

# エピジェネティクスの阻害剤研究を切り拓く スクリーニングテクノロジー

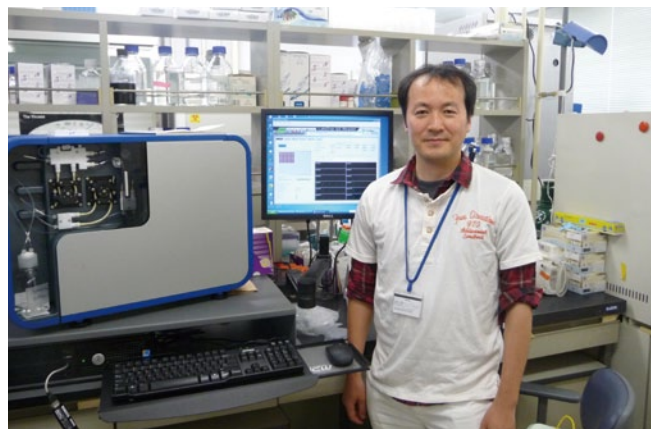
1990年代後半から飛躍的に進んだエピジェネティクス研究は、転写制御機構はもちろん、胚発生、細胞分化などで様々な新しい知見をもたらしている。さらに、2000年代に入って DNMT 阻害剤の 5-azacitidine (商品名 Vidaza<sup>®</sup>) や decitabine (商品名 Dacogen<sup>®</sup>)、HDAC 阻害剤の vorinostat (商品名 ZOLINZA<sup>®</sup>) や romidepsin (商品名 ISTODAX<sup>®</sup>) が相次いで上市し、メチル基転移酵素 EZH2 やプロモドメインリーダータンパク質の BRD4 が創薬のターゲットとして臨床開発が進むなど、創薬現場の新しいターゲットとして注目を集める<sup>1,2</sup>。エピジェネティクス関連因子の阻害剤は、これらの基礎研究では新しい解析ツール、創薬では新規のリード化合物の発見につながるため、もたらす恩恵は大きい。sub-nM から μM という高感度かつ広いレンジでの阻害活性測定が反応液を混ぜるだけで行える AlphaLISA と、タンパク質修飾の変化を高分解能のモビリティシフトアッセイで解析できる EZ Reader は、カイネティクス測定による阻害剤の評価を高速かつ大規模で実現することで、エピジェネティクス分野に寄与している。

国内の化合物ライブラリから新規のエピジェネティクス関連の阻害剤探索を牽引する吉田化学遺伝学研究室の伊藤昭博専任研究員は、AlphaLISA と EZ Reader の両方を駆使して研究を進める。HDAC、HAT、キナーゼなどの酵素の阻害剤のスクリーニングには EZ Reader を、ヒストンメチル基転移酵素、ヒストン脱メチル化酵素、リーダータンパク質などのタンパク質間相互作用解析には AlphaLISA とそれぞれの特長を活かした測定をすることで、新規の阻害剤探索で手応えを感じている。いくつかの阻害剤で結果が出始めている伊藤研究員にお話を伺うことができた。

## HDAC 阻害剤の縁

伊藤研究員が阻害剤をタンパク質の機能解析に用い始めたのはポストドクとして Duke 大学に留学していた 2000 年頃にさかのぼり、これが現在の研究キャリアにもつながることになる。留学先の Tso-Pang Yao 教授の研究室では、

p300/CBP を介した p53 のアセチル化のメカニズムや、HDAC1-MDM2 を介した p53 の脱アセチル化が p53 の分解に必要であるといった可能性を EMBO Journal に相次いで発表し<sup>3,4</sup>、伊藤研究員の翻訳後修飾の研究が本格的に幕を上げる。その中で脱アセチル化を抑制するために、クラス I、II の HDAC 阻害剤として知られるトリコスタチン A をよく用いていた。実は、このトリコスタチン A が HDAC の阻害剤であることを明らかにしたのが、現在所属する吉田化学遺伝学研究室の吉田稔主任研究員だったのだ。「一時帰国をした際に、Yao 教授と親交のあった吉田先生の研究室でもセミナーを開催させていただいたのですが、その時に吉田先生がトリコスタチン A の研究の先駆けであることを初めて知りました」と、笑いながら当時を振り返る。留学終了後に所属先として吉田主任研究員の研究室を選び、翻訳後修飾研究の第 2 幕が始まることになる。



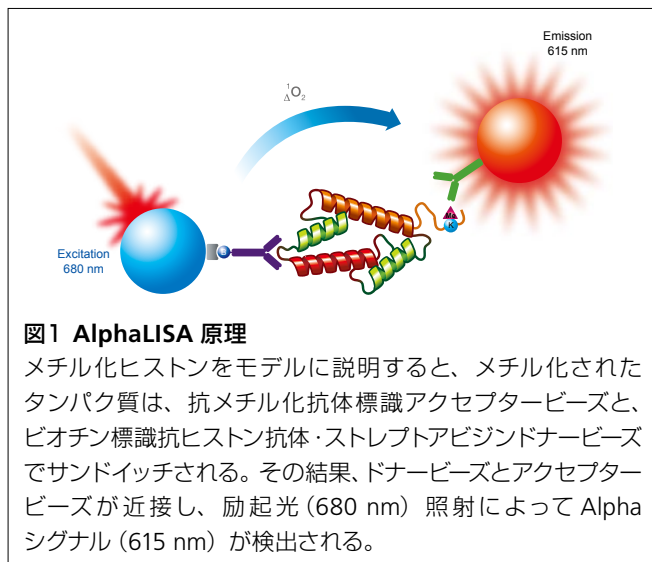
独立行政法人理化学研究所  
吉田化学遺伝学研究室  
バイオ安全技術課

専任研究員 伊藤 昭博氏

## 用途の広いスクリーニングシステム AlphaScreen/AlphaLISA

現在、吉田化学遺伝学研究室ではアセチル化、メチル化、SUMO 化などのタンパク質翻訳後修飾の研究テーマがいくつも走っている。伊藤研究員はハイスループットスクリーニング（以下、HTS）のシステムを利用して、メチル化、アセチル化、SUMO 化に関わる酵素や翻訳後修飾を認識するリーダータンパク質の阻害剤探索を中心に研究を推進している。この研究で、AlphaLISA と EZ Reader が一翼を担っている。

AlphaLISA（AlphaScreen）は Alpha テクノロジーというパーキンエルマー独自の技術を利用したアッセイ系だ。ドナービーズとアクセプタービーズが近接した時にのみ観測される発光（Alpha シグナル）を検出する。AlphaLISA と AlphaScreen では使用しているアクセプタービーズ中の発光物質が異なり、AlphaLISA は 615 nm に鋭いピークを出すユーロピウムキレートが、AlphaScreen には 520 nm ～ 620 nm にピークを持つルレンが含まれている。



ビオチン標識した H3K4me ペプチドと H3K4me を基質とする脱メチル化酵素 LSD1 を混合し、リジン残基の脱メチル化反応を観察する場合を例にとってみよう。反応後、まず反応系にストレプトアビジン標識したドナービーズと未修飾 H3K4 ペプチドの認識抗体を結合したアクセプタービーズを混合する。するとビオチン標識されたヒストン H3 ペプチドがドナービーズに結合し、そこへ未修飾の H3K4 ペプチドを認識してアクセプタービーズが接近する。この時ドナービーズからアクセプタービーズへ一重項酸素分子が移動してアクセプタービーズが発光する。この発光はビーズどうしが近接した時にのみ起こるので、特異的な結合を検出できるというわけだ(図1)。脱メチル化の阻害剤を加えれば、検出されるシグナルの変化で、阻害のカイネティクスを解析することができる。ダイナミックレンジが広く、sub-nM から μM レンジまでの親和性の相互作用の検出が可能で、数 μL の系でアッセイを行うことができる。この系で解析できたヒストン修飾酵素については情報が公開されており、その数も増えている<sup>5</sup>。

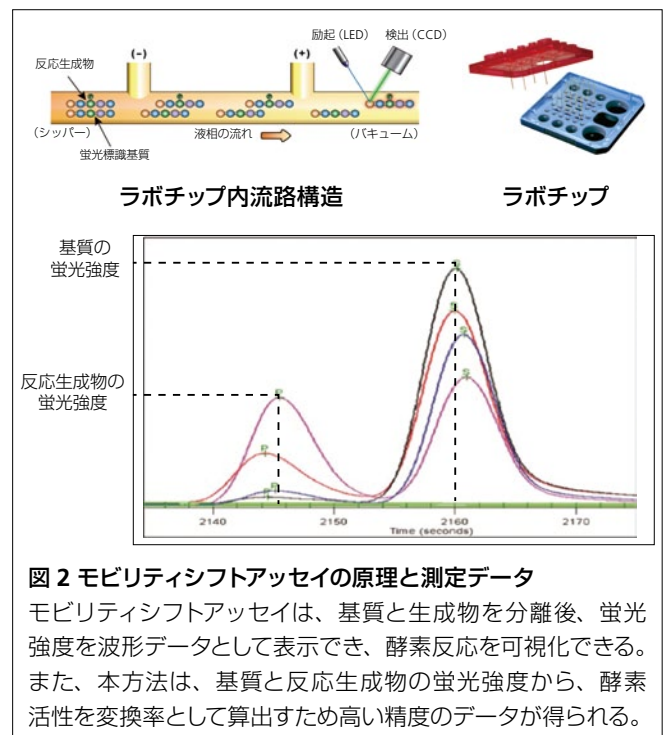
論文に目を向けると、例えば 2010 年の Nature<sup>6</sup> と 2012 年の Cell<sup>7</sup> で Oxford 大学の James E. Bradner らは分子

デザインで創出した新規の阻害剤候補 JQ1 の阻害活性の測定で AlphaScreen を活用している。JQ1 は 2 個のタンデムに並ぶプロモドメインと C 末側に特異的末端配列を持つ BET (bromodomain and extra terminal) ファミリータンパク質の BRD2、BRD3、BRD4、BRDT のアセチル化リジンの結合サイトにはまり込む。Nature では、AlphaScreen を用いて JQ1 のテトラアセチル化ヒストン H4 ペプチド-BRD4 プロモドメインの結合の阻害濃度 (IC50) を調べ、プロモドメイン I では IC50 が 77 nM、プロモドメイン II では IC50 が 33 nM と報告している。

伊藤研究員も使い勝手について実感しており、「AlphaLISA はスループットが高く、タンパク質-タンパク質相互作用の評価や、メチル化、脱メチル化酵素の阻害剤のアッセイ系では最も簡便ですね。あと、in silico スクリーニングで見つかった候補を評価する際にも用いています」と評価する。タンパク質-タンパク質相互作用のように、共有結合による修飾をとみなわないエピジェネティクスのイベントを調べられる点は、Bradner らが報告しているプロモドメインタンパク質阻害剤のようにリーダータンパク質をターゲットにした場面で強さを発揮してくるだろう。

## モビリティシフトで見極める EZ Reader

EZ Reader はマイクロ流路を利用した電気泳動システムで、高分解能のモビリティシフトアッセイを実現し、修飾、脱修飾のような共有結合をとみなす酵素の阻害剤探索で威力を発揮している。EZ Reader のモビリティシフトアッセイの CV 値は、ELISA 法の 11% に対して 1.2% と低いため、データごとのバラつきが少なく、より信頼性の高い実験結果を提供することにつながっている。



分離・測定の実理はシンプルで、リン酸化を例にして考えてみると、リン酸化によって基質ペプチドの電荷が非リン酸化ペプチドに比べてマイナス側に変化し、若干の電荷のズレが生じる。これを利用して分離し、最終的に検出器でペプチドを検出するというものだ(図2)。

ペプチド自体は泳動前に蛍光標識が施されるので、蛍光強度を測定していただくだけでカイネティクスがとれる。リン酸化/非リン酸化ペプチドのシグナル比から変換率を算出し、阻害剤の活性が容易に測定できる。この時に検出系や液量などの要因をキャリブレーションで常に補正することで、バラツキの少ない結果を実現している。

一度にいくつものサンプルを泳動できる機能を活用することで、阻害剤の評価やアッセイ系開発の基礎データを取得する場面で強みを発揮する。12 サンプルの解析ができる 12 sipper チップ(4 サンプル用の 4 sipper もある)を用いれば、多サンプル用の 384 ウェルプレートの解析完了に要する時間はわずか 15 分。4 sipper チップでも 45 分で完了できる。例えば、酵素の濃度を 12 段階(12 sipper) でふって、サンプルインジェクション、電気泳動、データ算出を一定の間隔で繰り返すリアルタイムカイネティクスを実施すれば、簡単に酵素濃度と反応時間の最適化が図れ、アッセイ系の構築をスピードアップする。その他にターゲットのタンパク質に対して阻害効果の高い化合物をプロファイリングする際にもこの機能が威力を発揮する。

さらに、基質に用いるペプチドに標識するクマリンの自家蛍光によってアーティファクトを拾ってしまうと言われているサーチチェーンの様な場合でも、自家蛍光を心配することなくカイネティクスを調べられる点は新たな解析の道を拓く。実際に、クラス III の HDAC である SIRT1 を使った実験で、アセチル化基質と脱アセチル化基質をうまく分離できることがわかっている<sup>8</sup>。伊藤研究員もサーチチェーンの研究を行っているが、「電気泳動の結果として目で見ることが出来る安心感は他に代え難い」と太鼓判を押す(図 3)。

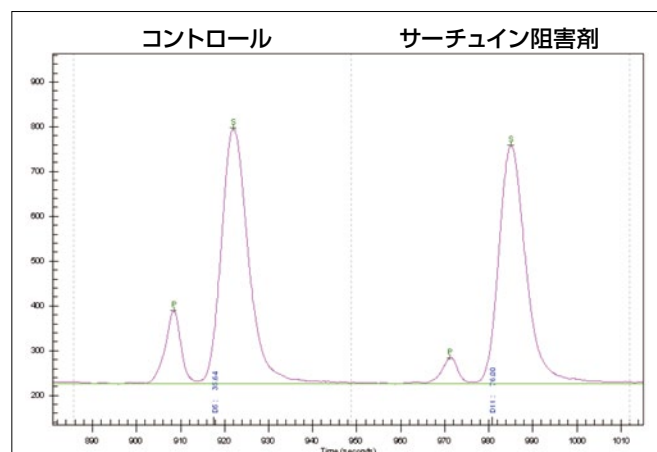


図 3 EZ Reader でサーチチェーン活性を測定したデータ

EZ Reader は、プロダクト(P)と基質(S)の量比からサーチチェーンの活性を可視化できる。また、サーチチェーン阻害剤のデータは、コントロールの結果と比較し、プロダクトのシグナルが低下していることがわかる。

## ハイスループットスクリーニングで変わる研究

AlphaLISA と EZ Reader の導入で、伊藤研究員らの研究環境は大きく変わってきている。「ハイスループットスクリーニングを行うにあたり、今では人がやるのは試薬の調製、プログラムのセットとプレートをセットするくらいです。夜にスタッカーと連動させた検出器を用いて測定

するので、翌日の朝に研究室に来ると結果が出ている」と、以前の環境から大きく変わった実感がこもる。以前は阻害剤の効果を学生が一つずつ観察しながらだったこともあり、一日に調べられる数はせいぜい 200 化合物程度だった。それが現在では、サンプル処理能力の向上とカイネティクスデータ取得の簡便さを合わせることで、一日の平均が 2,000 ~ 3,000 という高いスループットで、できるまでになった。In vitro で標的分子の阻害剤探索をする場合、1 次スクリーニングと再現性の確認を行う。そこをクリアすると IC50 の測定、標的分子のアイソフォームに対して選択性の有無のチェックや、標的タンパク質とのアフィニティー解析による測定が待っている。吉田化学遺伝学研究室では、アフィニティー解析では他の手法も用いるが、それ以外の多くの工程で AlphaLISA と EZ Reader を利用していると、伊藤研究員は装置の使い勝手と精度に信頼を寄せる。

## 芽を出し始めた HTS による阻害剤探索

吉田化学遺伝学研究室に HTS が導入されてから 5 年ほどが経過した。その中で、少しずつ効果のある阻害剤が見つかり始め、基礎研究、創薬の応用研究の結果として実を結び始めている。すでに SUMO 化のリーダータンパク質の阻害に関して AlphaLISA を使って結合アッセイを行った研究が論文として報告できるところまで来ている。今回は残念ながら論文や特許の関係で詳細を伺うことができなかったが、伊藤研究員の自信に満ちた笑顔はその結果の意味の大きさを物語っている。

これからの研究では阻害剤を利用してリジン残基の翻訳後修飾のメカニズムにおける修飾酵素とリーダータンパク質の関わりをさらに解明していきたいと語る。「現在力を入れているヒストンメチル化酵素のあるサブタイプはがんにも効くと言われていますが、どのがんに本当によく効くのかということは明らかになっていません。このメカニズムを自分なりのアプローチで明らかにしていきたいですね。また、サーチチェーンの研究も独自のアプローチで臨んでいます。こちらではすでに新しいことがわかりつつあります」。創薬研究、基礎研究の新たな切り口として大きな意味を持つ阻害剤探索、伊藤研究員の発見から次のブレークスルーが生まれてくることに期待が高まる。

### 【参考文献】

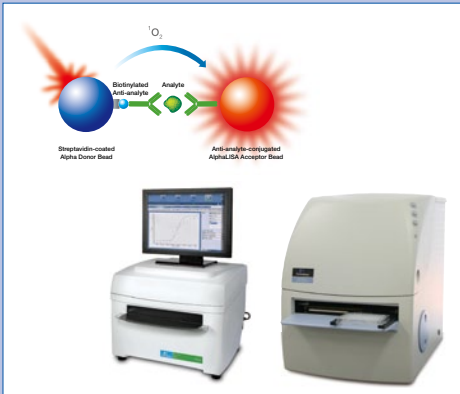
1. Epizyme 社 HP より <http://www.epizyme.com/programs/ezh2.asp>
2. Resverlogix 社プレスリリースより <http://www.resverlogix.com/media/press-release.html?id=471>
3. Ito A., et., al. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. EMBO 2001; 20 (6) : 1331-1340.
4. Ito A., et., al. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. 2001; 21 (22) : 6236-6245.
5. パーキンエルマー・ジャパン HP より [http://www.perkinelmer.co.jp/products\\_ls/assays/assays\\_0471.html](http://www.perkinelmer.co.jp/products_ls/assays/assays_0471.html)
6. Filipakopoulos P., et., al. Selective inhibition of BET bromodomains. Nature. 2010; 468 (7327) : 1067-1073.
7. Matzuk M. M., et., al. Small-Molecule Inhibition of BRDT for Male Contraception. Cell. 2012; 150 (4) : 673-684.
8. パーキンエルマー・ジャパン HP アプリケーションノートより [http://www.perkinelmer.co.jp/products\\_ls/reader/pdf/LC3000-AP-208.pdf](http://www.perkinelmer.co.jp/products_ls/reader/pdf/LC3000-AP-208.pdf)

# システム



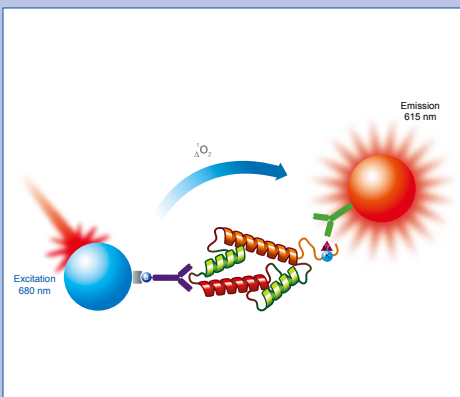
## 酵素阻害剤の評価を高精度で行える LabChip EZ Reader システム

特長	アプリケーション
<ul style="list-style-type: none"> <li>バラツキが少ないデータ サンプル毎に基質の変換率を算出可能</li> <li>簡単 B / F 分離不要のホモジニアスアッセイ</li> <li>酵素反応を直接検出 抗体などの検出用試薬が不要</li> <li>高次アッセイにも最適 リアルタイムのカイネティクス測定が可能 基質のKm 値、Ki 値の算出にも威力を発揮</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>プロテインキナーゼ</li> <li>脂質キナーゼ</li> <li>ヒストン脱アセチル化酵素</li> <li>ヒストンメチル転移酵素</li> <li>ホスホジエステラーゼ</li> <li>カスケードアッセイ</li> <li>プロテインホスファターゼ</li> <li>プロテアーゼ</li> <li>アシル基転移酵素</li> </ul>



## まぜるだけELISA ! Alpha / プレートリーダー EnSpire, EnVision

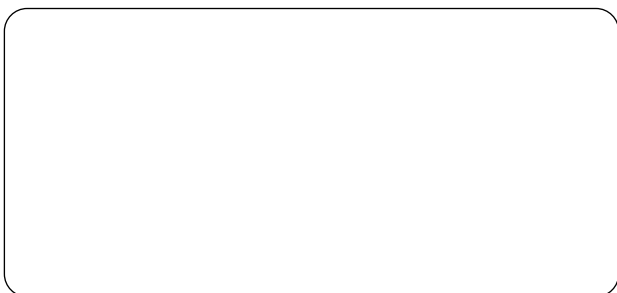
EnSpire	EnVision
6~384プレート対応	6~3456プレート対応
モノクロメーター	フィルター (オプション モノクロメーター)
Alpha 吸光度 蛍光 時間分解蛍光 発光 (高感度) ラベルフリー 温度コントロール	Alpha 吸光度 蛍光 蛍光偏光 時間分解蛍光 発光 (高感度) 温度コントロール



## 洗浄不要の混ぜるだけELISA。 In Vitroとセルベースに対応 ! AlphaLISA エピジェネティクスアッセイ

In Vitro アッセイ	セルベースアッセイ
<b>HAT/HDAC、HMT/HDMアッセイ</b> メチル化あるいはアセチル化ヒストンの検出のために、ヒストンH3タンパク質、あるいはペプチドを基質に用いるアッセイです。あらかじめメチル化・アセチル化された基質を使用することによって、デメチラーゼあるいはデアセチラーゼのアッセイも行うことができます。	<b>修飾ヒストン検出キット</b> AlphaLISA細胞内ヒストン修飾キットは細胞内に内在するヒストンのメチル化またはアセチル化修飾を、迅速に測定するためのホモジニアスサンドイッチアッセイキットです。化合物処理した細胞に専用試薬を添加していただくだけの操作が容易なアッセイです。

\* 記載されている製品の名称、仕様や外観については予告なしに変更される場合がありますので、あらかじめご了承ください。  
 \* 記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。  
 \* 本カタログに記載されているすべての製品は、試験研究目的でのみご使用いただけます。  
 \* 本カタログ内の価格には、消費税が含まれておりませんので、別途必要となります。



## 株式会社パーキンエルマージャパン www.perkinelmer.co.jp

### ライフサイエンス事業部

本 社 〒240-0005 横浜市保土ケ谷区神戸町134  
 横浜ビジネスパーク テクニカルセンター4F  
 TEL. (045) 339-5862 FAX. (045) 339-5872  
 大阪支社 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町5-3  
 TEL. (06) 6386-1771 FAX. (06) 6386-6401  
 東京営業所 〒101-0024 東京都千代田区神田和泉町1-7-17 CTKビル5F  
 TEL. (03) 3866-2647 FAX. (03) 3866-2652  
 九州営業所 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東1-12-6 花村ビル2F  
 TEL. (092) 474-2311 FAX. (092) 473-8353