

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 11 年度博士課程進学

氏名 古米亮平

指導教官 堀之内未治

論文題目 アイソザイム選択的ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の作用機構及び耐性機構に関する研究

ヒストンのアセチル化は、リン酸化とともに最も早くから知られたヒストンの翻訳後修飾である。アセチル化は 8 量体コアヒストンから露出した正に荷電した N 末領域のリジン残基で起こり、アセチル化によるプラス荷電の中和がヒストン-DNA あるいはヒストン-非ヒストン核蛋白との相互作用に影響し、さまざまな DNA 結合蛋白の DNA への結合性が上昇すると考えられている。ヒストン分子上のアセチル基はアセチルトランスフェラーゼ(HAT)とデアセチラーゼ(HDAC)による代謝回転を受けており、そのレベルは両酵素のバランスによって決まる。近年、それらの実体についての研究が進み、HAT は転写促進因子に導かれて DNA に近づき、近隣のヒストンをアセチル化することにより遺伝子発現を誘導する一方、HDAC は転写抑制因子に導かれヒストンを脱アセチル化することにより遺伝子発現のスイッチを OFF にすることが分かってきた。また、アセチル化ヒストンはクロマチンのリモデリングを容易にし、転写調節の構造的調節に関わると考えられている。

現在 HDAC はアイソザイムが 10 種類以上存在することが知られており、これらは酵素の基本的性質・発現の組織特異性・結合する因子等が異なっており、それぞれ異なる遺伝子の発現調節に関与すると考えられる。また、近年になって普遍的な蛋白質修飾の一つとしてヒストン以外の蛋白質にも可逆的なアセチル化が観察されるようになってきていることから、こうした多様な HDAC は非ヒストン蛋白質の脱アセチル化を担っている可能性も考えられる。従って、化学的療法や転写療法に HDAC 阻害剤を応用しようとする場合には、目的の遺伝子のみの発現制御を行うことのできるアイソザイム特異的な HDAC 阻害剤の開発が望まれる。

トリコスタチン A (TSA ; 図 1, 図 2) は 1975 年に放線菌が生産する抗真菌抗生物質として発見されたものであり、当醗酵学研究室において HDAC 阻害剤であることが明らかにされた。また最近になって、TSA と細菌由来の HDAC 様蛋白質 (*Aquifex aerolicus* 由来の histone deacetylase-like protein) との共結晶構造が解析され、TSA は基質アセチルリジンのアナログとして酵素活性中心ポケットに入り、そのヒドロキサム酸を通じて活性中心亜鉛イオンをキレートすることが明らかになっている (図 1)。一方、トラポキシ

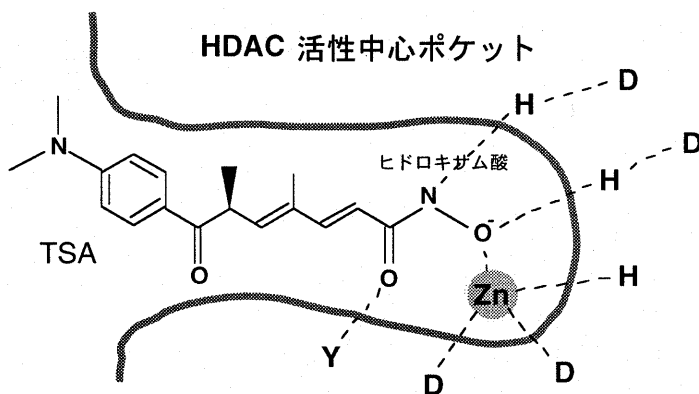


図1 TSAのHDAC阻害の分子機構

シン (TPX ; 図 2) はがん遺伝子 *v-sis* によってトランスフォームした細胞の形態を正常化するカビの代謝産物として発見された HDAC の不可逆的阻害剤である。TPX のもつエポキシ側鎖は基質と構造類似性があり、基質アナログとして酵素に接近し、反応性のあるエポキシケトンを通じて強い酵素阻害を引き起こすものと推定される。これらの HDAC 阻害剤は、白血病をはじめ神経芽細胞など多くの細胞系で分化誘導活性を示すとともに、*ras*, *sis* などのがん遺伝子でトランスフォームした細胞の形態正常化・大腸癌細胞に対する強力なアポトーシス誘導活性などが報告されており、抗がん剤として大きな期待が寄せられている。

### 1. 合成ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 CHAP に関する研究

これまでに知られる HDAC 阻害剤のうち、FK228 (後述) を除く全てが基質アセチルリジンと類似の構造を持つ。この構造部分は酵素の活性中心残基や亜鉛と相互作用する部位であり、ヒドロキサム酸やエポキシケトンなどが含まれる。また、結晶構造解析から活性中心ポケットの入口をふさぐ役割をしていると考え

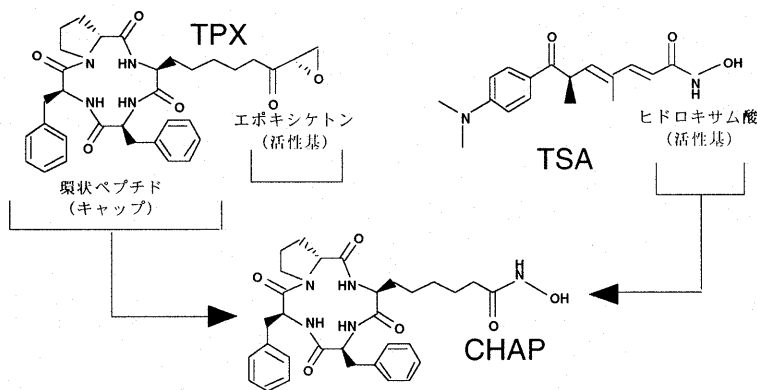


図2 CHAPの構造

られるキャップグループは、芳香族や環状ペプチドからなる。ポケット入口周辺は疎水性アミノ酸残基に富んでおり、酵素は阻害剤のこうした構造と疎水結合によって相互作用していると考えられる。HDAC の活性中心ポケットを構成するアミノ酸配列はよく保存されていることから、立体構造も酵素間でよく似ていると推定されるが、ポケット入口周辺は酵素間でかなり異なっており、酵素間で選択的な阻害作用を示すためには、キャップ構造の違いが重要であることが推定された。環状テトラペプチド部分は化学合成が可能であり、アミノ酸の種類や立体配置を改変することができる。TPX の活性基エポキシケトン是不安定で血中安定性が極めて悪いことから、活性基を TSA の持つヒドロキサム酸に改変したハイブリッド化合物を共同研究を通じて合成し、CHAP1(Cyclic Hydroxamic-Acid-containing Peptide)と名付けた(図 2)。部分精製酵素を用いた阻害活性測定により、CHAP1 は予想通り強力かつ可逆的な HDAC 阻害活性を示しただけでなく、酵素選択性を示すことが分かった。TSA がいずれの HDAC アイソザイムに対してもほぼ同程度の阻害の強さを示すのに対し、CHAP は環構造の違いにより HDAC1 に比べて 10~100 倍程度 HDAC6 に対して弱い阻害を示した。これらの結果から CHAP は TSA 同様、ヒドロキサム酸を介して阻害する強力な阻害剤であり、環状ペプチド部位が酵素選択性に関与することが示唆されたことから、CHAP が HDAC アイソザイム特異的阻害剤を開発するためのリード化合物であることを提示した。

## 2. FK228 の HDAC 阻害機構

FK228 (図 3) は、*v-ras* によってトランスフォームした細胞の形態を正常化する物質として発見された環状デプシペプチドである。動物実験の結果、ヌードマウスに移植したヒト肺癌、胃癌、大腸癌などの固形がんシスプラチンと同程度の有効性が確認されている。このような強い抗腫瘍活性に加え、米国 NCI でのヒトがん細胞パネルの感受性試験から既存の抗がん剤とは異なる作用機構が示唆されたことから、米国での臨床試験(現在第 II 相試験中)が開始されている。一方、細胞レベルでは細胞周期の G1, G2 期停止やがん細胞のアポトーシス誘導、SV40 初期遺伝子プロモーター転写の著しい活性化などが見られ、我々のグループは藤沢薬品工業のグループと共同で FK228 が強力な HDAC 阻害剤であることを証明した。FK228 は従来の HDAC 阻害剤とは構造が大きく異なり、その阻害の分子機構は不明であった。筆者は FK228 の

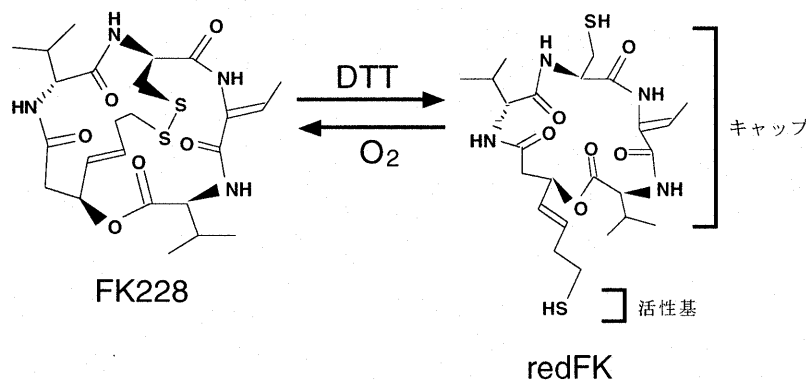


図3 FK228とredFKの構造

活性基は環状ペプチド内を架橋するジスルフィドが開裂した結果できるチオール基であり、それが HDAC 活性ポケット部位に入り亜鉛と配位することで阻害するのではないかと考え、FK228 の HDAC1 に対する阻害活性を検討した。還元剤 DTT 存在下では阻害活性が約 30 倍に増加するのに対し、過酸化水素存在下では約 1/50 に減少した。また精製した還元型 FK228 (redFK ; 図 3) は、DTT 存在下と同レベルの強い阻害活性を示した。さらに FK228 が細胞抽出液中ではほぼ定量的に還元型に変換されること、活性型と考えられる redFK は血清中では FK228 よりも不安定であること確認した。また、分裂酵母のグルタチオン合成酵素 *gsh1*, *gsh2* 変異株が FK228 に対して耐性を示したことから、主な細胞内還元力はグルタチオンであると考えられた。これらの結果は、FK228 が *in vivo* で還元型に変換されてはじめて、活性型として機能するプロドラッグであることを示す。このような FK228 の作用特性は、その強い抗がん活性に寄与している可能性が考えられる。

### 3. TSA 耐性変異 P29S

以前、当醗酵学研究室において、マウス FM3A 細胞を親株として得られた TSA に対して 10 倍以上耐性になる変異株 TR303 が単離されている。この TSA 耐性株 TR303 の HDAC1 の cDNA 配列を解析した結果、唯一 29 番目のプロリンがセリンに変異していることが分かった。また Pro-29 は活性中心ポケットの入口に位置し、大部分の HDAC アイソザイム間で保存された残基であったことから、この Pro-29 のセリンへの変異が TSA 耐性を付与する変異であると考えられた。そこで *in vitro* において、リコンビナント HDAC1/P29S と野生型 HDAC1 の TSA 感受性を比較したところ、予想通りこの変異酵素の方が TSA に耐性であった。さらに *in vivo* において、動物細胞に野生型、変異型 HDAC1 をそれぞれ過剰発現し TSA 存在下における生育を比較した結果、HDAC1/P29S 過剰発現株は TSA に対して耐性になることが分かった。これらの結果から、HDAC の Pro-29 が TSA に対する親和性に関与することが示唆された。

1. Ryohei Furumai, Yasuhiko Komatsu, Norikazu Nishino, Saadi Khochbin, Minoru Yoshida, Sueharu Horinouchi

Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 87-92

2. Yasuhiko Komatsu, Kin-Ya Tomizaki, Makiko Tsukamoto, Tamaki Kato, Norikazu Nishino, Shigeo Sato, Takao Yamori, Takashi Tsuruo, Ryohei Furumai, Minoru Yoshida, Sueharu Horinouchi, Hideya Hayashi

Cyclic Hydroxamic-Acid-Containing peptide 31, a Potent Synthetic Histone Deacetylase Inhibitor with Antitumor Activity (2001) *Cancer Res.*, **61**, 4459-4466

3. Ryohei Furumai, Akihisa Matsuyama, Nobuyuki Kobashi, Kun-Hyung Lee, Makoto Nishiyama, Hidenori Nakajima, Minoru Yoshida, Sueharu Horinouchi

(FK228 に関する論文を投稿準備中)