

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15959

研究課題名（和文）ヒストン脱アセチル化酵素に対するアロステリック型タンパク質間相互作用阻害薬の解析

研究課題名（英文）Analysis of an allosteric type protein interaction inhibitor against histone deacetylase

研究代表者

鈴木 美紀 (Suzuki, Miki)

京都大学・工学研究科・特定研究員

研究者番号：00628753

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々はinduced-fit作用型（アロステリック作用型）によるHDAC阻害作用を有する新規の化合物（HDAC阻害薬）の解析に取り組んだ。「当該阻害薬のinduced-fit作用によって誘起されるHDACの構造変化が、HDACと転写因子との相互作用阻害を引き起こすことで、HDAC活性に加え転写因子にも影響を与え、その結果、従来のHDAC阻害薬よりも強い細胞増殖阻害を示す」との仮説のもと検証を行った。我々は当該阻害薬によって、HDACとの相互作用が阻害される転写因子を同定し、この因子との相互作用阻害が、アポトーシスとオートファジーの開始制御遺伝子の発現に影響することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDAC阻害薬をデザインする段階では、HDACアイソザイム間での高い特異性や高い脱アセチル化阻害効率を主たる評価対象とする傾向が強い。一方、HDAC阻害薬が、がん細胞増殖を阻害する主な原因はこれら以外にもあると考えられており、例えば、相互作用する因子の違いによって、標的とする遺伝子の種類や作用する時期が変化することが知られている。本研究は、このような知見に基づいて、HDAC1/2とそれに相互作用する因子との相互作用阻害に焦点を当てた解析を行った。したがって、本研究は、HDAC阻害薬開発分野に対して、新しい視点からアプローチしており、創薬研究分野の発展に貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：We analyzed a new compound that inhibits HDACs through induced-fit action (allosteric effect). We hypothesized that the structural change of HDAC due to the induced-fit effect of the new compound inhibits the interaction between HDAC and transcription factors, affecting not only HDAC activity but also transcription factors, and as a result, the inhibitor becomes more potent. We identified a transcription factor whose interaction with HDAC is inhibited by this new compound, and revealed that inhibition of interaction between HDAC and this factor affects the expression of genes that control the initiation of apoptosis and autophagy.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス HDAC アロステリック作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、抗がん薬の分子標的として興味深い。HDAC の 18 種類のアイソフォームの中でも、HDAC1 および HDAC2 の阻害は、がん細胞の成長を抑制するため、HDAC1/2 は抗がん剤の創薬の標的とされ、様々な阻害薬が開発されている。我々はすでに、HDAC1/2 阻害薬である KPZ532 と KPZ560 を独自に見出し、以下の(1) - (2) の知見を得ている。

- (1) KPZ532 および KPZ560 は互いに類似の構造であり、精製した HDAC に対する酵素活性阻害効果も同程度である。しかし、乳がん細胞に対する増殖阻害効果は、KPZ560 が KPZ532 に比べて 1,000 倍以上高い。
- (2) KPZ532 は単純な結合様式 (One-step 型) であるが、KPZ560 は、HDAC1/2 の構造変化を誘起する induced-fit 型の阻害薬である。

以上より、KPZ560 の乳がん細胞に対する高い増殖阻害効果には、単純な酵素活性の阻害だけでなく、induced-fit 作用が大きく寄与しているのではないかと考えた (R A Copeland)。すなわち、KPZ560 はアロステリック型タンパク質間相互作用阻害薬であり、KPZ560 との結合に伴う HDAC1/2 の構造変化の結果、HDAC1/2 と相互作用する何らかの転写因子との親和性が損なわれ、そのため、細胞内の遺伝子発現が大きく変化し、細胞増殖阻害に至ると推定した。

### 2. 研究の目的

HDAC1/2 に対するアロステリック型タンパク質間相互作用阻害薬である KPZ560 の効果とその重要性を明らかにすることを目的とした。通常、酵素阻害薬の研究では、酵素の基質結合部位に作用し、基質の化学反応阻害に起因する作用について解析されるが、KPZ560 を用いた本研究は、酵素が触媒する化学反応ではなく、induced-fit 作用に基づく効果 (アロステリック作用) について解析した。

### 3. 研究の方法

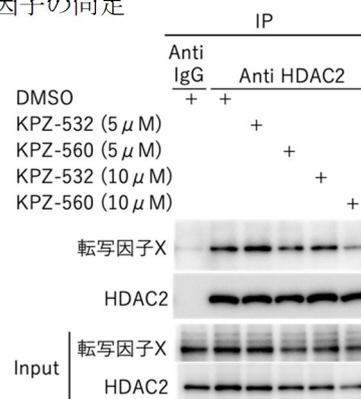
- (1) 免疫沈降実験とプロテオミクス解析とを組み合わせ、KPZ560 によって HDAC2 との相互作用が阻害されるタンパク質因子の特定を試みた。HDAC は相互作用する因子によって、標的とする遺伝子や、機能する細胞周期が異なる (A Laugesen and K Helin) ことから、KPZ560 によって、どの因子との相互作用が阻害されるのか同定することは重要である。対数増殖期の乳がん細胞 MCF-7 に対して、KPZ532、または KPZ560 を投与した後、37 度の CO<sub>2</sub> インキュベータで 6 時間培養した。その後、細胞破砕液を HDAC2 抗体で免疫沈降し、沈降産物に対してプロテオミクス解析を行った。KPZ532 と比較して、KPZ560 投与時に沈降産物量が減少するタンパク質因子を、プロテオミクス解析結果から探索したところ、ある転写因子 (以下転写因子 X と記載) の沈降量が大きく減少することが明らかになった。同沈降産物をウェスタンブロットングによっても解析したところ、転写因子 X の沈降量が減少していたため、転写因子 X を、KPZ560 投与により HDAC2 との相互作用が阻害される因子の一つであると同定した。
- (2) KPZ532 または KPZ560 を、最終濃度 2  $\mu$ M となるよう、MCF-7 細胞に投与し、37 度の CO<sub>2</sub> インキュベータで一晩培養した後、網羅的な遺伝子発現解析を行った。KPZ532 投与時と比較して、KPZ560 投与時においてのみ発現量が増加する遺伝子を探索した結果、KPZ560 投与によって、アポトーシスとオートファジー関連遺伝子の発現量が増加することが明らかになった。
- (3) KPZ532 または KPZ560 を、最終濃度 10  $\mu$ M となるよう、MCF-7 細胞に投与した後のアポトーシス関連因子の発現量の経時変化をウェスタンブロットングにて解析した。KPZ560 投与時におけるこれらのアポトーシス関連因子の発現量は、KPZ532 投与時と比較して高く、(2) の網羅的な遺伝子発現解析の結果を裏付けるものとなった。
- (4) KPZ560 による、HDAC と転写因子 X との相互作用阻害が、どの遺伝子の発現制御に関与するか明らかにすれば、最終的にアポトーシスとオートファジーによる細胞死に至る理由を明確にできると考え、以下の解析を行った。HDAC と転写因子 X は、それぞれスプライシングに関与すると報告されている (R Rahhal and E Seto) ため、アポトーシスとオートファジーの開始を制御する Bcl-X 遺伝子の mRNA のスプライシングパターンを、リアルタイム PCR により解析した (M Stevens and S Oltean)。その結果、KPZ560 投与後に、Bcl-X 遺伝子の mRNA のスプライシングパターンが特異的に変化することが明らかになった。
- (5) KPZ532 (One-step 型阻害薬) と、転写因子 X の活性阻害薬の両方の投与が、KPZ560 (Induced-fit 型阻害薬) 単独投与時と同様の細胞形態変化を起こすかどうか解析した。KPZ560 を最終濃度 10  $\mu$ M となるよう MCF-7 細胞に投与してから 6 時間程度で、細胞質において肥大化した

液胞が顕微鏡下で容易に観察できるが、これはオートファジーの特徴の一つである。そこで、肥大化した液胞の形成を、オートファジーの指標とした。KPZ532 (10  $\mu$ M) と転写因子 X (0.1  $\mu$ M) の活性阻害薬の両方を投与してから 6 時間後、細胞の形が変化するなどの形態変化が起こり、細胞がストレス下にあるのは明確であったが、肥大化した液胞は予想に反し観察されなかった。KPZ532 は KPZ560 と同様、slow-binding に標的 HDAC に作用するため、十分な HDAC 阻害に至る前に、転写因子 X の活性阻害効果のみが顕著に現れたのではないかと推測した。そこで、KPZ532 を単独で MCF-7 細胞に投与し、KPZ532 が標的 HDAC と十分相互作用したと推測される 3 時間後、転写因子 X 活性阻害薬を投与し、さらに 1 時間半から 12 時間培養して、細胞形態の経時変化を観察した。しかし、予想に反し、肥大化した液胞は観察されず、KPZ560 の Induced-fit 作用を、HDAC に対する One-step 型阻害薬と、転写因子 X の活性阻害薬とを用いて証明するには至らなかった。

#### 4. 研究成果

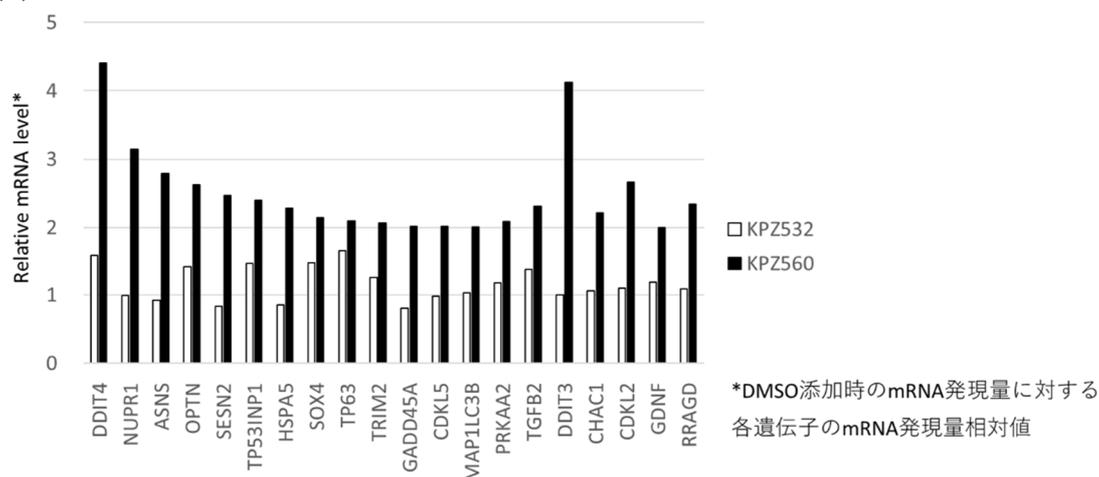
##### (1) 免疫沈降とプロテオミクス解析による、KPZ560 の標的因子の同定

	Normalized abundance			Max fold change
	DMSO	KPZ532 (10 $\mu$ M)	KPZ560 (10 $\mu$ M)	
HDAC2	47363	44307	49471	1.12
LSD1	13382	12764	12730	1.05
CoREST	13651	13247	13543	1.03
Sin3A	2785	2777	2831	1.02
MTA1	6886	5900	6491	1.17
転写因子X	5341	4826	3959	1.35



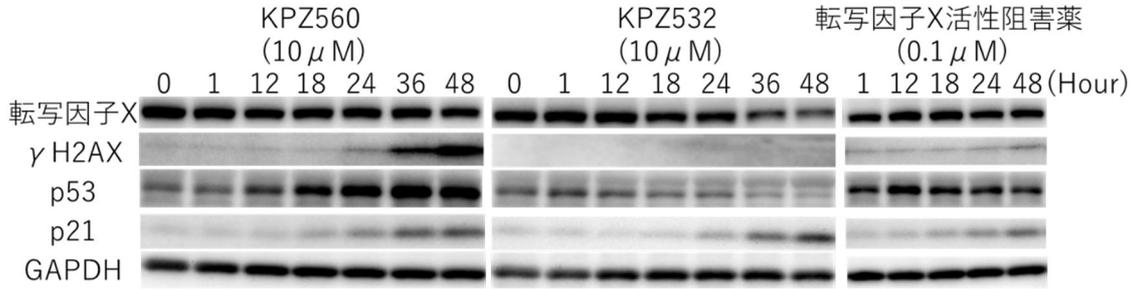
KPZ532 または KPZ560 を投与し、インキュベートした MCF-7 細胞の破碎液に対して、HDAC2 抗体により免疫沈降を行った。免疫沈降産物に対してプロテオミクス解析を行ったところ、LSD1 や CoREST などの代表的な HDAC2 相互作用因子 (A Laugesen and K Helin) については、HDAC2 抗体により免疫沈降される量に、KPZ532 または KPZ560 による違いはなかった。一方、転写因子 X は KPZ560 投与時特異的に免疫沈降される量が減少した (左表)。このことはウェスタンブロットティングでも確認された (右図)。

##### (2) マイクロアレイによる解析



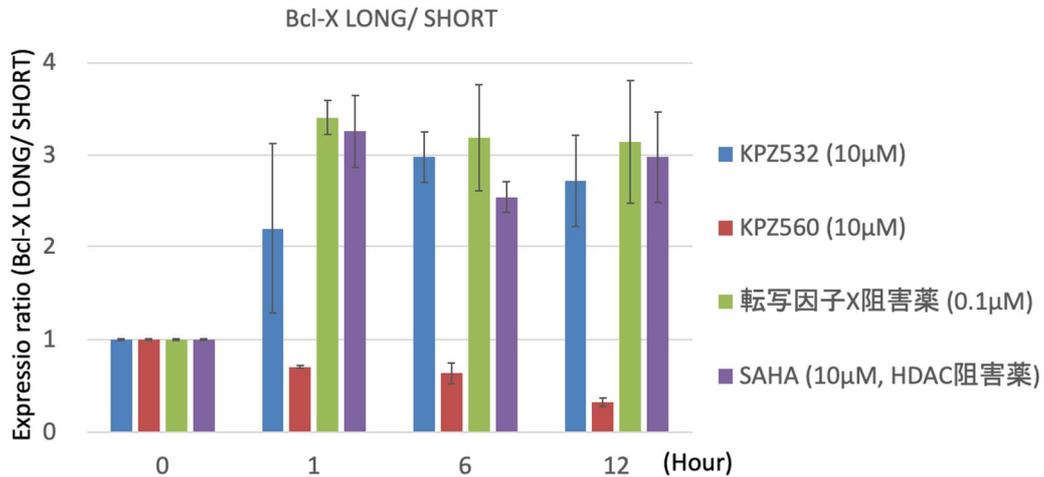
KPZ532 または KPZ560 を MCF-7 細胞に投与し、24 時間後の遺伝子発現解析を行った。KPZ560 投与時特異的に発現量が増加した遺伝子に、DNA 損傷、細胞周期、アポトーシス、オートファジーに関するものが多くあった。

(3) KPZ560 によるアポトーシス関連因子の発現誘導



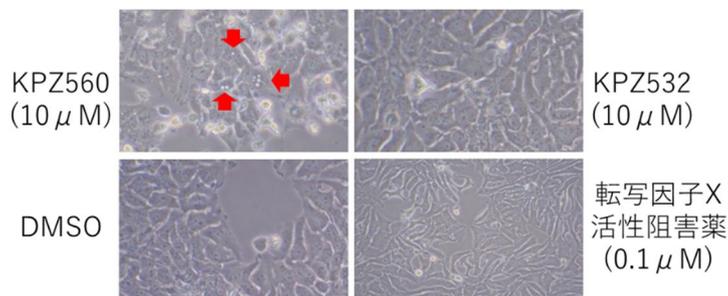
KPZ560、KPZ532 または転写因子 X の活性阻害薬を MCF-7 細胞に投与後、アポトーシス関連因子の発現の経時変化をウェスタンブロッティングにより観察した。KPZ560 投与において、これらの因子の発現が顕著であった。

(4) KPZ560 による、Bcl-X 遺伝子のスプライシングパターンの変化



KPZ560、KPZ532、転写因子 X の活性阻害薬または代表的な HDAC 阻害薬である SAHA を MCF-7 細胞へ投与してから 1、6、12 時間後における Bcl-X 遺伝子のスプライシングパターンを、リアルタイム PCR により解析した。Bcl-X 遺伝子は、Bcl-XL (長鎖型) と Bcl-XS (短鎖型) の mRNA を発現し、Bcl-XL はアポトーシスの開始を負に制御している。スプライシングパターンが変化し、Bcl-XS の合成量が多くなって Bcl-XL/S 比が減少すると、アポトーシスの開始が誘導されると報告されている (C Naro et al.). One-step 型の HDAC 阻害薬である KPZ532、SAHA、または転写因子 X 活性阻害薬を投与した場合と比較して、Induced-fit 型阻害薬である KPZ560 を投与した場合においてのみ、Bcl-XL/S の比が減少した。この結果から、Bcl-X は KPZ560 の標的遺伝子の一つであると考えている。

(5) KPZ560 によるオートファジーの誘導



KPZ560、KPZ532 または転写因子 X の活性阻害薬を添加 48 時間後の MCF-7 細胞の顕微鏡写真。Induced-fit 型阻害薬である KPZ560 投与において、オートファジーの特徴である、肥大化した液胞が多数生じた。これと同様に、One-step 型阻害薬である KPZ532 と転写因子 X 活性阻害薬の同時投与は、肥大化した液胞の形成を引き起こすのではないかと期待したが、予想に反し、そのような細胞形態変化は観察されなかった。

<引用文献>

R A Copeland, The drug-target residence time model: a 10-year retrospective., *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 87-95, 2016

A Laugesen and K Helin, Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer., *Cell Stem Cell*, 14 (6), 735-751, 2014

R Rahhal and E Seto, Emerging roles of histone modifications and HDACs in RNA splicing., *Nucleic Acids Research*, 47 (10), 4911-4926, 2019

M Stevens and S Oltean, Modulation of the Apoptosis Gene Bcl-x Function Through Alternative Splicing., *Frontiers in Genetics*, 10, 804, 2019

C Naro et al., The centrosomal kinase NEK2 is a novel splicing factor kinase involved in cell survival., *Nucleic Acids Research*, 42 (5), 3218-3227, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Itoh Yukihiko, Zhan Peng, Tojo Toshifumi, Jaikhan Pattaporn, Ota Yosuke, Suzuki Miki, Li Ying, Hui Zi, Moriyama Yukiko, Takada Yuri, Yamashita Yasunobu, Oba Makoto, Uchida Shusaku, Masuda Mitsuharu, Ito Shinji, Sowa Yoshihiro, Sakai Toshiyuki, Suzuki Takayoshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Discovery of Selective Histone Deacetylase 1 and 2 Inhibitors: Screening of a Focused Library Constructed by Click Chemistry, Kinetic Binding Analysis, and Biological Evaluation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 15171 ~ 15188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.3c01095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤幸裕, 展鵬, 東條敏史, 鈴木美紀, 李穎, 内田周作, 鈴木孝禎
2. 発表標題 Induced-fit型HDAC酵素阻害薬のアロステリック作用
3. 学会等名 反応と合成の進歩2020特別企画シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------