

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460159

研究課題名(和文) 基質認識に基づいたヒストン脱メチル化酵素阻害剤の創製

研究課題名(英文) Preparation of histone demethylase inhibitors based on substrate specificity

研究代表者

柿澤 多恵子 (Kakizawa, Taeko)

早稲田大学・理工学術院・講師(任期付)

研究者番号：60445963

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)：本研究では、フラビン依存性のヒストン脱メチル化酵素である lysine-specific demethylase 1 (LSD1) の阻害剤の合成を行った。LSD1 の基質であるヒストン H3 の配列の一部をペプチドとして化学合成し、LSD1 によって脱メチル化が行われる 4 番目のリシン残基の側鎖に、LSD1 の活性中心に結合可能であると予測される小分子を導入する方法で阻害剤合成を行った。一連の化合物を合成し、酵素阻害活性評価を行った。

研究成果の概要(英文)：Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is a flavin-dependent enzyme that removes methyl groups from lysine residues at the fourth position of histone H3. Several substrate-based LSD1 inhibitors that have LSD1 inactivator motifs on the side chain of the lysine residue in histone H3 peptide were prepared. Inhibitory activity of the synthesized compounds was evaluated using recombinant LSD1.

研究分野：創薬化学

キーワード：酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱メチル化酵素は、メチル化されたヒストン中のリシン残基を脱メチル化する酵素であり、フラビン依存性の lysine-specific demethylase 1 (LSD1) などが報告されている。ヒストン脱メチル化酵素阻害薬は、新たな作用機序の抗がん剤開発の観点から注目されている。

申請者はこれまで、酵素の基質特異性を活かしたペプチド型阻害剤の設計や合成を行ってきた。本研究に先立ち、LSD1 の基質に相当する、ヒストン H3 の配列中の脱メチル化を受けるアミノ酸である 4 番目のリシン残基 (Lys-4) の側鎖に、LSD1 の活性中心と結合して酵素を不活性にする小分子を導入する薬剤設計を行っている (引用文献 1)。合成した化合物は酵素レベルで高い LSD1 阻害活性を示し、かつ LSD1 以外のフラビン依存性酵素である monoamine oxidase A および B (MAO-A および MAO-B) に対しては低い阻害活性を示すことが明らかになっている。しかし、合成した化合物は配列部分が長い分子サイズが大きいため、実用化に向けた更なる検討が必要であった。

2. 研究の目的

本研究は、新規治療薬を目指したヒストン脱メチル化酵素阻害薬の創製を目的とする。中でも、実用化に向けた基質配列の最適化および構造活性相関研究に着目し、以下の 3 つの観点から研究を行う。

(1) 酵素レベルでの阻害活性の向上に向けた研究

基質配列中の Lys-4 の側鎖のアミノ基に LSD1 の活性中心に結合すると予想される様々な小分子を導入し、阻害活性のある化合物を得る。例えば、ピリジンやピロリン誘導体などの導入の検討を行う。また、Lys-4 以外のリシン残基の側鎖を修飾する研究を行う。

(2) 基質配列の最適化

本研究の開始前に合成したヒストン H3 の配列に基づくペプチド型阻害剤は、薬剤としてのサイズはかなり大きいものであった。従って、本実験では薬剤の実用化を考慮し、低分子量化に向けたペプチド鎖部分の短縮を行う。また基質配列を短くした際の他の酵素への選択性の変化を調べるため、MAO-A および MAO-B への阻害活性も評価する。

(3) 分子の最適化に向けた更なる研究

上記の (1) (2) の結果を利用し、更なる分子の最適化を検討する。特に (2) の結果から得られた短い配列を用いれば、分子の化学合成が簡便になり、今後の構造活性相関研究が促進される可能性がある。それに加え、本研究では化合物合成のための短縮ルートの開発、および Lys-4 の側鎖の長さの調整実

験を行う。

以上の観点から、高活性で実用的な LSD1 阻害剤研究を進展させることを目的とし、実験を行う。

3. 研究の方法

阻害剤の基質配列部分は、一般的なペプチド固相合成法で合成し、Lys-4 部位の修飾は、固相上あるいは液相での有機合成を組み合わせる方法で行った (参考文献 1, 2)。合成した阻害剤は HPLC による精製と、MALDI-TOF MS によるキャラクタリゼーションを行った。酵素アッセイは、京都府立医大の研究グループにサンプルを送付し、評価を依頼した。LSD1 の評価は、基質であるメチル化リシンが脱メチル化された時に生じる過酸化水素を検出する peroxidase assay に行った。MAO-A および MAO-B の阻害活性は、酵素と発光前駆体 MAO 基質を用いて評価を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

研究代表者は、LSD1 の基質に相当するヒストン H3 の配列に基づいた創薬研究を行った。従来の研究では、アミノ酸 21 残基から構成されるヒストン H3 の配列のうち、LSD1 から脱メチル化を受ける Lys-4 の側鎖のアミノ基に阻害活性を持つことが予想される trans-2-phenylcyclopropylamine (PCPA) を導入していた (図 1、参考文献 1)。本研究における主な結果を次の ~ に示す。

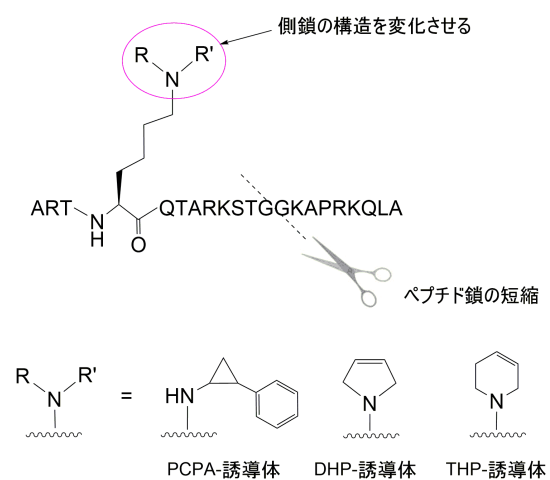


図 1. 本研究の概要。側鎖部分の構造活性相関研究およびペプチド鎖の短縮による配列の最適化。

酵素レベルでの阻害活性の向上に向けた研究  
従来の LSD1 阻害剤に用いていた PCPA 以

外に、阻害活性を示す新たな誘導体の探索を行った。Lys-4 部位に様々な小分子を導入した新たな化合物を合成し、阻害活性を評価したところ、2,5-dihydro-1H-pyrrole (DHP) および 1,2,3,6-tetrahydropyridine (THP) を用いた誘導体に活性が見られた。酵素アッセイでは、これらは PCPA よりやや低い程度の LSD1 阻害活性を示した。

また Lys-4 以外のリシン残基として、LSD1 から脱メチル化を受けるとされる 9 番目のリシン残基 (Lys-9) の側鎖部分に対しても PCPA、DHP および THP を導入した化合物を合成し、活性の評価を行った。その結果、Lys-9 部位を修飾した阻害剤は、それぞれ対応する Lys-4 の阻害剤よりもやや低い阻害活性を示すことが明らかになった。

#### 基質配列の最適化

これまでの研究では、LSD1 の基質に相当する 21 残基のヒストン H3 の配列に基づいた創薬研究を行ってきた。本研究では、Lys-4 を含む配列のうち、C 末端側から 4 残基ずつアミノ酸数を減らした阻害剤をそれぞれ合成した。酵素アッセイを行った結果、配列を短くするに従い、徐々に LSD1 阻害活性の低下が見られたが、アミノ酸数が 17~9 残基の配列においても中程度の阻害活性を維持することが分かった。一方、これらの化合物は MAO-A および MAO-B に対しては低い阻害活性を保つことが明らかになった。

#### 分子の最適化に向けた更なる研究

分子の更なる最適化を図ることに先立ち、薬剤合成の短縮ルートの探索を行った。これまでの合成ルートでは、阻害剤のヒストン H3 の配列部分を一般的なペプチド固相合成法によって合成した後、脱樹脂を行っていた。HPLC による精製後、Lys-4 部位の修飾を液相での有機合成によって行う方法を採用していた (参考文献 1、2)。しかし短縮ルートでは、ヒストン H3 の配列部分を固相合成した後、固相上で Lys-4 部位の修飾を行なっている。短縮した合成ルートを活用し、研究の効率を高めたうえで、薬剤の実用化に向けた更なる実験を行った。

LSD1 阻害剤の Lys-4 の側鎖部分全体を調整する研究として、Lys-4 の側鎖の長さを調節しつつ、側鎖のアミノ基に上記にて決定した LSD1 の活性中心に結合して阻害をすることが可能である小分子類を導入する研究を行った。阻害剤の合成において、配列部分は上記において決定した短縮したペプチド鎖を用いた。また、4 番目に導入したリシン残基および側鎖の長さを変更したアミノ酸類における側鎖の誘導は、上記の固相上での修飾によって行った。

一連の化合物を合成し、これらの LSD1 阻害活性評価を行った結果、側鎖の長さを変更したアミノ酸類よりもリシンを用いた阻害剤の方が高い活性を示した。酵素と阻害剤に

よるモデリングを行った結果、リシンを用いた場合の方が側鎖に導入した小分子類をより酵素の活性部位に近づけられるとの結果が出た。

#### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

上記に記載した様々な結果を中心に、学会および学術論文にて発表を行った。LSD1 阻害剤は新たながん治療薬となる可能性から、国内外で広く注目を浴びている。本研究に関して発表した学術論文は、国内外のグループの学術論文などに引用されている (参考文献 3)。

#### (3) 今後の展望

一般に、酵素の基質特異性を活かした阻害剤設計は、高活性な化合物が得られるという観点からだけでなく、酵素への高い選択性を示す可能性からも非常に有用である。本研究においても基質配列を活かした化合物合成を行っており、LSD1 阻害活性を維持しつつ MAO に対する阻害活性は低い値を示した。本研究が、ヒストン脱メチル化酵素阻害薬という新たな作用機序の抗がん剤開発のための研究に対してだけでなく、酵素阻害剤研究全般の発展に貢献できることを期待する。

#### <参考文献>

D. Ogasawara, Y. Itoh, H. Tsumoto, T. Kakizawa, K. Mino, K. Fukuhara, H. Nakagawa, M. Hasegawa, R. Sasaki, T. Mizukami, N. Miyata, T. Suzuki, Lysine-specific demethylase 1-selective inactivators: protein-targeted drug delivery mechanism, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, 2013, pp.8620-8624.

J. C. Culhane, D. Wang, P. M. Yen, P. A. Cole, Comparative analysis of small molecules and histone substrate analogues as LSD1 lysine demethylase inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, 2010, pp. 3164-3176.

例えば H. Ü. Kaniskan, M. L. Martini, J. Jin, Inhibitors of Protein Methyltransferases and Demethylases, *Chem. Rev.*, vol. 118, 2018, pp. 989-1068. など。

#### 5. 主な発表文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Taeko Kakizawa, Yosuke Ota, Yukihiro Itoh, Takayoshi Suzuki, Histone H3 peptides incorporating modified lysine residues as lysine-specific demethylase 1 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal*

*Chemistry Letters*, 査読有、vol. 28、2018、pp. 167-169、  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.11.035>

Taeko Kakizawa, Tamio Mizukami, Yukihiro Itoh, Makoto Hasegawa, Ryuzo Sasaki, Takayoshi Suzuki、Evaluation of phenylcyclopropylamine compounds by enzymatic assay of lysine-specific demethylase 2 in the presence of NPAC peptide、*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*、査読有、vol. 26、2016、pp. 1193-1195、  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.036>

Taeko Kakizawa, Yosuke Ota, Yukihiro Itoh, Hiroki Tsumoto, Takayoshi Suzuki、Histone H3 peptide based LSD1-selective inhibitors、*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*、査読有、vol. 25、2015、pp. 1925-1928、  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.03.030>

〔学会発表〕(計5件)

Taeko Kakizawa, Yosuke Ota, Yukihiro Itoh, Takayoshi Suzuki、Lysine-specific demethylase 1 inhibitory activity of histone H3 peptides incorporating modified lysine 4、第54回ペプチド討論会、2017年11月20日(月)～22日(水)、大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス。

Taeko Kakizawa, Takayoshi Suzuki、Modification of the lysine residue of histone H3 peptides as lysine-specific demethylase 1 inhibitors、第53回ペプチド討論会、2016年10月26日(水)～28日(金)、京都テルサ。

Taeko Kakizawa, Tamio Mizukami, Yukihiro Itoh, Takayoshi Suzuki、Evaluation of phenylcyclopropylamine-type inhibitors by an *in vitro* lysine-specific demethylase 2 assay in the presence of NPAC dodecapeptide、第52回ペプチド討論会、2015年11月16日(月)～18日(水)、平塚中央公民館。

Taeko Kakizawa, Yosuke Ota, Yukihiro Itoh, Takayoshi Suzuki、Structure-activity relationship studies of the peptidic inactivators of histone demethylase LSD1、第51回ペプチド討論会、2014年10月22日(水)～24日(金)、徳島大学 蔵本キャンパス。

Taeko Kakizawa, Yosuke Ota, Yukihiro

Itoh, Takayoshi Suzuki、Truncation studies of histone H3 peptide analogs as lysine-specific demethylase 1 inactivators、第51回ペプチド討論会、2014年10月22日(水)～24日(金)、徳島大学 蔵本キャンパス。

〔その他〕  
学会のプロシーディング等

T. Kakizawa, T. Mizukami, Y. Itoh, T. Suzuki、Evaluation of phenylcyclopropylamine-type inhibitors by an *in vitro* lysine-specific demethylase 2 assay in the presence of NPAC dodecapeptide、*Peptide Science 2015*, ed. H. Hojo T. Inazu, H. Katayama、査読有、pp. 187-188 (2016) Japanese Peptide Society。

T. Kakizawa, Y. Ota, Y. Itoh, T. Suzuki、Truncation studies of histone H3 peptide analogs as lysine-specific demethylase 1 inactivators、*Peptide Science 2014*, ed. A. Otaka、査読有、pp. 249-250 (2015) Japanese Peptide Society。

T. Kakizawa, Y. Ota, Y. Itoh, T. Suzuki、Structure-activity relationship studies of the peptidic inactivators of histone demethylase LSD、*Peptide Science 2014*, ed. A. Otaka、査読有、pp. 247-248 (2015) Japanese Peptide Society。

など

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柿澤 多恵子 (KAKIZAWA, Taeko)

早稲田大学・理工学術院・講師(任期付き)

研究者番号：60445963