

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19479

研究課題名(和文)人工化学触媒によるヒストン選択的アセチル化とがん細胞増殖抑制

研究課題名(英文) Histone-Selective Synthetic Acylation Mediated by Chemical Catalyst as Potential anti-Cancer Strategy

研究代表者

金井 求 (Kanai, Motomu)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：20243264

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)：生命は生体分子と化学反応のネットワークから発現する。生体内の化学反応には酵素が介在し、酵素の機能異常、あるいはそれにより引き起こされる生体内化学反応の異常が、生体恒常性の損失や疾患に密接に関与している。本研究の目的は、遺伝子転写を正に制御する翻訳後修飾であるヒストンタンパク質のリジンアセチル化に焦点を当て、生体内での人工化学触媒反応によって酵素非依存的にヒストンアセチル化を導入することを目的とする。本研究では、化学触媒DSHが、生細胞内でヒストンを含む内在性タンパク質の特定の残基を選択してアセチル化を進行させることを見出した。さらに、DSHよりも活性の高い化学触媒HXAの開発をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命現象は有機分子と化学反応のネットワークから発現し、そのネットワーク異常が病態を引き起こす。生体内の化学反応は通常、酵素により促進されるが、酵素の機能を代替する化学触媒をつくることを目的として研究をおこなっている。本研究では、遺伝子転写を正に制御するヒストンタンパク質のリジンアシル化を促進する化学触媒を開発した。これにより、エピゲノムを化学的に制御することによる病態治療の端緒を拓いた。

研究成果の概要(英文)：Life emerges from a network of biomolecules and chemical reactions. Enzymes intervene in the chemical reactions in the living system, and the abnormal function of the enzymes or the abnormal chemical reactions in the living system is closely related to the loss of the homeostasis of the life and the diseases. The purpose of this study is to focus on lysine acetylation of histone proteins, which is a post-translational modification that positively regulates gene transcription, and to introduce histone acetylation in an enzyme-independent manner by artificial chemical catalysis in vivo. In the present study, we found that the chemical catalyst DSH selectively promoted acetylation of endogenous proteins at specific residues, including histones, in living cells. Furthermore, we have developed a chemical catalyst, HXA, which is more active than DSH.

研究分野：触媒

キーワード：触媒 エピゲノム タンパク質翻訳後修飾 ヒストンアシル化 遺伝子転写

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日の創薬分野において、従来、主流であった低分子医薬は副作用や開発ハードルの高さなどの問題点を克服することが困難で、抗体や核酸などのバイオ医薬や、iPS細胞や幹細胞を利用した再生医療などの新しい創薬・治療概念が実用化され始めている。診断や予防の技術を進化させて行くとともに、新しい創薬・治療概念を模索して行くことが医療の進歩につながり、ひいては医療産業の活性化、健康国家の創造、さらには健康に裏打ちされた活発な経済・産業活動に波及する。一方で、バイオ医薬品は非常に高価であり、高齢化社会が進みバイオ医薬品が多用されるようになった場合には、国家財政への深刻な影響が懸念される。以上の背景や要請のもとに我々は、酵素を代替する機能を発現する化学触媒の開発を基盤として、これを生体内へ導入することで病態を治療する**触媒医療**を、第四の医療パラダイムとして提唱し、研究をおこなっている。化学触媒により、生体内化学秩序に人為的・化学的に介入することで、従来の低分子医薬の優位点を維持しつつ、そこに生体高分子の化学構造を生命環境下で動的かつ人為的に変化させる概念を導入することにより、新たな病態治療の地平を化学と生物の融合から拓いていくことを目指している。強力な作用および従来の低分子医薬がカバーできなかった遺伝的疾患等の治療への適用可能性を有している点が、特徴である。触媒医療を実現するためには、触媒活性や選択性の革新的向上、反応パターンの拡張、毒性低減、標的部位へのデリバリーといった、物質科学と生命科学に波及する最先端の分野の課題を解決しながら統合して行く必要がある。医療応用とともに基礎科学の点からも極めて挑戦的で魅力的な課題である。

2. 研究の目的

生命は生体分子と化学反応のネットワークから発現する。生体内の化学反応には酵素が介在し、酵素の機能異常、あるいはそれにより引き起こされる生体内化学反応の異常が、生体恒常性の損失や疾患に密接に関与している。中でも細胞内リジンアシル化反応は、細胞機能の制御に重要な役割を担っている翻訳後修飾であり、特にヒストンアセチル化はそのアセチル化領域に対応する遺伝子の発現を促進すること、およびヒストンアセチル化の減少とがんをはじめとした様々な疾患との関与が明らかになっていることから、基礎生物学的のみならず創薬・医学的側面から非常に興味をもたれている。実際に、生体内で脱アセチル化反応を担っている酵素であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤が抗がん剤として上市に至っている。しかし生体内酵素の機能調節、特に阻害に依存した従来の医薬は、酵素の欠損・失活が疾患の原因である場合に治療効果が期待できないと考えられる。従って、生体内酵素が本来行うべき反応を化学触媒によって代替することが出来れば、既存の医薬では不可能な疾患の治療が可能になる。さらには生体内酵素が行うことの出来ない非天然型の反応によって細胞機能の制御が可能ならば、酵素活性の制御を基盤とする既存の医薬では達成し得ない革新的な医療となると期待される。

以上の背景のもとに本研究は、遺伝子転写を正に制御する翻訳後修飾であるヒストンタンパク質のリジンアセチル化に焦点を当て、生体内での人工化学触媒反応によって酵素非依存的にヒストンアセチル化を導入することを目的とする。

3. 研究の方法

標的タンパク質に対するリガンドとアシル化触媒活性部位を連結して、リガンドの識別能を用いて触媒活性部位近傍のリジンを選択的にアシル化することを目指した (Figure 1) [1]。生細胞内での触媒関与によるタンパク質選択的アシル化反応を達成するべく、信頼性のある低分子リガンド (TMP) が知られている大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) をモデルタンパク質として、生細胞内において eDHFR の特定のリジン残基を選択的にアシル化修飾できる触媒系の確立に取り組んだ。触媒活性部位として、アセチル CoA を含む反応性の低いアシル化剤を活性化できる DSH [2] を用いた。

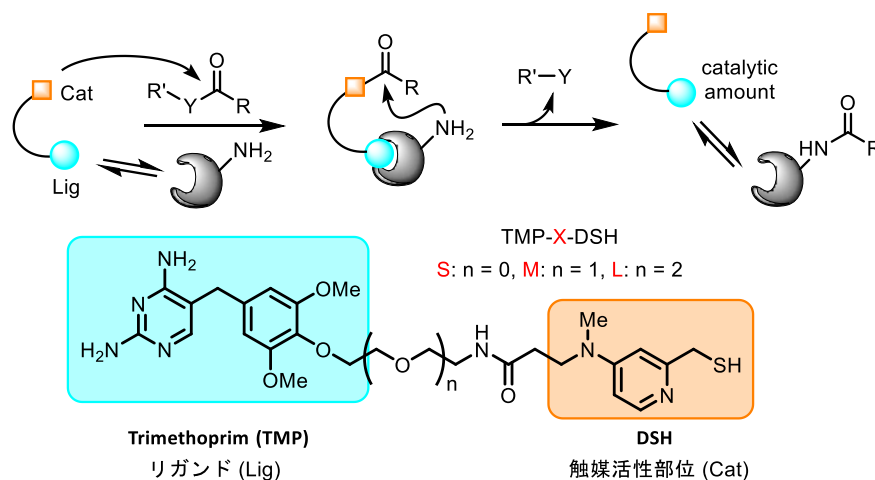


Figure 1. 生細胞内での標的タンパク質選択的触媒的アシル化反応

4. 研究成果

リガンド部位と触媒活性部位の間のリンカー長が異なる三種の触媒 TMP-DSH (S, M, L) を合成し、構造活性相関を調べた (Figure 1)。単離精製した大腸菌リコンビナント eDHFR-GFP に対し、各 TMP-DSH、アセチル CoA、および TCEP (空气中で触媒がジスルフィドを形成し、不活性なダイマーとなりやすいために還元剤として加えている) を添加し、中性緩衝液中において反応に付した後、アセチルリジン抗体を用いたウェスタンブロットにより反応の進行を評価した (Figure 2)。その結果、TMP-M-DSH が最も高い触媒活性を示すことが分かった。

LC-MS/MS による反応収率の解析を行ったところ、32 番目のリジン残基 (K32) のアセチル化は、触媒非存在下では 0.5%であったのに対し、TMP-M-DSH の添加により 94%まで促進された。また、eDHFR は 6 つのリジン残基を持つが、K32 以外のリジン残基についてはいずれもほとんどアセチル化の進行は確認されず、高い位置選択性を発現することが分かった。触媒結合部位と各リジン残基の位置関係を確認するため、TMP と同じ結合部位に結合するメトトレキサートと eDHFR の共結晶 X 線構造解析結果を参照したところ、最も高い収率を示した K32 はリガンド結合部位の近傍に位置していることが分かった。すなわち、リガンドが標的タンパク質に結合することにより、触媒活性部位の近傍に位置するリジン残基に選択的にアセチル化を導入できたものと考察できる。

続いて、同反応の細胞内適用に取り組んだ。HEK293T 細胞に eDHFR-GFP を発現させ、TMP-M-DSH とアセチル CoA を加えて反応を行ったが、細胞内では全くアセチル化が進行しなかった (Figure 3)。アセチル CoA はアニオン性の分子であり、細胞の外から加えても細胞膜を透過せず、化学触媒によるアセチル化の進行のためには細胞内のアセチル CoA の濃度では十分でないことが示唆された。

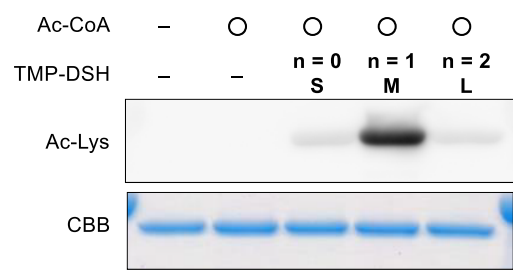


Figure 2. リンカーの最適化

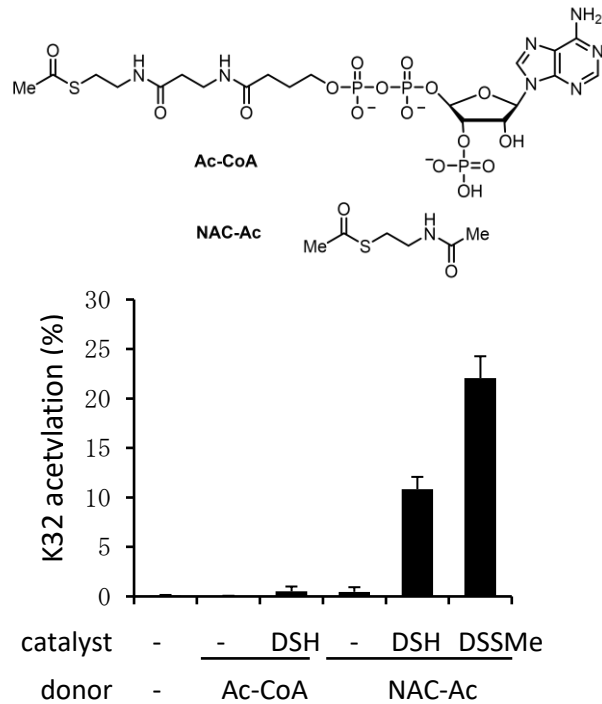


Figure 3. 生細胞内でのアセチル化

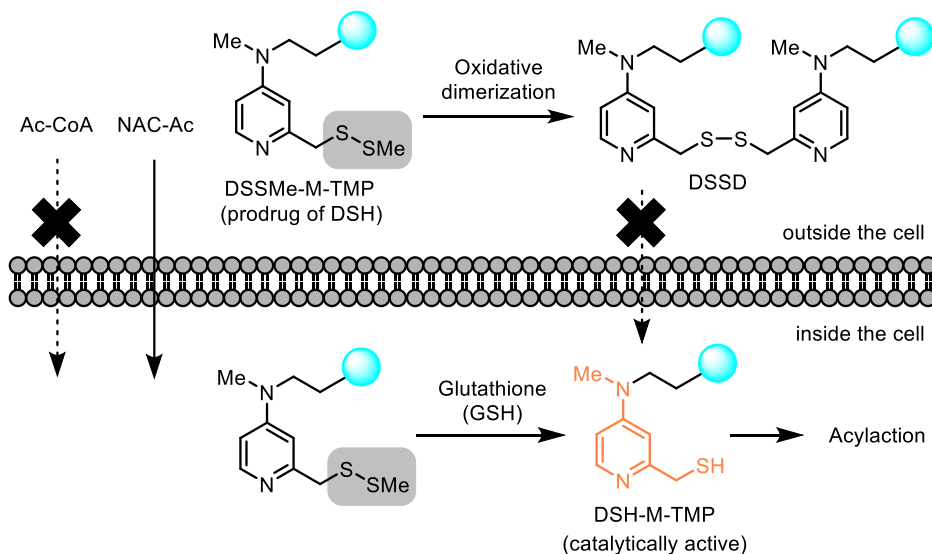


Figure 4. アセチル化剤と触媒の細胞膜透過

そこで、アセチル CoA の部分構造で負電荷を持たない NAC-Ac を用いたところ、K32 のアセ

チル化が 11% 程度の収率で進行した (Figure 3)。これは、細胞膜透過型のアセチル化剤を用いることが細胞内反応に必須であることを示唆している。また上記のように、DSH は中性緩衝液中で容易に酸化されジスルフィド二量体 DSSD を形成するが、DSSD は分子量 1000 以上の分子であり、細胞膜を透過できない可能性が懸念された。そこで、触媒デザインの改良に取り組むことにした。DSH のチオール基をプロドラッグ化した DSSMe を設計した (Figure 4)。DSSMe はジスルフィド保護により酸化的二量体化が抑えられ、細胞外の中性培地中において安定に存在する。また、細胞内には数 mM レベルでグルタチオンが存在することが知られており、細胞内に入ると速やかにジスルフィド部位が還元され DSH を生成することが期待される。

TMP-M-DSSMe を用いて細胞内反応を行ったところ、およそ 2 倍の収率向上が見られ、22% 程度の収率で K32 のアセチル化が進行した (Figure 3)。また、用いるアシル化剤のアシル基を変えることで、マロニル化やアジドアセチル化も可能であることが分かった。マロニル化反応を用いて細胞内アシル化反応のタンパク質間選択性を評価したところ、標的タンパク質選択的にアシル化反応が進行することが分かった (Figure 5)。

以上のように、我々は触媒とアシル化剤の構造を最適化することによって、生細胞内で狙った標的タンパク質の特定のリジン残基に対して生理的に意味のあるアシル化をおこなうことに成功した [3]。また、化学触媒の利点を活かして、非天然アシル修飾を導入することも可能であった。この知見を活かして、染色体を構成するヒストンの特定のリジン残基を化学触媒的にアシル化することも可能となっている [4]。さらに生細胞内反応の効率を向上させるためにより活性の高い触媒活性部位の開発にも成功した [5]。

<参考文献>

- [1] Koshi, Y.; Nakata, E.; Miyagawa, M.; Tsukiji, S.; Ogawa, T.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 245.
- [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. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7568.
- [3] Hamajima, W.; Fujimura, A.; Fujiwara, Y.; Yamatsugu, K.; Kawashima, S. A.; Kanai, M. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 1102.
- [4] Fujiwara, Y.; Yamanashi, Y.; Sato, Y.; Kujirai, T.; Kurumizaka, H.; Kimura, H.; Yamatsugu, K.; Kawashima, S. A.; Kanai, M. *Submitted for publication*.
- [5] Mizumoto, S.; Xi, S.; Fujiwara, Y.; Kawashima, S. A.; Yamatsugu, K.; Kanai, M. *Chem Asian J.* **2020**, *15*, 833.

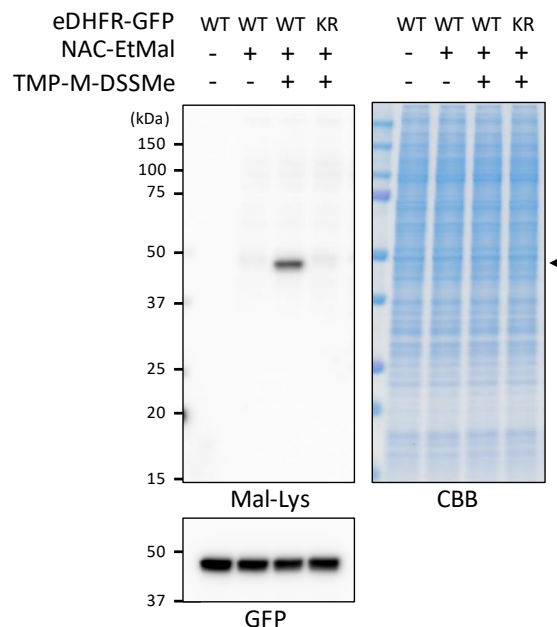


Figure 5. 生細胞内でのマロニル化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamatsugu Kenzo, Furuta Masahiro, Xi Siqu, Amamoto Yoshifumi, Liu Jiaan, Kawashima Shigehiro A., Kanai Motomu	4. 巻 26
2. 論文標題 Kinetic analyses and structure-activity relationship studies of synthetic lysine acetylation catalysts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 5359 ~ 5367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.07.009	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 -
1. 著者名 Tanabe Kana, Liu Jiaan, Kato Daiki, Kurumizaka Hitoshi, Yamatsugu Kenzo, Kanai Motomu, Kawashima Shigehiro A.	4. 巻 8
2. 論文標題 LC-MS/MS-based quantitative study of the acyl group- and site-selectivity of human sirtuins to acylated nucleosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2656-2666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-21060-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishiguro Tadashi, Tanabe Kana, Kobayashi Yuki, Mizumoto Shinsuke, Kanai Motomu, Kawashima Shigehiro A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Malonylation of histone H2A at lysine 119 inhibits Bub1-dependent H2A phosphorylation and chromosomal localization of shugoshin proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7671-7680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26114-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamatsugu Kenzo, Kawashima Shigehiro A, Kanai Motomu	4. 巻 46
2. 論文標題 Leading approaches in synthetic epigenetics for novel therapeutic strategies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 10 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2018.03.011	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 -

1. 著者名 Amamoto Yoshifumi, Aoi Yuki, Nagashima Nozomu, Suto Hiroki, Yoshidome Daisuke, Arimura Yasuhiro, Osakabe Akihisa, Kato Daiki, Kurumizaka Hitoshi, Kawashima Shigehiro A., Yamatsugu Kenzo, Kanai Motomu	4. 巻 139
2. 論文標題 Synthetic Posttranslational Modifications: Chemical Catalyst-Driven Regioselective Histone Acylation of Native Chromatin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 7568 ~ 7576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.7b02138	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 -

1. 著者名 Ishiguro Tadashi, Amamoto Yoshifumi, Tanabe Kana, Liu Jiaan, Kajino Hidetoshi, Fujimura Akiko, Aoi Yuki, Osakabe Akihisa, Horikoshi Naoki, Kurumizaka Hitoshi, Yamatsugu Kenzo, Kawashima Shigehiro A., Kanai Motomu	4. 巻 2
2. 論文標題 Synthetic Chromatin Acylation by an Artificial Catalyst System	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chem	6. 最初と最後の頁 840 ~ 859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chempr.2017.04.002	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 -

1. 著者名 Tanabe Kana, Liu Jiaan, Kato Daiki, Kurumizaka Hitoshi, Yamatsugu Kenzo, Kanai Motomu, Kawashima Shigehiro A.	4. 巻 8
2. 論文標題 LC-MS/MS-based quantitative study of the acyl group- and site-selectivity of human sirtuins to acylated nucleosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-21060-2	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 -

1. 著者名 Ni Jizhi, Taniguchi Atsuhiko, Ozawa Shuta, Hori Yukiko, Kuninobu Yoichiro, Saito Takashi, Saido Takaomi C., Tomita Taisuke, Sohma Youhei, Kanai Motomu	4. 巻 4
2. 論文標題 Near-Infrared Photoactivatable Oxygenation Catalysts of Amyloid Peptide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem	6. 最初と最後の頁 807 ~ 820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chempr.2018.02.008	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 -

1. 著者名 Ishizawa Kouhei, Nagai Hideoki, Shimizu Yohei, Kanai Motomu	4. 巻 66
2. 論文標題 Boron-Catalyzed Carboxylic Acid-Selective Aldol Reaction with Trifluoromethyl Ketones	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 231 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c17-00545	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16件 (うち招待講演 16件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子の構造変換ダイナミズムへの人工介入を目指した触媒研究
3. 学会等名 京都大学大学院工学研究科、特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Synthetic Lysine Acylation of Histones
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium, Kyoto, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子の構造変換ダイナミズムへの人工介入を目指した触媒研究
3. 学会等名 山口大学 IoLセンターシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子の構造変換ダイナミズムへの人工介入を目指した触媒研究
3. 学会等名 第29回 万有仙台シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子を基質とする化学的構造変換法の創出と展開
3. 学会等名 創薬生命科学特別講義I、名古屋市立大学 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalization of Stable Organic Molecules
3. 学会等名 Spanish-Japanese Symposium on Modern Synthetic Methodology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalization of Small Molecules and Proteins
3. 学会等名 52nd Burgenstock Conference, Brunnen, Switzerland (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 低分子から生体高分子までを標的とする触媒反応開発
3. 学会等名 第27回 万有福岡シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 低分子から生体高分子までを標的とした触媒反応開発
3. 学会等名 平成29年度前期有機合成化学講習会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 生体分子を標的とする触媒反応の開発と応用
3. 学会等名 創薬セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalization of Proteins
3. 学会等名 6th French-Japanese Symposium on Medicinal & Fine Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Motomu Kanai
2. 発表標題 Aerobic Oxygen-Driven Functionalization of Proteins
3. 学会等名 1st International Symposium on Catalysis for Sustainable Chemical Synthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 タンパク質を基質とする化学反応開発
3. 学会等名 蛋白研セミナー、カルコゲン、ヘテロ元素を含む生体分子の化学、大阪大学蛋白質研究所 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 A Method for Site-Selective Histone Lysine N-Acylation
3. 学会等名 the 2017 International Symposium on Bio-related Chemistry (ISBC2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 Synthetic chromatin acylation promoted by chemical catalyst systems
3. 学会等名 理研H29年度 エピジェネティクスセミナーシリーズ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金井求
2. 発表標題 化学触媒による凝集アミロイドの無毒化・除去
3. 学会等名 第1回ライフサイエンスイノベーションセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院薬学系研究科 有機合成化学教室HP http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kanai/index.html 東京大学大学院薬学系研究科 有機合成化学教室 http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kanai/index.html</p>

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