

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670052

研究課題名(和文) ヒストンメチル化の化学的検出法及び酵素阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel detection method for histone methylation and HMT inhibitors

研究代表者

影近 弘之 (Kagechika, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：20177348

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)：本研究では、ヒストンメチル化の新規化学的検出法を開発し、ヒストンメチル化酵素選択的な新規阻害剤の創製を行った。

1) ヒストンメチル化の新規化学的検出法の開発：アミノ基と各種求電子剤との芳香族求核置換反応を詳細に解析し、リシンよりもN-メチルリシンと13倍速く反応する求電子剤を見だし、本結果をもとに、リシンのN-メチル化を定量する方法を確立した。

2) ヒストンメチル化酵素SET7/9の阻害剤の開発：化合物ライブラリーから見いだしたヒストンメチル化酵素SET7/9の阻害活性を持つシプロヘプタジンをリード化合物として、その構造活性相関を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this project, development of a novel method to detect histone methylation and of novel HMT inhibitors were examined.

1) Among aromatic electrophiles, we found that 1-fluoro-2,5-dinitrobenzene reacted with N-methyllysine faster than with lysine. By using this reagent, we developed novel detection method of N-methylation of lysine.

2) Novel SET7/9 inhibitors were developed by using cyproheptadine as a lead compound, that was identified as SET7/9 inhibitor by screening of our chemical library.

研究分野：医薬化学

キーワード：ヒストンメチル化酵素 阻害剤 検出法 芳香族求核置換反応 SET7/9 シプロヘプタジン

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA やヒストンに対するアセチル化、メチル化、リン酸化等の化学修飾が、遺伝子の転写を厳密に制御していることが明らかにされ、これらの修飾反応を担う酵素の生理機能と医薬への応用が注目されている。これまで、ヒストンのアセチル化に関する研究は個々のアセチル化・脱アセチル化酵素選択的な阻害剤の開発がなされ、創薬展開も行われてきたが¹⁾、一方で、ヒストンメチル化酵素 (Histone methyl transferase, HMT) については、個々の HMT によってメチル化されるアミノ酸残基、導入されるメチル基数が異なり、メチル化を受けるアミノ酸残基により転写制御も様々であるなど、不明の点も多い²⁾。さらに、HMT の基質はヒストン蛋白質のみならず、転写因子や核内受容体など、他の基質蛋白質もメチル化し、その機能を制御することも報告されている。HMT 機能の破綻が種々の疾患に関与していることが報告されていることから³⁾、HMT は創薬の重要な標的分子であるが、その阻害剤の開発は限られており、臨床展開されているものは無い⁴⁾。その要因の一つに、簡便でハイスループット可能なアッセイ系の欠如が挙げられ、新しいスクリーニング系の構築に基づく新規 HMT 阻害剤の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒストンメチル化酵素(HMT)阻害剤探索のための新しいスクリーニング系を構築することを目指し、リシンと *N*-メチルリシンを区別する化学反応を見だし、リシンの *N*-メチル化を定量する方法を開発することを目指す。また、新規 HMT 阻害剤の創製を目指す。

3. 研究の方法

(1) リシンの *N*-メチル化を定量する方法の開発: ヒストンメチル化酵素 (HMT) は Adenosylmethionine (AdoMet) を補酵素として、基質のリシン残基側鎖のアミノ基をメチル化し、Adenosylhomocysteine (AdoHcy) を生成する。本研究者はリシンと *N*-メチルリシンに対して反応性が異なる芳香族求電子剤を見だしている。本反応を応用して、リシン残基メチル化の化学的検出に基づく簡便で新しいスクリーニング系を構築し、HMT 阻害剤の探索を行う。

(2) 新規 HMT 阻害剤の創製: 本研究者は、化合物ライブラリーのスクリーニングにより、HMT の 1 つである SET7/9 の活性を抑制する化合物としてシプロヘプタジンを見だしている。そこで、本化合物の誘導体を合成し、その構造活性相関を明らかとし、より高活性な SET7/9 阻害剤の開発を行う。

4. 研究成果

(1) リシンの *N*-メチル化を定量する方法の開発

求電子的な芳香族化合物とアミン等の求核剤との間で起こる芳香族求核置換反応 (S_NAr) 反応は、脱離基や近傍の官能基に由来する立体障害、電子的な効果によりその反応性が異なることが予測される。そこで、種々の求電子性芳香族化合物 (Fig. 1) を用いて、リシンおよび *N*-メチルリシンとの反応速度を解析し、*N*-メチルリシン選択的な反応剤の探索を行った。

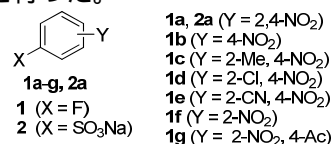


Fig. 1. Structures of aromatic electrophiles

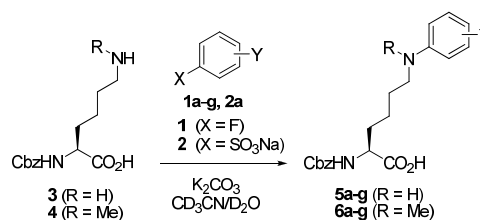


Fig. 2. S_NAr reaction of lysine (3) and *N*-methyllysine derivatives (4) with various electrophiles

その結果、4-fluoro-3-nitroacetophenone (1g) が、*N*-メチルリシンに対してリシンよりも 17 倍の反応速度で反応することを見いだした。さらに、吸光スペクトルを比較したところ、350 nm における吸光度が、*N*-メチルリシンの反応性生物 6g の方が 5g よりも約 13 倍大きいことがわかった。

反応速度および生成物の吸光度の差を利用することにより、HMT によるリシンのメチル化を検出する実験系が構築できることが示唆されたので、リシンに対する *N*-メチルリシンの割合を変化させた各溶液に求核剤 5g を添加し、15 min 後に反応を停止させた後の 350 nm の吸光度を測定した。その結果、吸光度から算出された *N*-メチルリシンの含有率は、調整した *N*-メチルリシンの含有率とほぼ一致した。ついで、Set7/9 の基質であるヒストン蛋白質 H3 の 4 番目のリシンを含む 8 残基のペプチドを用いて同様の検討を行ったところ、*N*-メチル化の割合を算出できることが明らかとなった。以上の結果をもとに、Set7/9 による基質のメチル化の検出を試みた。その結果、酵素反応に必要な DTT や AdoMet を透析によって取り除くことにより、Set7/9 によるリシンのメチル化反応を検出しうることを示した。

(2) 新規 HMT 阻害剤の創製

本研究者は、理化学研究所との共同研究により、化合物ライブラリーを用いたスクリーニングから、セロトニン受容体アンタゴニスト等の作用を持つシプロヘプタジン (Fig. 3) が HMT の 1 種である Set7/9 の阻害活性を持

つことを見いだした。シプロヘプタジンは Set7/9 に対して選択的な作用を有していたものの、その阻害活性はあまり強くなく、また、in vivo で用いた際の作用も弱い等の問題点があった。そこで、シプロヘプタジンをリード化合物として、構造展開を行った。

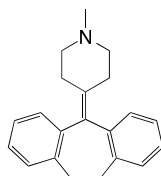


Fig. 3. Structure of cyproheptadine

シプロヘプタジンはピペリジン環とジベンゾスベレン環が二重結合を介して連結した構造を持つ。その結晶構造解析から、独特の折れ曲がった立体構造をとることが示されている。そこで、この立体構造が阻害活性に重要であるかを検討するため、三環性構造を種々変換した化合物 7~13 を合成した。また、合成が簡便な骨格への変換が可能かどうかを検討するために、N-メチルピペリジンとスベレン環との連結構造を変換した化合物 14~16 を合成した (Fig. 4)。

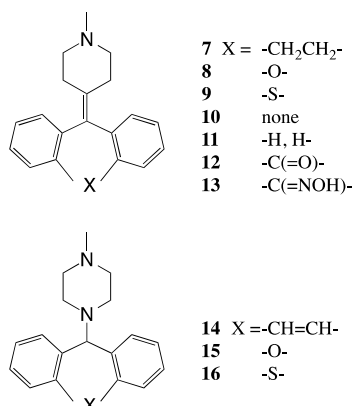


Fig. 4. Structures of cyproheptadine derivatives with different ring system

合成した化合物の Set7/9 阻害活性の評価を行った結果、炭素-炭素二重結合を硫黄原子に置き換えた誘導体 9 がシプロヘプタジンと同程度の阻害活性を有するものの、その他の誘導体では阻害活性が減弱した。従って、Set7/9 阻害活性には、シプロヘプタジンの折れ曲がった構造が重要であることがわかった。

次に、シプロヘプタジンのピペリジン環上の置換基効果を検討した。まず、窒素原子上のメチル基を種々の置換基に変換した化合物を合成したところ、いずれも阻害活性が現弱した。従って、ピペリジン環の N-メチル基は Set7/9 に対する阻害活性において重要な構造であることがわかった。ついで、これまでに報告された HMT 阻害剤の幾つかがアルキルアミノ基を有していることに着目し、シプロヘプタジンのピペリジン環炭素上にアルキルアミノ基などの官能基を導入した

誘導体 17~24 を合成した (Fig. 5)。

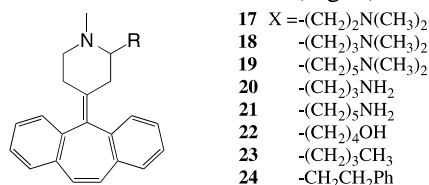


Fig. 5. Structures of cyproheptadine derivatives with substituent on the piperidine ring

次に、ジベンゾスベレン環への種々の置換基導入を行った (Fig. 6)。その結果、スベレン環の 2 位にメトキシ基を導入した化合物がシプロヘプタジンよりも強い SET7/9 阻害活性を有していることがわかった。

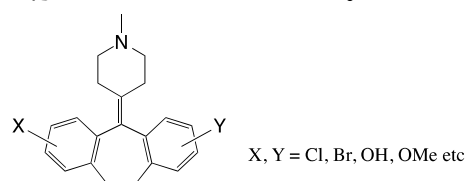


Fig. 6. Structures of cyproheptadine derivatives with substituent on the dibenzosuberene ring

以上のように、ヒストンメチル化酵素 (HMT) 阻害剤開発のための化学的手法の開発と、HMT の 1 種である SET7/9 阻害剤の創製研究を行った。N-メチル化の検出法の開発においては、化学反応である S_NAr 反応を利用したリシンのメチル化を検出する実験系をみいだした。本手法を用いて分工学的に HMT 活性を見積もる方法を構築した。現在、本手法をより感度の高い蛍光法へと展開している。

Set7/9 阻害剤開発では、リード化合物であるシプロヘプタジンの立体構造の重要性、構造活性相関の解析を行い、より強力な活性化合物をみいだした。現在、更なる構造展開を行っている。

以上の成果はヒストンメチル化酵素 (HMT) を分子標的とする医薬開発において有用な知見、手法、化合物を提供するものと考えている。

<引用文献>

- 1) Smith, K. T.; WorkmanInt. J. L. Histone deacetylase inhibitors: Anticancer compounds. *J Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 21-25.
- 2) Völkel, P.; Angrand, P.-O. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **2007**, *89*, 1-20.
- 3) Liu, F.; Chen, X.; Allali-Hassani, A.; Quinn, A. M.; Wasney, G. A.; Dong, A.; Barsyte, D.; Kozieradzki, I.; Senisterra, G.; Chau, I.; Sjarheyeva, A.; Kireev, D. B.; Jadhav, A.; Herold, J. M.; Frye, S. V.; Arrowsmith, C. H.; Brown, P. J.; Simeonov, A.; Vedadi, M.; Jin, J. Discovery of a 2,4-Diamino-7-aminoalkoxyquinazoline as a Potent and

Selective Inhibitor of Histone Lysine Methyltransferase G9a. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7950-7953.

- 4) Greiner, D.; Bonaldi, T.; Eskeland, R.; Roemer, E.; Imhof, A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nature Chem. Biol.* **2005**, 1, 143.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Yokoo, H.; Ohsaki, A.; Kagechika, H.; Hirano, T. Structural development of canthin-5,6-dione moiety as a fluorescent dye and its application to novel fluorescent sensors. *Tetrahedron* **2016**, 72, 5872-5879. 査読あり

DOI: 0.1016/j.tet.2016.08.014

Fujiwara, T.; Ohira, K.; Urushibara, K.; Ito, A.; Yoshida, M.; Kanai, M.; Tanatani, A.; Kagechika, H.; Hirano, T. Steric structure-activity relationship of cyproheptadine derivatives as inhibitors of histone methyltransferase Set7/9. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 4318-4323. 査読あり

DOI: 10.1016/j.bmc.2016.07.024

Takemoto, Y.; Ito, A.; Niwa, H.; Okamura, M.; Fujiwara, T.; Hirano, T.; Handa, N.; Umehara, T.; Sonoda, T.; Ogawa, K.; Tariq, M.; Nishino, N.; Dan, S.; Kagechika, H.; Yamori, T.; Yokoyama, S.; Yoshida, M. Identification of Cyproheptadine as an Inhibitor of SET Domain Containing Lysine Methyltransferase 7/9 (Set7/9) That Regulates Estrogen-Dependent Transcription. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (8), 3650-3660. 査読あり

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01732

Persaud, S. D.; Park, S. W.; Ishigami-Yuasa, M.; Koyano-Nakagawa, N.; Kagechika, H.; Wei, L.-N. All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating ERK1/2 phosphorylation. *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 22396. 査読あり

DOI: 10.1038/srep22396

Shiraishi, T.; Kagechika, H.; Hirano, T. 6-Arylcoumarins: versatile scaffolds for fluorescent sensors. *New J. Chem.* **2015**, 39, 8389-8396. 査読あり

DOI: 10.1039/c5nj01609f

Kodaka, M.; Yang, Z.; Nakagawa, K.; Maruyama, J.; Xu, X.; Sarkar, A.; Ichimura, A.; Nasu, Y.; Ozawa, T.; Iwasa, H.; Ishigami-Yuasa, M.; Ito, S.; Kagechika, H.; Hata, Y. A new cell-based assay to evaluate myogenesis in mouse myoblast C2C12 cells. *Exp. Cell. Res.* **2015**, 336, 171-181.

査読あり

DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.06.015

Mori, S.; Takagaki, R.; Fujii, S.; Matsumura, M.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Lipase-catalyzed asymmetric acylation of boron cluster-containing secondary alcohols. *Tetrahedron Asymm.* **2014**, 25, 1505-1512. 査読あり

Doi: 10.1016/j.tetasy.2014.10.009

Shiraishi, T.; Saito, T.; Kagechika, H.; Hirano, T. Development of a novel fluorescent sensor to detect a specific range of pH. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 6784-6786. 査読あり

DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.10.037

〔学会発表〕(計 13 件)

Okazaki, Y.; Fujiwara, T.; Takaguchi, A.; Hirano, T.; Mori, S.; Kagechika, H. Development of a facile method to detect the activity of histone methyltransferase based on S_NAr reaction, International Chemical Biology Symposium 2016, Oct. 24-26, 2016, Madison, USA.

平野道丈、平野智也、藤原敬士、大平香澄、伊藤昭博、吉田稔、影近弘之。Cyproheptadine を基にしたヒストンメチル化酵素 Set7/9 阻害剤の開発。第 60 回日本薬学会関東支部会。2016 年 9 月 17 日、東京大学、東京。

岡崎優祐、藤原敬士、平野智也、森修一、影近弘之。S_NAr 反応を利用したヒストンメチル化酵素 Set7/9 の活性検出法の開発。第 60 回日本薬学会関東支部会。2016 年 9 月 17 日、東京大学、東京。

Yokoo, H.; Hirano, T.; Ohsaki, A.; Kagechika, H. Development of Novel Fluorescent Sensors Based on Fluorescent Natural Compounds, 252nd ACS National Meeting, Aug. 21-25, 2016, Philadelphia, USA.

平野道丈、平野智也、藤原敬士、大平香澄、伊藤昭博、吉田稔、影近弘之。「Suberene 環部を修飾した Cyproheptadine 誘導体の合成と Set7/9 に対する阻害活性評価」。日本薬学会第 136 年会。2016 年 3 月 26~29 日、パシフィコ横浜、横浜。

Hirano, T.; Hirano, M.; Fujiwara, T.; Ohira, K.; Ito, A.; Yoshida, M.; Kagechika, H. Structure-activity relationships of cyroheptadine as inhibitors of histone methyltransferase, Set7/9, International symposium for RIKEN epigenetics program, Feb. 15-16, 2016, Riken, Tokyo.

平野道丈、平野智也、藤原敬士、大平香澄、伊藤昭博、吉田稔、影近弘之。「ヒストンメチル化酵素 Set7/9 阻害剤の開発」。第 33 回メディスナルケミストリーシン

ポジウム . 2015 年 11 月 25～27 日、幕張国際研修センター、千葉 .

Hirano, M.; Hirano, T.; Fujiwara, T.; Ohira, K.; Kagechika, H.; Ito, A.; Yoshida, M. Study for the development of inhibitors for Set7/9, 3rd International retinoid meeting, Oct. 21-23, 2015, Gifu Grand Hotel, Gifu.

平野智也、藤原敬士、平野道丈、大平香澄、伊藤昭博、吉田稔、影近弘之 . ヒストンメチル化酵素 Set7/9 阻害剤の開発 . 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会 . 2015 年 6 月 10～12 日、東北大学、仙台 .

藤原敬士、高口明日香、森修一、平野智也、影近弘之 . ヒストンメチル化酵素活性評価系の開発研究 . 日本薬学会第 135 年会 . 2015 年 3 月 26～28 日、神戸サンポーホール、神戸 .

Hirano, T.; Shiraishi, T.; Saito, T.; Kagechika, H. Development of Fluorescent Sensors with its Functions Regulated by Chemical or Enzymatic Reaction. 3rd International Chemical Biology Meeting, Nov. 17-20, 2014, San Francisco, USA.

平野智也、白石拓也、齋藤俊樹、影近弘之 . 蛍光物質ライブラリーおよびその構築法を基にした多機能性蛍光センサー群の開発 . 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム . 2014 年 9 月 11～13 日、岡山大学、岡山 .

平野智也、白石拓也、齋藤俊樹、影近弘之 . 蛍光物質ライブラリー構築を基にした蛍光センサー群の開発 . 日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会 . 2014 年 6 月 11～13 日、大阪大学、大阪 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

影近 弘之 (KAGECHIKA, Hiroyuki)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号 : 20177348

(2)連携研究者

平野 智也 (HIRANO, Tomoya)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授
研究者番号 : 20396980