

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19326

研究課題名（和文）酵素には不可能なヒストン超アシル化による生細胞エピゲノム操作と理解

研究課題名（英文）Epigenome manipulation by chemical catalyst-driven abiotic histone acylation

研究代表者

山次 健三（Yamatsugu, Kenzo）

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：30646807

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生命はタンパク質などの生体分子とそれらに介在する化学反応から成り、その代表がタンパク質の翻訳後修飾である。本研究では、遺伝子転写に關与するヒストンタンパク質に、本来生体にはない翻訳後修飾、特にリジン残基のアシル化修飾を化学触媒により導入し、細胞のエピゲノムを操作すること、理解することを目的とした。

従来よりも高活性なアシル化触媒系を開発し、白血病細胞選択的なヒストンアシル化とエピゲノム操作により増殖阻害を引き起こすことに成功した。さらに、細胞内のアシルCoAを活性化してヒストンアシル化を行う新触媒を開発し、環境変化にตอบสนองして変化する細胞内アシルCoAの濃度を検知するエピゲノムツールを開発できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、遺伝子転写に關与するヒストンタンパク質を対象に、本来生体にはない翻訳後修飾を化学触媒により導入し、細胞のエピゲノムを操作すること、細胞の応答を理解することを目的とする。生きた細胞のヒストンに非天然型の化学修飾を積極的に導入して細胞のエピゲノム状態を操作する例はなく、本研究の成果は、化学触媒によるエピゲノム操作という革新的な生体機能制御法の開発に発展すると考えられ、分子生物学、薬学、医学などの広い生命科学分野に大きな波及効果を持つ。

研究成果の概要（英文）：Life emerges from biomolecules such as proteins and the chemical reactions mediated by them. Post-translational modification of proteins is a representative example. The purpose of this research is to manipulate and understand the epigenome of cells by introducing abiotic post-translational modifications, particularly acylation of lysine residues, into histone proteins, which are involved in gene transcription, using chemical catalysts.

We developed an acylation catalyst system with higher activity than conventional ones and succeeded in causing growth inhibition through selective histone acylation and epigenome manipulation of leukemia cells. Furthermore, we developed a new catalyst that activates intracellular acyl-CoA to perform histone acylation, and were able to develop an epigenetic tool that detects the concentration of intracellular acyl-CoA, which changes in response to environmental changes.

研究分野：有機化学

キーワード：触媒 ヒストン 生細胞内反応 アシル化

1. 研究開始当初の背景

生体は環境に応じて自身が持つ生体分子、特にタンパク質の化学修飾状態(翻訳後修飾:PTM)を変化させる。例えば、お酒を過剰に摂取すると、その代謝産物である酢酸とそれ由来であるアセチル CoA の細胞内濃度が上昇し、神経細胞におけるヒストンのリジン残基アセチル化の亢進とそれに依存した遺伝子転写の変動が確認される。また、食品添加物である安息香酸は、摂取すると細胞内でベンゾイル CoA へと変換され、本来生体には見られないヒストンのベンゾイル化と遺伝子転写の亢進を引き起こす。これらは、生体が天然・非天然を含む化学的な環境変化に柔軟に応答することの好例であり、逆に化学的な摂動によって生体分子の化学修飾状態の変化とそれによる細胞機能の変化を誘起出来る可能性を示唆している。

2. 研究の目的

以上のように生命は DNA やタンパク質などの生体分子とそれらに介在する化学反応から成るが、生体に介入しうる化学反応は、生物触媒である酵素が触媒する「天然の」ものに限定される必要はない。本研究では、遺伝子転写に関与するヒストンタンパク質を対象に、本来生体にはない、あるいは本来酵素によって活発に導入されていない翻訳後修飾、特にリジン残基のアシル化修飾を化学触媒により導入し、細胞のエピゲノムを操作すること、細胞の応答を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

筆者はこれまで、生細胞内のヒストンタンパク質にリジン残基アセチル化修飾を非酵素的に導入し、細胞のエピゲノムに合成化学的に介入する研究を行ってきた¹⁾。しかし、これまでの触媒(DSH触媒²⁾、図1)には、本研究の目的となる非天然型のアシル化修飾を、特に細胞表現型の変化を誘導できるほどに導入するだけの力量がなかった。そこで本研究ではまず、従来の触媒よりも強力なアシル化活性を有する触媒系を開発することとした。

4. 研究成果

(1) Boronate-Assisted Hydroxamic Acid (BAHA)触媒の開発と合成的エピゲノム介入による細胞機能変化

DSH触媒の触媒サイクルを図1に示す。DSHは求核触媒として働く4-dimethylaminopyridine (DMAP)の2位にメルカプトメチル基を有する触媒であり、チオエステルをアセチルドナーとして用いて標的タンパク質のリジン残基をアセチル化する。まずチオエステルドナーとのチオール・チオエステル交換反応によってアセチルドナーのアセチル基を触媒分子内に取り込む。これによって分子間反応では活性化できなかったアセチル基を、分子内反応によって活性化することが可能となり、活性なアセチルピリジニウムを生じる。このとき触媒近傍にヒストンのリジン残基が存在すれば、その活性なアセチル基を転移し、DSH触媒が再生する。

DSH触媒により細胞のエピゲノムに介入することに成功したが³⁾、その反応性は十分ではなく、細胞機能変化を誘導するには力量が足りなかった。DSH触媒の反応性の低さには主に2つの要因が考えられた。

1) DSHの求核触媒中心であるDMAPは塩基性であり、中性水溶液条件下ではそのほとんどがプロトン化を受け不活性化されていること、2) 細胞内にはその還元的環境を保つために、グルタチオン(GSH)というチオール分子が1~10 mM程度存在し、DSH触媒とチオエステルアシルドナーとの間の動的チオール・チオエステル交換に競合することである。ひとつめの問題に対しては、①ヒドロキサム酸が中性水溶液条件下でむしろ脱プロトン化されて優れた求核触媒になることを見出して解決した(図2a)⁴⁾。ふたつめの問題に対しては、②非チオエステル性のアシルドナーの再探索を行うことで、*N*-アシル尿素構造がGSHやリジン残基との非特異的な反応を抑えた低反応性のアシルドナーであることを見出した(図2a)。

ここでひとつの課題が生じる。反応性を十分に抑えたアシルドナーを、触媒・アシルドナーともに低濃度となる細胞内において、触媒がいかに活性化するかということである。この課題は、ヒドロキサム酸触媒にジオール基を持たせ、かたやアシルドナーにはフェニルホウ酸基を持たせることで、細胞内で可逆的なホウ酸エステル結合を形成させて両者を近接させ、触媒によるアシル基の効率的な活性化を実現することで解決した(図2a)。こうして開発した Boronate-

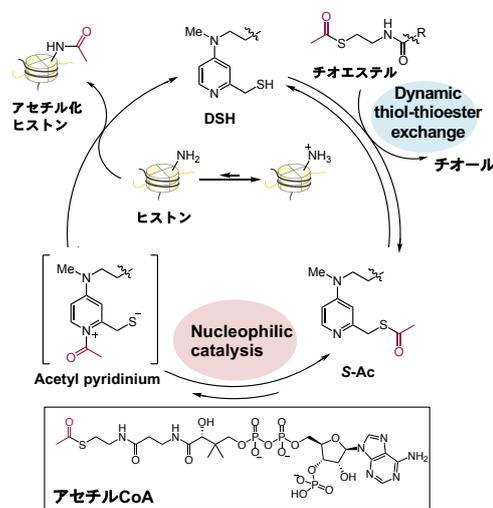


図1 従来のヒストンアセチル化触媒 DSH

Assisted Hydroxamic Acid (BAHA) 触媒は、従来の DSH 触媒系の 1/100 のアシルドナー濃度でも 3 倍以上のアシル化活性を発揮することがわかり、天然から非天然にいたる様々な翻訳後修飾を細胞内の目的タンパク質に対して高収率・高選択的に導入することが可能となった (図 2b) ⁵⁾。

従来の DSH 触媒によるエピゲノム介入において、触媒中心を DSH から BAHA へと置き換え、さらに白血病細胞選択的な細胞膜透過ペプチドを共役することで、白血病細胞選択的なヒストンアセチル化を試みた (図 3)。白血病細胞である THP-1 を PEG-LANA-BAHA-CPP 触媒とアセチルドナー分子で処理したところ、H2BK120 アセチル化の上昇と同ユビキチン化の減少に伴って、いくつかのがん抑制遺伝子の発現上昇が見られることがわかり、白血病細胞の増殖が抑制されることがわかった (図 3)。正常細胞を同条件で処理してもヒストンアセチル化の上昇は見られないことから、本触媒系は白血病細胞選択的なエピゲノム介入と細胞機能変化を誘導できることがわかった。

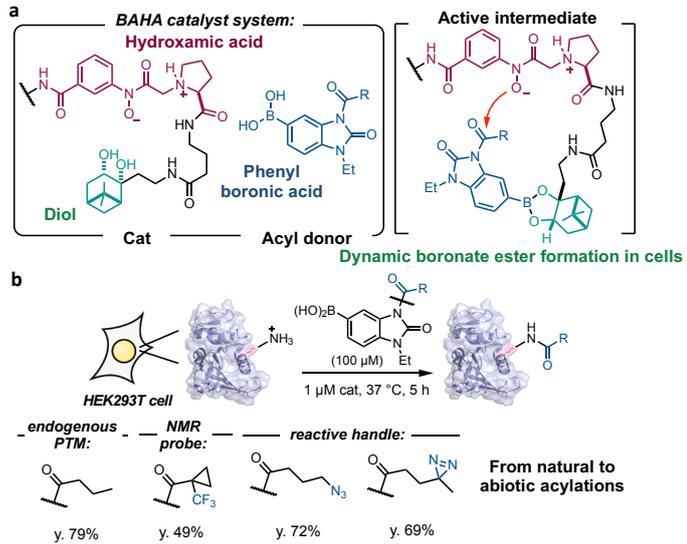


図2 Boronate-Assisted Hydroxamic Acid (BAHA) 触媒系

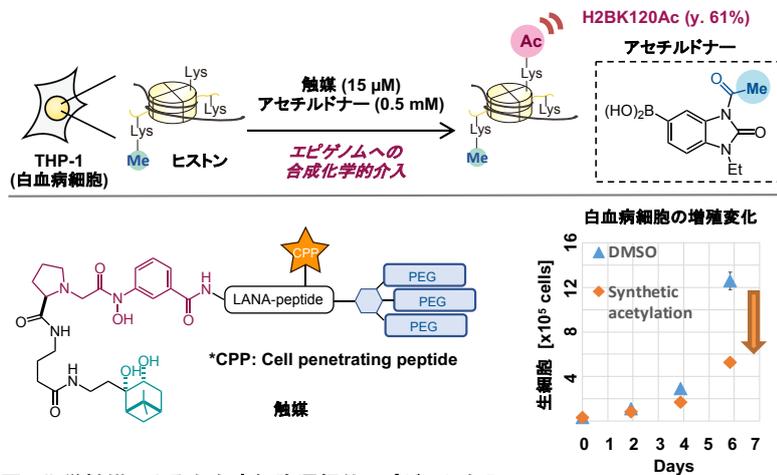


図3 化学触媒による白血病細胞選択的エピゲノム介入

(2) 細胞内のアシル CoA を活性化する触媒 *mBnA* の開発

これまで開発した触媒は、細胞内ヒストンのアセチル化を行うのに細胞外部からアセチルドナー分子を添加する必要があり、ヒストンアセチル化酵素のように細胞内のアセチル CoA を活性化してアセチル化反応を行うことは出来なかった。細胞内のアシル CoA、例えばアセチル CoA の濃度は 3~20 μM とされており、この低濃度のアセチルドナーを活性化するには強力な触媒が必要と考えられる。そこで、BAHA 触媒の検討で見出した生理的条件下で活性化されるヒドロキサム酸濃度で存在するアシル CoA を活性化してヒストンアシル化を行う触媒が出来るのではないかと考えた。

検討の結果、分子内にチオール基を有するヒドロキサム酸触媒 *mBnA* を開発した。外部アセチルドナーを用いずに細胞を触媒のみで処理したところ、従来の DSH 触媒では H2BK120 のアセチル化の亢進が認められなかった一方で、*mBnA* 触媒ではその亢進が見られた (図 4a)。さらに、細

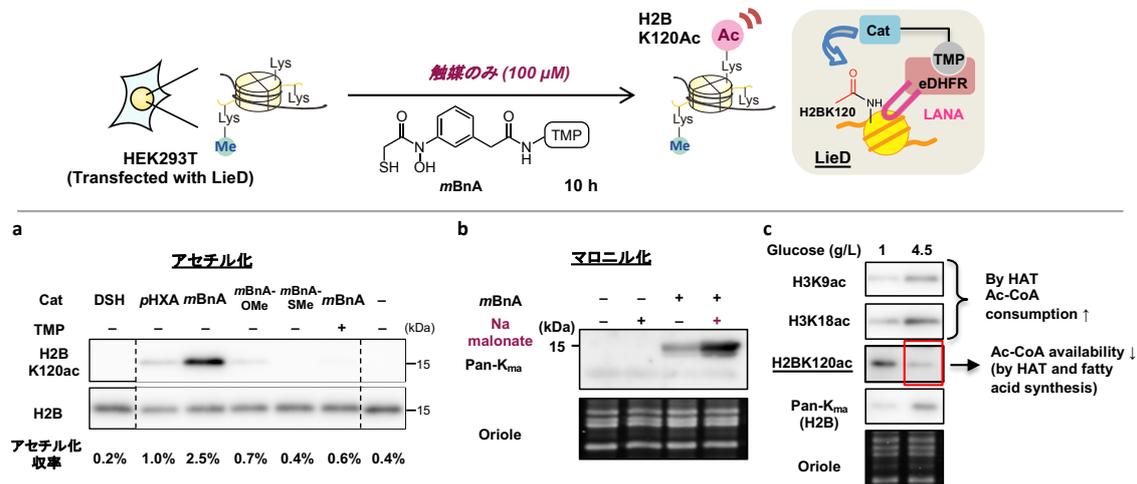


図4 *mBnA*触媒は細胞内アシルCoAを活性化してヒストンをアシル化する

胞をマロン酸ナトリウムで処理して細胞内のマロニル CoA の濃度を上昇させたのちに *m*BnA 触媒で処理したところ、H2BK120 のマロニル化の亢進が見られた (図 4b)。この結果は、*m*BnA 触媒が細胞内のアシル CoA の濃度を検知して、ヒストンアシル化反応を行うことを示唆している。そこで、各種栄養条件下で細胞を培養し、*m*BnA 触媒で処理することでヒストンアシル化反応を行ったところ、細胞内アセチル CoA の濃度が上昇すると報告されている高グルコース栄養状態において、*m*BnA 触媒によるヒストンアセチル化は意外にも低下した (図 4c)。これは、細胞全体でのアセチル CoA 量とは異なり、核-細胞質画分におけるアセチル CoA 濃度は低下している可能性を示唆するものである。これらの結果は、*m*BnA 触媒が核-細胞質画分に存在する局所環境のアシル CoA 濃度を検知する有用なツールであることを示唆しており、*m*BnA 触媒が環境応答における細胞エピゲノム変化を調べる有用なツールとなりうることを示している⁶⁾。

<引用文献>

- 1) Yamatsugu, K.; Kawashima, S. A.; Kanai, M. “Leading approaches in synthetic epigenetics for novel therapeutic strategies” *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *46*, 10-17.
- 2) Amamoto, Y.; Aoi, Y.; Nagashima, N.; Suto, H.; Yoshidome, D.; Arimura, Y.; Osakabe, A.; Kato, D.; Kurumizaka, H.; Kawashima, S. A.; Yamatsugu, K.; Kanai, M. “Synthetic Posttranslational Modifications: Chemical Catalyst-Driven Regioselective Histone Acylation of Native Chromatin” *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 22, 7568-7576.
- 3) Fujiwara, Y.; Yamanashi, Y.; Fujimura, A.; Sato, Y.; Kujirai, T.; Kurumizaka, H.; Kimura, H.; Yamatsugu, K.; Kawashima, S. A.; Kanai, M. “Live-Cell Epigenome Manipulation by Synthetic Histone Acetylation Catalyst System” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, 4, e2019554118.
- 4) Mizumoto, S.; Xi, S.; Fujiwara, Y.; Kawashima, S. A.; Yamatsugu, K.; Kanai, M. “Hydroxamic Acid-Piperidine Conjugate is an Activated Catalyst for Lysine Acetylation under Physiological Conditions” *Chem. Asian J.* **2020**, *15*, 6, 833-839.
- 5) Adamson, C.; Kajino, H.; Kawashima, S. A.; Yamatsugu, K.; Kanai, M. “Live-Cell Protein Modification by Boronate-Assisted Hydroxamic Acid Catalysis” *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 37, 14976-14980.
- 6) Habazaki, M.; Mizumoto, S.; Kajino, H.; Kujirai, T.; Kurumizaka, H.; Kawashima, S. A.; Yamatsugu, K.; Kanai, M. “A chemical catalyst enabling histone acylation with endogenous acyl-CoA” *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 5790.

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 Kenzo Yamatsugu, Motomu Kanai	4. 巻 123
2. 論文標題 Catalytic Approaches to Chemo- and Site-Selective Transformation of Carbohydrates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Reviews	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.chemrev.2c00892	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8件（うち招待講演 5件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenzo Yamatsugu
2. 発表標題 Synthetic Epigenetics Enabled by Chemical Catalysts
3. 学会等名 ICPAC Kota Kinabalu 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山次健三
2. 発表標題 合成的エピゲノムを拓く化学触媒の開発研究
3. 学会等名 第48回反応と合成の進歩シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山次健三
2. 発表標題 細胞のエピゲノムに合成化学的に介入する触媒
3. 学会等名 第7回 SPIRITS生物-無機-有機融合化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山次健三
2. 発表標題 細胞内のアシルCoAを活性化するヒストンアシル化触媒
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野崎多実子、花田華世、山次健三、川島茂裕、金井求
2. 発表標題 位置選択性を制御可能なヒストンアシル化触媒システム
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山次健三
2. 発表標題 細胞のエピゲノムに介入できる有機分子触媒
3. 学会等名 第24回 ケムステVシンポ 有機分子触媒（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 幅崎美涼、梶野英俊、水本真介、川島茂裕、山次健三、金井求
2. 発表標題 細胞内アセチルCoAを活性化するヒストンアセチル化触媒の開発
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野崎多実子、竹内悠馬、花田華世、山次健三、川島茂裕、金井求
2. 発表標題 位置選択性を制御可能なヒストンアシル化触媒システム
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------	---------