審　査　の　結　果　の　要　旨

氏　名　　梶　野　　英　俊

梶野英俊は，「酢酸フェニル型アセチルドナーを用いた超高収率なヒストンアセチル化を可能にする化学触媒システムの開発」というタイトルで，以下の研究を行った。

背景と目的

染色体を構成する主要なタンパク質であるヒストンの翻訳後修飾は、遺伝子発現の調節に密接に関与している。特にヒストンテールのリジン残基のアセチル化は遺伝子転写の活性化と正の相関があることから、アセチル化レベルの低下は様々な疾患との関連が示唆されている。当研究室では、内在性酵素に依存しないヒストンアセチル化を促進できる化学触媒システムの開発に取り組んでいる (Fig. 1) 。これまでにクロマチン結合性の DMAP 系触媒分子 (PDP、16DMAP) とアセチルドナー分子 (3NMD8R) を開発しており、これらを組み合わせて試験管内においてヒストンのアセチル化に成功しているが、そのアセチル化収率は最適条件でも低収率にとどまっており、さらなるアセチル化収率の向上が課題であった。そこで梶野は、高収率なヒストンアセチル化を可能にする化学触媒システムの実現を目的として研究に着手した。

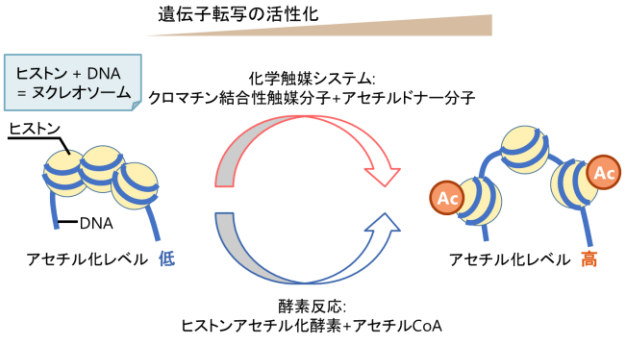

Fig. 1 化学触媒システムによる人工的ヒストンアセチル化

①新規アセチルドナー分子、PAc-gly の開発

3NMD8R は DNA へのリガンドである 8R に、アセチル基供与性を示す NMD を 3 分子連結した構造をもっている。低収率の原因の一つとして、この NMD 自体の比較的高い反応性が挙げられた。梶野は、NMD はタンパク質のリジン残基と触媒非依存的に反応してアセチル基を消費してしまうほか、加水分解も受けることから、反応系中で十分なアセチルドナー濃度を保つことができていないと考えた。そこで、リジン残基による求核攻撃や加水分解を受けづらい一方で、触媒分子によっては活性化されるアセチルドナー分子の開発を試みた。アセチル基供与性と脱離基の酸性度には相関があるため、NMD の脱離基の pK_a (9.85) を参考に様々な pK_a の化合物を用いてスクリーニングを行い、フェノール (pK_a 9.95) が脱離基となる酢酸フェニル (PAc) が理想的なアセチル基供与性を示すことを見出した (Fig. 2) 。また、PAc の反応性を DFT 計算を用いて解析し、PAc から脱離したフェノキシドアニオンが、基質の一級アンモニウムカチオンの脱プロトン化を行うことで、効率よくアセチル化反応を促進しているという反応機構を提案した。

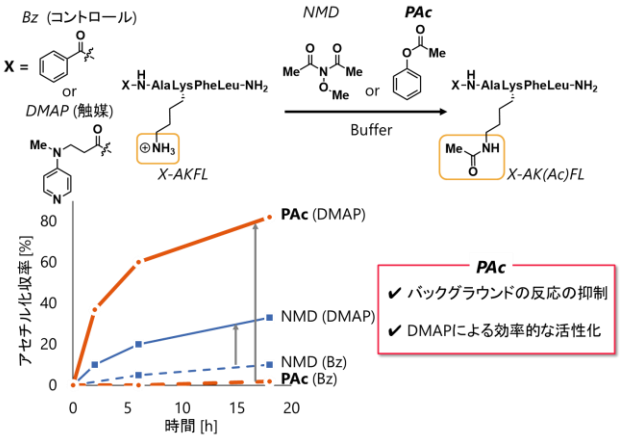

Fig. 2 NMD と酢酸フェニル (PAc) の反応性の比較

さらに、触媒分子とアセチルドナー分子を高濃度で用いると、DNA 上で両分子が競合し、触媒依存的なアセチル化が進行しづらくなるという新たな問題点を見出した。これを解決するために、梶野は触媒分子と競合しないアセチルドナーの分子設計が必要であると考えた。アセチルドナー分子の 8R 部位による DNA との結合は、触媒分子との近接効果による効率的な活性化と、触媒分子との接触頻度の向上に寄与している。NMD と比較して、PAc はそれ自身が DMAP によって非常に効率よく活性化されることから近接効果は不要であり、さらに高濃度で用いることで接触頻度の低下も補うことができると考え、8R 部位を水溶性のエチレングリコール (gly) 鎖に置換した PAc-gly を合成した (Fig. 3 左) 。その結果、PDP 触媒の存在下 PAc-gly の濃度依存的にヒストンのアセチル化収率が向上し、最適条件では再構成ヌクレオソームのヒストン H3 を 80–90%の高収率でアセチル化することに成功した (Fig. 3 右) 。以上のように、梶野は PAc-gly の開発によって超高収率でヒストンをアセチル化できる化学触媒システムの開発に成功した。

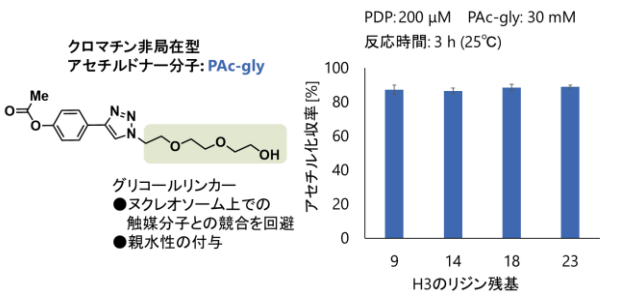

Fig. 3 PAc-gly の構造と反応性

②*Xenopus* egg extract system への応用

本触媒システムによるヒストンアセチル化が染色体機能に与える影響を調べるために、梶野はカエル卵抽出液由来の無細胞系を用いた。この実験系ではアフリカツメガエル精子核 (*Xenopus laevis* sperm nuclei、以下 XSP) を卵抽出液に加えることで、試験管内で細胞周期の進行や DNA 複製に伴う染色体上のイベントを再現することが可能である。本触媒システムで高度にアセチル化した XSP (Ac-XSP) を卵抽出液に加え、高アセチル化状態のヒストンが核内イベントに与える影響を解析した。まず、16DMAP 触媒と PAc-gly を用いて Ac-XSP の調製を行うと、ヒストン H3 の広い範囲で、リジン残基のアセチル化レベルが 90%程度まで上昇した。この Ac-XSP を卵抽出液に加え DNA 複製効率を測定すると、コントロールの XSP に比べてその効率は大きく低下することを見出した (Fig. 4) 。Ac-XSP 上のクロマチン結合性タンパク質を調べた結果、核膜孔の形成に必須である ELYS のクロマチン結合が顕著に低下することを発見した。この結果は、ヒストンのアセチル化は ELYS のクロマチン結合を阻害することで核膜孔の形成不全を誘導し、DNA 複製因子が核内へ輸送されなくなることで DNA 複製が阻害されることを示唆している。今後、ELYS の結合を阻害しているアセチル化リジン残基の特定など、より詳細な DNA 複製の阻害機構の解析を行うことで、ヒストンの翻訳後修飾の細胞周期における役割について、新たな知見を得られる可能性がある。内在性アセチル化酵素の一つである p300 では XSP をアセチル化することはできないため、上述した現象は PAc-gly の開発によって初めて明らかになったと言える。

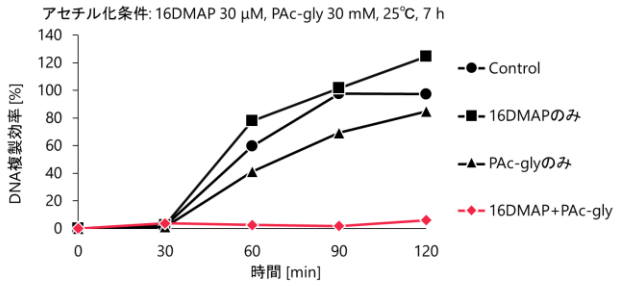

Fig. 4 ヒストンのアセチル化が DNA 複製に与える影響

以上の業績は，化学触媒システムによる疾患治療という新規治療概念の確立に大きく貢献するものであり，博士（薬科学）の学位論文として合格と認められる。