

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 古米 亮平

アセチルトランスフェラーゼとデアセチラーゼ(HDAC)による代謝回転を受けているヒストンのアセチル化は、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。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ている。本論文は、各種 HDAC 阻害剤の作用機構および耐性機構について述べている。

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

目的の遺伝子のみを発現制御を行うことのできるアイソザイム特異的な HDAC 阻害剤の開発を目的とした実験を行った。可逆的 HDAC 阻害剤トリコスタチン A (TSA) は、細菌由来の HDAC 様蛋白質との共結晶構造が解析され、基質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事が明らかになっている。一方、不可逆的 HDAC 阻害剤トラポキシシン (TPX) はエポキシ側鎖が基質アナログとして酵素に接近し、エポキシケトンを経由して強い酵素阻害を引き起こすものと推定される。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。TPX の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は不安定であることから、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。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、ヒドロキサム酸を経由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 のヒストン脱アセチル化酵素阻害の分子機構に関する研究

FK228 は、強い抗腫瘍活性を持つ HDAC 阻害剤である。FK228 の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ると考え、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、精製した還元型 FK228 (redFK) は、DTT 存在下と同レベルの強い阻害活性を示した。更に FK228 が細胞抽出液中で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 *gcs1*, *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唆している。

3. トリコスタチン耐性変異 HDAC1 P29S に関する研究

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 についての解析を行った。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。

以上、本論文はヒストンアセチル化機構の解明や新しい薬剤開発を目的とし、HDAC 阻害剤を用いた研究を行い、阻害剤の作用機構や耐性機構を明らかにしたものである。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。