehiko Nakagawa
Development of highly sensitive fluorescence probe for citrulline utilizing benzil moiety and detection of PAD activity
Bioorg. Med. Chem. Lett. 29, 923–928 (2019)

学会発表

1. 國枝一輝、山内啓雅、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「フェニルグリオキサールの反応性に基づいたシトルリン検出蛍光プローブの開発」
第6回 CSJ 化学フェスタ, 2016年11月14-16日、東京（ポスター発表）
2. 國枝一輝、山内啓雅、川口充康、家田直弥、中川秀彦

「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」
日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25-27 日、仙台 (ポスター発表)

3. 國枝一輝、山内啓雅、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「PAD 活性検出系の構築を目的とした消光性蛍光基質の開発」
日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 年会, 2017 年 6 月 7-9 日、札幌 (ポスター発表)
4. 國枝一輝、山内啓雅、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「化学反応性に基づいた新規シトルリン検出蛍光プローブの開発」
第 63 回日本薬学会東海支部 総会・大会, 2017 年 7 月 8 日、名古屋 (口頭発表)
優秀発表賞
5. 國枝一輝、山内啓雅、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「d-PeT 機構制御に基づいた PAD 活性検出蛍光プローブの開発」
第 5 回バイオ関連シンポジウム若手フォーラム, 2017 年 9 月 6 日、東京 (ポスター発表)
6. 國枝一輝、山内啓雅、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「光誘起電子移動を利用したシトルリン検出蛍光プローブの開発」
第 35 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2017 年 10 月 25-27 日、名古屋
(ポスター発表)
7. 國枝一輝、山内啓雅、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「PAD 活性検出蛍光プローブの開発と機能評価」
日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 26-28 日、金沢 (ポスター発表)
8. 國枝一輝、山内啓雅、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「新規シトルリン検出蛍光プローブの開発と機能評価」
第 16 回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2018 年 5 月 18-19 日、大阪 (口頭発表)
9. 國枝一輝、山内啓雅、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「蛍光プローブを用いた PAD 活性評価系の構築」
日本ケミカルバイオロジー学会 第 13 年会, 2018 年 6 月 11-13 日、東京 (ポスター発表)

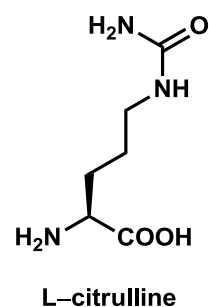
10. 國枝一輝、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「網羅的な PADs 活性検出系の構築」
酸化ストレス学会東海支部 第 7 回学術集会, 2019 年 2 月 16 日、名古屋（口頭発表）
11. 國枝一輝、川口充康、家田直弥、中川秀彦
「アイソザイム非依存的な PAD 活性検出蛍光プローブの開発」
日本薬学会第 139 年会, 2019 年 3 月 21-23 日、幕張（ポスター発表 演題登録済）

第2章 序論

2-1 シトルリン

2-1-1 シトルリンについて

シトルリンは非コードアミノ酸の1種であり、1914年に古賀らによりスイカの絞り汁から単離され¹、1930年に和田らによって構造が決定された上で、**citrulline**と命名された²。その後、1932年に Krebs らの報告によって、オルニチン回路の代謝中間体としてシトルリンの重要性が示された³。翌1933年にはカゼインをトリプシン処理するとシトルリンが得られることが明らかになった⁴。このような経緯で非コードアミノ酸であるシトルリンが多くの研究者から注目を集めることになった。1960年代から1990年代にかけては、関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) 患者の血清中に抗シトルリン化ペプチド抗体 (anti-cyclic citrullinated peptide antibody; ACPA) が存在することが明らかにされている⁵⁻¹⁰。1998年には、ノーベル医学・生理学賞が授与された「一酸化窒素 (nitric oxide; NO) の発見」において注目された NO 産生酵素 (nitric oxide synthase; NOS) が L-アルギニンを L-シトルリンへと代謝することが明らかになり、シトルリンは再度注目を集めた。加えて、2002年に中島らがプロテオミクス解析によりヒストンのシトルリン化を発見し¹¹、2004年に Cuthbert ら、Wang らのグループがそれぞれ、*Cell* 誌、*Science* 誌に PAD4 によるヒストンのシトルリン化を介したエピジェネティック制御機構について報告をしたことで、ヒストンのシトルリン化の生理的な重要性が示された^{12,13}。



2-1-2 シトルリンの生合成と代謝

生体内において、シトルリンは遊離アミノ酸およびペプチド性アミノ酸として存在し、それぞれに以下の生合成経路、代謝経路が提唱されている。

遊離アミノ酸である L-シトルリンは、オルニチン回路・一酸化窒素生合成経路によって、生合成・代謝されている (Figure 2-1)¹⁴⁻¹⁹。ミトコンドリアにおいてはオルニチンとカルバモイルリン酸からオルニチントランスカルバミラーゼ (ornithine transcarbamylase; OTC) によりリン酸と共に生合成される。一方、細胞質中で、シトルリンはアルギニノコハク酸合成酵素 (argininosuccinate synthase; ASS) により ATP 依存的にアスパラギン酸と縮合し、アルギニノコハク酸 (argininosuccinic acid; ASA) へと変換される。この ASS はアルギニノコハク酸リアーゼ (argininosuccinate lyase; ASL)、血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase; eNOS)、カチオン性アミノ酸トランスポーター1 (cationic amino acid transporter 1; CAT1) および熱ショック蛋白質 (heat shock protein 90; HSP90) と複合体を形成している。そのため、オルニチン回路では ASS により産生された ASA は ASL によってアルギニンへと変換された後に、NO 合成経路において NOS による代謝を受けた後に、NO の産生を伴いながらシトルリンが生合成される。

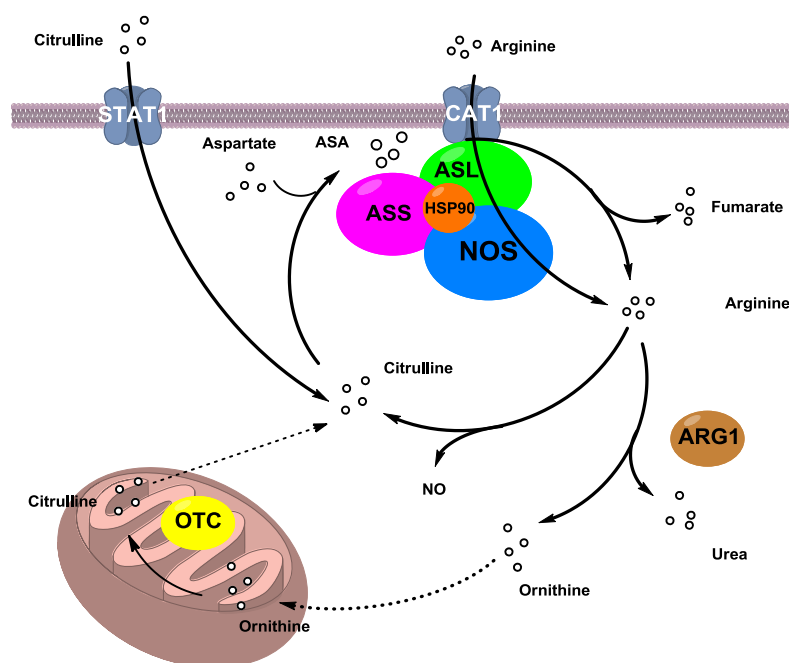


Figure 2-1: Biosynthesis and metabolism of citrulline

ペプチド性シトルリンは、ペプチド性アルギニン脱イミノ化酵素 (PAD) によるアルギニン側鎖の脱イミノ化によって生成する (Figure 2-2)²⁰。

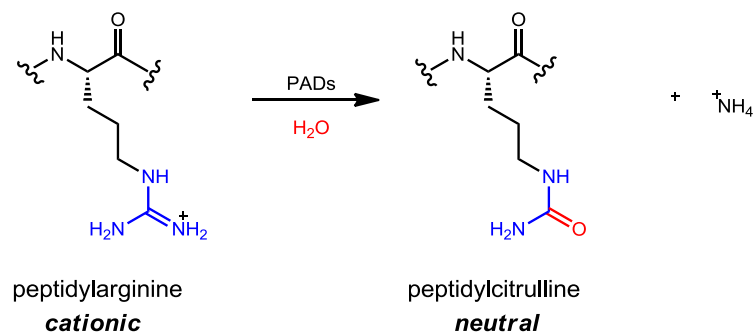


Figure 2-2: Citrullination of peptidylarginine by PADs

この反応はシトルリン化と呼ばれ²¹、近年ではタンパク質のアルギニン残基の翻訳後修飾の1種として認識されている。このシトルリン化に伴い、生理的条件下でカチオン性を帯びたグアニジノ基は電荷的に中性なウレイド基へと変換される。シトルリン化の際の分子量の変化は極わずかであるが、疎水性の上昇や静電反発の軽減、水素結合ドナー・アクセプターの数の変化 (Figure 2-3) によってタンパク質のフォールディングや他の生体分子との相互作用 (Figure 2-4) に変化が生じる^{22,23}。これまでにシトルリン化の明確な生理学的意義は解明されていないが、タンパク質の高次構造およびその機能やタンパク質分解耐性に影響を与える可能性があると考えられている²²⁻²⁴。

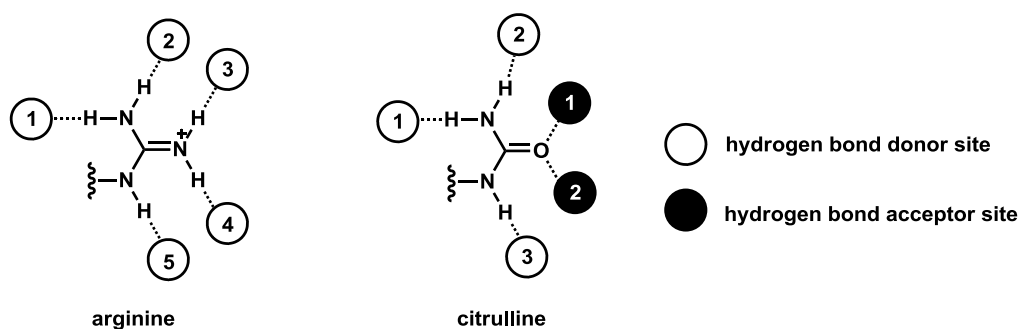


Figure 2-3: Hydrogen bond donor/acceptor site of arginine and citrulline.

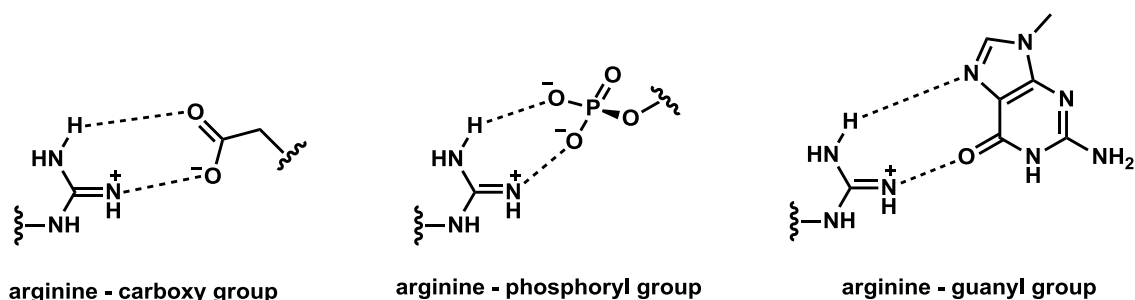


Figure 2-4: Interactions of the arginine guanidinium group with the carboxyl, phosphoryl and guanyl groups.

2-2 ペプチド性アルギニン脱イミノ化酵素 (Peptidylarginine deiminase; PAD)

2-2-1 PAD アイソザイムの特徴

タンパク質中のシトルリン残基は 1960 年代に毛髪の内毛根鞘細胞および髄質細胞の加水分解物であるポリペプチドから検出された²⁵。このシトルリン残基は遺伝子にコードされていないアミノ酸残基であることから、タンパク質の翻訳後修飾によって产生されていることが推測された。その後の研究によって、カルシウム濃度依存的にペプチド性アルギニン残基をシトルリン残基へと変換する酵素として PAD が特定された²⁶。これまでに組織分布や基質特異性、遺伝子の異なる 5 種類のアイソザイム (PAD1-4, 6) が同定されている。これらのアイソザイムは共通して、カルシウムイオン濃度依存的に活性が増強することが知られており、1 mM 以上の高濃度のカルシウムイオン存在下で完全に活性化された状態になるという特徴を有している^{27,28}。しかし、生体内でどのようにして高濃度のカルシウムイオンが存在する環境を得ているのかは明らかではない。現在、チャネル開口時に mM オーダーまで濃度が上昇するカルシウムイオンチャネル近傍に一時的に移行して活性化を受けている可能性が指摘されている^{29,30}。さらに、PAD のカルシウム依存性は翻訳後修飾や結合タンパク質との相互作用により変化すると推測されており、実際に関節リウマチ患者から単離された抗体が結合した PAD4 は活性化を受け、0.2 mM のカルシウムイオン存在下でヒストン H3 中のシトルリンが 400 倍増加することが示された³¹。

PAD と類似のカルシウム依存性グアニジノ基修飾酵素である dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase (DDAH) や arginine deiminase (ADI) が L-アルギニンを基質とす

るのに対し³²、PAD はペプチド性アルギニンを基質認識し、L-アルギニンを基質認識しない³³。この基質特異性は、活性部位近傍のアミノ酸残基と基質との相互作用によって理解されている。Figure 2-5 に示すように、PAD4 の基質認識には R374 と基質主鎖のアミド部位との水素結合が重要であるが、L-アルギニンの場合このような水素結合を形成することができず、親和性が低くなる³²。また、この R374 のアラニン変異体では酵素活性が 20~50 分の 1 に低下したことから、この相互作用が基質認識および活性には重要と考えられる。PAD4 はこのようにして、ペプチド性アルギニンと遊離のアルギニンを区別して認識している。

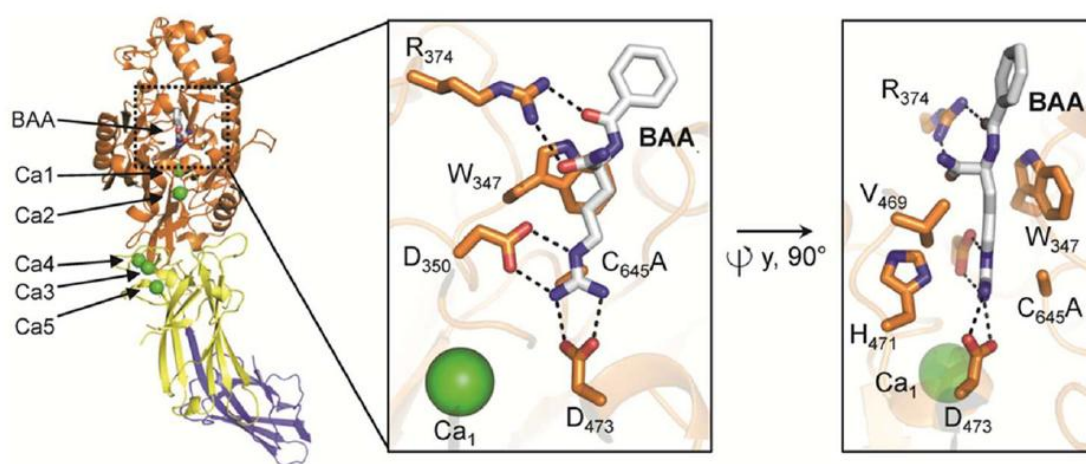


Figure 2-5. Substrate recognition of PAD4 with *N*^ε-benzoyl-L-arginine amide (BAA)³⁴.

また、PADs の触媒部位および基質認識部位は酵素表面に位置しているため、ペプチド性のアルギニンやタンパク質中のアルギニンを認識することが可能である。加えて PAD の触媒部位は U 字型の貫通した構造であるため、グアニジノ基と反対側の入り口から水が酸素源として接近し、脱イミノ化が進行する。それに対し、DDAH や ADI では L-アルギニンが近傍のループ構造によって溶媒から守られる形で活性部位に接近して酵素反応を受ける。このような立体効果が PADs と DDAH および ADI での基質認識の違いに寄与していると考えられる^{35,36}。

PAD4 によるシトルリン化は次のようなメカニズムで進行する(Figure 2-6)^{32,37,38}。基質アルギニン残基のグアニジノ基は D350, D473 のカルボキシ基と水素結合を形成し、活性中心に存在する C645 による求核攻撃を受ける。その後、グアニジノ基を挟んで C645 と反対側に存在する H471 からのプロトン供与と続くアンモニアの脱離、水の付加を経てウレイド基へと変換される。この触媒反応には、C645 のチオール基の脱プロトン化と H471 のプロトン化が共に起こることが必要であるため、PAD4 のシトルリン化は pH 7.3 ~ 8.3 の間で起こる。PAD1 および PAD3 でも同様の機構で進行する。

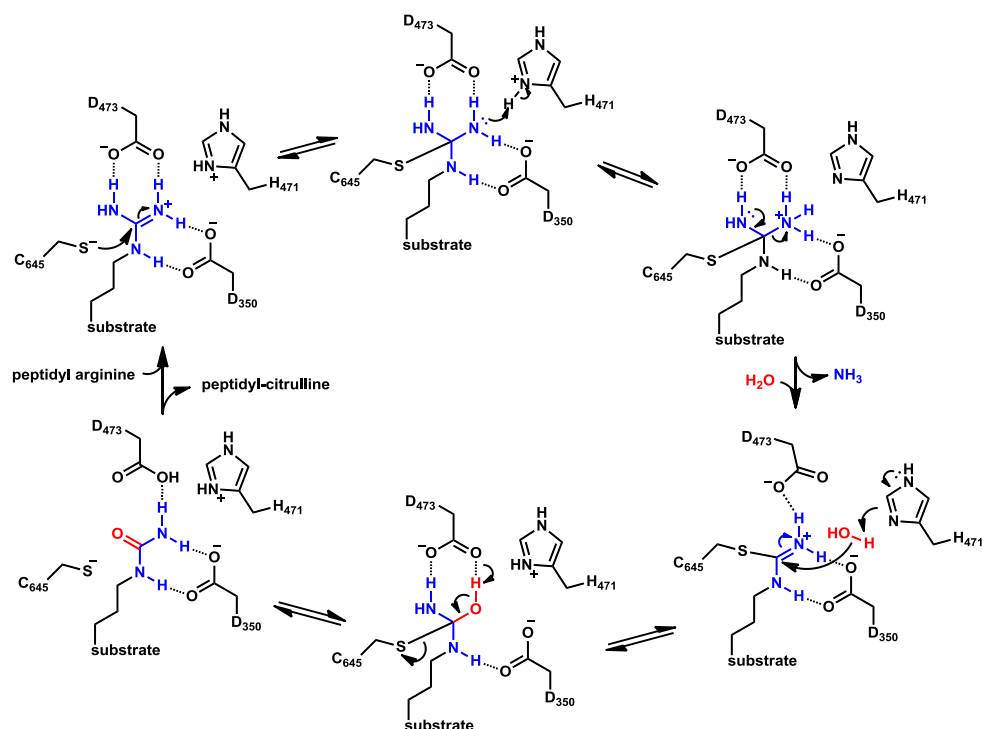


Figure 2-6. The mechanism of enzymatic reaction with PAD4, PAD1 and PAD3.

一方、pH プロファイルの結果から PAD2 の触媒反応では、基質アルギニン残基のグアニジノ基が D351, D473 のカルボキシ基との水素結合形成に加え、プロトン化を受けた H471 のイミダゾイル基による活性化を受けながら、C647 のチオラート による求核攻撃を受けることが示された (Figure 2-7)³⁹。そのため、PAD1,3,4 では段階的に進行する C645 のチオール基付加と H471 のイミダゾイル基の脱プロトン化が、PAD2 においては協奏的に進行する。

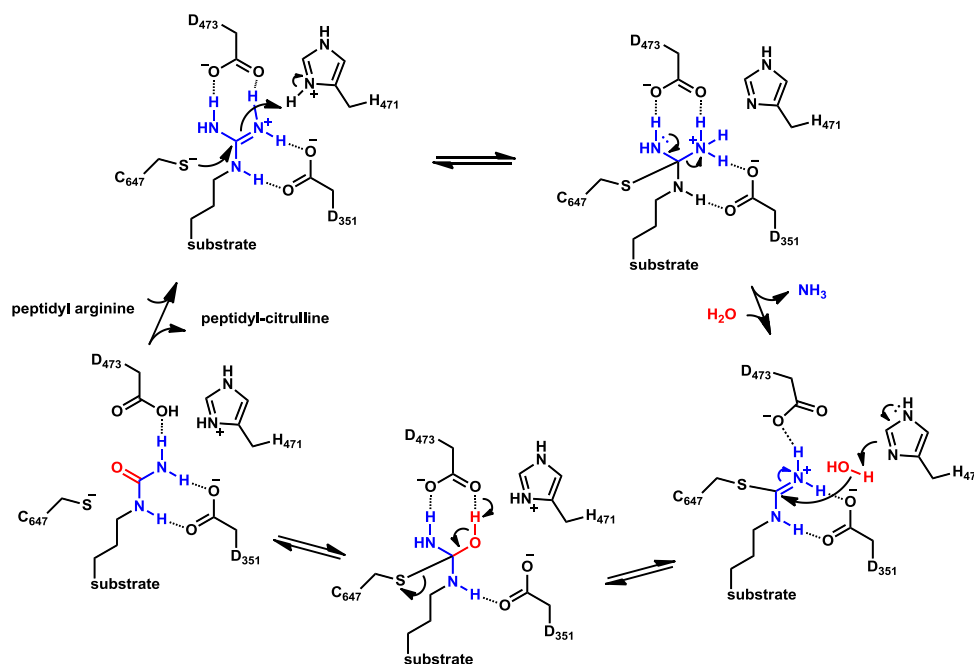


Figure 2-7. The mechanism of enzymatic reaction with PAD2.

2-2-1-1 PAD1

PAD1 は、主に表皮や子宮で発現し、発現した組織では細胞質に局在している。PAD1 はケラチン K1 を基質として、表皮組織の角質化に関与していると考えられている⁴⁰⁻⁴²。

2-2-1-2 PAD2

PAD2 は、PAD アイソザイムの中で最も多様な組織においてその発現が確認されているアイソザイムであり、分泌腺・脳・子宮・脾臓・腎臓・骨格筋・表皮などで発現している^{28,43-46}。この PAD2 の発現レベルの制御を担っている因子は mRNA スプライシングとタンパク質の翻訳である。PAD2 の基質として、中枢神経系のミエリン塩基タンパク質 (myelin basic protein; MBP) や骨格筋のビメンチンおよびマクロファージが知られているが^{46,47}、近年アストロサイトのグリア細胞線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein; GFAP) やヒト好中球のβ-アクチンとγ-アクチンが PAD2 の新たな基質として発見された^{48,49}。PAD2 は各組織中で細胞質に発現しているが、マウス乳腺上皮細胞やスクレイピー感染マウスの海馬ニューロンでは核での PAD2 の発現が確認されたことから、ヒストンをはじめとした核内タンパク質のシトルリン化を介し核機能に関与している可能性が示唆されている^{50,51}。

2-2-1-3 PAD3

PAD3 は、表皮と毛嚢で発現が認められ、発現組織では細胞質中に局在している⁵²⁻⁵⁴。PAD3 は内毛根鞘や毛嚢髓質において構造タンパク質であるトリコヒアリンと共局在し、表皮ではプロフィラグリンやフィラグリンと共局在している。PAD3 が標的とするフィラグリンは顆粒層や角質層下層部でケラチン中間径フィラメントと相互作用している。PAD3 によるフィラグリンやトリコヒアリンのシトルリン化は *in vivo* でも確認されている。

2-2-1-4 PAD4

PAD4 は、白血球に加え、様々な臓器の腫瘍において過剰発現が確認されているため^{11,47,55}、腫瘍化に関連している可能性が示唆されている^{56,57}。PAD4 は 5 つの PAD アイソザイムの中で唯一 N 末に核移行シグナル (nuclear localization signal, NLS; P₅₆AKKKST₆₃) を有しており、核局在を有すると考えられている⁵⁸。PAD4 はヒストン H1, H2A, H3, H4 など様々な核内タンパク質をシトルリン化するため、核機能に対して重要な役割を担っていると考えられている^{13,59-64}。

2-2-1-5 PAD6

PAD6 は、マウスの卵や胚から同定され、卵細胞の細胞骨格形成と受胎能力の制御に関与すると認識されてきたが⁶⁵、近年になり、細胞質に局在して胚発生の早期段階において微小管機能の制御を担っていることが明らかになった⁶⁶。また、ヒト組織においては主に卵巣と精巣と末梢血白血球に発現している⁶⁷。PAD6 は活性中心のシステイン残基を持たないため、他のアイソザイムとは異なり脱イミノ化活性を示さない可能性が示唆されている³²。

以上の内容をまとめると Table 2-1 のようになる。

Table 2-1. The distribution, substrate and pyshiological role of PAD isozymes.

Isozyme	Distribution	Substrate	Physiological role
PAD1	Skin epidermis, uterus Cytoplasm	Keratin, filaggrin	Skin differentiation
PAD2	Numerous tissue especially muscle, brain Cytoplasm, nucleus	Myelin basic protein, vimentin, hitrone H3, H4	Probably brain development
PAD3	Skin, hair follicle Cytoplasm	Filaggrin, tricho hyalin	Skin differentiation, hair follicle formation
PAD4	Granulocyte, macrophage, neutrophil Nucleus	Nuclear protein, ex. histone H1, H2A, H3, H4	Cellular differentiation, transcriptional regulator, NET formation
PAD6	Oocyte, embryos Cytoplasm	No citrullintion activity	Embryonic development, oocyte cytoplasmic lattice formation

2-2-2 PAD4 の遺伝子制御

真核生物の DNA はコアヒストン八量体に巻きつき、ヌクレオソーム構造を形成する⁶⁸。この構造を基盤とし、高次のクロマチン構造が形成されることで遺伝子発現が制御されている。クロマチンの高次構造を制御する因子の一つとして、DNA メチル化やヒストンの翻訳後修飾に代表されるエピジェネティクスが挙げられる。DNA メチル化はヘテロクロマチンを形成することで遺伝子発現の制御に関与する⁶⁹。ヒストン修飾としてこれまでにアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などが発見されており、これらの修飾が組み合わさることでクロマチン構造が変化し遺伝子発現が制御されている。そして近年、シトルリン化も新たなヒストン修飾としてクロマチン構造の変化に関与すると考えられるようになった⁷⁰。

ヒストンの修飾を行うために、アセチル化を司る HAT (histone acetyltransferase) と脱アセチル化を司る HDAC (histone deacetylase)、リン酸化を司るキナーゼと脱リン酸化を司るホスファターゼといった、アミノ酸側鎖の相互変換を可能とする 2 種類の酵素が対になって存在している^{71,72}。PAD4 はアルギニン残基に対する脱イミノ化酵素として同定されたが⁷³、通常アルギニン残基の脱イミノ化反応以外にもモノメチルアルギニン残基の脱メチルイミノ化を触媒することから、protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) や coactivator-associated arginine methyltransferase (CARM1/PRMT4) によるヒストン H3 や H4 のアルギニン残基のメチル化に拮抗することが知られている (Figure 2-8)¹³。一方で、対称、非対称を問わずジメチル化アルギニンに対するシトルリン化活性は低いことも知られている。

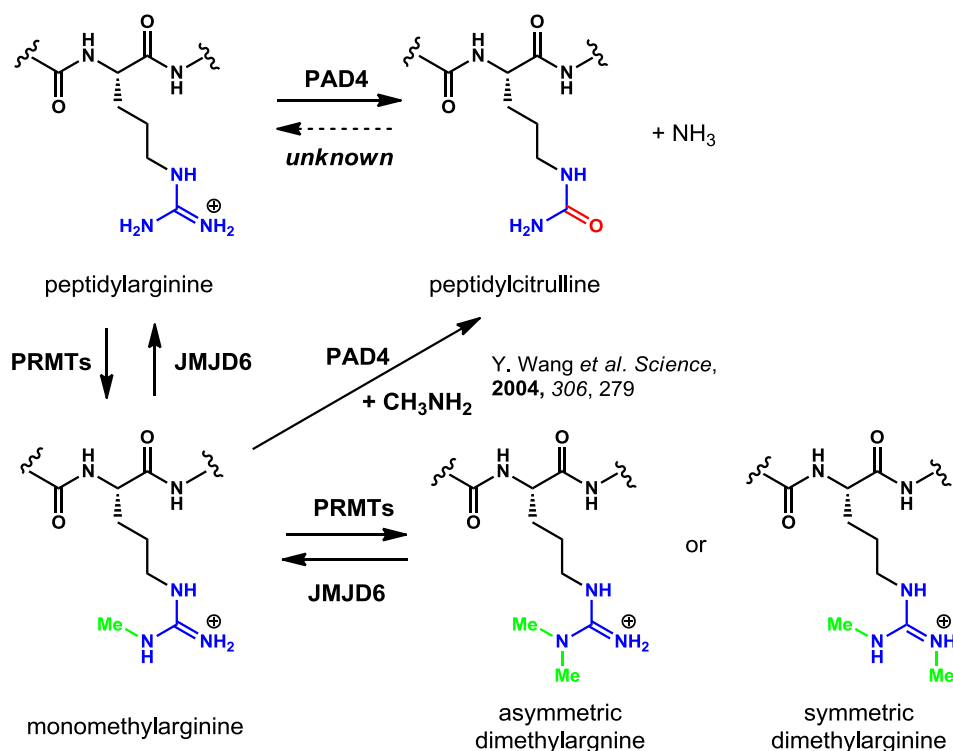


Figure 2-8. The interaction of citrullination and methylation of peptidyl arginine

また興味深い事に、メチル化やアセチル化などのエピジェネティックな修飾に対して脱メチル化および脱アセチル化活性を有する酵素が存在するが、シトルリン化に関してはPADが脱イミノ化反応を触媒する酵素であることは明らかではあるものの、その逆反応を触媒する酵素は現時点で発見されていない。

PAD4が拮抗すると考えられているCARM1 (PRMT4)とPRMT1は、ヒストンのアルギニン残基のメチル化を触媒し転写活性化因子として機能するため⁷⁴⁻⁷⁸、PAD4はそれらの酵素と拮抗し転写抑制因子として機能する可能性が考えられる。実際に、エストロゲン受容体標識遺伝子のプロモーター領域におけるアルギニン残基の修飾(ヒストンH3R17とヒストンH4R3)はエストラジオール処理により変化し、メチル化レベルの減少とシトルリン化レベルの上昇が確認された⁷⁹。この知見から、同領域でのPAD4とPRMTsの相互作用の可能性が示唆された。またPAD4はがん抑制遺伝子のp53とも相互作用し、p53標的遺伝子の発現を転写抑制因子として制御していることも明らかになった^{80,81}。DNA損傷前にはp21/CIP1 WAF1、GADD45やPUMAのp53標的遺伝子のプロモーター領域における高度なシトルリン化とPAD4の結合が見られるが、DNA損

傷後は PAD4 が解離してシトルリン化レベルが低下する一方で、メチル化レベルは上昇する。以上のことから、アルギニン残基のシトルリン化およびメチル化は遺伝子発現の制御に密接に関与していることが考えられる。PRMT とヒストンアセチル化酵素 p300/CBP は複合体を形成し、p53 標的遺伝子の転写活性化を担うことが報告されていること⁷³、および PAD4 と HDAC2 も p53 標的遺伝子プロモーター領域で結合していることから⁸⁰、エピジェネティックに p53 標的遺伝子の制御を実行していると考えられる (Figure 2-9)⁸²。

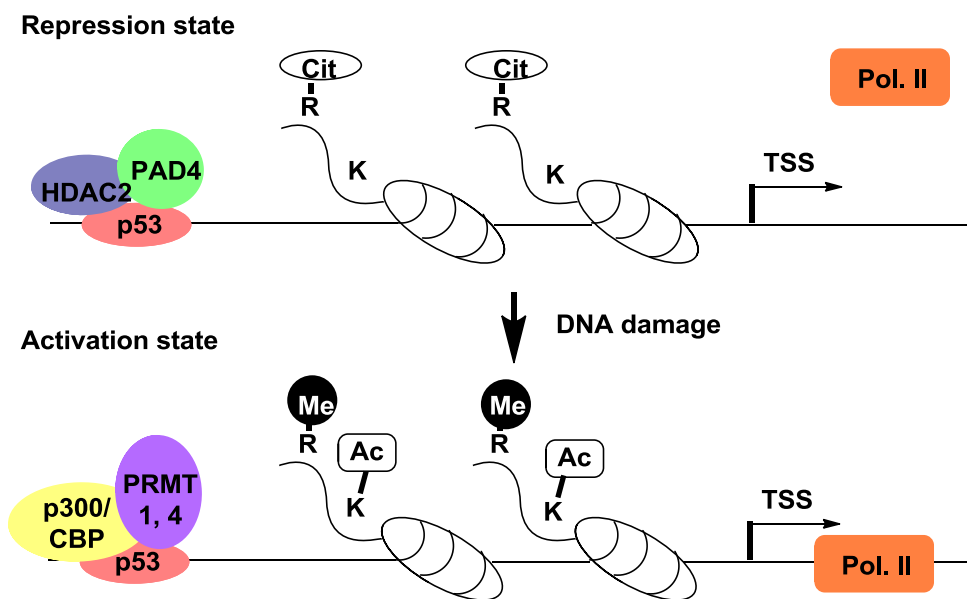


Figure 2-9. The epigenetic effect on p53 target genes.

また PAD4 には転写活性化因子としての働きも知られている。MCF-7 細胞において、ETS 発がん遺伝子ファミリーに属する Elk-1 遺伝子と相互作用し、シトルリン化を引き起こすことで、Elk-1 のリン酸化が亢進し転写活性化を誘導することが確認された⁸³。

2-2-3 PAD と NETs

2-2-3-1 NETs (Neutrophil Extracellular Traps)

好中球は細菌感染などから宿主を守る体防御機構を担っており、細菌を貪食し活性酸素を産生することによって生体防御に寄与している。2004 年、Brinkmann らによって好中球による新たな細胞死機構が報告された⁸⁴。その新規細胞死機構は、活性化好中球が核内のクロマチン網を細胞外に放出することによって誘導される。このクロマチン網は NETs (neutrophil extracellular traps) と呼ばれ、細胞質内抗菌タンパク質を含む⁸⁵。放出された NETs は細菌を捕捉して好中球やマクロファージによる貪食を受けやすくすることに加え、自身の殺菌作用によって宿主への感染を抑制する⁸⁴。この NETs 形成による細胞死は NETosis と定義され、アポトーシスやネクローシスなど他の細胞死とは区別されている。NETs は生体防御における重要な自然免疫機構であり、疾病との関連に注目が集まっているが、その制御機構には不明な点が多く残されている。しかし、NETs 形成に伴う放出物は周辺の正常細胞の細胞死をも誘発するため、生体内においては厳密に制御されていることが考えられる。

この NETs 形成にシトルリン化が関与すると考えられている。PAD4 によるヒストンのシトルリン化に伴う DNA との相互作用の減弱と、高次クロマチン構造の脱凝縮が NETs 形成を誘導すると考えられている (Figure 2-10)⁸³。

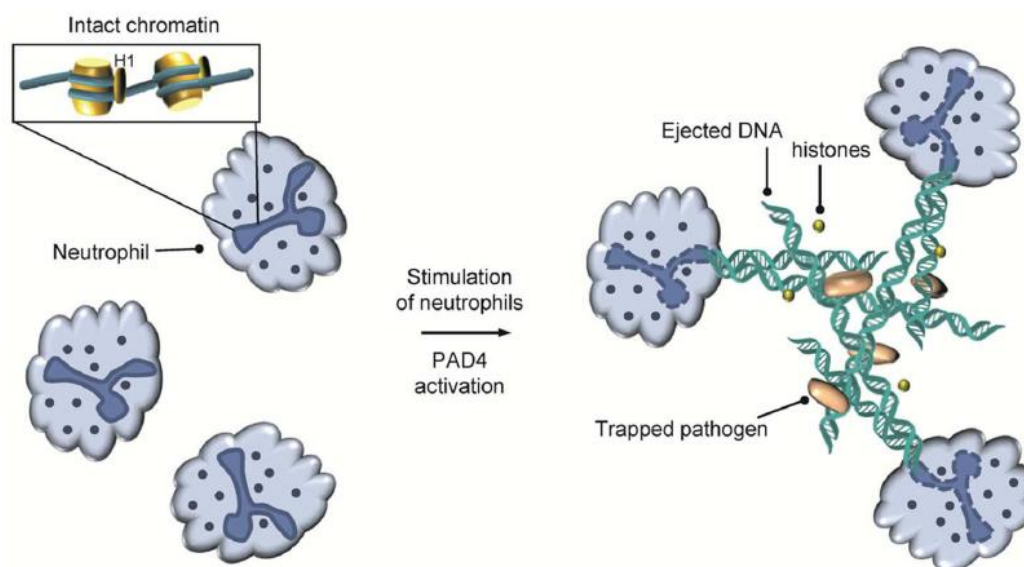


Figure 2-10. NET formation in neutrophils by PAD4³¹.

2-2-3-2 NETs とシトルリン化

近年、HL-60 細胞において、PAD4 の阻害が NETs 形成を強く抑制することが明らかになり、PAD4 と NETs 形成との関連およびヒストンのシトルリン化と NETs 形成の関連が示唆された^{86,87}。NETs 形成においてヒストンのシトルリン化は必要不可欠であり、活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) 依存的な PAD4 の活性化が必要である。NADPH オキシダーゼが抑制されて ROS が産生されない慢性肉芽腫症では NETs 形成が誘導されず易感染性になることから、NETs の生体防御における寄与は大きいと考えられる⁸⁸。さらに、PAD4 ノックアウトマウスにおいても NETs が形成されないことが示され、PAD4 活性すなわちシトルリン化が重要であることが示唆された。しかし、必要十分なシトルリン化の量など不明な点は残されている。

2-2-4 PAD と疾患

NETs と PAD4 との関連に加え、PAD および PAD が産生するシトルリン化タンパク質と様々な疾患との関連が明らかになってきている。

2-2-4-1 関節リウマチ

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は全身性の慢性自己免疫疾患であり、活性化したマクロファージの浸潤と滑膜の炎症が特徴である。リウマチ患者において臨床的に注目されている自己抗原として ACPA (anti-citrullinated protein antibody) が挙げられる⁸⁹。ACPA は当初、シトルリン化フィラグリンおよびその環状化ペプチドである CCP (cyclic citrullinated peptide) に対する自己抗原として同定され、その感度と特異性の高さから早期診断のマーカーや予後予測因子として注目されている。ACPA の抗原となるシトルリン化タンパク質には、フィラグリン・フィブリノフェン・ビメンチンなど報告例が多い^{8,90-92}。これらのタンパク質にシトルリン残基が存在すると免疫細胞に誤った信号が伝達され、免疫応答が起こり抗シトルリン化抗体の産生が誘導される。また、リウマチ患者において PAD4 と PAD2 が発現している白血球が滑膜液組織に浸透すると、滑膜液中に PAD4 および PAD2 を放出し、シトルリン化タンパク質が産生される^{93,94}。細胞外カルシウムイオン濃度は数 mM であるため、NETosis により放出された PADs は十分なシトルリン化活性を有すると想定される⁴⁵。

2-2-4-2 多発性硬化症

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は中枢神経系の疾患である。神経系では PAD2 と PAD4 が発現しており⁹⁵、中でも MS には PAD2 が深く関連すると考えられていて、MBP の過剰なシトルリン化とミエリン鞘の脱髄などが誘導される。また、過剰なシトルリン化を受けた MBP ではリン脂質との間の相互作用が減弱し、ミエリン鞘を形成できなくなる。MS の症状が発現するよりも先に、ミエリン鞘における PAD2 の発現および MBP のシトルリン化レベルの上昇が確認されている。

2-2-4-3 がん

ヒストン修飾や DNA のメチル化といったエピジェネティックな修飾には腫瘍形成との関連が深い^{96,97}。PAD4 は主に白血球に発現しているが、腫瘍組織内での過剰発現が認められている¹¹。また、PAD4 はがん抑制関連遺伝子 p53 に対する抑制因子として作用し、その下流に存在するがん化抑制遺伝子を制御することから PAD4 の過剰発現と腫瘍形成との関与が考えられた。一方、PAD4 の発現は p53 に直接的に制御されており、p53 に対してネガティブフィードバックな作用が示唆されている⁹⁸。加えて、近年 PAD4 阻害剤 YW3-56 と HDAC 阻害剤 SAHA との併用によってがん細胞の成長を阻害可能なことが報告され、PAD4 は HDAC2 とともに p53 標的遺伝子の発現を抑制することが示された⁹⁹。これらの知見から、PAD4 阻害剤が抗がん剤として作用する可能性が示唆された。

2-4-4-4 アルツハイマー病

中枢神経系で起こるタンパク質のシトルリン化は、タンパク質の変性と沈殿析出を誘発することによって神経を脱落させ、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) をはじめとする神経変性疾患を引き起こす^{100,101}。実際に AD 脳ではビメンチンや GFAP などのシトルリン化タンパク質が同定されており、今後益々の研究が期待される領域と思われる。

2-3 PADs に対する基質特異性

PADs のアイソザイム間の基質特異性は、触媒メカニズムが共通な PAD1, 3, 4 について化学合成したヒストン H4 の N 末側の部分配列を用い検討された¹⁰²。その結果、PAD3 が PAD1,4 と比較し長いペプチド配列をよく認識することが示され、この知見を基に PAD3 選択的阻害剤が開発された。

基質認識において重要な要因としてはアルギニン残基が形成する 2 つのアミド結合のカルボニル基と R374 の相互作用と、アルギニン残基の周辺ペプチドのβ-シート様構造の形成¹⁰³が考えられているが、PAD4 はヒストン配列中の複数のアルギニン残基をシトルリン化することが知られている(Figure 2-11)。加えて PAD4 と PAD2 がヒストンの同じ位置のアルギニン残基をシトルリン化可能なことも明らかになっている。しかし生体内ではこれらのシトルリン化は厳密に制御されており、そのような選択性を獲得する理由として、①高次クロマチン構造によるヒストンの基質への接近の制御、②シトルリン化以外の他の翻訳後修飾の関与、③PAD4 と協働する他の生体分子の存在などが考えられているが、詳細は未だ不明である。

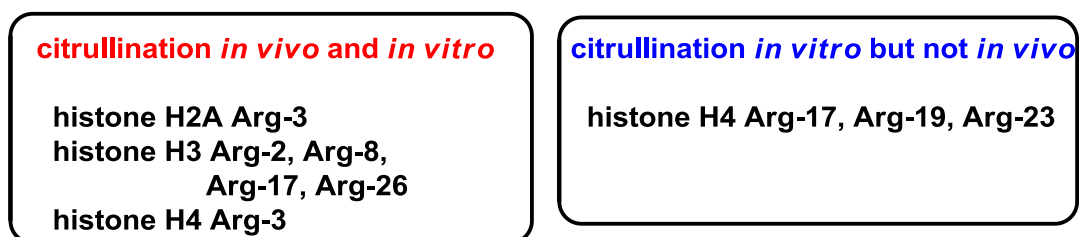


Figure 2-11. Citrullination sites of histones by PAD4.

2-4 PAD 阻害剤

2-4-1 可逆的阻害剤

これまでに報告されている PAD の可逆的阻害剤を Figure 2-12 に示す。生物活性天然物として知られている paclitaxel は mM オーダーで PAD4 に対する阻害活性を示す¹⁰⁴。また、抗生物質として知られているストレプトマイシンやミノサイクリンも PAD4 に対する阻害作用を有するが、他のアイソザイムに対しても同様に阻害活性が認められ、選択性がないことが明らかになっている¹⁰⁵。Thompson らによって報告されたルテニウムレッドはカルシウムイオンが結合していないアポ酵素と相互作用し、PAD2 の活性発現に重要なカルシウムイオンの競合的阻害剤として作用する¹⁰⁶。そのため、活性部位に結合しない阻害剤のシーズ化合物と認識されている。一方で、カルシウムイオン濃度依存性を示す化合物として GSK199、GSK484 が報告されている¹⁰⁷。これらの化合物は、nM オーダーで PAD4 に対する選択的な阻害活性を示す。その阻害様式は、活性部位の入り口付近で α -ヘリックスを構成するアミノ酸残基と相互作用し、その二次構造を崩し β -シート構造を誘起することによって考えられている。

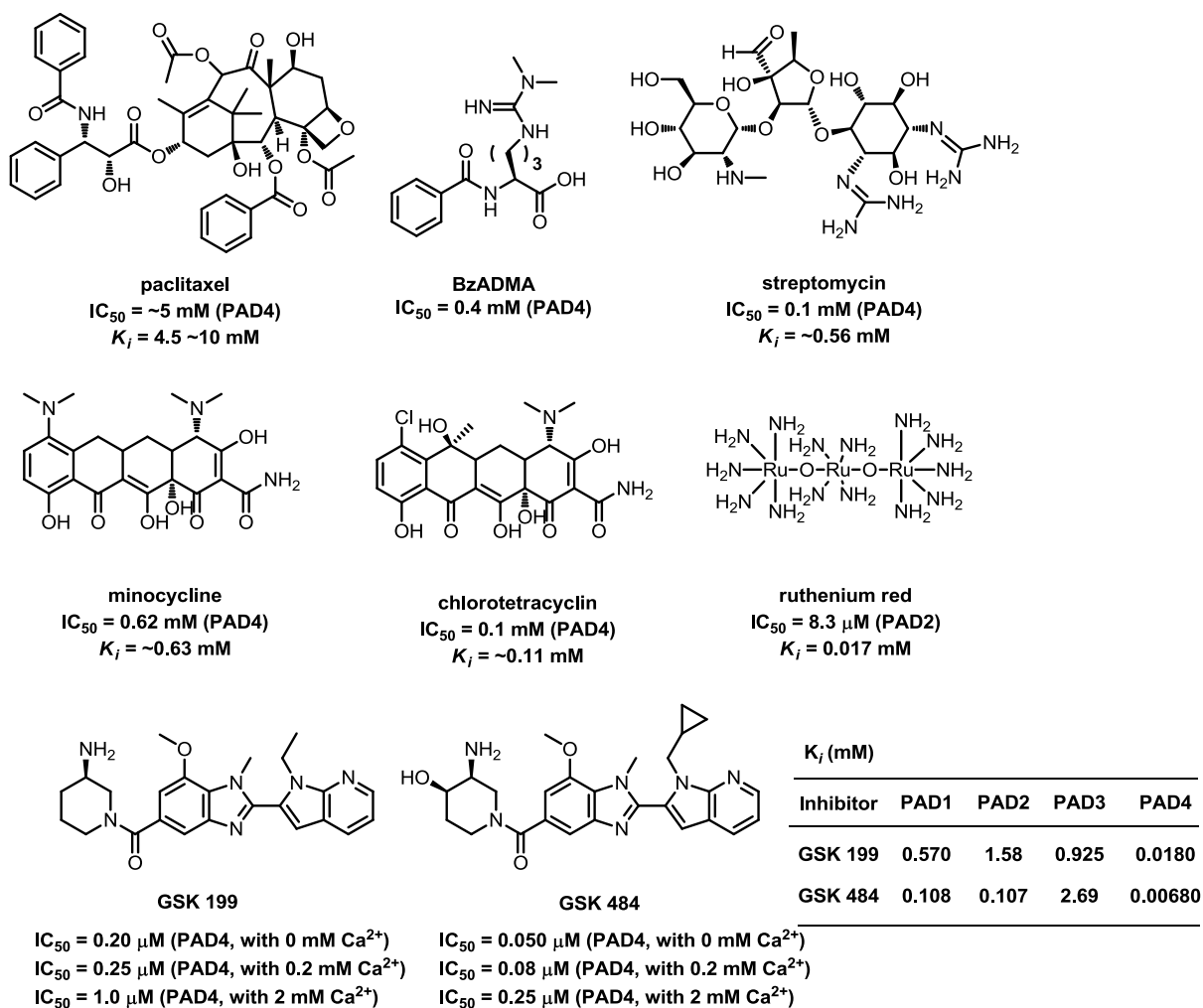


Figure 2-12. Reversible PAD inhibitors. 20

2-4-2 不可逆的阻害剤

これまでに報告されている PAD の不可逆的阻害剤の例を Figure 2-13 に示す。不可逆的阻害剤は PAD の活性部位に存在する C645 との間に共有結合を形成し、安定なチオエーテルを形成する。最初の共有結合型 PAD 阻害剤、Cl-acetamidine¹⁰⁸ をもとに、PAD のよい基質になる *N*-ベンゾイルアルギニン様構造へと誘導化された Cl-amidine が開発された¹⁰⁹。その後、Cl-amidine の問題点であった疎水性を向上させ、バイオアベイラビリティを改善した YW3-56 が報告された⁹⁹。YW3-6 の *in vitro* における IC₅₀ 値は Cl-amidine と同程度だが、膜透過性の改善により細胞系では約 50 倍の活性を示す。

これらの不可逆的阻害剤には、PAD 以外にも活性中心近傍にシステイン残基を有する酵素と反応し得る反応点を有することが欠点として挙げられる。また、共通して PAD アイソザイムを幅広く阻害してしまうため、それぞれのアイソザイム選択的な作用を解明することは困難である。今後は高活性な阻害剤の開発以上に、PAD アイソザイム選択的な阻害剤開発が求められる。

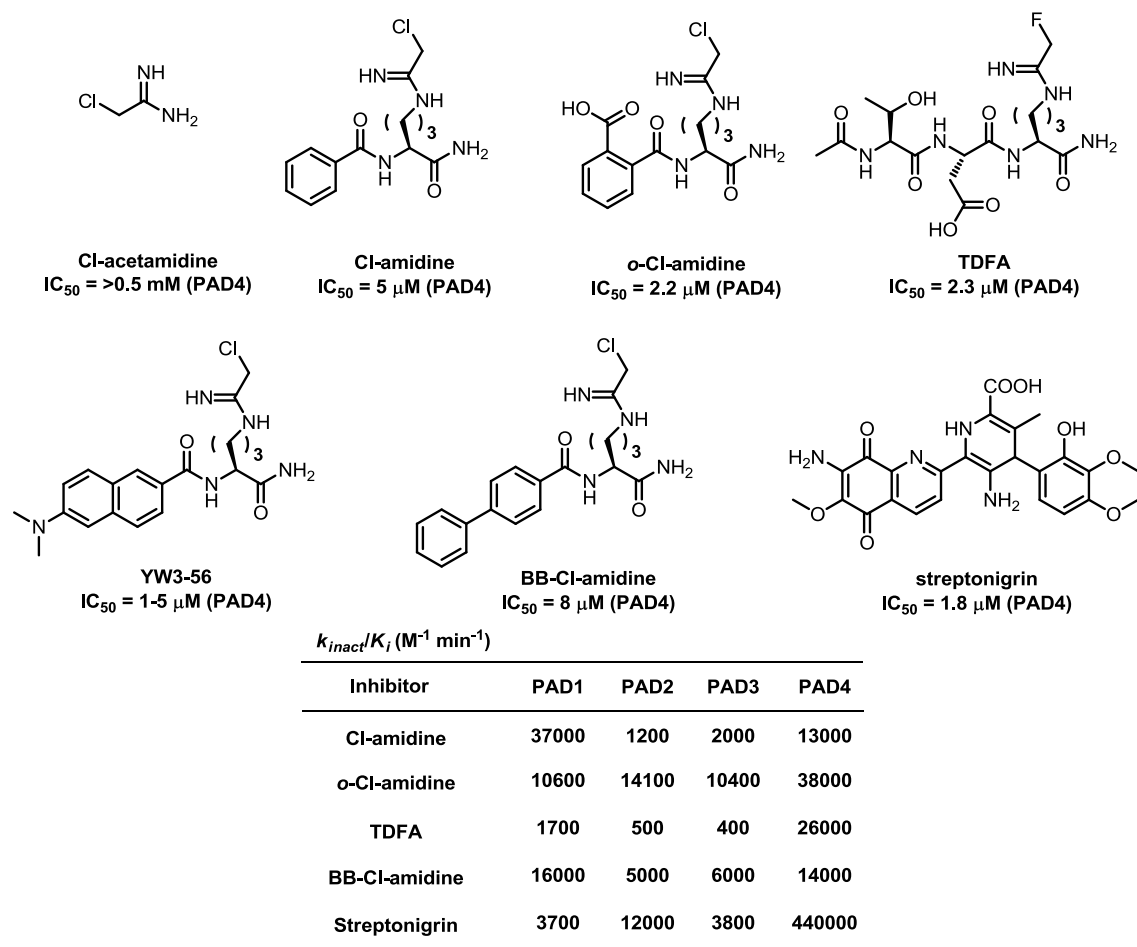


Figure 2-13. Irreversible and covalent PAD inhibitors.

2-5 PAD 活性検出法

一般的に PAD 活性はタンパク質のアルギニン残基のシトルリン化と関連するため、基質の脱イミノ化を追跡する手法が広く用いられてきた。

2-5-1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法

ELISA キットを用いた本手法は antibody-based assay for PAD activity (ABAP) アッセイと呼ばれ、抗シトルリン化抗体を用いて PAD により産生されたシトルリン化ペプチドを検出する手法である (Figure 2-14)¹¹⁰。マイクロプレートに異なる濃度のヒト PAD4 を添加し、シトルリン化ペプチドの増加量を測定することにより活性を評価する。ELISA 法は高感度かつ特異的である上に検体がライセートなど夾雑な場合でも特異的に PAD 活性を検出できるため、最も信頼性が高い検出系と言える。しかし、キットが高価なため、大規模なケミカルスクリーニングを行うにはコストが大きいことが問題点として挙げられる。

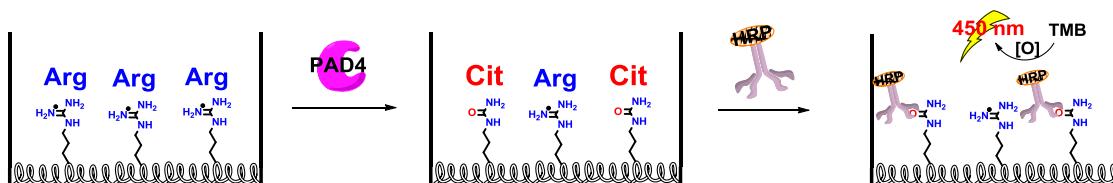


Figure 2-14. Mechanism of ABAP assay, HRP: horseradish peroxidase, TMB: tetramethyl benzidine

2-5-2 アンモニア検出法

アンモニア検出法は PAD4 が酵素反応によりグアニジノ基を脱イミノ化する際に副生するアンモニア量が PAD4 のシトルリン化活性に相関するという考えに基づき、人工基質 *N*- α -benzoyl-L-arginine (BAEE) の脱イミノ化により生じるアンモニアをオルトフタルアルデヒドと反応させることで PAD4 活性を検出する手法である (Figure 2-15)¹¹¹。この手法では、高反応性なアンモニアを正確に検出することが困難であること、再現性に乏しいことなどが問題点として挙げられる。

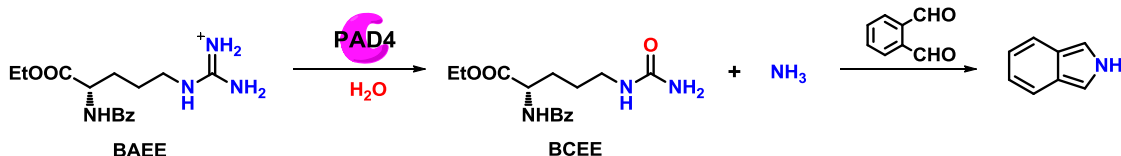


Figure 2-15. Mechanism of PAD4 screening kit based on the detection of ammonia

2-5-3 酵素反応を利用した turn-on 型蛍光プローブによる検出法

2014年 Sabulski らは turn-on 型蛍光プローブを用いた PAD4 活性検出法を報告した¹¹²。**ZRcoum** は、分子内のグアニジノ基がトリプシンに認識されることで C 末が切断され、蛍光性のアミノクマリンが遊離することで発蛍光性を示す (Figure 2-16)。一方、**ZRcoum** 中のグアニジノ基が PAD4 によりシトルリン化を受けると、トリプシンに認識されなくなり、アミド結合が切断を受けず蛍光強度の上昇は見られない。しかし、この評価系はトリプシン阻害活性を有する化合物には機能しない。そのため、トリプシンと PAD4 双方の阻害活性を有する化合物だとヒットしていても見落としてしまうことが懸念される。しかし、安価かつ高感度な PAD4 活性検出が可能な点は蛍光プローブを用いた評価系の最大の利点であり、今後改良を重ね実用化に近づけられることが期待される。

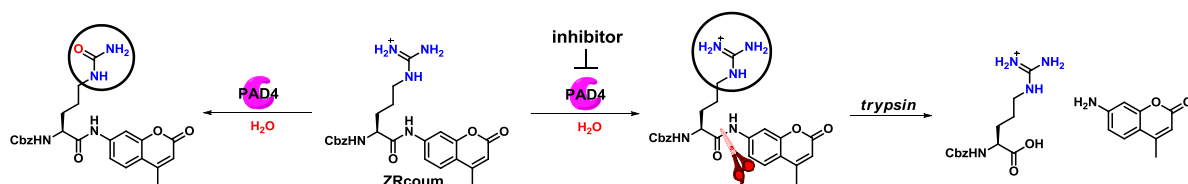


Figure 2-16. Mechanism of detecting PAD4 activity using ZRcoum.

2-6 研究目的

上述のように、タンパク質中のアルギニン残基のシトルリン化には多様な疾患との関連が指摘されており、疾患治療薬開発のために様々な活性評価系が構築されている。しかし、これまでに報告された **PAD4** 活性検出系には、大規模な化合物ライブラリーを用いたケミカルスクリーニングを実施するにはコストや再現性など克服すべき課題が多い。このことは他の翻訳後修飾酵素と異なり **PADs** によるシトルリン化が付加および分解を伴わず、酵素反応の前後での化学構造の僅かな変化を精緻に認識し活性検出に繋げる手法が乏しいためと考えられる。そのため、基質自身のシトルリン化もしくはシトルリン化を受けた基質の捕捉により検出可能となる機能性分子の開発が望まれている。

また、アルギニン残基のシトルリン化は、メチル化など他の翻訳後修飾と拮抗すると考えられている。したがってシトルリン化の生理学的意義の解明に加えシトルリン化を制御可能な分子ツールの開発は、複雑多岐にわたるエピジェネティクスの理解を大いに推進することが期待される。

そこで私は、より簡便な **PAD4** 活性検出系の構築を目的とした。その目的が実現できれば、構築した評価系を **PAD4** 以外の他の **PAD** アイソザイムに適用することで、アイソザイム選択的阻害剤の創製だけでなく、それぞれのアイソザイムの基質特異性に関する知見が得られると考え、網羅的な阻害剤探索を志向した評価系の構築にも着手した。

第3章 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

3-1 d-PeT 機構制御に基づいた PAD 活性検出プローブの高度化

3-1-1 Flu-Glyoxal (FG) の分子設計

簡便かつ高感度な PAD4 活性検出系を構築するために、当研究室山内は、2010 年に Tuttüren らにより報告された酸性条件下でのフェニルグリオキサールとシトルリンの特異的な環化反応に着目した (Figure 3-1)¹¹³。この特異的環化反応を蛍光分子の消光原理である光誘起電子移動の一種、donor-excited photoinduced electron transfer (d-PeT) 機構 (Figure 3-2)¹¹⁴⁻¹¹⁶ と組み合わせた turn-on 型蛍光プローブ **Flu-Glyoxal (FG)** を開発した¹¹⁷。

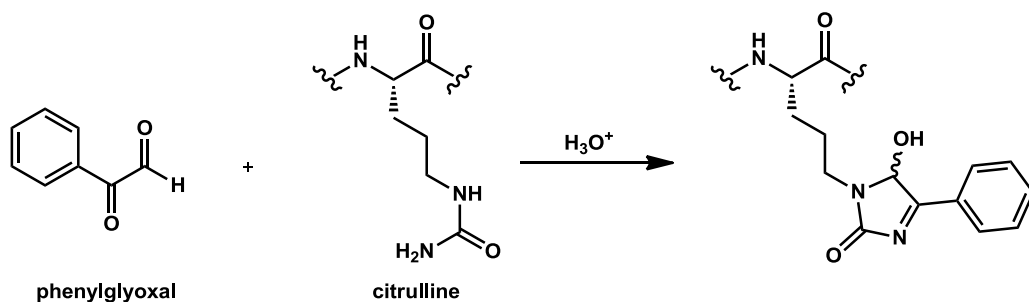


Figure 3-1. The specific reaction of glyoxal with citrulline under acidic conditions.

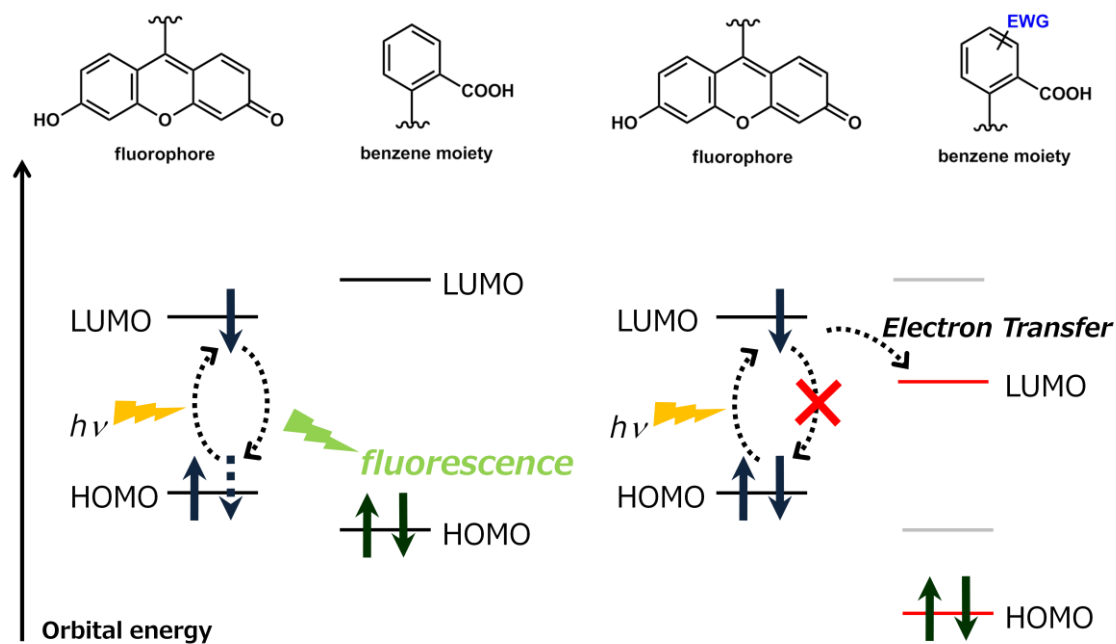


Figure 3-2. The quenching mechanism of fluorophore by d-PeT.

FG のベンゼン環の電子密度は電子求引性のカルボキシ基およびグリオキサル構造により低下しているが、酸性条件下でのシトルリン特異的反応により環化生成物に誘導されると、ベンゼン環の電子密度上昇に伴い d-PeT 機構による消光が解消され、蛍光が増大することを期待した (Figure 3-3)。また酸性条件下ではアルギニン側鎖はプロトン化を受け求核性を有さないことから **FG** はアルギニンとは反応しないと想定される。

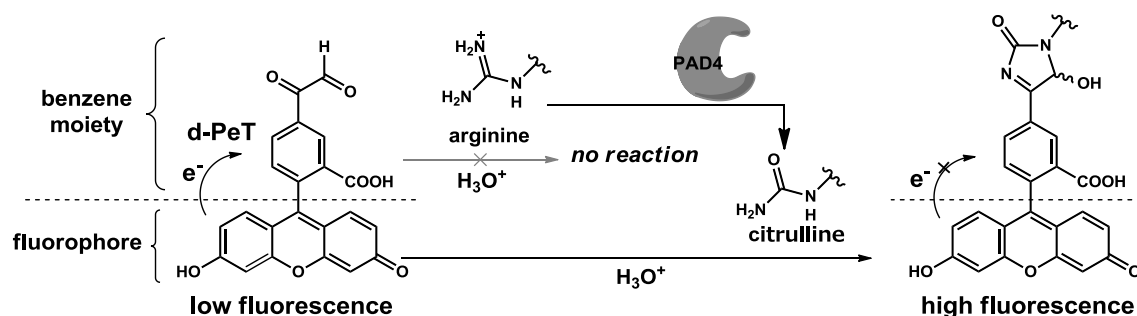


Figure 3-3. The presumed fluorescence enhancement mechanism of **FG** with citrulline produced by PAD4.

このように d-PeT 機構を作動原理とした turn-on 型蛍光プローブとして機能すれば、反応前後での蛍光強度を比較することでシトルリン産生量、すなわち PAD4 活性を検出することが可能になると期待された。

3-1-2 FG を用いた PAD4 活性検出¹¹⁵

山内は、**FG** を用いた PAD4 活性検出系を Figure 3-4 のように設計した。PADs の既知の人工基質である *N*^α-benzoyl-L-arginine ethyl ester (**BAEE**) はシトルリン化を受け *N*^α-benzoyl-L-citrulline ethyl ester (**BCEE**) に変換される。この **BCEE** を酸性条件下で **FG** と反応させた後、反応溶液を中和して蛍光測定を実施した。

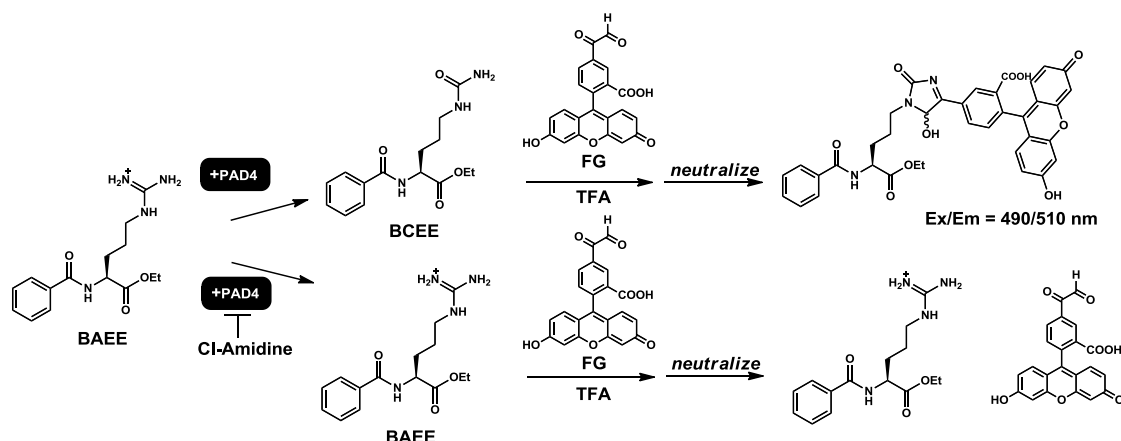


Figure 3-4. The assay design of detecting PAD4 activity using **FG**.

その結果、基質である **BAEE** と PAD4 (human recombinant) 存在下で有意な蛍光上昇が確認された (Figure 3-5)¹¹⁷。一方、酵素非存在下および阻害剤 **Cl-amidine**¹⁰⁹ を添加した条件下では蛍光上昇が認められなかったことから、**FG** はシトルリン選択的に反応することが示唆された。したがって、**FG** の蛍光増大を利用して **PAD4** 活性が検出可能であることが示された。

しかし、本評価系構築の過程で以下の2つの課題が明らかになった。1つ目の課題はフルオレセインが酸性条件下で分子内スピロ環化を引き起こすことで蛍光が pH 依存性を示すため、蛍光測定前に反応溶液を中性に導く必要がある点である。この中和操作における pH の値のばらつきが大きく、再現性良く中和することは困難であった。加えて大規模なケミカルスクリーニングの実施を想定すると、1つでも多くの操作を省略し、簡便化することが望ましいと言える。2つ目の課題は、酵素および基質が存在しない条件下においても **FG** の蛍光が観測されることである。そのため未反応の **FG** のバックグラウンド蛍光が生成物であるシトルリンとの環化生成物の蛍光に重なることが懸念された。このような背景から **FG** を高度化し、これらの課題を解決するための構造展開に着手した。

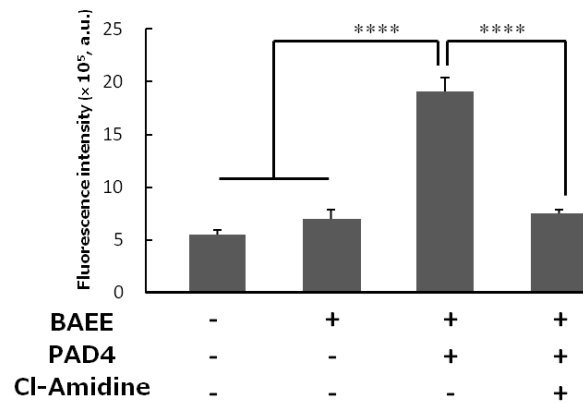


Figure 3-5. Detection of PAD4 activity using **FG**¹¹⁵. The enzymatic reaction was conducted in 100 mM Tris HCl buffer (50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 2 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 10 mM **BAEE**, 200 nM PAD4 and 100 μM Cl-amidine; total volume was 10 μL) at 37 °C for 30 min. Trifluoroacetic acid (TFA) (3.0 μL) and 750 mM **FG** (2.0 μL; in MilliQ containing 10% DMSO) were added and the mixture was incubated at 37 °C for 120 min, then diluted with MilliQ (185 μL). The results are mean ± s.e.m. from three experiments. *****p* < 0.0001 after Bonferroni correction (*n* = 3) Excitation wavelength, 490 nm; emission wavelength 510 nm.

3-1-3 フルオレセインの分子内スピロ環化平衡

フルオレセイン¹¹⁸は酸性条件下でスピロ環化消光を起こすことが知られている (Figure 3-6)¹¹⁹。この現象は、フルオレセインの2位カルボキシ基が電子欠損部位であるキサンテン環9位を攻撃して閉環体を形成することにより起こる。開環体ではキサンテン環の共役が保持され可視光領域の吸収と蛍光がそれぞれ見られるが、スピロ環化した閉環体ではキサンテン環の共役が分断され可視光領域の吸収と蛍光は消失する。したがって、**FG** を酸性溶液中でも蛍光性の開環体で存在可能な構造に誘導化する必要があると考えられた。

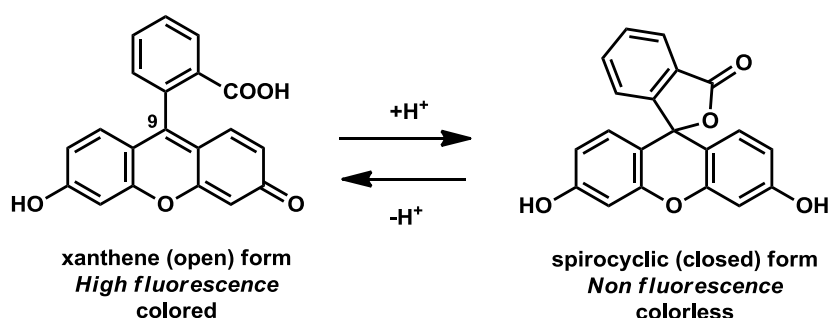


Figure 3-6. The spirocyclization of fluorescein under acidic condition.

フルオレセインにはスピロ環化を含んだ酸解離平衡が知られている (Figure 3-7a)¹²⁰。この平衡にはフルオレセインの2位カルボキシ基とキサンテン環のフェノール性水酸基が関与し、pH に応じて有利なフォームが異なる^a。一方、フルオレセイン2位をメチルエステル化した場合、カルボキシ基の脱プロトン化が進行しないため続くスピロ環化を抑制可能である¹²¹。その結果、フルオレセインの pH 2–6 の間で見られるフォームがメチルエステルでは存在せず、平衡に関与する部位をキサンテン環のみに限定できる (Figure 3-7b)。したがって、フルオレセイン2位をメチルエステル化することにより、フルオレセインの酸解離平衡を単純化し、酸性条件下で閉環反応が起こらないようにできると考えた。

^a フルオレセインは pH2-6 の水溶液中ではスピロ環化した閉環体となり得るが、さらに強い酸性条件下においてはキサンテン環のカルボニル酸素がプロトン化されて生じる開環体が優位に存在するようになる。特異的環化反応の条件は pH 0 であり、このプロトン化された開環体で存在していると考えられる。

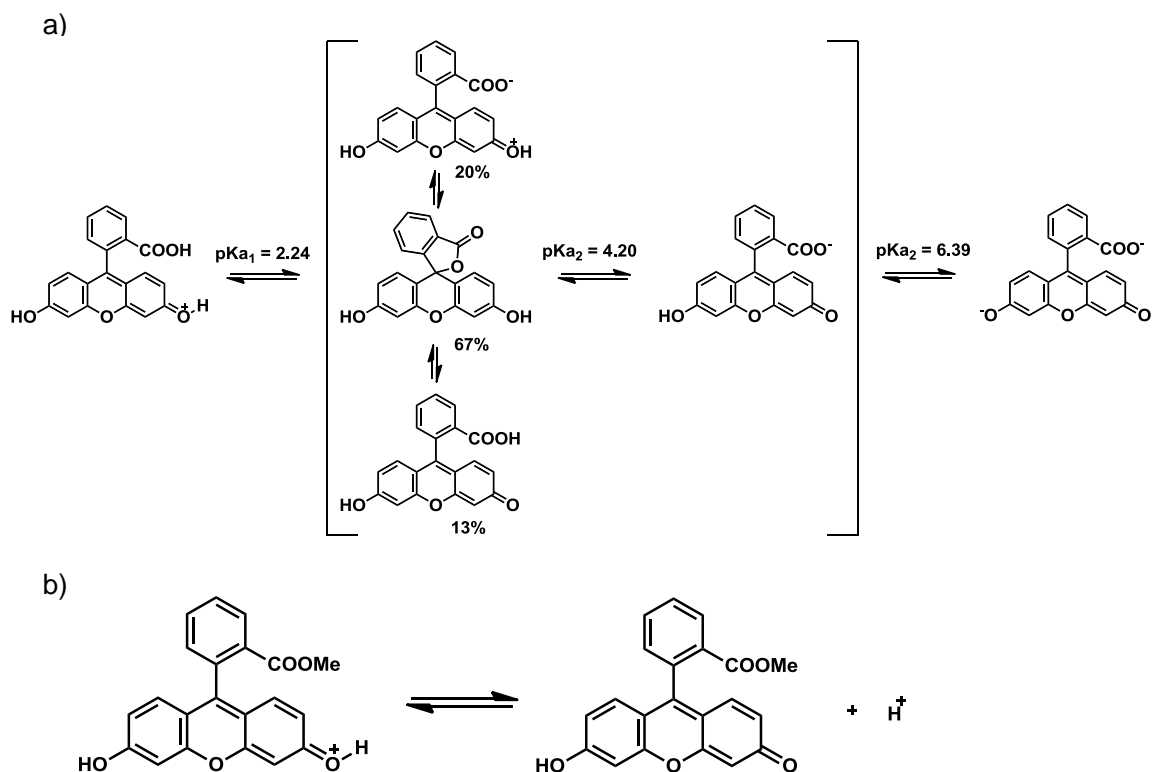


Figure 3-7. The acid dissociation equilibrium of (a) fluorescein and (b) fluorescein methyl ester.

また、これまでに様々なフルオレセイン誘導体が設計、合成され、その中の 1 つとして 2 位がカルボキシ基からメチル基に変換された **Tokyo Green (TG)**¹²² が知られている (Figure 3-8)。この **TG** であってもメチルエステル同様にフルオレセインのスピロ環化は抑制可能と想定される。しかし、カルボン酸誘導体であるエステルへの構造展開を採用することで、**d-PeT** 機構においてアクセプターとして機能するベンゼン環部位の電子密度への変化、すなわち **d-PeT** 機構制御への影響を最小限に抑制できると考えた。加えて、プローブの物性や分光学的特性も **FG** から大きく乖離しないことを期待した。

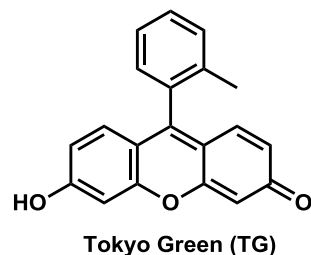


Figure 3-8. The structure of **TG**

スピロ環化を抑制し酸性条件下での蛍光測定を志向した **FG** のメチルエステル、**FGME** を市販のフルオレセイン誘導体から合成した (Scheme 3-1)。出発物質である **5**-アミノフルオレセイン (**5**) をジアゾニウム塩に変換後、ヨウ化カリウムを作用させヨウ化物 **6** に誘導した後に、キサンテン環の 2 つのフェノール性水酸基をアセチル基で保護し、ヨウ化物 **7** を得た¹²³。続いて、得られた **7** に対しパラジウム触媒存在下、無水酢酸を作用させてアセトフェノン誘導体へと導いた後¹²⁴、キサンテン環の 2 つのアセチル基の脱保護と酸触媒による 2 位カルボキシ基のメチルエステル化を行った。最後に、二酸化セレンを用いアセトフェノン部位を酸化してグリオキサール構造を構築し、目的の **FGME** を得た。また、**FGME** を酸性条件下で L-シトルリンと作用させることで環化生成物 **FGME-Cit** も併せて合成した。



3-1-5 FGME を用いたシトルリン検出

合成した **FGME** を用いて、シトルリン検出プローブとしての機能評価を行った。

まず、酸性条件下で L-シトルリンが検出可能であることを確認した。その結果、**FGME** は **FG** とは異なり、中和操作を行う必要なく、酸性のままマイクロプレート上で L-シトルリンを検出可能なことが示された (Figure 3-9)^b。以上より、**FGME** を用いることで **FG** による活性検出時に必要であった中和操作の省略に成功した。

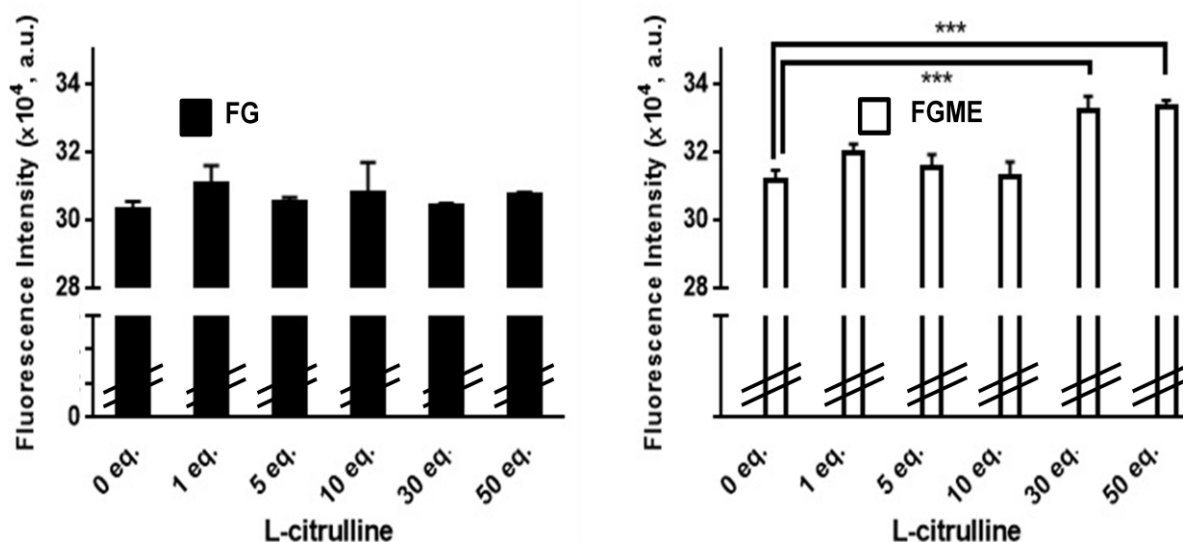


Figure 3-9. Detection of L-citrulline using **FG** or **FGME** under acidic conditions. To a sample solutions (15 μ L) of L-citrulline (1–50 eq.) in PAD buffer were added TFA (3 μ L, final concentration; 20%) and glyoxal probes (**FG** or **FGME**, 2 μ L, 750 μ M solution in MilliQ containing 75% DMSO, final concentration; 100 μ M), and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 2 h. The results are mean \pm s.e.m. from three experiments. *** $p < 0.005$ vs 0 eq. group after Bonferroni correction. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm

^b **FG** を用いた場合にはシトルリン濃度依存に関わらずほぼ一定の蛍光強度であった。この結果はシトルリンと反応していないのではなく、濃度依存性はあるものの蛍光増大が小さいのに対し値のばらつきが大きく、蛍光増大が誤差範囲内に収まっているため見かけ上差がなく見えると考えられる。**FG**、**FGME** どちらを用いた場合にも大きなバックグラウンド蛍光が得られた。このバックグラウンド蛍光の原因としてグリオキサールの求電子性由来する水和物の生成が考えられる。水和されるとベンゼン環の電子密度が上昇し d-PeT 機構による消光が不十分になり、蛍光性を示すと想定される。

しかし、**FGME** の蛍光増大は 30 当量以上という大過剰のシトルリン存在下でのみ確認され、10 当量以下の濃度域ではほとんど差がないことも明らかになった。その原因として、**FGME** の感度の低さが考えられた。グリオキサールとシトルリンとの反応は平衡反応であることから、シトルリンが 30 当量近く存在する場合に、はじめて有意な蛍光上昇が確認可能なほど平衡が偏ったと考えられる (Figure 3-10)。

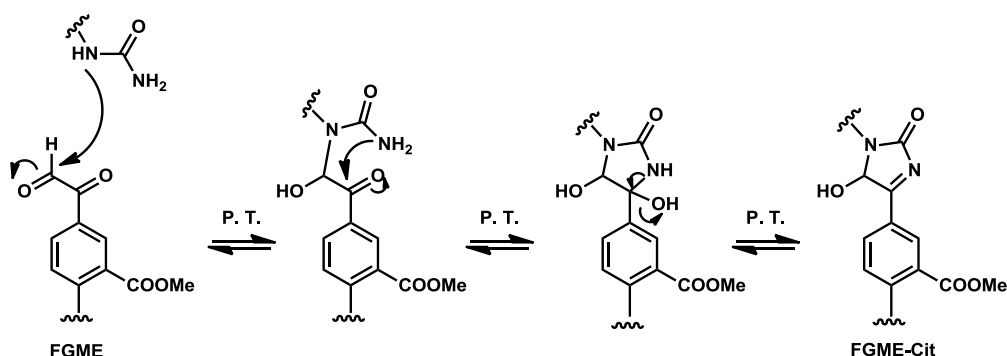


Figure 3-10. Presumed reaction mechanism of **FGME** with L-citrulline.

続いて L-シトルリンではなく、人工基質から PAD4 による酵素反応で産生したシトルリン化体が **FGME** を用いて検出可能であるか、評価した。

FG の機能評価の場合と同様、PAD の人工基質である **BAEE** を PAD4 と 37 °C でインキュベーションさせ、酵素反応を進行させた後、シトルリン化体 **BCEE** が存在する反応溶液を酸性に導き、**FGME** を加えさらに 2 時間 37 °C でインキュベーションしてグリオキサール部とシトルリン部とを反応させた。その結果、**FGME** は PAD4 による酵素反応により生じたシトルリン化体とも反応し、酸性条件のまま有意な蛍光増大で検出可能なことが示された (Figure 3-11)。加えて、その蛍光上昇は PAD4 阻害剤である **Cl-amidine** を添加することで有意に抑制されることも明らかになった。

° **BAEE** のみの場合に蛍光増大が認められた理由として、**FGME** と **BAEE** のグアニジノ基が反応した化合物が生じた可能性が挙げられる。そのような生成物はベンゼン環の電子密度の上昇に伴い、d-PeT 機構による消光が解消された蛍光性の化合物であると想定される。

Cl-amidine を添加するとコントロールと比較し蛍光強度が減弱した。この結果が再現性よく得られたことから、**Cl-amidine** は蛍光性の水和物の生成を抑制し、**FGME** の存在比を高める脱水剤のように作用する可能性が考えられる。

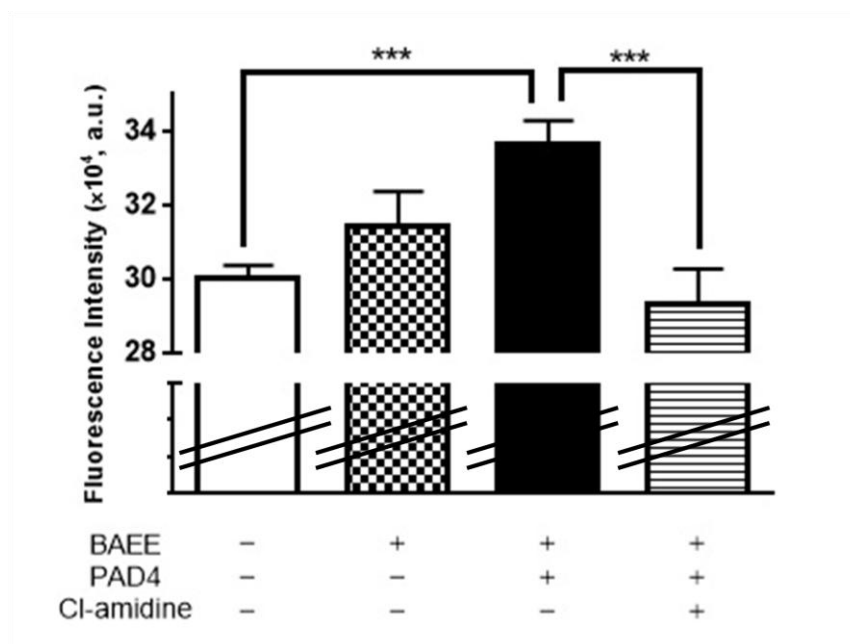


Figure 3-11. Detection of PAD4 activity using **FGME** under acidic conditions. A solution of PAD4 (5 μ M, 2 μ L), **BAEE** (100 mM, 2 μ L) and **Cl-amidine** (1 mM, 2 μ L) in PAD buffer (14-20 μ L) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 30 min. Then, TFA (10 μ L) and FGME (1 mM, 5 μ L) were added and the mixture was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 2 h. After the reaction finished, fluorescence intensity was measured with a plate reader. The results are mean \pm s.e.m. from three experiments. *** p < 0.005 after Bonferroni correction. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm

この結果から **FGME** を用いることで **FG** を用いた PAD4 活性検出系で必要であった中和操作を省略し、より簡便な *in vitro* PAD4 活性検出系を確立することに成功した。

しかし、**FG** を用いた評価系と比較して酵素反応前後での蛍光増大の程度が小さくなったことから、**FGME** への誘導化に伴いプローブの光学特性に変化が生じている可能性を考え、光学特性を測定、評価した。

3-1-6 FGME の光学特性評価

まず、**FGME** およびそのシトルリンとの環化生成物 **FGME-Cit** の吸光スペクトルと蛍光スペクトルを測定した (Figure 3-12)。そして測定した各種スペクトルから光学特性パラメータを算出した (Table 3-1)。

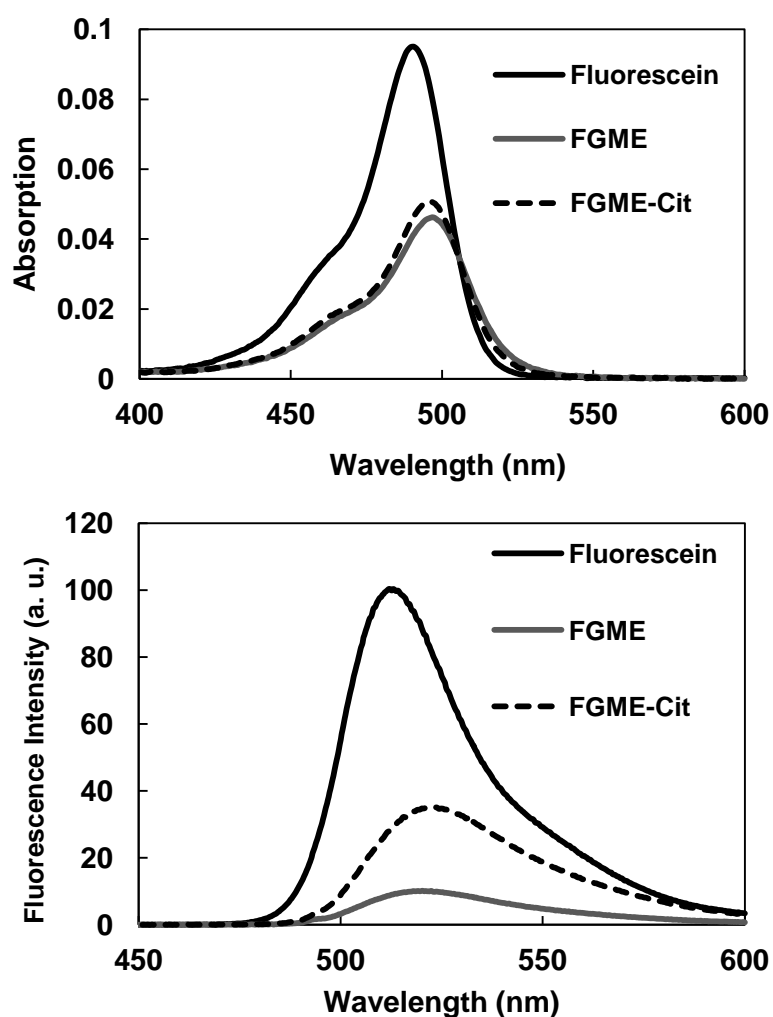
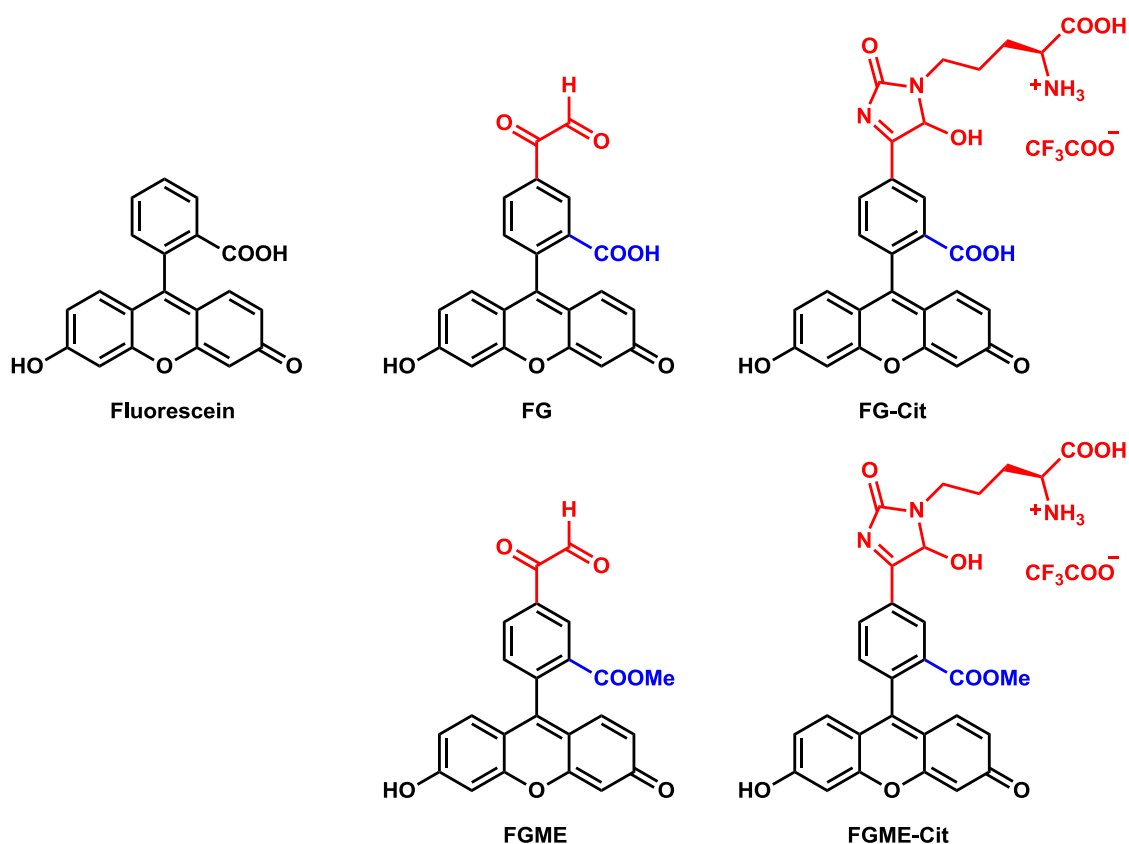


Figure 3-12. Absorption and fluorescence spectra of 1 μ M fluorescein (measured in 0.1 N NaOH solution containing 0.1% DMSO), **FGME**, **FGME-Cit** (measured in sodium phosphate buffer (pH 7.4)). $\lambda_{\text{ex}} = 493$ nm.

Table 3-1. Photochemical properties of fluorescein, **FGME** and **FGME-Cit** ^[a].



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

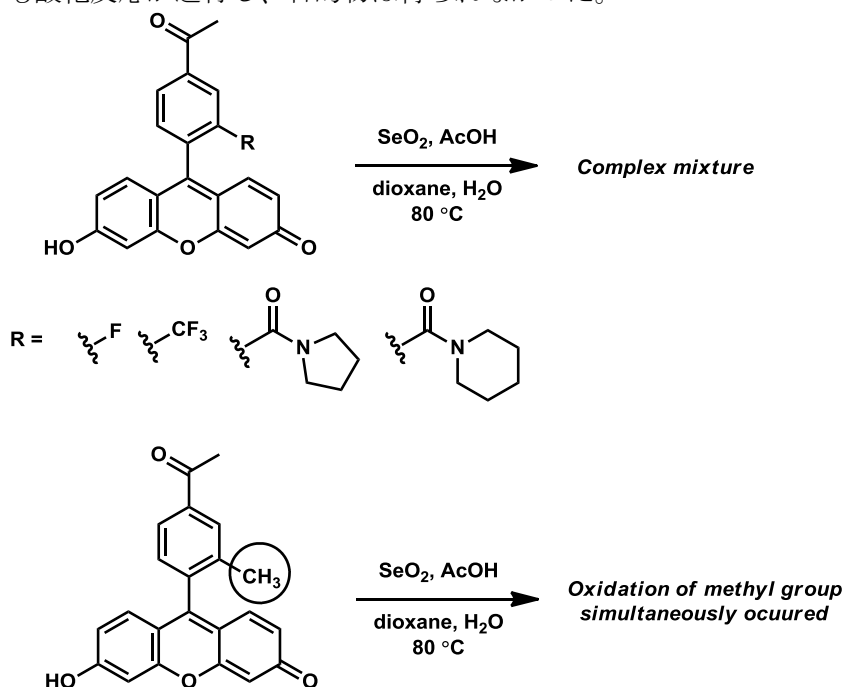
^[a] Measured in sodium phosphate buffer (pH 7.4). For determination of Φ_{FL} , fluorescein in 0.1 N NaOH ($\Phi_{\text{FL}} = 0.85$) was used as a fluorescence standard.

その結果、**FGME** はコントロールのフルオレセインと比較すると低い蛍光量子収率を示したため、d-PeT 機構による消光を受けている可能性が示唆された。また、**FGME** の蛍光量子収率は **FG** とほぼ同程度であり、メチルエステルへの誘導化後も期待通りプロブの d-PeT 機構効率は保持されていると考えられた。しかし、シトルリンとの環化生成物の蛍光量子収率に着目すると、**FG-Cit** に比べ **FGME-Cit** の蛍光量子収率が小さ

く、環化反応後の蛍光回復が小さいことが明らかになった。すなわち、**FGME-Cit** のベンゼン環の LUMO のエネルギー準位は **d-PeT** 機構制御を十分に解消するほどには上昇していないことが考えられた。

FGME、**FGME-Cit** の吸光スペクトルから、**FG**、**FG-Cit** に比べてそれぞれ極大吸収波長の長波長シフトが確認されたため、電子密度低下によるベンゼン環の LUMO エネルギー準位の低下が示唆された。この結果から、**FGME-Cit** のベンゼン環は **d-PeT** 機構による電子移動を起こすうえで最適な電子密度よりも低下している、すなわち LUMO のエネルギー準位が下がりすぎていることがシトルリンとの反応後の蛍光回復の効率低下を招いている可能性が考えられた^d。

^d この結果からメチルエステルでは電子求引性が高すぎると考え、下記のフルオレセイン 2 位を CF_3 基、アミド基に変換した化合物と 2 位にフッ素原子を導入した化合物の合成を試みた。いずれの化合物もセレン酸化前駆体までは調製できたが、グリオキサールへの酸化条件に付すと複雑な混合物が得られた。ESI-MS や NMR 測定を試みたが、目的物の存在を確認することはできなかった。また、2 位カルボキシ基がメチル基に変換された **TG** 誘導体の合成も試みた。しかし、この化合物ではグリオキサールへの酸化と同時に 2 位メチル基でも酸化反応が進行し、目的物は得られなかった。



3-1-7 酸性条件下における **FGME** の光学特性評価

これまでの光学特性評価は中性緩衝液中で行った結果に基づくものであり、PAD4 活性検出系で蛍光測定を行うグリオキサールとシトルリンとの反応溶液、すなわち強酸性条件下におけるプローブの光学特性を反映しているわけではないことが懸念された。そこで、20% TFA を含む緩衝液中での **FG** および **FGME** とそれぞれのシトルリンとの環化生成物 **FG-Cit**、**FGME-Cit** の吸光スペクトルと蛍光スペクトルの測定を行った (Figure 3-13)[°]。

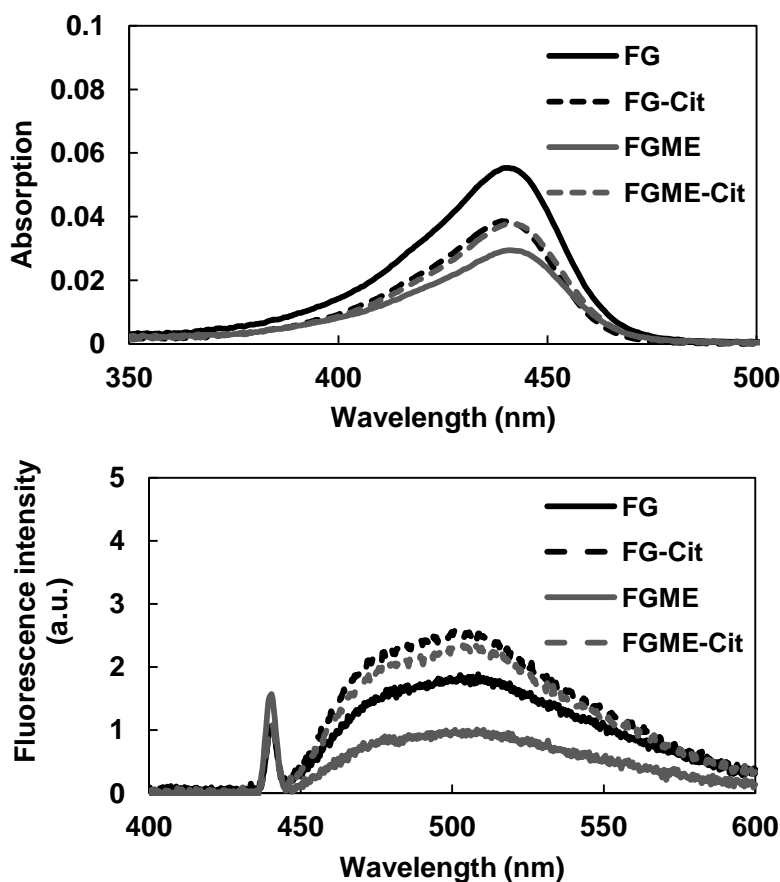


Figure 3-13. Absorption (upper) and fluorescence (bottom) spectra of 1 μ M **FG**, **FG-Cit**, **FGME**, and **FGME-Cit** (measured in sodium phosphate buffer containing 20% TFA). λ_{ex} = 440 nm.

[°] 3-1-3 で述べたように、キサンテン環がプロトン化を受けて開環体として存在しているかを吸収スペクトルから判断できると考えた。その結果、**FG**、**FGME** はどちらも 440 nm 付近に極大吸収を持ち、開環体の存在が示唆された。そこで、440 nm で励起した場合の **FG** と **FGME** の蛍光スペクトルを測定し、得られたスペクトルを比較した。

測定した各種スペクトルから、**FG** および **FGME** は酸性条件下においても **d-PeT** 機構による消光を受けていることが示唆された。また、**FG** および **FGME** とそれぞれの環化生成物 **FG-Cit** および **FGME-Cit** との蛍光スペクトルの比較から、**FGME** では環化反応前後で **FG** よりも大きな蛍光強度の増大が観測された。この蛍光増大の差が酸性条件下におけるシトルリン化体検出を可能にした要因であると考えられる。

これらの結果から、酸性条件下における **FGME** の光学特性は **FG** と比較しても検出感度の低下の直接の原因にはならないことが示唆された。したがって、**FGME** は **FG** よりも酸性条件下での蛍光測定に適した光学特性を有しているが、その反応性が十分ではないため **PAD4** 活性検出系においては検出感度が低下したと考えられた。

3-1-8 小括

当研究室で開発された **d-PeT** 機構制御に基づいた新規シトルリン検出蛍光プローブ **FG** の課題の 1 つであった、蛍光の pH 依存性を改善した蛍光プローブ **FGME** を設計・合成した。合成した **FGME** は標品の **L**-シトルリンに加え、**PAD4** が酵素反応により産生した生成物であるシトルリン化体と特異的に反応し、特異的環化反応後の酸性溶液のままプレートリーダーを用いて検出可能なことを示した。

これらの結果から、**FGME** を用いることで **FG** を用いた **PAD4** 活性検出系では必要であった中和操作を省略した、より簡便な *in vitro* **PAD4** 活性検出系の構築を実現した。

3-2 アイソザイム非依存的な PAD の網羅的活性検出を志向した benzil 型蛍光プローブの開発

3-2-1 d-PeT 機構制御型蛍光プローブ **FGME** の問題点

FGME への誘導化によってフルオレセインのスピロ環化を抑制し、酸性条件下における蛍光測定を実現したが、**FGME** にも 2つの問題点が残されていた。すなわち、**d-PeT** 機構による消光が不十分であるため、バックグラウンド蛍光が観測されて検出感度が低下する点、および **FGME** の反応性が乏しい点である。その原因として、グリオキサールの高い求電子性に由来する水和物の生成が考えられる。グリオキサールが水和を受けることで、ベンゼン環の電子密度すなわち **LUMO** のエネルギー準位が上昇した結果、**d-PeT** 機構による消光効率の低下を誘導することが予想された。

また、シトルリンのウレイド基は酸性条件下でグリオキサールとのみ反応し、その水和物とは反応しない。そのため、水和の起こりやすさは反応溶液中のグリオキサールの存在比を低下させるため、消光効率だけでなく反応効率の低下も招くことが懸念された。

これらの問題を解決するための方法として、フルオレセインのベンゼン環の電子密度のチューニングが考えられるが、ベンゼン環への官能基導入法は乏しく、広範な誘導体合成は困難なことが予想された。

3-2-2 d-PeT 機構制御に基づいた turn-on 型過酸化水素検出蛍光プローブ

グリオキサール構造を有する d-PeT 機構制御型シトルリン検出蛍光プローブ **FGME** の問題点を解決するために、2011 年に東京大学長野らのグループによって報告された、d-PeT 機構を作動原理とする turn-on 型過酸化水素プローブ **NBz** に着目した¹²⁵。**NBz** では benzil 構造が過酸化水素と反応し、蛍光性の 5-カルボキシフルオレセインが放出されることで蛍光が回復する (Figure 3-14)。中性緩衝液中でこの benzil 構造は安定に存在するため、d-PeT 機構により効率的に消光を受けることが示されている。

加えてこれら benzil 型プローブでは末端芳香環の構造展開が容易であり、置換基導入によって 1,2-ジケトン反応性を調整することが可能と考えられた。

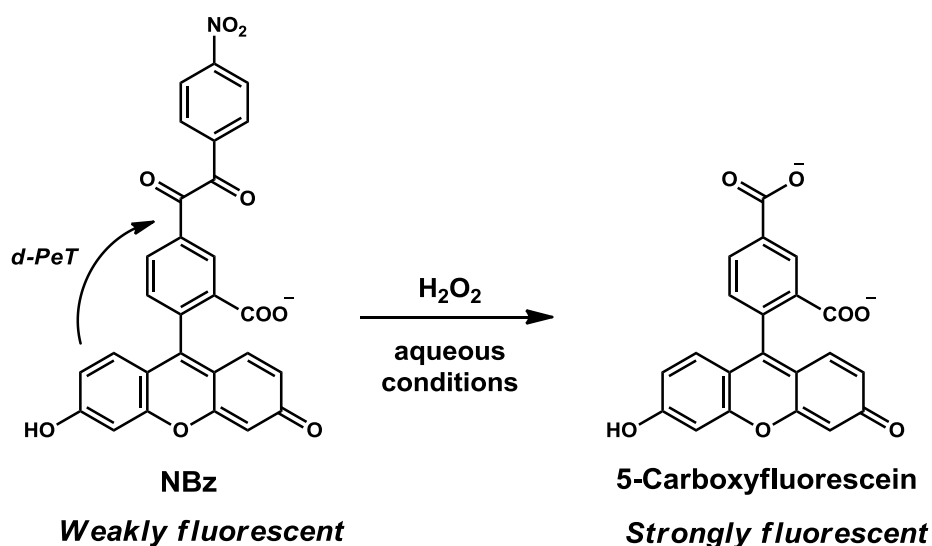


Figure 3-14. Design of fluorescence probe for detection of hydrogen peroxide using **NBz**.

3-2-3 Benzil 型シトルリン検出蛍光プローブの分子設計

NBz のような benzil 型蛍光プローブはグリオキサール同様に 1,2-ジカルボニル構造を有するため、酸性条件下でシトルリンとの特異的環化反応を引き起こすことが可能と考えた (Figure 3-15)^f。

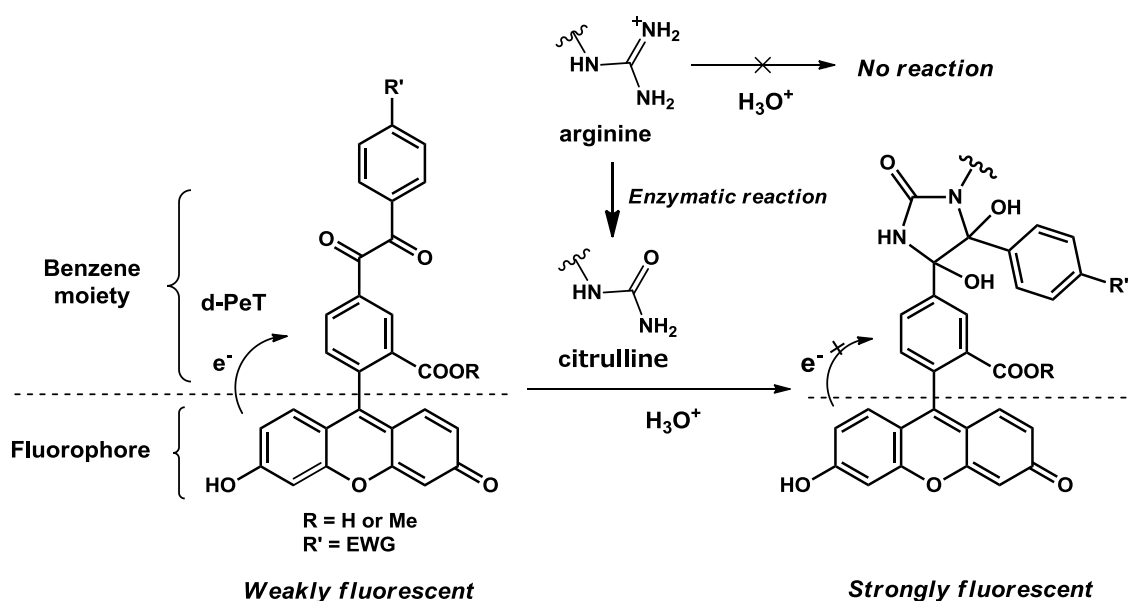


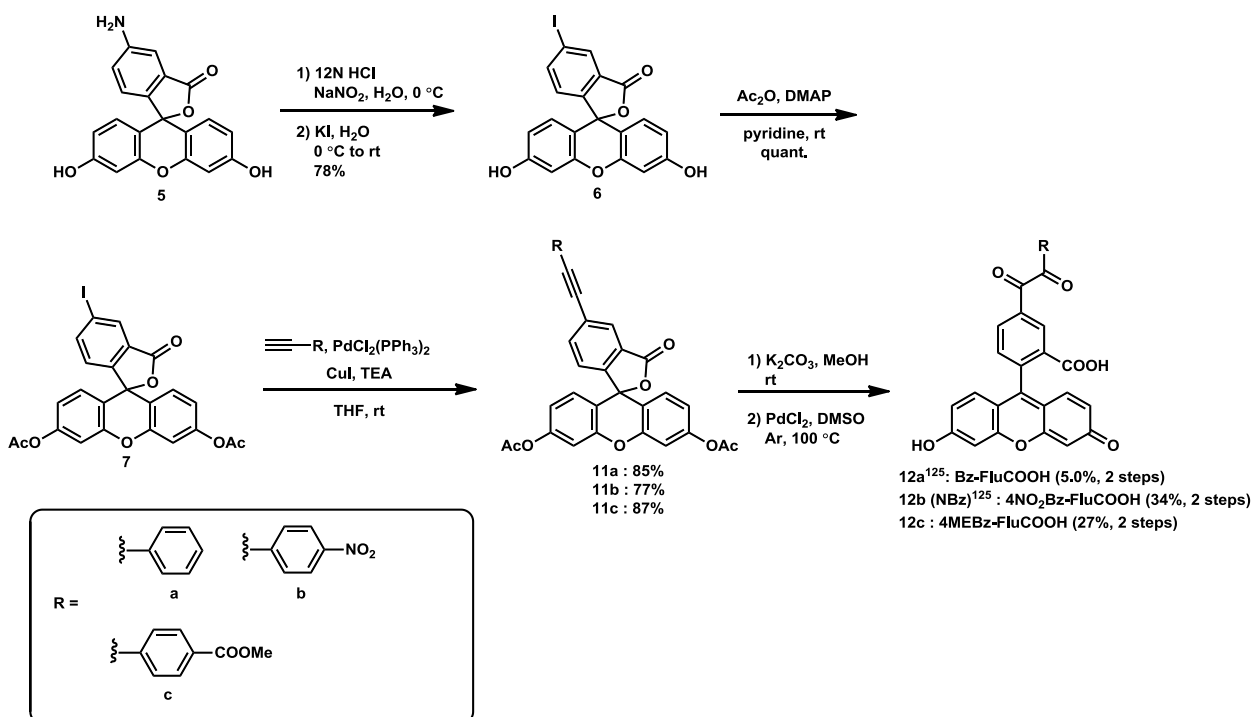
Figure 3-15. Proposed reaction of benzil-type fluorescence probes with electron-withdrawing group (EWG).

また、benzil 構造とすることでグリオキサールと比較して立体的・電子的に水和を受けにくくなることが期待される。一方で、シトルリンとの反応性はグリオキサールには劣ることが予想されるが、末端芳香環への置換基導入によりジケトン部位の反応性を適切に向上させることが可能と考えられる。そして、benzil 型蛍光プローブにおいても **FGME** と同様、シトルリンとの特異的反応後の生成物でベンゼン環部位の電子密度が上昇することに伴い、d-PeT 機構制御による消光が解消されれば、PAD4 活性を検出可能な **turn-on** 型蛍光プローブとして機能することが期待された。

^f 3-1-7 で **FG** が特異的環化反応後の酸性溶液中で吸収と蛍光を有することが明らかになったからため、Figure 3-15 のように R = COOH の化合物も検討することにした。**FG** と **FGME** の光学特性の比較より、わずかな電子密度の差でもプローブの機能に影響し得ると考えた。

3-2-4 Benzil 型シトルリン検出蛍光プローブの合成

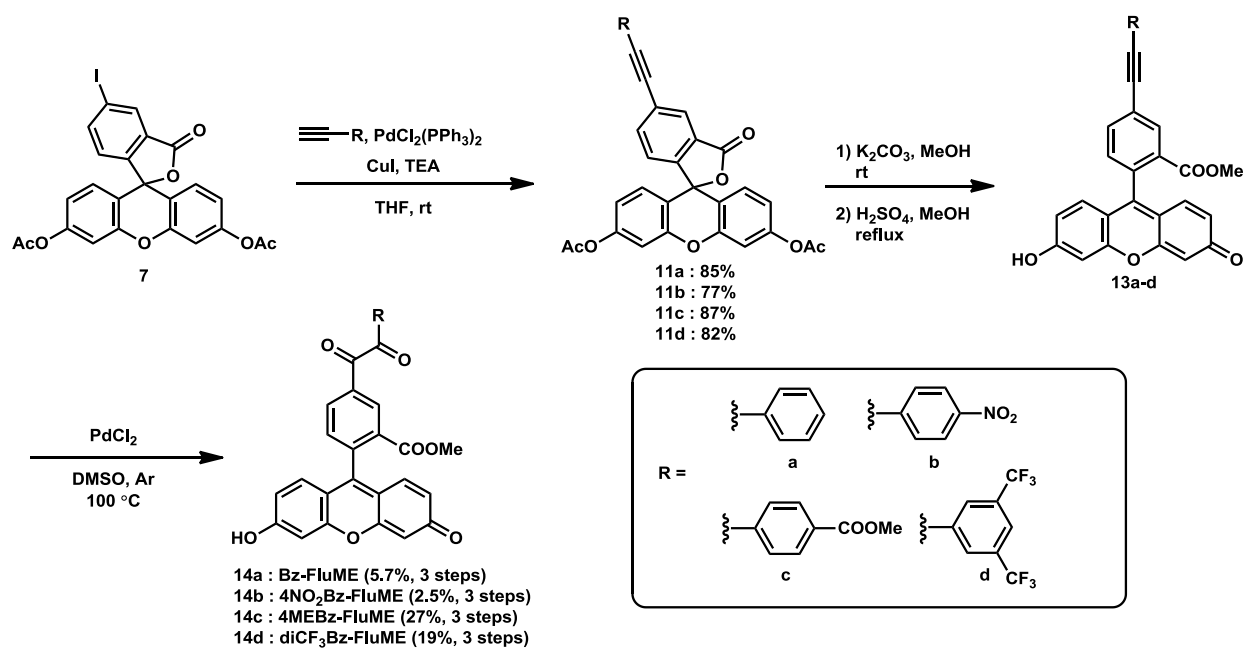
設計した benzil 型蛍光プローブを Scheme 3-2 にしたがって合成した。**FGME** の合成経路と同様に、市販の **5-アミノフルオレセイン** を出発物質に中間体 **7** を調製した後、異なる電子求引性置換基を有するフェニルアセチレンとの菌頭カップリングにより種々の内部アルキンに導いた。続いて、アセチル保護されたキサンテン環の 2 つの水酸基を脱保護し、続くパラジウム触媒を用いたアルキンの酸化¹²⁵により benzil 構造を構築した。



Scheme 3-2. Synthesis of benzil-type fluorescence probes (**12a-c**) with a carboxyl group in the fluorescein moiety.

同様に、フルオレセインの 2 位カルボキシ基をメチルエステル化した benzil 型蛍光プローブの合成も行った (Scheme 3-3)。内部アルキン **11a-d** までは Scheme 3-2 同様に合成し、2 つのアセチル基を脱保護した後、酸触媒存在下メタノール中で加熱還流させてカルボキシ基のメチルエステル化を行った。最後に Pd 触媒を用いてアルキンを酸化し、benzil 部位を構築した。

このようにして、末端芳香環上の電子求引性置換基およびフルオレセイン 2 位置換基が異なる benzil 型蛍光プローブを 7 種合成した。



Scheme 3-3. Synthesis of benzil-type fluorescence probes (**14a–d**) with a methoxycarbonyl group in the fluorescein moiety

3-2-5 中性条件下における benzil 型プローブの光学特性

合成した benzil 型蛍光プローブに関して光学特性評価を行った。まず、それぞれのプローブの吸光スペクトルと蛍光スペクトルを pH7.4 リン酸緩衝液中にて測定した (Figure 3-16)。得られたスペクトルから各種パラメータを算出し、コントロールのフルオレセインおよび前述の **FGME** と比較した (Table 3-2)。

その結果、benzil 構造に導くことによって、**FGME** と比較して蛍光量子収率が低くなり、d-PeT 機構による消光が効率化することが示唆された。

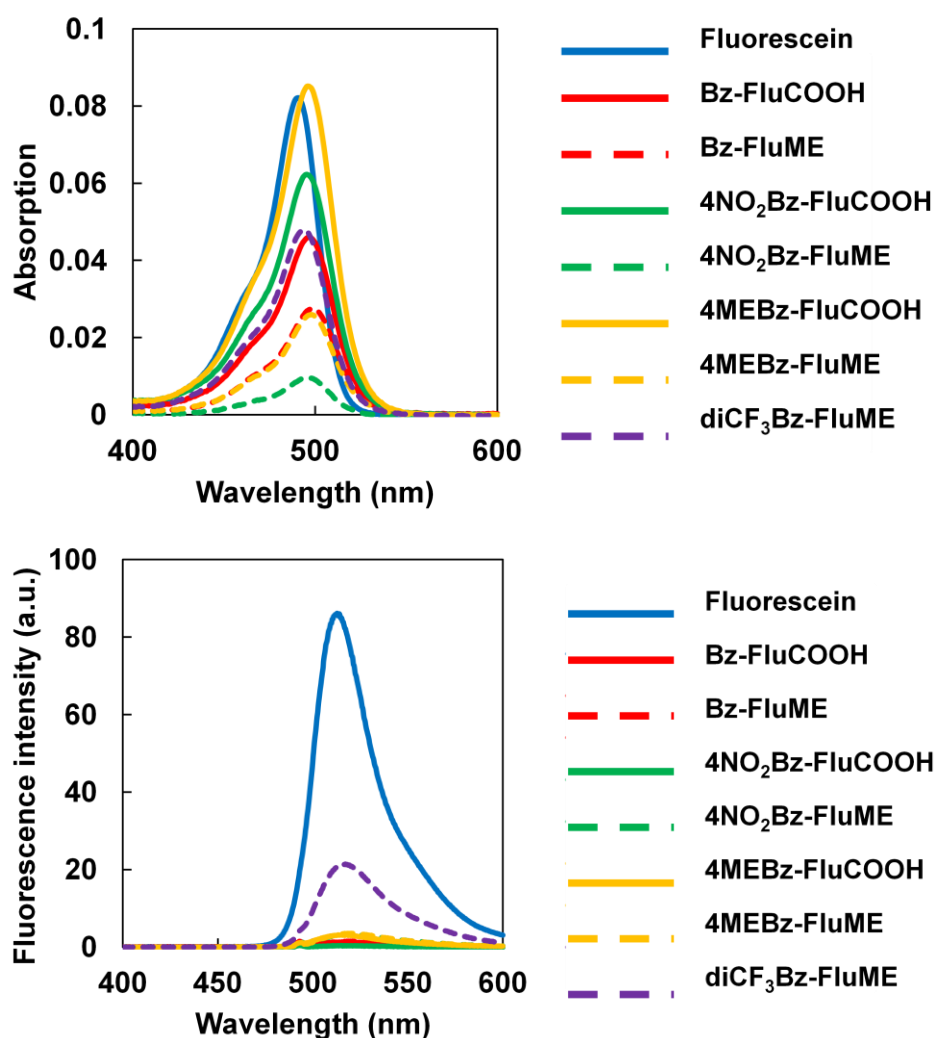
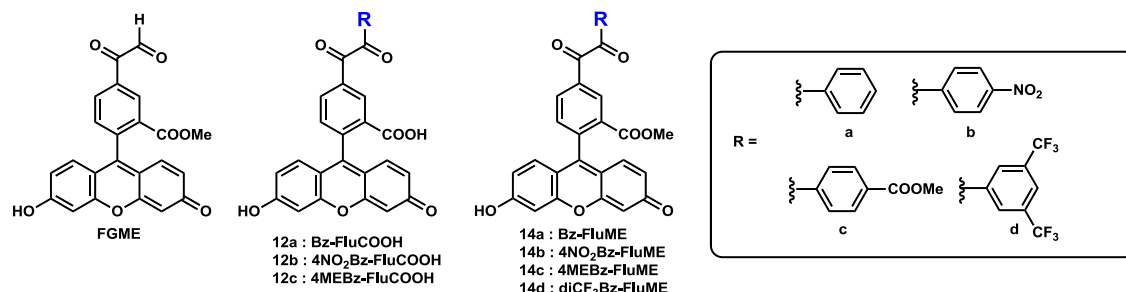


Figure 3-16. Absorption and fluorescence spectra of 1 μ M fluorescein (measured in 0.1 N NaOH solution containing 0.1% DMSO) and benzil-type fluorescence probes (measured in sodium phosphate buffer (pH 7.4)). $\lambda_{\text{ex}} = 493$ nm.

Table 3-2. Photochemical properties of fluorescein and benzil-type fluorescence probes^[a]



	Φ_{FL}	λ_{max} (nm)	λ_{em} (nm)	ε ($\times 10^4$ / M • cm)
Fluorescein	0.850	491	513	8.60
FGME	0.183	497	520	3.80
Bz-FluCOOH	0.024	496	518	5.00
Bz-FluME	0.055	498	520	1.87
4NO ₂ Bz-FluCOOH	0.028	495	515	6.17
4NO ₂ Bz-FluME	0.074	497	519	0.97
4MEBz-FluCOOH	0.038	497	516	10.2
4MEBz-FluME	0.129	498	520	2.67
diCF ₃ Bz-FluME	0.238	493	516	5.12

^[a]Measured in sodium phosphate buffer (pH 7.4). For determination of Φ_{FL} , fluorescein in 0.1 N NaOH (Φ_{FL} = 0.85) was used as a fluorescence standard.

また、フルオレセイン 2 位のメチルエステル化に伴いモル吸光係数 (ε) が小さくなった。フルオレセインの酸解離平衡を考慮すると、スピロ環化体を形成しないメチルエステルの方が極大吸収波長付近の吸収は大きくなると考えられる。しかし、エステルに誘導されるとプローブの溶解性が低下するため、このような ε の低下を招いたと考えられる。過去の報告でメチルエステルのスペクトル測定時には 5% エタノールが加えられていたこと¹²¹からも、溶解性が光学特性に影響を与えている可能性が考えられる。

3-2-6 酸性条件下における benzil 型蛍光プローブのスペクトル測定

中性条件下でのスペクトル測定に続いて、実際のシトルリンとの反応条件である 20% TFA を含んだ緩衝液中での吸光スペクトルと蛍光スペクトルを測定した (Figure 3-17)。

蛍光スペクトルの測定結果から、中性条件下と同様に d-PeT 機構による消光を受けることが確認された。

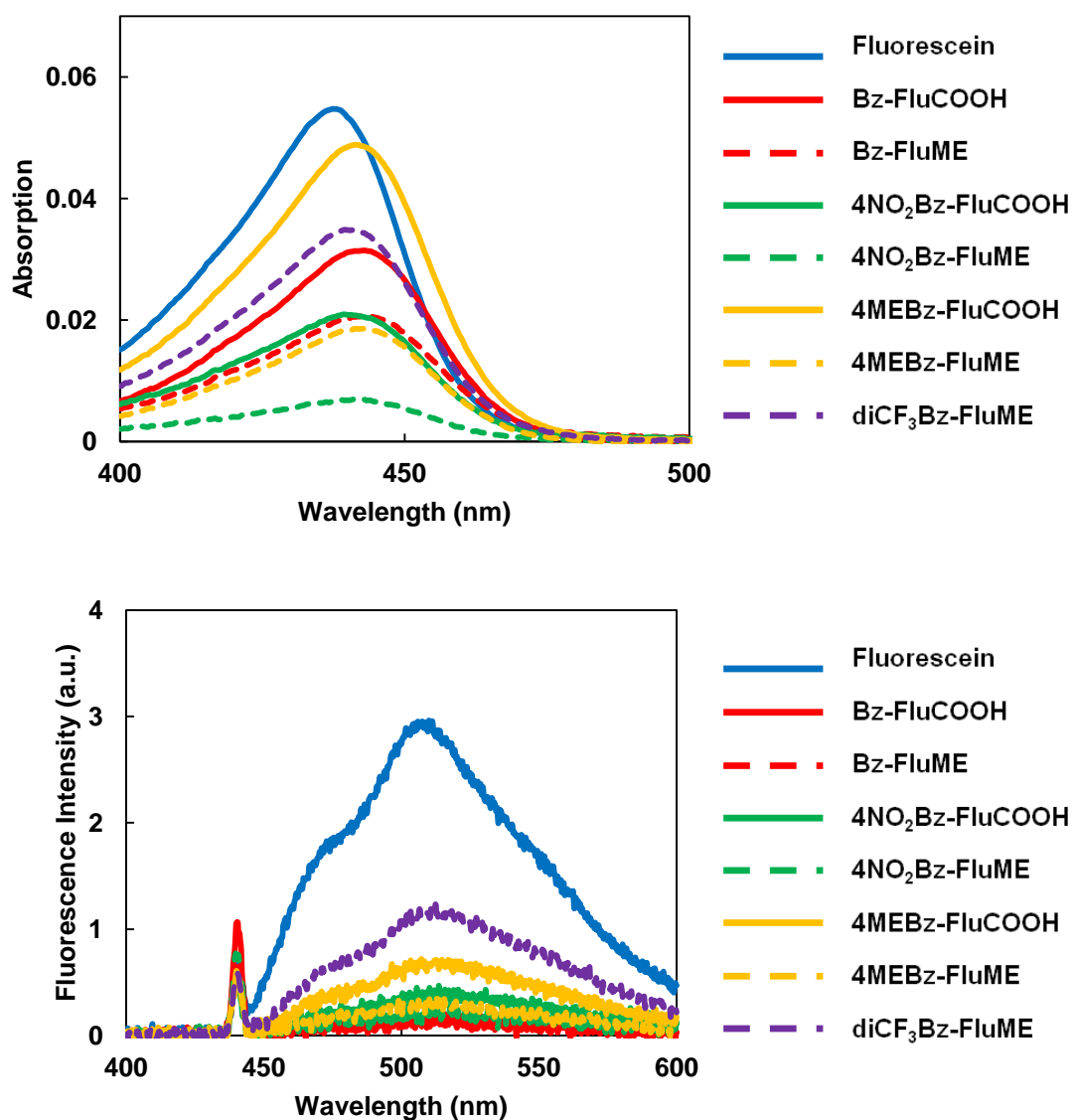


Figure 3-17. Absorption (upper) and fluorescence (bottom) spectra of 1 μ M fluorescein and benzil-type fluorescence probes (measured in sodium phosphate buffer containing 20% TFA). $\lambda_{\text{ex}} = 440$ nm.

3-2-7 シトルリンと benzil 型プローブの反応性評価

光学特性評価の結果から、benzil 型プローブは d-PeT 機構制御による効率的な消光を受けていることが示唆されたので、続いて反応性の評価を行った。

まず、L-シトルリンとの反応性を評価した。20% TFA を含んだ緩衝液中に L-シトルリンおよび各 benzil 型プローブを加え、50 °C で 0、30、60、90、120 分間インキュベーションした反応溶液を HPLC にて分析した。その結果、いずれのプローブを用いた場合にも時間依存的にプローブが消費されることが確認された(Figure 3-18)。その際の benzil 型プローブの反応性は末端芳香環上に電子求引性置換基を導入することで向上する傾向が認められた。

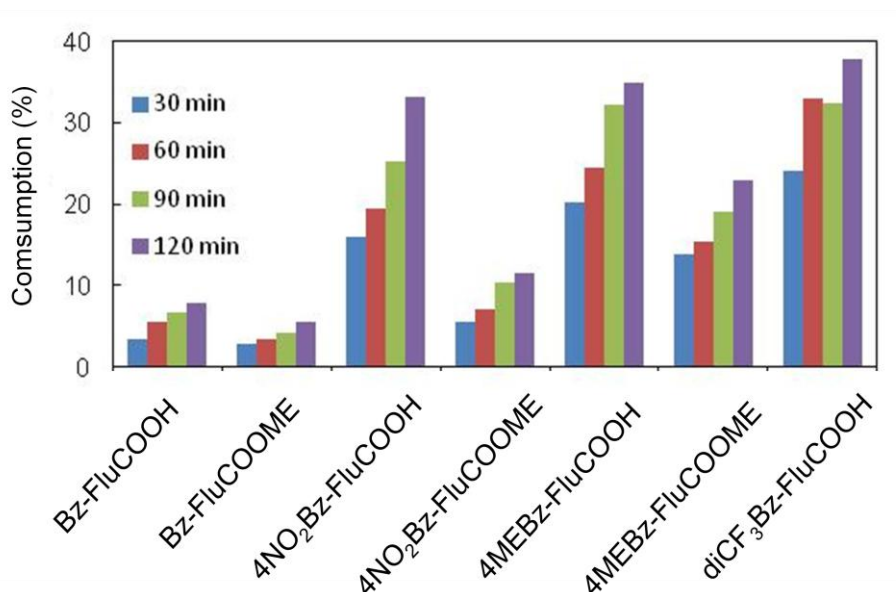


Figure 3-18. Time-dependent reaction of benzyl-type fluorescence probes with L-citrulline under acidic conditions. A solution (50 μ L) of each fluorescence probe (5 μ L, 1 mM solution in DMSO, final concentration; 100 μ M), L-citrulline (5 μ L, 100 mM solution in PAD buffer, final concentration; 10 mM) and TFA (10 μ L, final concentration; 20%) in PAD buffer (30 μ L) were incubated at 50 °C for 30, 60, 90, or 120 min and subjected to HPLC with absorbance detection.

この benzil 型 プローブを L-シトルリンとインキュベーションした際に生じる生成物がフルオレセインに由来する蛍光を有しているか、120 分間インキュベーションした後の反応溶液を HPLC により分析した (Figure 3-19)[§]。プローブのみを緩衝液中でインキュベーションした結果、生じたピークが水和物だと考えられる。**4NO₂Bz-FluME** を除き、benzil 型プローブの蛍光は著しく抑制されていること、水和物を含めたその他の生成物は benzil 型プローブと比較して著しく強い蛍光を有していることが認められた。より電子求引性の高い NO₂ 基や CF₃ 基を 2 つ導入したプローブでは水和物が生じやすく、蛍光性の水和物の生成はバックグラウンド蛍光の上昇に加えて反応系中の benzil 型化合物の存在量を減少させるため、反応効率の低下を招くが考えられる。

[§] 元のプローブのピークはカルボン酸で 17 分程度、メチルエステルで 20 分程度に観測された。最下段のシトルリンを加えずインキュベートした反応溶液のクロマトグラムにおいて新たに生じた 12 分付近のピークが自発的に生じた水和物である。**4NO₂Bz-FluME** の水和物の蛍光だけが弱く得られた理由は、ニトロベンゼンが d-PeT 機構のアクセプターとして作用することで消光しているからと考えている。CF₃ 基を 2 つ導入したプローブでは水和物と反応生成物の保持時間が近いいため重なって観測された。

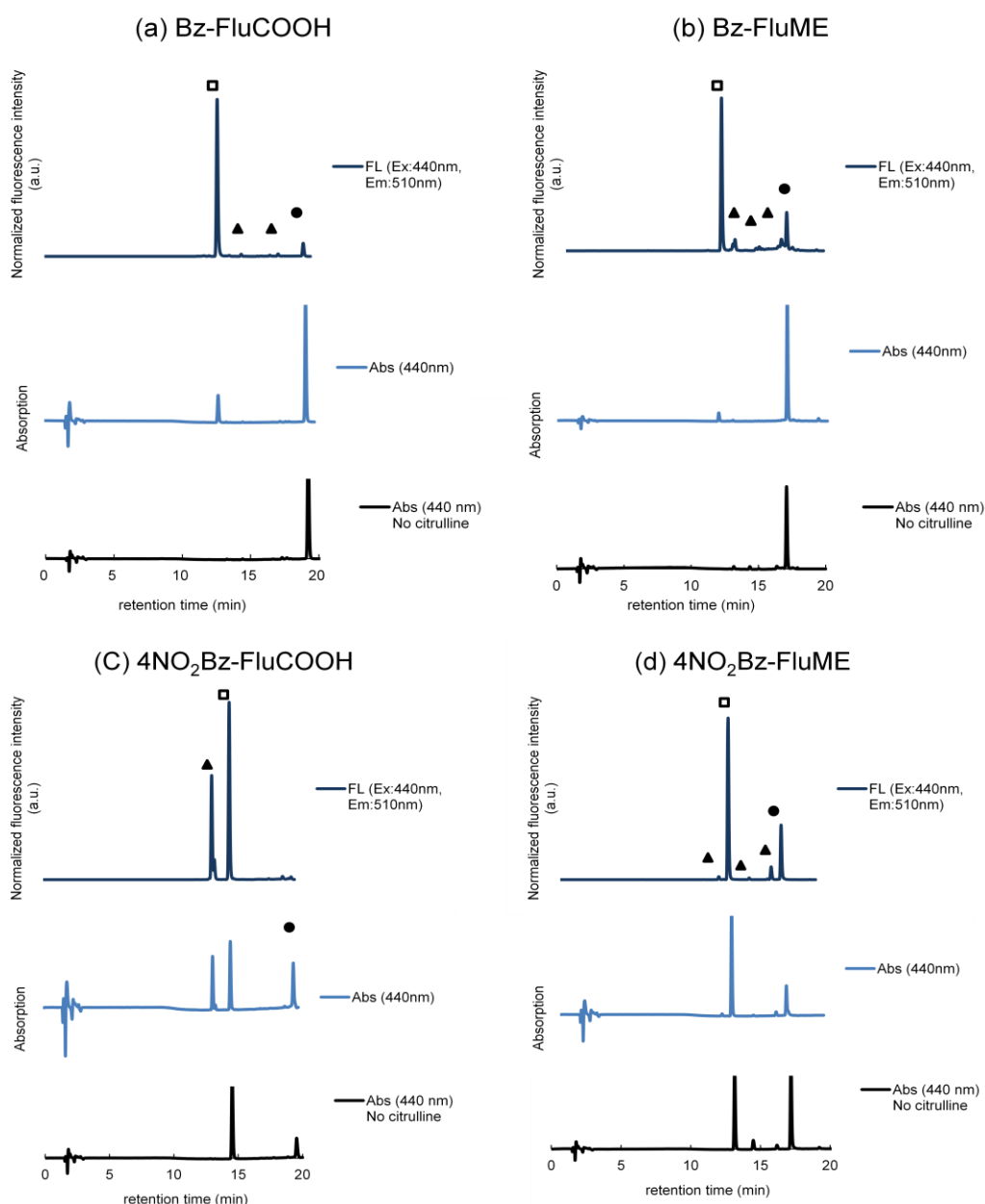


Figure 3-19A. HPLC analyses of the reaction products between benzil probes and L-citrulline. A solution (50 μ L) of each fluorescence probe (**Bz-FluCOOH**, **Bz-FluME**, **4NO₂Bz-FluCOOH**, **4NO₂Bz-FluME**; 5 μ L, 1 mM solution in DMSO, final concentration; 100 μ M), L-citrulline (10 μ L, 100 mM solution in PAD buffer, final concentration; 20 mM) and TFA (10 μ L, final concentration; 20%) in PAD buffer (25 μ L) was incubated at 50 $^{\circ}$ C for 2 hr and subjected to HPLC with absorbance and fluorescence detection. Each sample was loaded onto an Inertsil ODS-3 column (5 mm; 150 \times 4.6 mm) on a Shimadzu HPLC system. The eluates were monitored with a photodiode array detector (SPD-M10A VP). (A) MilliQ water containing 0.1 % TFA and (B) MeCN containing 0.1 % TFA were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 80 % and B 20 % \rightarrow 20 min, A 20 % and B 80 % \rightarrow 25 min, A 20% and B 80 %. \bullet : benzil probe, \square : spontaneously generated product in 20% TFA contained buffer, \blacktriangle : product(s).

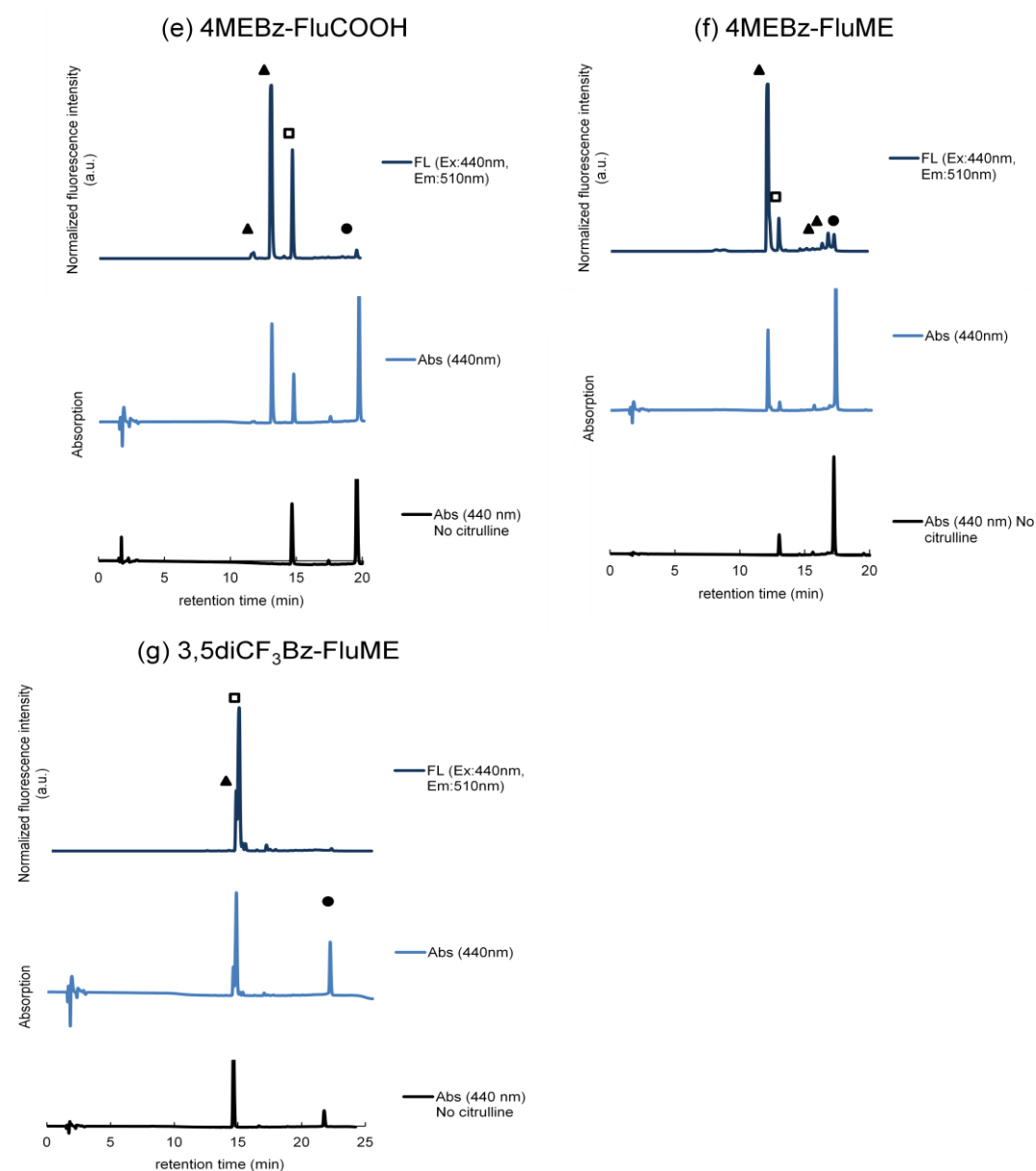


Figure 3-19B. HPLC analyses of the reaction products between benzil probes and L-citrulline. A solution (50 μL) of each fluorescence probe (**4MEBz-FluCOOH**, **4MEBz-FluME**, **diCF₃Bz-FluME**; 5 μL , 1 mM solution in DMSO, final concentration; 100 μM), L-citrulline (10 μL , 100 mM solution in PAD buffer, final concentration; 20 mM) and TFA (10 μL , final concentration; 20%) in PAD buffer (25 μL) was incubated at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 2 hr and subjected to HPLC with absorbance and fluorescence detection. Each sample was loaded onto an Inertsil ODS-3 column (5 mm; 150 \times 4.6 mm) on a Shimadzu HPLC system. The eluates were monitored with a photodiode array detector (SPD-M10A VP). (A) MilliQ water containing 0.1 % TFA and (B) MeCN containing 0.1 % TFA were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 80 % and B 20 % \rightarrow 20 min, A 20 % and B 80 % \rightarrow 25 min, A 20% and B 80 %. ●: benzil probe, □: spontaneously generated product in 20% TFA contained buffer, ▲: product(s).

3-2-8 シトルリン誘導体 **BCME** と benzil 型プローブの反応性評価

ここまでに機能評価に用いていた L-シトルリンは、PAD 活性検出に利用する人工基質 **BAEE** から産生される **BCEE** と異なり、無保護のカルボキシ基とアミノ基を有しているため、これらの官能基が静電的な相互作用や水素結合によって benzil プローブとの反応性に影響を及ぼしていることが懸念された。そこで、酵素反応で生じたシトルリン化体により近い基質として、**BCEE** と類似した市販の *N*^α-Bz-L-citrulline methyl ester (**BCME**) を用いて反応性の評価を行った。

L-シトルリンとの反応性を評価した時と同様に、20% TFA 水溶液中でプローブと **BCME** とを 50 °C で 2 時間インキュベーションした後、蛍光強度をプレートリーダーで測定した。コントロールとしてプローブのみを酸性水溶液中でインキュベーションした場合と **BCME** の代わりに酵素反応の人工基質である **BAEE** とインキュベーションした場合の蛍光強度も合わせて測定した (Figure 3-20)。

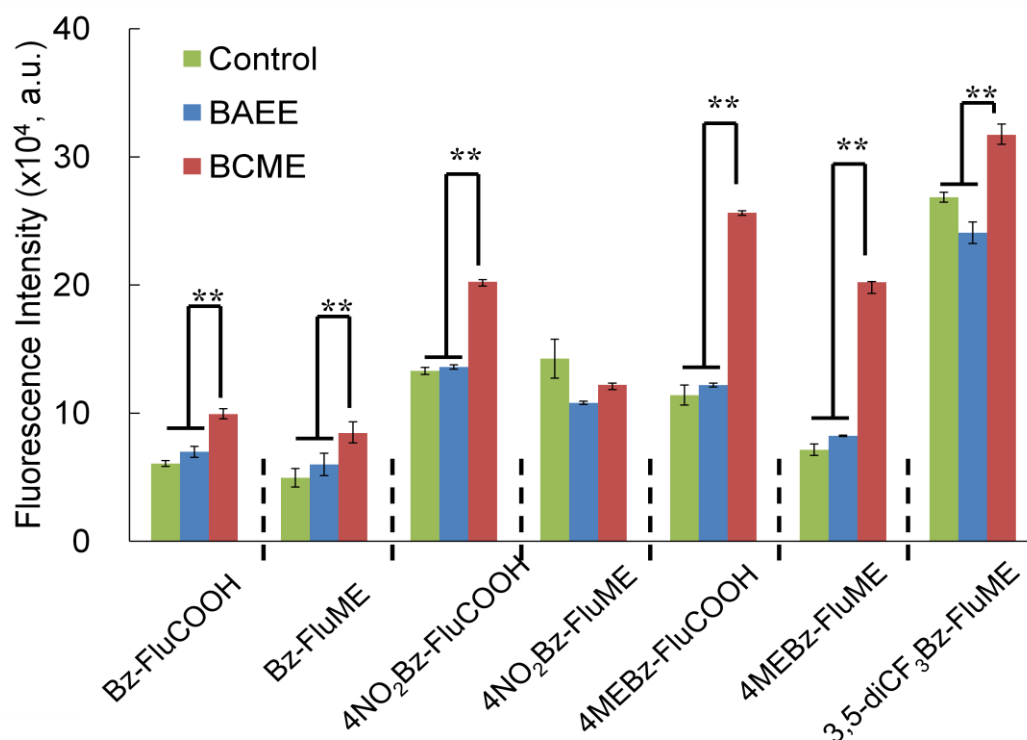


Figure 3-20. Fluorescence detection of **BCME** using benzil-type fluorescence probes under acidic conditions. A solution (50 μ L) of each fluorescence probe (5 μ L, 1 mM solution in DMSO, final concentration; 100 μ M) and **BCME** (10 μ L, 100 mM solution in TFA, final concentration; 20 mM) in PAD buffer (35 μ L) or **BAEE** (10 μ L, 100 mM solution in PAD buffer, final concentration; 20 mM) in PAD buffer (25 μ L) and TFA (10 μ L) was incubated at 50 °C for 2 h. The results are mean \pm s.e.m. from three experiments. ** p < 0.01 after Bonferroni correction among each probe. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm.

その結果、**4NO₂Bz-FluME** 以外のいずれのプロープも **BCME** 特異的な蛍光増大を示した^h。一方、**BAEE** を用いた場合には基質を添加せずプロープのみをインキュベーションした場合と蛍光強度にほとんど差異は認められなかった。また、この実験においてプロープのみを加えたもの (control) の結果はそれぞれのプロープのバックグラウンド蛍光を反映すると考えられる。蛍光増大の大きさと **benzil** 部位の反応性およびバックグラウンド蛍光の大きさから総合的に判断した結果、**4MEBz-FluME** を合成した **benzil** プロープ群の中で最も良好な機能を有した蛍光プロープと決定した。

^h **4NO₂Bz-FluME** で control と比較して **BAEE**、**BCME** を用いた場合に蛍光強度が減少する理由は、Figure 3-19 の結果から水和物が d-PeT 機構による消光を受けるが示唆されたように、**BAEE** および **BCME** との反応生成物でも d-PeT 機構がはたらき、これらの化合物では水和物よりも効率的に消光しているからだと考えられる。

3-2-9 4MEBz-FluME による蛍光増大のシトルリン濃度依存性

最適化したプローブ **4MEBz-FluME** を用いて、酸性条件下におけるシトルリン特異的な環化反応に伴う蛍光増大が反応溶液中に存在する **BCME** 量に依存するかを評価した。

BCME 濃度を 0–20 mM に変化させた酸性反応溶液中で **4MEBz-FluME** と 50 °C で反応させ、2 時間後の蛍光強度をプレートリーダーを用いて測定した (Figure 3-21)。

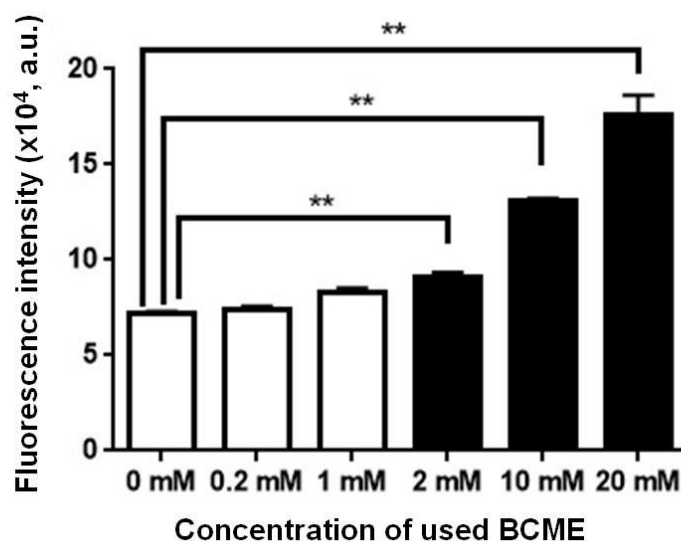


Figure 3-21. **BCME**-concentration dependency of **4MEBz-FluME** under acidic conditions. To **BCME** (0, 1, 5, 10, 50, 100 mM, 10 μ L, final concentration, 0, 0.2, 1, 2, 10, 20 mM) in TFA (10 μ L) were added PAD buffer (35 μ L) and **4MEBz-FluME** (1 mM, 5 μ L, final concentration; 100 mM). The mixtures were incubated at 50 °C for 2 h. The results are mean \pm s.e.m. from three experiments ** $p < 0.01$ vs 0 mM group after Bonferroni correction. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm.

その結果、**BCME** 濃度依存的な蛍光増大が確認された。この時、**BCME** が 2 mM 以上存在する条件下において有意な蛍光増大が認められたことから、**4MEBz-FluME** をシトルリン検出に用いる場合には、あらかじめ 2 mM 以上のシトルリン化体が産生されるように酵素反応を最適化することが望ましい。そのような条件下であれば、シトルリン産生量は PAD 活性を反映すると考えられることから、PAD 活性の有無を判断可能だと考えられる。

3-2-10 4MEBz-FluME を用いた PAD4 活性検出

4MEBz-FluME を用いて、PAD4 が酵素反応によって産生したシトルリン化体 **BCEE** を検出可能であるか評価した。

BAEE と PAD4 を 50 °C で 1 時間インキュベーションした後に、反応溶液を酸性に導き、**4MEBz-FluME** を添加してシトルリン化体と 50 °C で 2 時間反応させた。その結果、基質と酵素存在下で有意な蛍光増大が認められ、その蛍光増大は阻害剤である **Cl-amidine** を添加することによって抑制された (Figure 3-22)。また、このときの蛍光増大量は **FGME** を用いた PAD4 活性検出系と比較し大きくなったことから、**4MEBz-FluME** を用いることでより大きなダイナミックレンジを持って **BCEE** を検出可能なことが示された。

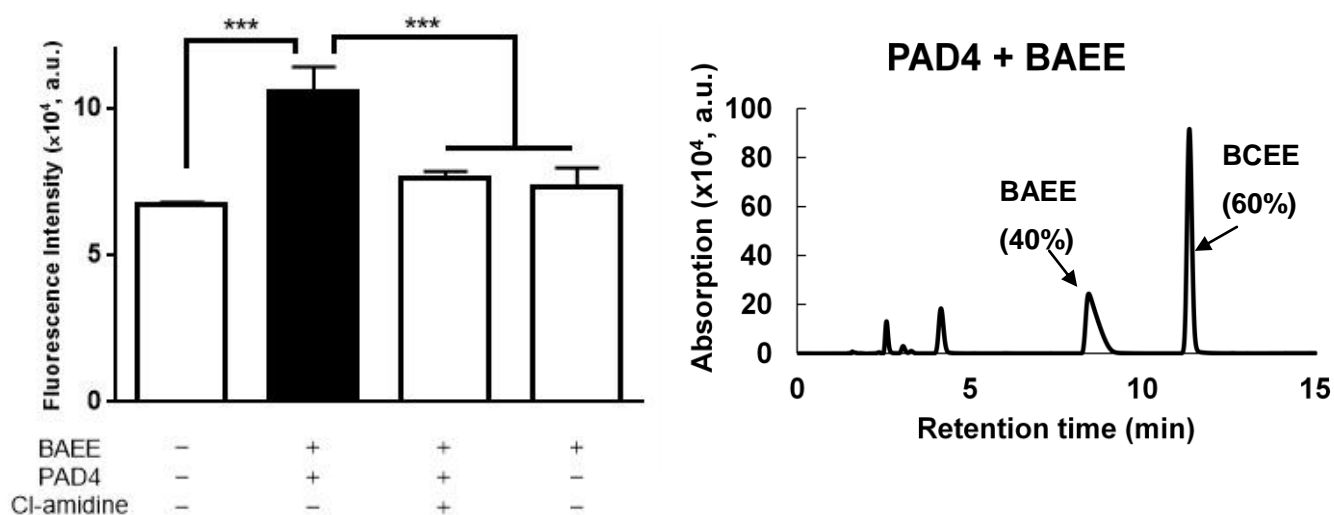


Figure 3-22. (Left) Detection of PAD4 activity with **4MEBz-FluME**. The enzymatic reaction was conducted in PAD buffer (100 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 20 mM **BAEE**, PAD4 (as provided in the PAD4 assay kit purchased from Cayman Chemical, without dilution) and 10 μM **Cl-amidine**; total volume was 20 μL) at 50 °C for 1 h. TFA (10 μL), 1 mM **4MEBz-FluME** (5 μL, final concentration 100 μM) and PAD buffer (15 μL) were added and the mixture was incubated at 50 °C for 2 h. The results are mean ± s.e.m. from three experiments. ****p* < 0.005 after Bonferroni correction. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm. (Right) Generation of **BCEE** after the enzymatic reaction of **BAEE** with PAD4 for 1 hr. 60% of **BAEE** was found to be citrullinated. The reaction solution was loaded onto an Inertsil ODS-3 column (5 mm; 150 × 4.6 mm) on a Shimadzu HPLC system. The eluates were monitored with a photodiode array detector. (A) MilliQ water containing 0.1 % TFA and (B) MeCN containing 0.1 % TFA were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 80 % and B 20 % → 20 min, A 20 % and B 80%.

酵素反応後、**4MEBz-FluME** を添加する直前の反応溶液を HPLC で分析すると、酵素反応で生じたシトルリン化体は 60%、すなわち 12 mM 相当と見積もられた。Figure 3-21 で得られた濃度依存性を鑑みると、PAD4 活性検出時の蛍光増大率は 12 mM のシトルリン化体存在下で予想される蛍光増大率と概ね一致し、合理的な結果と考えられた。

3-2-11 **4MEBz-FluME** を用いた PAD2 活性検出

PADs のシトルリン化活性は「55 °C、pH 7.2 で 1 時間当たりの **BAEE** から **BCEE** を産生する反応から算出する」と定められている (Figure 3-23)。そのため、**BAEE** を用いた PAD4 活性検出系は、PAD4 に限らずシトルリン化活性を有する他のアイソザイムにも適用可能と考えられる。

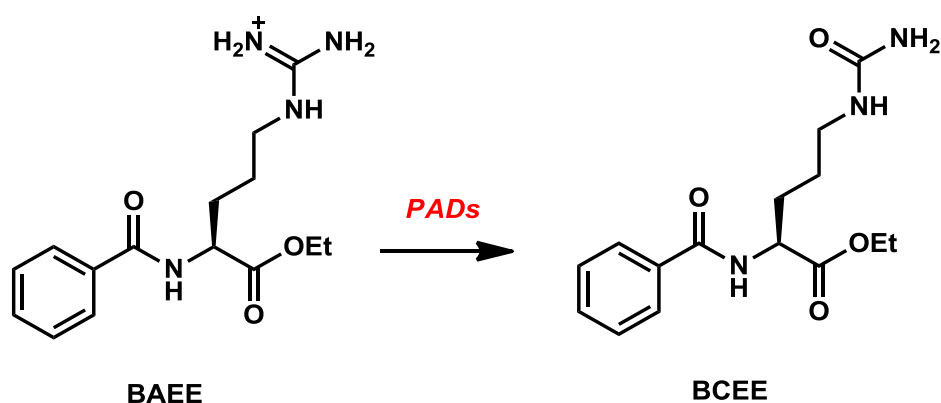


Figure 3-23. Citrullination of **BAEE** to **BCEE** by PAD enzymes

そこで、**4MEBz-FluME** を用いた PAD4 活性検出系を PAD2 にも適用することとした。PAD2 の主な局在場所は細胞質であるが、一部が核にも局在し、ヒストンのシトルリン化を介して核機能にも関与すること及び多発性硬化症との関連が深いことが知られている。また、近年中枢神経系では PAD2 と PAD4 が共に発現していることから、両アイソザイムを標的とした阻害剤の重要性が指摘された¹²⁶。そのようなデュアル阻害剤を創製するには同一の評価系で複数の PAD アイソザイムの活性が検出可能なことが望ましいと考えられる。

PAD2 の活性検出のため、**BAEE** を PAD2 とともに 50 °C で 5 時間インキュベーションした後に反応溶液を酸性に導き、**4MEBz-FluME** を添加してシトルリン化体と 50 °C で 2 時間反応させた。その結果、PAD2 においても基質と酵素存在下で有意な蛍光増大が認められ、その蛍光増大は阻害剤である **Cl-amidine** を添加することによって抑制された (Figure 3-24 left)。

PAD2 のシトルリン化活性は PAD4 と比較して弱いため、酵素反応の時間を 5 倍長くしてもシトルリン化体の生成率は 8.6 % に留まった (Figure 3-24 right)。しかし、d-PeT 機構の効率化と、水和物の生成抑制による反応系中での 1,2-ジカルボニル化合物の存在比の上昇に伴うプローブの高度化によって、PAD4 よりもシトルリン化活性の弱い他のアイソザイムにおいても、そのシトルリン化活性を検出可能なことが示された。

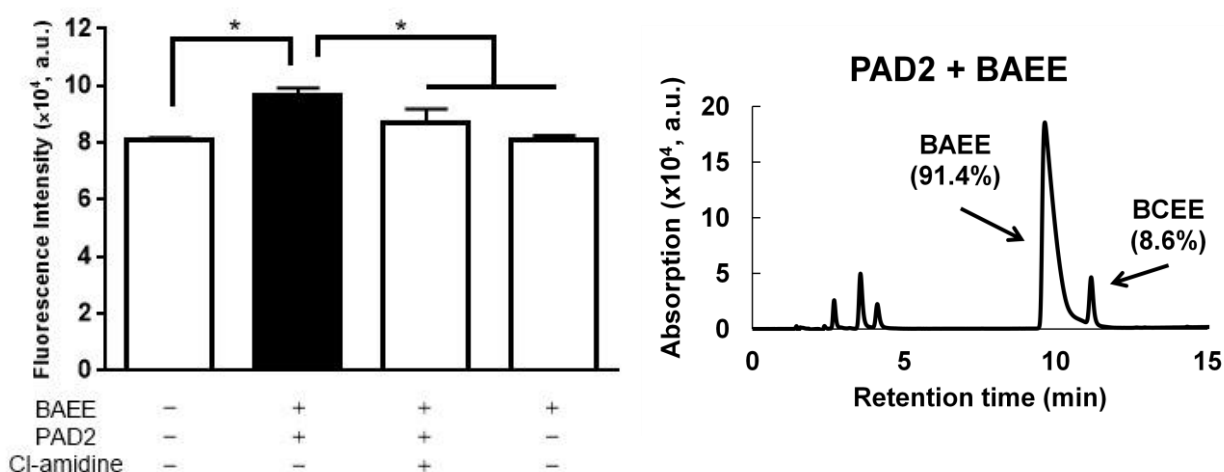


Figure 3-24. (Left) Detection of PAD2 activity with **4MEBz-FluME**. The enzymatic reaction was conducted in PAD buffer (100 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 20 mM **BAEE**, 600 nM PAD2 and 10 μM **Cl-amidine** (in PAD buffer containing 10% DMSO); total volume was 20 μL) at 50 °C for 5 h. To TFA (10 μL), 1 mM **4MEBz-FluME** (5 μL, final concentration 100 μM) and PAD buffer (15 μL) were added. The mixture was incubated at 50 °C for 2 h. The results are mean ± s.e.m. from three experiments. **p* < 0.05 after Bonferroni correction. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm. (Right) Generation of **BCEE** after the enzymatic reaction of **BAEE** with PAD2 for 1 hr. 8.6% of **BAEE** was found to be citrullinated. The reaction solution was loaded onto an Inertsil ODS-3 column (5 mm; 150 × 4.6 mm) on a Shimadzu HPLC system. The eluates were monitored with a photodiode array detector (SPD-M10A VP). (A) MilliQ water containing 0.1 % TFA and (B) MeCN containing 0.1 % TFA were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 80 % and B 20 % → 20 min, A 20 % and B 80%.

3-2-12 4MEBz-FluME を用いた Cl-amidine の PAD4 阻害濃度の算出

4MEBz-FluME を用いると、複数の PAD アイソザイムを検出可能なことが確認できたので、続いて本評価系が PAD アイソザイムの阻害濃度算出に利用可能であるか検討した。

既知の不可逆的 PADs 阻害剤である Cl-amidine の PAD4 阻害濃度の算出を試みた。段階的に濃度を変化させた Cl-amidine と PAD4 をプレインキュベーションした後、反応溶液に BAEE を添加して 1 時間 50 °C で酵素反応を行った。反応溶液を酸性に導いた後 4MEBz-FluME を加え 2 時間インキュベーション後、反応溶液の蛍光強度をプレートリーダーを用いて測定した。そして、得られた蛍光強度から各 Cl-amidine 濃度での阻害率を算出した (Figure 3-25)。

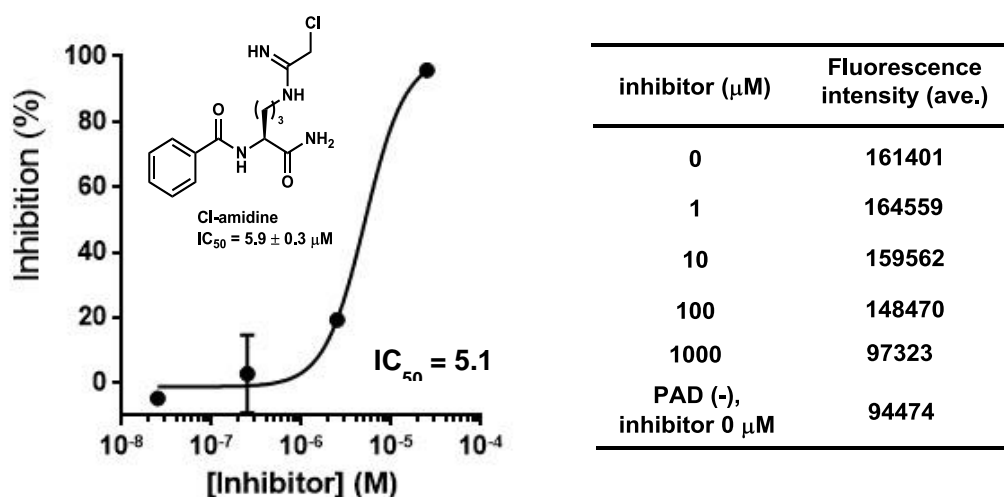


Figure 3-25. Calculation of half-inhibitory activity (IC_{50}) of Cl-amidine with 4MEBz-FluME. The enzymatic reaction was conducted in PAD buffer (100 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 2 mM DTT, 50 mM BAEE, 1.5 μM PAD4 and 1, 10, 100, 1000 μM Cl-amidine (in PAD buffer containing 10% DMSO, final DMSO concentration 0.25%); total volume was 20 μL) at 50 °C for 5 h. To TFA (10 μL), 1 mM 4MEBz-FluME (5 μL , final concentration 100 μM) and PAD buffer (15 μL) were added. The mixture was incubated at 50 °C for 2 h. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm.

その結果、濃度上昇に伴うシグモイド型の阻害活性の増大が確認されたⁱ。得られた曲線から算出した IC₅₀ 値は 5.1 μM であり、**4MEBz-FluME** を用いることで PADs 阻害濃度を算出可能なことが示された。

また、**4MEBz-FluME** を用いた本評価系における Z' 値は 0.64 であった (Figure 3-26)。Z' 値は 0.50 以上ある場合、そのスクリーニング系は十分な質と精度を有すると認められる。したがって、**4MEBz-FluME** を用いた PAD 活性検出系はスクリーニング系として必要な精度を満たしていることが明らかになった。

	0%	100%
Av	101580	181517
SD	2641.63	6926.29

Av: average
SD: standard deviation

$$Z' = 1 - (3 \times SD_{100\%} + 3 \times SD_{0\%}) / (Av_{100\%} - Av_{0\%})$$

$$\text{or } Z' = b/a$$

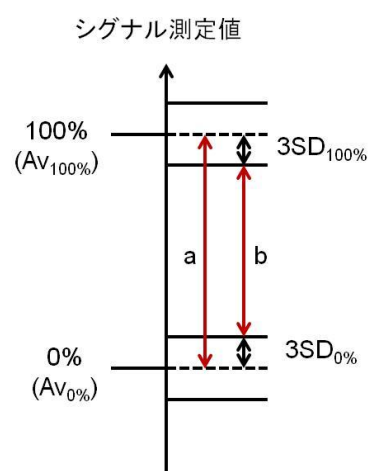


Figure 3-26. Calculation of Z' factor about detection system using **4MEBz-FluME**. The enzymatic reaction was conducted in PAD buffer (100 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 50 mM **BAEE**, 1.5 μM PAD4; total volume was 20 μL) at 50 °C for 1 h. TFA (10 μL), 1 mM **4MEBz-FluME** (5 μL, final concentration 100 μM) and PAD buffer (15 μL) were added and the mixture was incubated at 50 °C for 2 h. The results are mean ± s.e.m. from eight experiments. ****p* < 0.005 after Bonferroni correction. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm.

ⁱ 阻害曲線は最大値が 100%、最小値が 0%に収束するようにフィッティングした。

3-2-13 小括

Benzil 型に誘導化した新規シトルリン検出蛍光プローブ群を設計・合成した。合成したプローブの機能評価を行い、benzil 型プローブが効率的に消光していることを確認した。プローブの消光効率に加え、水和物生成との兼ね合いであるシトルリンとの反応性や特異的環化反応後の蛍光増大の大きさから最適化した **4MEBz-FluME** は PAD4 だけでなく、よりシトルリン化活性の弱い PAD2 の活性も評価可能なことを示した。また、既知の阻害剤を用いた PAD4 阻害濃度の算出と Z' 値からアッセイ系として十分な質と機能を有することが示唆された。

第4章 結語

以上のように、私は d-PeT 機構制御に基づいた turn-on 型新規シトルリン検出蛍光プローブとして **FGME** および **4MEBz-FluME** を開発した。

これらのプローブは、シトルリンとプローブとの特異的反応に用いられる酸性条件下で蛍光測定が可能な化合物であり、これらの化合物を用いることで中和操作を省略した簡便な *in vitro* 活性検出系を構築できた。また、benzil 型シトルリン検出蛍光プローブ **4MEBz-FluME** は、d-PeT 機構効率およびウレイド基との反応性を向上できたことから、PAD4 だけでなくよりシトルリン化活性が弱い PAD2 の活性も検出可能なことが示された。したがって、複数の PAD アイソザイムに対し **4MEBz-FluME** を用いたケミカルスクリーニングを実施することで、アイソザイム選択的な阻害剤候補化合物の探索に加え、PAD アイソザイムの基質特異性の解明に貢献することが期待される。

第5章 実験の部

General methods and materials

^1H NMR spectra and ^{13}C NMR spectra were recorded with a JEOL JNM-LA500, JEOL JNM-A500, Varian VNMRS 500, JEOL JNM-ECZ500 or BRUKER AVANCE600 spectrometer in the indicated solvent. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million relative to the internal standard, tetramethylsilane (TMS). Electrospray ionization (ESI) mass spectra were recorded with a JEOL JMS-T100LC mass spectrometer equipped with a nanospray ion source. UV/Vis absorption spectra were recorded with a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu). Fluorescence spectra were recorded with an RF-5300PC fluorometer (Shimadzu). Analytical HPLC was performed with a Shimadzu pump system equipped with a reversed-phase ODS column (Inertsil ODS-3 4.6 \times 150 mm, GL Science, Tokyo, Japan) at a flow rate of 1.0 mL min $^{-1}$. Semipreparative HPLC purification was performed with a JASCO PU-2086 pump system equipped with a reversed-phase ODS column (Inertsil ODS-3 20 \times 250 mm, GL Science) at a flow rate of 10 mL min $^{-1}$. Microplate fluorescence assay was performed with an ARVO X5 plate reader (PerkinElmer). Recombinant human PAD4 was purchased from Cayman Chemical Company (Michigan, USA). All other reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI, Tokyo, Japan), Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan), Nacalai Tesque (Kyoto, Japan), or Kanto Kagaku (Tokyo, Japan) and used without further purification. Flash column chromatography was performed with silica gel 60 (particle size 0.032–0.075) supplied by Taikoh-shoji.

Experimental part of FGME

3',6'-dihydroxy-5-iodo-3H-spiro[2-benzofuran-1,9'-xanthene]-3-one (6)

To a suspension of 5-aminofluorescein (**5**) (3.00 g, 8.63 mmol) in 12 N aqueous HCl (35.0 mL) was added 18.0 g of ice. The mixture was cooled to 0 °C, then a solution of sodium nitrite (900 mg, 13.0 mmol) in water (15.0 mL) was slowly added over 5 min. The mixture was stirred at 0 °C for 1.5 hour, then a solution of potassium iodide (11.5 g, 69.0 mmol) in water (25.0 mL) was added dropwise over 10 min. The mixture was stirred at room temperature for 4 h, then extracted with i-PrOH/CH $_2$ Cl $_2$ (v/v = 1/3; 3 times). The combined organic layer was washed with saturated aqueous sodium thiosulfate and brine, and dried over sodium sulfate. Filtration, evaporation and purification by silica gel flash column chromatography (CHCl $_3$ /MeOH = 9/1) gave 2.69 g (6.75 mmol, 78 %) of **6** as an orange solid: ^1H NMR (CDCl $_3$, 500 MHz) δ 8.35 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.93 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 2.4 Hz, 2H),

6.66 (d, J = 8.6, 2.4 Hz, 2H), 6.55 (d, J = 8.6 Hz, 2H).

3',6'-bis(acetyloxy)-5-iodo-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one (7)

To a solution of **6** (1.10 g, 2.41 mmol) and *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (35.0 mg, 0.290 mmol) in pyridine (15.0 mL) was added acetic anhydride (800 μ L, 7.85 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 hour, then poured into water, and extracted with AcOEt. The combined organic layer was washed with brine and dried over sodium sulfate. Filtration, evaporation and purification by silica gel flash column chromatography (AcOEt/*n*-hexane = 1/5 to 1/3) gave 1.30 g (2.40 mmol, quantitative yield) of **7** as a yellow solid: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.37 (s, 1H), 7.99 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.09 (s, 2H), 6.95 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.84-6.80 (br, 4H), 2.31 (s, 6H).

5-acetyl-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthene]-3',6'-diyl diacetate (8)

Anhydrous *N,N*-dimethylformamide (15.0 mL) was added through a septum to an Ar-purged flask containing **7** (1.16 g, 2.15 mmol), tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) (98.0 mg, 0.107 mmol) and anhydrous lithium chloride (455 mg, 10.7 mmol). Acetic anhydride (1.01 mL, 10.8 mmol) and *N,N'*-diisopropylethylamine (748 μ L, 4.29 mmol) were added dropwise. The resulting mixture was stirred at 100 $^\circ\text{C}$ for 16 h, then cooled to room temperature, quenched with H_2O , and extracted with diethyl ether and AcOEt. The combined organic layer was dried over sodium sulfate. Filtration, evaporation and purification by silica gel flush column chromatography (AcOEt/ *n*-hexane = 1/4 to 1/2) afforded 489 mg (1.07 mmol, 50 %) of **8** as a pale orange solid: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.57 (1H, s), 8.29 (1H, dd, J = 8.1, 1.5 Hz), 7.30 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.12 (2H, d, J = 2.0 Hz), 6.83 (2H, dd, J = 8.6, 2.0 Hz), 6.81 (2H, d, J = 8.6 Hz), 2.72 (3H, s), 2.32 (6H, s).

5-acetyl-3',6'-dihydroxy-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-one (9)

To a solution of **8** (229 mg, 0.500 mmol) in MeOH (25.0 mL) was added potassium carbonate (152 mg, 1.10 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 22 h, then poured into saturated aqueous sodium dihydrogenphosphate dihydrate and extracted with AcOEt. The combined organic layer was dried over sodium sulfate. The organic layer was filtered, and the filtrate was evaporated to dryness over silica gel. Purification by silica gel flash column chromatography (AcOEt/ *n*-hexane = 1/2 to 1/1) afforded 164 mg (0.460 mmol, 93 %) of **9** as a orange solid: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.56 (s, 1H), 8.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 6.58 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.53 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 2H), 3.39 (m, 2H), 2.74 (s, 3H).

5-acetyl-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl) benzoic acid methyl ester (10)

A mixture of **5** (200 mg, 0.576 mmol), MeOH (10.0 mL), and concentrated H₂SO₄ solution (0.200 mL) was heated for 24 h at room temperature. The solution was poured onto ice, and then a saturated NaHCO₃ solution was slowly added. The orange precipitate was separated and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to afford **10** (108 mg, 42%) as a yellow solid. MS (ESI⁺): 389.090 [M+1]⁺.

2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-5-(2-oxoacetyl) benzoic acid methyl ester (FGME, 3)

To a solution of SeO₂ (92.0 mg, 0.840 mmol) in 1,4-dioxane (300 µL) and MilliQ (30.0 µL, 1.68 mmol) was added AcOH (24.0 µL, 420 mmol). The mixture was heated at 80 °C for 30 min, and the resulting clear solution was cooled to room temperature and used for the oxidation of **10**. To a solution of **10** (44.3 mg, 0.114 mmol) in 1,4-dioxane (2.00 mL) and MilliQ (100 µL) was added activated SeO₂ solution (144 µL, 0.342 mmol) and the reaction mixture was heated at 80 °C for 2 h. The reaction was monitored by ESI-MS. The mixture was cooled to room temperature and the crude product was purified by reverse-phase HPLC to afford **3** (7.90 mg, 16%) as a yellow solid. HRMS (ESI⁺): calcd: 403.0817; found: 403.0818 [M+H]⁺, calcd: 421.0923; found: 421.0914 [M+OH+H]⁺, calcd: 435.1079; found: 435.1079 [M+OMe+H]⁺. HPLC purity: 96.3 % (254 nm)

(1S)-1-methylester-3-(4-(3-carboxy-4-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-phenyl)-5-hydroxy-2-oxo-2,5-dihydro-1H-imidazol-1-yl)propan-1-aminium trifluoroacetate (FGME–Cit, 4)

To a solution of L-citrulline (1.80 mg, 10.0 µmol) in 400 µL of H₂O/ TFA (v/v = 1/1) was added **FGME (3)** (4.00 mg, 10.0 µmol). The reaction mixture was stirred for 22 h and monitored by reverse-phase HPLC. Then, it was evaporated in vacuo to afford an orange amorphous solid, which was purified by reverse-phase HPLC to afford 1.80 mg (2.67 µmol, 28 %) of **FGME–Cit TFA salt (4)** as a orange solid: ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 8.28 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 7.05 (s, 2H), 6.94 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 5.45 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.99 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.82–3.72 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.23–3.13 (m, 1H), 2.01–1.88 (m, 2H), 1.84–1.68 (m, 2H). HRMS (ESI⁺): calcd: 560.1669; found: 560.1653 [M]⁺. HPLC purity: 95.3 % (254 nm)

Preparation of glyoxal probes and assay buffer.

Glyoxal probes (**FG** and **FGME**) were prepared as 10 mM stock solutions in DMSO. PAD assay buffer (Tris-HCl (pH 7.60), containing 50 mM NaCl, 2 mM DTT and 10 mM CaCl₂) was prepared as a stock solution.

Absorption and fluorescence spectroscopy

Absorption and fluorescence spectra were measured in a quartz cuvette (4 × 4 × 40 mm) on UV-1800 (Shimadzu, Japan) and RF5300PC (Shimadzu, Japan) instruments, respectively. Spectra of citrulline probes were measured in PBS (pH 7.4) or 20% TFA in PAD buffer at the final concentration of 1 μM (0.1% DMSO). The fluorometer slit width was 3.0 nm for both excitation and emission, the sensitivity was set to low, and the excitation wavelength was 490 nm (in neutral condition) or 440 nm (in acidic condition). Relative fluorescence quantum yield was obtained by comparing the area under the emission spectrum of the sample in sodium phosphate buffer (pH 7.4) with that of fluorescein in 0.1 N NaOH, whose quantum yield is 0.85.

Detection of L-citrulline with glyoxal fluorescence probes

A solution (15 μL) of glyoxal fluorescence probe (2 μL, 750 μM solution in DMSO, final concentration; 100 μM), L-citrulline (1-50 equiv. in PAD buffer) and TFA (3 μL, final concentration; 20%) was incubated at 37 °C for 2 h. Then, the fluorescence intensity was measured with a plate reader (ARVOX5). The results are mean ± s.e.m. from three experiments. ****p* < 0.005 after Bonferroni correction. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm

Enzymatic assay of PAD4 with BAEE

BAEE (100 mM, final concentration 10 mM, 1 μL) in Tris-HCl (pH 7.60) was incubated in PAD assay buffer (7 μL, total volume 10 μL), containing PAD4 (2 μM, final concentration 0.2 μM) and 10 % DMSO in PAD assay buffer (1 μL, final DMSO concentration 1%) at 37 °C for 0 min, 10 min, 20 min, or 30 min. Then, each solution was diluted with MilliQ (190 μL) and loaded onto an Inertsil ODS-3 column (5 mm; 150 × 4.6 mm) on a Shimadzu HPLC system. The eluates were monitored with a photodiode array detector (SPD-M10A VP) and fluorescence detector (RF-20A XS). (A) MilliQ water containing 0.1 % TFA and (B) MeCN containing 0.1 % TFA were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 90 % and B 10 % → 20 min, A 10 % and B 90 %.

Enzymatic reaction of FGME and PAD4 and inhibition assay using Cl-amidine

A solution (20 μ L) of PAD4 (5 nM, 2 μ L, first concentration; 0.5 nM, final concentration; 0.2 nM), BAEE (100 mM, 2 μ L, first concentration; 10 mM, final concentration; 4 mM) and Cl-amidine (1 mM, 2 μ L, first concentration; 100 μ M, final concentration; 40 μ M) in PAD buffer (14–20 μ L) was incubated at 37 °C for 30 min. Then, TFA (10 μ L, final concentration; 20%), **FGME** (1 mM, 5 μ L, final concentration; 100 μ M) and PAD buffer (15 μ L) were added and the mixture was incubated at 37 °C for 2 h. After the reaction was finished, fluorescence intensity was measured with a plate reader (ARVOX5). The results are mean \pm s.e.m. from three experiments. *** $p < 0.005$ after Bonferroni correction. Excitation wavelength = 450 nm, emission wavelength = 535 nm.

Experimental part of benzil probes

Synthesis of 11a, 11b, 12a and 12b.

11a, 11b, 12a and **12b** were prepared by a known method¹¹². **12a**: HPLC purity: 98.1 % (254 nm), **12b**: HPLC purity: 95.2 % (254 nm).

Synthesis of 11c.

5-Iodo fluorescein diacetate (**7**, 50.0 mg, 0.102 mmol), methyl 4-ethynylbenzoate (23.0 mg, 0.143 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (8.50 mg, 12.1 μ mol), and CuI (2.30 mg, 12.0 μ mol) were mixed in dry THF (3.00 mL), and triethylamine (80.0 μ L) was added. The mixture was stirred at room temperature for 12 h under an argon atmosphere. THF was evaporated under reduced pressure and the mixture was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/*n*-hexane = 1/4, 2/3, 3/2, 4/1) to afford **11c** (51.1 mg, 87%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.17 (s, 1H), 8.06 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.82 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 6.85–6.84 (m, 4H), 3.94 (s, 3H), 2.32 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 168.9, 168.2, 166.5, 152.5, 152.2, 151.6, 138.4, 131.8, 130.2, 129.7, 129.0, 128.3, 127.0, 126.7, 125.3, 124.3, 117.9, 116.0, 110.6, 91.0, 90.0, 81.9, 52.4, 21.2. MS (ESI⁺) 597 [M+1]⁺, 629 [M+Na]⁺.

Synthesis of 12c.

To a solution of **11c** (51.1 mg, 89.0 μ mol) in methanol (2.00 mL) was added K₂CO₃ (50.0 mg) and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. After completion of the reaction, the mixture was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in DMSO (2.0 mL), then PdCl₂ (5.20 mg, 5.94 μ mol) was added, and the mixture

was stirred at 100 °C for 12 h under an argon atmosphere. The crude product was purified by preparative HPLC to afford **12c** (12.4 mg, 27%, 2 steps) as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 8.47 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.36 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 8.17 (br., 4H), 7.52 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.56 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 192.1, 191.3, 167.3, 165.2, 159.6, 157.6, 151.6, 136.4, 135.3, 134.8, 133.6, 130.3, 129.6, 129.4, 129.2, 126.9, 126.6, 125.1, 112.6, 108.4, 102.2, 52.6. HRMS (ESI⁺): calcd: 523.10291; found: 523.10291 [M+H]⁺ (2.67 mDa). HPLC purity: 95.4 % (254 nm)

Synthesis of **11d**.

11d was similarly prepared from 3,5-ditrifluoromethylethynylbenzene in 82% yield.

11d: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 8.19 (s, 1H), 8.00 (s, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.11 (s, 2H), 6.85-6.84 (m, 4H), 2.32 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 168.9, 168.1, 153.1, 152.3, 151.6, 138.4, 132.4, 132.1, 131.7, 129.0, 128.5, 126.8, 124.8, 124.6, 124.4, 118.0, 115.9, 110.7, 90.5, 88.5, 81.9, 31.0, 21.2. MS (ESI⁺) 653 [M + 1]⁺, 675 [M+Na]⁺.

Synthesis of **14a**.

To a solution of **4a** (69.5 mg, 0.161 mmol) in methanol (2.00 mL) was added K₂CO₃ (111 mg, 0.805 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. After completion of the reaction, the mixture was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in MeOH (2.00 mL) and then H₂SO₄ (0.300 mL) was added. The mixture was refluxed for 12 h, then H₂O was added, and the resulting precipitate was collected and dried under reduced pressure to afford **6a** as a yellow solid. The crude product was used for the next step without further purification. To a solution of **6a** (crude) in DMSO (3.00 mL) was added PdCl₂ (6.00 mg, 33.8 μmol). The mixture was stirred at 100 °C for 13 h under an argon atmosphere. The reaction was monitored by reverse-phase HPLC. After the reaction was complete, the crude product was purified by preparative HPLC to afford **7a** (4.41 mg, 5.7%, 3 steps) as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 8.69 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.38 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.85 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.76 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.68 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.73 (s, 2H), 6.67 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 3.61 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 193.5, 192.7, 164.1, 158.1, 156.4, 151.8, 140.1, 135.8, 133.9, 133.3, 132.1, 132.0, 131.4, 130.6, 130.4, 130.0, 129.5, 121.5, 114.5, 103.2, 52.8. HRMS (ESI⁺): calcd: 479.22308; found: 479.11130; [M+H]⁺ (-1.78 mDa). HPLC purity: 96.2% (254nm).

14b, **14c**, and **14d** were similarly prepared from **11b**, **11c**, and **11d** in 2.5%, 27%, and 19%

yield, respectively.

14b: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 8.79 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.47 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 8.45 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.31 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 6.79 (s, 2H), 6.73 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 3.62 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ 191.0, 190.8, 164.6, 157.0, 153.6, 151.3, 140.2, 137.3, 134.8, 133.9, 132.4, 132.2, 132.2, 131.6, 130.9, 130.8, 124.5, 121.9, 115.1, 103.6, 53.2. HRMS (ESI $^+$): calcd: 524.09816; found: 524.09776; $[\text{M}+\text{H}]^+$ (-0.39 mDa). HPLC purity: 96.6% (254nm).

14c: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 8.73 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.42 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.19 (br, 4H), 7.76 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 6.70 (s, 2H), 6.65 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.61 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ 192.2, 191.6, 165.3, 164.2, 156.3, 151.7, 151.0, 140.1, 135.4, 135.0, 134.1, 133.2, 132.0, 131.7, 130.5, 130.5, 130.2, 129.8, 121.6, 114.5, 108.5, 103.3, 52.7. HRMS (ESI $^+$): calcd: 537.11856; found: 537.11680; $[\text{M}+\text{H}]^+$ (-1.75 mDa). HPLC purity: 95.2% (254nm).

14d: ^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 8.86 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 8.65 (s, 2H), 8.58 (s, 1H), 8.52 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 1.8 Hz, 2H), 6.77 (dd, J = 9.2, 1.8 Hz, 2H), 3.63 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ 188.3, 187.6, 164.3, 156.7, 139.3, 134.7, 133.8, 132.4, 132.0, 131.4, 130.9, 130.8, 130.5, 129.9, 128.8, 128.7, 124.0, 121.8, 114.7, 103.1, 52.8. HRMS (ESI $^+$): calcd: 601.07220; found: 601.07146; $[\text{M}+\text{H}]^+$ (-0.74 mDa). HPLC purity: 98.9% (254nm).

Preparation of benzil probes and assay buffer.

Benzil probes were prepared as 10 mM stock solutions in DMSO. PAD assay buffer (Tris-HCl (pH 7.60), containing 50 mM NaCl, 2 mM DTT and 10 mM CaCl_2) was prepared as a stock solution.

HPLC analysis of the time-dependence of the cyclo-addition reaction of benzil probes with L-citrulline

A solution (50 μL) of each fluorescence probe (5 μL , 1 mM solution in DMSO, final concentration; 100 μM), L-citrulline (5 μL , 100 mM solution in PAD buffer, final concentration; 10 mM) and TFA (10 μL , final concentration; 20%) in PAD buffer (30 μL) was incubated at 50 $^\circ\text{C}$ for 30 min, 60 min, 90 min or 120 min. Then, each solution was loaded onto an Inertsil ODS-3 column (5 mm; 150 \times 4.6 mm) on a Shimadzu HPLC system. The eluates were monitored with a photodiode array detector (SPD-M10A VP). (A) MilliQ water containing 0.1 % TFA and (B) MeCN containing 0.1 % TFA were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 80 % and B 20 % \rightarrow 20 min, A 20 % and B 80 % \rightarrow 25 min, A 20 % and B 80 %.

HPLC analysis of the reaction products of benzil probes and L-citrulline

A solution (50 μ L) of each fluorescence probe (5 μ L, 1 mM solution in DMSO, final concentration; 100 μ M), L-citrulline (10 μ L, 100 mM solution in PAD buffer, final concentration; 20 mM) and TFA (10 μ L, final concentration; 20%) in PAD buffer (25 μ L) was incubated at 50 °C for 2 hr. Then, each solution was loaded onto an Inertsil ODS-3 column (5 mm; 150 \times 4.6 mm) on a Shimadzu HPLC system. The eluates were monitored with a photodiode array detector (SPD-M10A VP) and a fluorescence detector (RF-20A XS). (A) MilliQ water containing 0.1 % TFA and (B) MeCN containing 0.1 % TFA were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 80 % and B 20 % \rightarrow 20 min, A 20 % and B 80 % \rightarrow 25 min, A 20% and B 80 %.

Detection of L-citrulline with benzil fluorescence probes

A solution (50 μ L) of each fluorescence probe (5 μ L, 1 mM solution in DMSO, final concentration; 100 μ M), L-citrulline (10 μ L, 100 mM solution in PAD buffer, final concentration; 20 mM) and TFA (10 μ L, final concentration; 20%) in PAD buffer (30 μ L) was incubated at 50 °C for 2 hr. Then, the fluorescence intensity was measured with a plate reader (ARVOX5). The results are mean \pm s.e.m. from three experiments. * p < 0.05, **** p < 0.001 after Bonferroni correction.

Detection of BCME with benzil fluorescence probes

A solution (50 μ L) of each fluorescence probe (5 μ L, 1 mM solution in DMSO, final concentration; 100 μ M) and **BCME** (10 μ L, 100 mM solution in TFA, final concentration; 20 mM) in PAD buffer (35 μ L) or **BAEE** (10 μ L, 100 mM solution in PAD buffer, final concentration; 20 mM) in PAD buffer (25 μ L) and TFA (10 μ L) was incubated at 50 °C for 2 hr. Then, the fluorescence intensity was measured with a plate reader (ARVOX5). The results are mean \pm s.e.m. from three experiments. ** p < 0.01 after Bonferroni correction among each probe.

Concentration dependency of fluorescence generation from BCME

To **BCME** (0, 1, 5, 10, 50, 100 mM, 10 μ L, final concentration, 0, 0.2, 1, 2, 10, 20 mM) in TFA (10 μ L) were added PAD buffer (35 μ L) and **4MEBz-FluME** (1 mM, 5 μ L, final concentration; 100 μ M). The mixture was incubated at 50 °C for 2 hr, and then, the fluorescence intensity was measured with a plate reader (ARVOX5). The results are mean \pm s.e.m. from three experiments. The results are mean \pm s.e.m. from three experiments. ** p < 0.01 vs 0 mM group after Bonferroni correction.

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 CaCl₂, 2 mM DTT, 20 mM BAEE, PAD4 (as provided in the PAD4 assay kit purchased from Cayman Chemical, without dilution) or 600 nM PAD2 and 10 μM Cl-amidine; total volume was 20 μL) at 50 °C for 1 h. TFA (10 μL), 1 mM 4MEBz-FluME (5 μL, final concentration 100 μM) and PAD buffer (15 μL) were added, and the mixture was incubated at 50 °C for 2 h. Fluorescence intensity was measured with a plate reader (ARVOX5). The results are mean ± s.e.m. from three experiments. *** $p < 0.005$ after Bonferroni correction. In addition, generation of BCME after the enzymatic reaction of BAEE with PAD4 for 1 hr was confirmed by HPLC analysis. The reaction solution was loaded onto an Inertsil ODS-3 column (5 mm; 150 × 4.6 mm) on a Shimadzu HPLC system. The eluates were monitored with a photodiode array detector (SPD-M10A VP). (A) MilliQ water containing 0.1 % TFA and (B) MeCN containing 0.1 % TFA were used as developing solvents. Gradient conditions were as follows: 0 min, A 80 % and B 20 % → 20 min, A 20 % and B 80%.

Calculation of half-inhibitory activity of Cl-amidine using 4MEBz-FluME.

The enzymatic reaction was conducted in PAD buffer (100 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 50 mM BAEE, 1.5 μM PAD4 and 1, 10, 100, 1000 μM Cl-amidine at 50 °C for 1 h. TFA (10 μL), 1 mM 4MEBz-FluME (5 μL, final concentration 100 μM) and PAD buffer (15 μL) were added, and the mixture was incubated at 50 °C for 2 h. Fluorescence intensity was measured with a plate reader. The results are mean ± s.e.m. from three experiments. *** $p < 0.005$ after Bonferroni correction. IC₅₀ value of Cl-amidine was calculated by using GraphPad Prism6. $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$, X = concentration of Cl-amidine, Y = inhibition rate, Top = maximum reaction value, Bottom = basic reaction value.

Calculation of Z' factor about detection system using 4MEBz-FluME.

The enzymatic reaction was conducted in PAD buffer (100 mM Tris HCl, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 50 mM BAEE, 1.5 μM PAD4 at 50 °C for 1 h. TFA (10 μL), 1 mM 4MEBz-FluME (5 μL, final concentration 100 μM) and PAD buffer (15 μL) were added, and the mixture was incubated at 50 °C for 2 h. Fluorescence intensity was measured with a plate reader. The results are mean ± s.e.m. from eight experiments. *** $p < 0.005$ after Bonferroni correction.

参考文献

1. 古賀弥太郎, 大嶽了, *J. Tokyo Chem. Soc.* **1914**, 35.
2. 和田光穂, *日本農芸化学会誌* **1930**, 6, 474–484.
3. Krebs, H. A. and Henseleit, K. *Hoppe.-Seyl. Z.* **1932**, 210, 33–66.
4. Wada, M. *Biochem. Z.* **1933**, 257, 1.
5. Nienhuis, R. L. and Mandema, E. *Ann. Rheum. Dis.* **1964**, 23, 302–305.
6. Young, B. J., Mallya, R. K., Leslie, R. D., Clark, C. J., and Hamblin, T. J. *Br. Med. J.* **1979**, 2, 97–99.
7. Hoet, R. M. A., Boerbooms, A. M. T., Arends, M., Ruiter, D. J. and Venrooij, Q. J. *Ann. Rheum. Dis.* **1991**, 50, 611–618.
8. Sebbag, M., Simon, M., Vincent, C., Masson-Bessiere, C., Girbal, E., Durieux, J.J. and Serre, G. *J. Clin. Invest.* **1995**, 95, 2672–2679.
9. Harding, C. R. and Scott, I. R. *J. Mol. Biol.* **1983**, 170, 651–673.
10. Schellekens, G. A., de jong, B. A., van den Hoogen, F. H., van de Putte, L. B. and van Venrooij, W. J. *J. Clin. Invest.* **1998**, 101, 273–281.
11. Nakashima, K., Hagiwara, T. and Yamada, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 49562–49568.
12. Cuthbert, G. L., Daugat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. and Kouzarides, T. *Cell*, **2004**, 118, 545–553.
13. Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y. H., Perlin, J. R., Leonelli, L., Sonbuchner, L. S., McDonald, C. H., Cook, R. G., Dou, Y., Roeder, R. G., Clarke, S., Stallcup, M. R., Allis, C. D. and Coonrod, S. A. *Science*, **2004**, 306, 279–283.
14. Flam, B. R., Hartmann, P. J., Harrell-Booth, M., Solomonson, L. P. and Eichler, D. C. *Nitric Oxide*, **2001**, 5, 187–197.
15. Solomonson, L. P., Flam, B. R., Pendleton, L. C., Goodwin, B. L. and Eichler, D. C. *J. Exp. Biol.* **2003**, 206, 2083–2087.
16. Oyadomari, S., Gotoh, T., Aoyagi, K., Araki, E., Shichiri, M. and Mori, M. *Nitric Oxide* **2001**, 5, 187–197.
17. Li, C., Huang, W., Harris, M. B., Goolsby, J. M. and Venema, R. C. *Biochem. J.* **2005**, 386, 567–574.
18. Erez, A., Nagamani, S. C., Shchelochkov, O. A., Premkumar, M. H., Campeau, P. M., Chen, Y., Garg, H. K., Li, L., Mian, A., Bertin, T. K., Black, J. O., Zeng, H., Tang, Y., Reddy, A. K., Summar, M., O'Brien, W. E., Harrison, D. G., Mitch, W. E., Marini, J. C., Aschner, J. L., Bryan, N. S. and Lee, B. *Nat. Med.* **2011**, 17, 1619–1627.
19. Fike, C. D., Summar, M. and Aschner, J. L. *Acta Paediatr.* **2014**, 103, 1019–1026.
20. Vessenaar, E. R., Zendman, A. J., van Venrooij, W. J. and Pruijn, G. J. *BioEssays*, **2003**, 25,

1106–1118.

21. Fearon, W. R. *Biochem. J.* **1939**, 33, 902–907.
22. György, B., Tóth, E., Tarcsa, E., Falus, A. and Buzás, E. I. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2006**, 38, 1662–1677.
23. Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Bénazeth, S. and Cynober, L. *Amino Acids* **2005**, 29, 177–205.
24. Hermansson, M., Artemenko, K., Ossipova, E., Eriksson, H., Lenggqvist, J., Makrygiannakis, D., Catrina, A. I., Nicholas, A. P., Klareskog, L., Savitski, M., Zubarev, R. A. and Jakobsson, P. *J. Proteomics Clin. Appl.* **2010**, 4, 511–518.
25. Rogers, G. E. *Nature* **1962**, 194, 1149–1151.
26. Rogers, G. E. and Taylor, L. D. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, 86A, 283–294.
27. Watanabe, K., Akiyama, K., Hikichi, K., Ohtsuka, R., Okuyama, A. and Senshu, T. *Biochim. Biophys. Acta.* **1988**, 966, 375–383.
28. Terakawa, H., Takahara, H. and Sugawara K. *J. Biochem.* **1991**, 110, 661–666.
29. Slade, D. J., Fang, P., Dreyton, C. J., Zhang, Y., Fuhrmann, J., Rempel, D., Bax, B. D., Coonrod, S. A., Lewis, H. D., Guo, M., Gross, M. L. and Thompson, P. R. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 1043–1053.
30. Tour, O., Adams, S. R., Kerr, R. A., Meijer, R. M., Sejnowski, T. J., Tsien, R. W. and Tsien, R. Y. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 423–431.
31. Darrah, E., Giles, J. T., Ols, M. L., Bull, H. G., Andrade, F. and Rosen, A. *Sci. Transl. Med.* **2013**, 5, 186ra65.
32. Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M. and Sato, M. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 777–783.
33. Shirai, H., Blundell, T. L. and Mizuguchi, K. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 465–468.
34. Fuhrmann, J., Clancy, K. W. and Thompson, P. R. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 5413–5461.
35. Linsky, T. W. and Fast, W. *Comprehensive Natural Products Chemistry II, Chemistry and Biology; Elsevier: Amsterdam*, **2010**, 8, 125–159.
36. Thompson, P. R. and Fast, W. *ACS. Chem. Biol.* **2006**, 1, 433–441.
37. Knuckley, B., Bhatia, M. and Thompson, P. R. *Biochem.* **2007**, 46, 6578–6587.
38. Knuckley, B., Causey, C. P., Jones, J. E., Bhatia, M., Dreyton, C. J., Osborne, T. C., Takahara, H. and Thompson, P. R. *Biochem.* **2010**, 49, 4852–4863.
39. Dreyton, C. J., Knuckley, B., Jones, J. E., Lewallen, D. M. and Thompson, P. R. *Biochem.* **2014**, 53, 4426–4433.
40. Rus'd, A.A., Ikejiri, Y., Ono, H., Yonekawa, T., Shiraiwa, M., Kawada, A. and Takahara, H. *Eur. J. Biochem.* **1999**, 259, 660–669.
41. Guerrin, M., Ishigami, A., Méchin, M. C., Nachat, R., Valmary, S., Sebbag, M., Simon, M.,

- Senshu, T. and Serre, G. *Biochem. J.* **2003**, 370, 167–174.
42. Ishida-Yamamoto, A., Senshu, T., Eady, R. A., Takahashi, H., Shimizu, H., Akiyama, M. and Iizuka, H. *J. Invest. Dermatol.* **2002**, 118, 282–287.
43. Nagata, S. and Senshu, T. *Experientia* **1990**, 46, 72–74.
44. Urano, Y., Watanabe, K., Sakaki, A., Arase, S., Watanabe, Y., Shigemi, F., Takeda, K., Akiyama, K. and Senshu, T. *Am. J. Dermatopathol.* **1990**, 12, 249–255.
45. Vossenaar, E. R., Nijenhuis, S., Helsen, M. M., van der Heijden, A., Senshu, T., van den Berg, W. B., van Venrooij, W. J. and Joosten, L. A. *Arthritis Rheum.* **2003**, 48, 2489–2500.
46. Vossenaar, E. R., Radstake, T. R., van der Heijden, A., van Mansum, M. A., Dieteren, C., de Rooij, D. J., Barrera, P., Zendman, A. j. and van Venrooij, W. J. *Ann. Rheum. Dis.* **2004**, 63, 373–381.
47. Lamensa, J. W. and Moscarello, M. A. *J. Neurochem.* **1993**, 61, 987–996.
48. Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., Murayama, S., Asaga, H., Toda, T., Kimura, N. and Maruyama, N. *J. Neurosci. Res.* **2005**, 80, 120–128.
49. Darrah, E., Rosen, A., Giles, J. T. and Andrade, F. *Annals of the Rheumatic Diseases* **2012**, 71, 92–98.
50. Cherrington, B. D., Morency, E., Struble, A. M., Coonrod, S. A. and Wakshlag, J. J. *PLoS One* **2010**, 5, e11768.
51. Jang, B., Shin, H. Y., Choi, J. K., Du, P. T. N., Jeong, B. H., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R. I., Kim, Y. S. and Choi, E. K. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, 70, 116–124.
52. Chavanas, S., Méchin, M. C., Nachat, R., Adoue, V., Coudane, F., Serre, G. and Simon, M. *J. Dermatol. Sci.* **2006**, 44, 63–72.
53. Kanno, T., Kawada, A., Yamanouchi, J., Yosida-Noro, C., Yoshiki, A., Shiraiwa, M., Kusakabe, M., Manabe, M., Tezuka, T. and Takahara, H. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, 115, 813–823.
54. Nachat, R., Méchin, M. C., Charveron, M., Serre, G., Constans, J., Simon, M. *J. Invest. Dermatol.* **2005**, 125, 34–41.
55. Asaga, H., Nakashima, K., Senshu, T., Ishigami, A. and Yamada, M. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, 70, 46–51.
56. Chang, X. and Han, J. *Mol. Carcinog.* **2006**, 45, 183–196.
57. Chang, X., Han, J., Pang, L., Zhao, Y., Yang, Y. and Shen, Z. *BMC cancer* **2009**, 9, 40.
58. Nakashima, K., Hagiwara, T. and Yamada, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 49562–49568.
59. Nakashima, K., Hagiwara, T., Ishigami, A., Nagata, S., Asaga, H., Kuramoto, M., Senshu, T. and Yamada, M. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 27786–27792.
60. Hagiwara, T., Nakashima, K., Hirano, H., Senshu, T. and Yamada, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 290, 979–983.

61. Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J. and Clarke, S. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 32890–32896.
62. Guo, Q. and Fast, W. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 17069–17078.
63. Tanikawa, C., Espinosa, M., Suzuki, A., Masuda, K., Yamamoto, K., Tsuchiya, E., Ueda, K., Daigo, Y., Nakamura, Y. and Matsuda, K. *Nat. Commun.* **2012**, 3, Article number: 676.
64. Christophorou, M. A., Castelo-Branco, G., Halley-Stott, R. P., Oliveira, C. S., Loos, R., Radzisheuskaya, A., Mowen, K. A., Bertone, P., Silva, J. C., Zernicka-Goetz, M., Nielsen, M. L., Gurdon, J. B. and Kouzarides, T. *Nature* **2014**, 507, 104–108.
65. Esposito, G., Vitale, A. M., Leijten, F. P., Strik, A. M., Koonen-Reemst, A. M., Yurttas, P., Robben, T. J., Coonrod, S. and Gossen, J. A. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2007**, 273, 25–31.
66. Kan, R., Yurttas, P., Kim, B., Jin, M., Wo, L., Lee, B., Gosden, R. and Coonrod, S. A. *Dev. Biol.* **2011**, 350, 311–313.
67. Chavanas, S., Méchin, M. C., Takahara, H., Kawada, A., Nachat, R., Serre, G. and Simon, M. *Gene*. **2004**, 330, 19–27.
68. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. *Nature*, **1997**, 389, 251–260.
69. Bird, A. *Cell* **1992**, 70, 5–8.
70. Jenuwein, T. and Allis, C. D. *Science*, **2001**, 293, 1074–1080.
71. Kuo, M. H. and Allis, C. D. *Bioessays* **1998**, 20, 615–626.
72. Nowak, S. J., Pai, C. Y. and Corces, V. G. *Mol. Cell Biol.* **2003**, 23, 6129–6138.
73. Bannister, A. J., Schneider, R. and Kouzarides, T. *Cell* **2002**, 109, 801–806.
74. An, W., Kim, J. and Roeder, R. G. *Cell* **2004**, 117, 735–748.
75. Bauer, U. M., Daujat, S., Nielsen, S. J., Nightingale, K. and Kouzarides, T. *EMBO Rep.* **2002**, 3, 39–44.
76. Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W. and Stallcup, M. P. *Science*, **1999**, 284, 2174–2177.
77. Strahl, B. D., Briggs, S. D., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Koh, S. S., Ma, H., Cook, R. G., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Stallcup, M. R. and Allis, C. D. *Curr. Biol.* **2001**, 11, 996–1000.
78. Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P. and Zhang, Y. *Science*, **2001**, 293, 853–857.
79. Denis, H., Deplus, R., Putmans, P., Yamada, M., Métivier, R. and Fuks, F. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, 29, 4982–4993.
80. Li, P., Wang, D., Yao, H., Doret, P., Hao, G., Shen, Q., Qiu, H., Zhang, X., Wang, Y., Chen, G. and Wang, Y. *Oncogene* **2010**, 29, 3153–3162.
81. Li, P., Yao, H., Zhang, Z., Li, M., Luo, Y., Thompson, P. R., Gilmour, D. S. and Wang, Y. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, 28, 4745–4758.
82. Wang, S. and Wang, Y. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1829, 1126–1135.

83. Zhang, X., Gamble, M. J., Stadler, S., Cherrington, B. D., Causey, C. P., Thompson, P. R., Roberson, M. S., Kraus, W. L. and Coonrod, S. A. *PLoS genetics* **2011**, 7, e1002112.
84. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A. *Science*, **2004**, 303, 1532–1535.
85. Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. *J. Cell Biol.* **2012**, 198, 773–783.
86. Lewis, H. D., Liddle, J., Coote, J. E., Atkinson, S. J., Barker, M. D., Bax, B. C., Bicker, K. L., Bingham, P. R., Campbell, M., Chen, Y. H., Chung, C. W., Craggs, P. D., Davis, R. P., Eberhard, D., Joberty, G., Lind, K. E., Locke, K., Maller, C., Martinod, K., Patten, C., Polyakova, O., Rise, C. E., Rudiger, M., Sheppard, R. J., Slade, D. J., Thomas, P., Thorpe, J., Yao, G., Drewes, G., Wagner, D. D., Thompson, P. R., Prinjha, R. K. and Wilson, D. M. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 189–191.
87. Knight, J. S., Subramanian, V., O'Dell, A. A., Yalavarthi, S., Zhao, W., Smith, C. K., Hodgin, J. B., Thompson, P. R. and Kaplan, M. J. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-205365.
88. Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M. W., Hobbs, K., Huizinga, T. W. J., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T. K., Laing, T., Mease, P., Menard, H. A., Moreland, L. W., Naden, R. L., Pincus, T., Smolen, J. S., Stanislawska-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P. P., Upchurch, K. S., Vencovsky, J., Wolfe, F. and Hawker, G. *Arthritis Rheum.* **2010**, 62, 2569–2581.
89. Mimori, T. *Intern. Med.* **2005**, 44, 1122–1126.
90. Masson-Bessière, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhausser, E., Nogueira, L., Vincent, C. S., Vincent, T. and Serre, G. *J. Immunol.* **2001**, 166, 4177–4184.
91. Skriner, K., Adolph, K., Jungblut, P. R. and Burmester, G. R. *Arthritis Rheum.* **2006**, 54, 3809–3814.
92. Suzuki, A., Yamada, R., Ohtake-Yamanaka, M., Okazaki, Y., Sawada, T. and Yamamoto, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 333, 418–426.
93. Kinloch, A., Lundberg, K., Wait, R., Wegner, N., Lim, N. H., Zendman, A. J., Saxne, T., Malmström, V. and Venables, P. J. *Arthritis Rheum.* **2008**, 58, 2287–2295.
94. Vossenaar, E. R. and van Venrooij, W. J. *Arthritis Res. Ther.* **2004**, 6, 107–111.
95. Musse, A. A., Li, Z., Ackerley, C. A., Bienzle, D., Lei, H., Poma, R., Harauz, Z., Moscarello, M. A. and Mastronardi, F. G. *Dis. Models Mech.* **2008**, 1, 229–240.
96. Esteller, M. *N. Engl. J. Med.* **2008**, 358, 1148–1159.
97. Gla-Yam, E. N., Saito, Y., Egger, G. and Jones, P. A. *Annu. Rev. Med.* **2008**, 59, 267–280.
98. Tanikawa, C., Ueda, K., Nakagawa, H., Yoshida, N., Nakamura, Y. and Matsuda, K. *Cancer Res.* **2009**, 69, 8761–8769.

99. Wang, Y., Li, P., Wang, S., Hu, J., Chen, X. A., Wu, J., Fisher, M., Oshaben, K., Zhao, N., Gu, Y., Wang, D., Chen, G. and Wang, Y. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 25941–25953.
100. Achary, N. K., Nagele, E. P., Han, M., Coretti, N. J., DeMarshall, C., Kosciuk, M. C., Boulos, P. A. and Nagele, R. G. *J. Autoimmun.* **2012**, 38, 369–380.
101. Jang, B., Ishigami, A., Maruyama, N., Carp, R. I., Kim, Y. S. and Choi, E. K. *Prion* **2013**, 7, 42–46.
102. Knuckley, B., Causey, C. P., Jones, J. E., Bhatia, M., Dreyton, C. J., Osborne, T. C., Takahara, H. and Thompson, P. R. *Biochem.* **2010**, 49, 4852–4863.
103. Arita, K., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Yamada, M. and Sato, M. *PNAS* **2006**, 103, 5291–5296.
104. Pritzker, L. B. and Moscarello, M. A. *Biochim. Biophys. Acta. Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, 1388, 154–160.
105. Knuckley, B., Luo, Y. and Thompson, P. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 739–745.
106. Lewallen, D. M., Bicker, K. L., Madoux, F., Chase, P., Anguish, L., Coonrod, S., Hodder, P. and Thompson, P. R. *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 913–921.
107. Lewis, H. D., Liddle, J., Coote, J. E., Atkinson, S. J., Barker, M. D., Bax, B. D., Bicker, K. L., Bingham, R. P., Campbell, M., Chen, Y. H., Chung, C. W., Craggs, P. D., Davis, R. P., Eberhard, D., Joberty, G., Lind, K. E., Locke, K., Maller, C., Martinod, K., Patten, C., Polyakova, O., Rise, C. E., Rüdiger, M., Sheppard, R. J., Slade, D. J., Thomas, P., Thorpe, J., Yao, G., Drewes, G., Wagner, D. D., Thompson, P. R., Prinjha, R. K. and Wilson, D. M. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 189–191.
108. Stone, E. M., Schaller, T. H., Bianchi, H., Person, M. D. and Fast, W. *Biochem.* **2005**, 44, 13744–13752.
109. Luo, Y., Arita, K., Bhatia, M., Knuckley, B., Lee, Y-H., Stallcup, M. R., Sato, M. and Thompson, P. R. *Biochem.* **2006**, 45, 11727–11736.
110. Zendman, A. J., Raijmakers, R., Nijenhuis, S., Vossenaar, E. R., Tillaatr, Mv., Chirivi, R. G., Raats, J. M., van Venrooij, W. J., Drijfhout, J. W. and Pruijn, G. J. *Anal. Biochem.* **2007**, 369, 232–240.
111. Roth, M. *Anal. Biochem.* **1971**, 43, 880–882.
112. Sabulski, M. J., Fura, J. M. and Pires, M. M. *J. Vis. Exp.* **2014**, 5, e52114.
113. Tuttunen, A. E. V., Holm, A., Jørgensen, M., Stadtmüller, P., Rise, F. and Fleckenstein, B. *Anal. Biochem.* **2010**, 403, 43–51.
114. Ueno, T., Urano, Y., Setsukinai, K., Takakusa, H., Kojima, H., Kikuchi, K., Ohkubo, K., Fukuzumi, S. and Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14079–14085.
115. Gabe, Y., Urano, Y., Kikuchi, K., Kojima, H. and Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3357–3367.

116. Ueno, T., Urano, Y., Kojima, H. and Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10640–10641.
117. 山内啓雅 修士論文 名古屋市立大学, **2016**.
118. Baeyer, A. *Chem. Ber.* **1871**, *4*, 555.
119. Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P. H., Püschl, A. and Schaumburg, K. *Structural Chemistry* **1995**, *3*, 161–165.
120. Tamura, Z., Morioka, T., Maeda, M. and Tsuji, A. *Bunseki Kagaku* **1994**, *43*, 339–346.
121. Chen, S.-C., Nakamura, H. and Tamura, Z. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 475–479.
122. Urano, Y., Kamiya, M., Kanda, K., Ueno, T., Hirose, K. and Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888–4894.
123. Ieda, N., Hishikawa, K., Eto, K., Kitamura, K., Kawaguchi, M., Suzuki, T., Fukuhara, K., Miyata, N., Furuta, T., Nabekura, J. and Nakagawa, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3172–3175.
124. Cacchi, S., Fabrizi, G., Gavazza, F. and Goggiamani, A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 289–291.
125. Abo, M., Urano, Y., Hanaoka, K., Terai, T., Komatsu, T. and Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* *2005*, *127*, **2013**, *133*, 10629–10637.
126. Muth, A., Subramanian, V., Beaumont, E., Nagar, M., Kerry, P., McEwan, P., Srinath, H., Clancy, K., Parelkar, S. and Thompson, P. R. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 3198–3211.

謝辞

本研究に際し、統括的な御指導、御助言を賜りました本学大学院薬学研究科 中川秀彦教授に心より感謝し御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、実験の細部にわたり直接的な御指導、御鞭撻を賜りました本学大学院薬学研究科 川口充康助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、特に有機合成の知識、技術に関する多くの有益なる御助言を賜りました本学大学院薬学研究科 家田直弥助教に厚く感謝致します。

本論文を執筆するにあたり、細部にわたる御指導、御討論をしていただきました、本学大学院薬学研究科 樋口恒彦教授、中村精一教授、牧野利明教授に深く感謝の意を表します。

本研究におきまして、全般にわたって数多くの知識、知見を残して頂きました、山内啓雅修士に深く感謝致します。

化合物の合成を行う際、元素分析、質量分析、核磁気共鳴測定を行って頂きました、本学総合機器分析施設の皆様に深く感謝致します。

有機化学の研究を開始するにあたり、基礎的な技術に関する直接的な御指導、御鞭撻に加え、有機合成に関する数々の知識を賜り、研究者としての礎を築いてくださいました東北大学大学院理学研究科化学専攻 加藤信樹講師に深謝致します。

最後に、研究室生活を非常に有意義なものにして頂き、数々の御助言、御協力を頂きました本学薬化学教室の皆様に心より感謝し御礼申し上げます。本当にありがとうございました。

平成 31 年 3 月
國枝一輝