

令和元年6月20日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21626

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素の反応機構解析と阻害剤開発

研究課題名(英文) Reaction mechanism and inhibitor development of a histone demethylase

研究代表者

仙石 徹 (Sengoku, Toru)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：60576312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の翻訳後修飾を操作する低分子は、生物学研究ツールとして有用であると共に創薬リード化合物として豊かな可能性を持つ。本研究では、塩基性残基の修飾に関する以下の2種類の酵素について、酵素の反応機構理解と阻害剤開発を目標とした。ヒストンH3K27脱メチル化酵素KDM6Aについて構造解析と阻害剤開発を行い、*in silico*スクリーニングにより得られた化合物のうち一つがH3K27メチル化に異常を持つグリオーマ細胞の増殖を抑制することを見出した。また、アルギニンラムノシル化酵素EarPについて、その標的タンパク質である翻訳因子EF-Pとの複合体の構造を決定し、反応機構の構造基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では予備的ながら細胞実験でグリオーマ細胞の増殖を抑制する活性を持ったKDM6阻害剤候補化合物を見出すことができた。本化合物の化学構造を最適化することにより、実験ツールや薬剤候補化合物として有用な分子の創出につながると期待される。また、本研究で解明されたラムノース転移酵素の新規反応機構は、様々な種類の糖転移酵素に幅広く共有される基本的な機構であると考えられると同時に、その新規阻害剤のデザインに有用な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：Small molecules that control post-translational modification of proteins are useful as biological research tools and have rich potential as lead compounds for drug discovery. In this study, for the following two types of enzymes involved in modification of basic residues, we aimed at understanding the reaction mechanism of the enzymes and developing inhibitors of following two modification enzymes. We performed structural analysis and inhibitor development of histone H3K27 demethylase KDM6A and found that one of the compounds obtained by *in silico* screening inhibited the proliferation of glioma cells with abnormal H3K27 methylation. We also determined the structure of the arginine rhamnosyltransferase EarP in complex with its target protein, translation factor EF-P, and elucidated the structural basis of its reaction mechanism.

研究分野：構造生物学

キーワード：エピジェネティクス 酵素 阻害剤開発

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾は様々な生命現象を制御している。例えば、ヒストン H3 の Lys27 のメチル化は条件的ヘテロクロマチン形成を誘導し遺伝子発現を抑制する。また、翻訳因子 EF-P は特定のリジンまたはアルギニン残基が修飾を受けることで機能が活性化される。これらの修飾に關与する酵素については、生化学的・構造生物学的解析により反応機構と特異性決定機構が明らかになりつつあり、また研究ツールや創薬リード化合物として有用な阻害剤の開発が盛んに進められている。本研究では、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素 KDM6A と EF-P アルギニンラムノース転移酵素 EarP を対象として、その反応機構解明と阻害剤開発を試みた。

## 2. 研究の目的

### (1) ヒストン H3K27 脱メチル化酵素 KDM6A の反応機構解明

申請者は以前に KDM6A とヒストン H3 ペプチドとの複合体の構造決定を行い、KDM6A による H3K27 特異性の構造基盤を解明していた。本研究では、時分割 X 線結晶構造解析の手法を用いて KDM6A による脱メチル化の素課程を可視化し、反応機構の精密な解析を目指した。

### (2) H3K27me3/2 特異的脱メチル化酵素 KDM6A の特異的阻害剤開発

特異性と高親和性を併せ持ち培養細胞実験で使用可能な KDM6 阻害剤の開発を目指した。

### (3) アルギニンラムノース転移酵素 EarP の反応機構解明

EarP は近年報告された新規アルギニンラムノース転移酵素で、その基質認識機構や反応機構は全く分かっていなかった。EarP と EF-P、ラムノースドナーとの複合体の構造解析を行い、基質認識機構と反応機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 時分割 X 線結晶構造解析による反応機構解明

KDM6 は反応に酸素と鉄イオン必要とすることを利用し、嫌気下あるいは鉄イオン非存在下で KDM6A・ペプチド・補因子複合体を結晶化することで反応前の構造を結晶化した。その後、結晶を酸素あるいは鉄イオンにさらして脱メチル化反応を開始させ、適当な時間をおいた後に結晶を液体窒素で凍結することにより反応中間体を補足し、X 線結晶構造解析によりそれらの構造決定を試みた。

### (2) KDM6A の特異的阻害剤開発

*in silico* スクリーニングとハイスループットアッセイを組み合わせ、理化学研究所の低分子ライブラリーから KDM6A を特異的に阻害する低分子の同定を試みた。ヒット化合物について、KDM6A との複合体の X 線結晶構造解析を試みるとともに、グリオーマ細胞の増殖抑制能を調べた。

### (3) EarP の反応機構解明

EarP と基質との複合体の X 線結晶構造解析を行い、変異体の生化学的解析と合わせて動作機構の解明を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 様々な条件下で KDM6A と基質ペプチド複合体結晶について結晶内反応を進行させて中間体構造の捕捉を試みたが、新規の中間体構造を決定するには至らなかった。結晶中の反応進行の同期が十分でなく、明瞭な電子密度変化につながらないことが原因と考えている。この問題の解決法として、KDM6A のほかに、類似の反応機構を持つ KDM5 や KDM4 を用いた時分割解析

が考えられる。一方、KDM6A の発現系と精製方法を改良し、収量を数倍程度改善することに成功した。この改良法は今後のさらなる KDM6A 阻害剤開発に有用である。

(2) *in vitro* アッセイの結果から得られた KDM6 阻害剤候補化合物について、細胞アッセイによる絞り込みを行った。ある種の脳幹グリオーマ細胞ではグローバルな H3K27me3 レベル低下が見られ、それによる遺伝子発現異常がグリオーマを引き起こすと考えられている。そのため、この種のグリオーマに対して H3K27 脱メチル化酵素阻害剤を用いた H3K27me3 レベル回復による治療戦略が提唱されている。我々が同定した 8 種類の KDM6 阻害剤候補化合物を用い、その存在下でグリオーマ細胞株を培養したところ、1 種類の化合物が増殖を抑制することを見出した。一方で、上記 8 種類の化合物について KDM6A との複合体の結晶構造解析を試みたが、化合物由来の電子密度マップを得ることができず、構造決定には至らなかった。

(3) EarP・EF-P 複合体と EarP-ラムノースドナー複合体の結晶構造決定に成功した。構造解析から、EarP は EF-P と幅広い相互作用面を形成することで特異的にそのアルギニン残基を活性中心に導いていることが明らかになった。2 つの複合体構造から分子動力学シミュレーションによるモデリングを行い、EarP が反応時にラムノースのコンフォメーションを不安定なものに変化させ、アルギニン残基によるラムノース原子の求核反応を促進している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件、査読あり)

(1)

Sengoku T, Suzuki T, Dohmae N, Watanabe C, Honma T, Hikida Y, Yamaguchi Y, Takahashi H, Yokoyama S, Yanagisawa T.

Structural basis of protein arginine rhamnosylation by glycosyltransferase EarP.

Nat Chem Biol. 2018

Apr;14(4):368-374. doi: 10.1038/s41589-018-0002-y.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 仙石徹・柳沢達男・鈴木健裕・疋田泰士・渡邊千鶴・本間光貴・堂前直・高橋秀幸・横山茂之

髄膜炎菌由来の翻訳因子 EF-P のラムノース修飾による活性化の構造的基盤

日本分子生物学会年会

2016 年

(2) Toru Sengoku

Structural basis for activation of *Neisseria meningitidis* elongation factor P with arginine-32 rhamnosylation by EarP

3rd International Symposium of Medicinal Sciences

2017 年

(3) 仙石徹・鈴木健裕・堂前直・渡邊千鶴・本間光貴・疋田泰士・山口芳樹・高橋英之・横山茂之・柳沢達男

EarP による翻訳因子 EF-P の Arg32 ラムノシル化の構造的基盤

ConBio2017

2017 年

〔その他〕

ホームページ等

( 1 ) 髄膜炎菌がタンパク質に糖をつける独特な仕組み  
理化学研究所プレスリリース

[http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180215\\_2/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180215_2/)

( 2 ) 糖転移酵素 EarP による翻訳因子 EF-P の Arg のラムノシル化の構造的な基盤  
ライフサイエンス新着レビュー

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/18011>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。