

## 博士論文（要約）

論文題目      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

氏      名      梶野   英俊

## 【背景・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。我々は、内在性酵素に依存せずにヒストンアセチル化を促進できる化学触媒システムを開発できれば、新たな疾患治療概念になると考えた(Fig. 1)。我々の化学触媒システムは触媒とアセチルドナーの2分子で構成される。これまでの研究で、アセチル化触媒である DMAP を複数連結した触媒分子(3Py8DMAP3Py (PDP)、16DMAP)と、アセチルドナー分子(3NMD8R)を開発した(Fig. 2)。これらは分子自体のカチオン性部位(DMAP、8R)と DNA のアニオン性部位の間ではたらく静電

相互作用や、DNA へのリガンド(3Py)を介してクロマチンに結合し、近接効果によりヒストンとの反応性が向上する。我々は本触媒システムで生理条件下においてヒストンのアセチル化に成功しているが、報告した触媒システムによるアセチル化収率は最適条件でも低収率(十数%)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<sup>1</sup>。そこで本研究では、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。

## 【方法・結果】

### 0) 問題点と解決手法

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。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に耐性がある一方で、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。

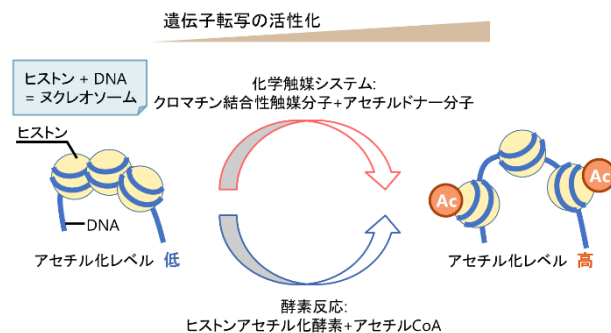


Fig. 1: 化学触媒システムによる人工的ヒストンアセチル化

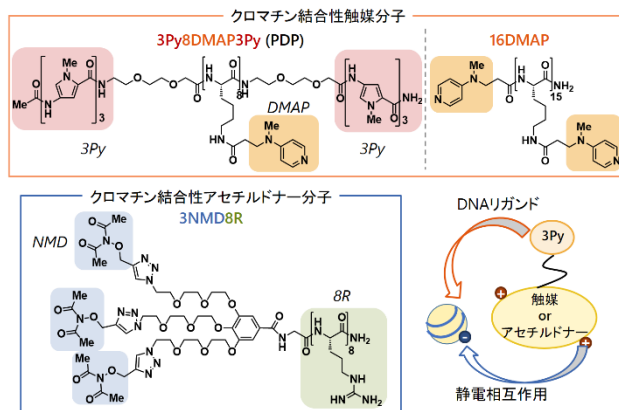


Fig. 2: クロマチン結合性化学触媒システム

## 1) 新規アセチル基供与性分子の探索

理想的なアセチル基供与性分子として、それ自体の反応性は低いが、DMAP によって NMD よりも高いアセチル化収率を示す分子を探索した。化合物のスクリーニングはリジンを含むモデルペプチドを用いる、独自の評価系で行った。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 が有する脱離基の  $pK_a$  (9.85) を参考に様々な  $pK_a$  の化合物を検討したところ、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した (Fig. 3)。

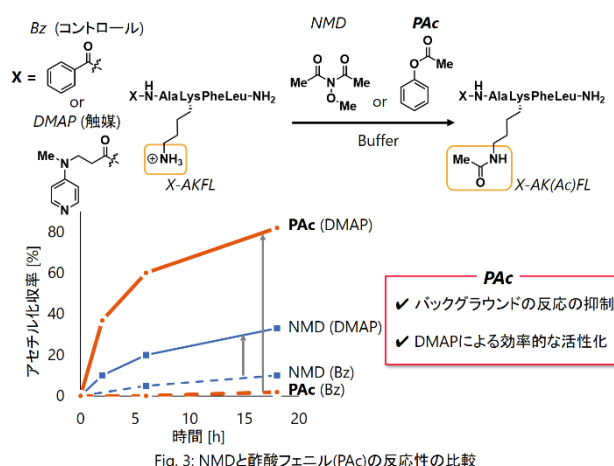


Fig. 3: NMDと酢酸フェニル(PAc)の反応性の比較

PAc の理想的な反応性を DFT 計算と実験の両面から解析した。計算の結果、PAc は DMAP とプロトン化されたアミンと共に六員環遷移状態を経由し、アセチルピリジニウムイオンの生成と同時にフェノキシドアニオンによるアンモニウムの脱プロトン化が起こることが示唆された (Fig. 4)。脱離基の塩基性が低いチオ酢酸 *S*-フェニルを用いた対照実験では DMAP による反応の加速が PAc と比較して弱いことから、アミンの脱プロトン化の重要性が示唆された。

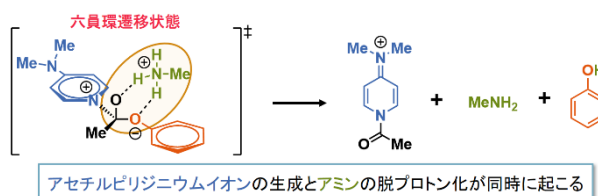


Fig. 4: DFT計算から予想されるアセチルピリジニウムイオンの生成機構

## 2) 3PAc8R の安定性の評価

3 分子の PAc を 8R へ連結した 3PAc8R は、水中で 3NMD8R よりも高い安定性を示した。また、3PAc8R は PDP 非存在下では夾雑タンパク質やヒストンに対するアセチル化をほとんど促進しなかった。

## 3) アセチルドナー分子の反応性の向上

再構成ヌクレオソーム (rNuc) に対して、PDP 存在下、3PAc8R は 3NMD8R を上回る反応性を示したが、依然として低収率であった。しかし、ヒストンアセチル化収率向上のために 3PAc8R の濃度を高くすると、予想に反してその収率は低下した。これは、PDP も 3PAc8R もヌクレオソーム結

合性をもつため、rNuc 上で両化合物が競合したためであり、アセチル化収率向上のためには PDP と競合しない分子設計が必要であることが示唆された。NMD と異なり、PAc は DMAP によって強く活性化されることから近接効果は不要と考え、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. 5 左)。その結果、PDP 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 rNuc のヒストン H3 テールを 90-100% の高収率でアセチル化することに成功した (Fig. 5 右)。

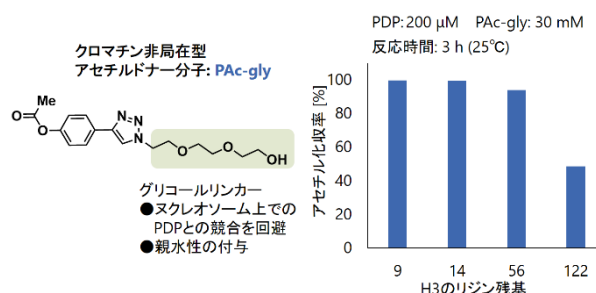


Fig. 5: PAc-glyの構造と反応性

#### 4) *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、カエル卵抽出液由来の無細胞系を用いた。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。そこで、本触媒システムで高度にアセチル化した XSP(Ac-XSP)を間期卵抽出液に加え、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 と PAc-gly を用いて Ac-XSP の調製を行ったところ、ヒストン H3、H4 の広い範囲で、リジン残基のアセチル化レベルが 10%以下から 50-90%に上昇した。この Ac-XSP を間期卵抽出液に加え、DNA 複製効率を測定したところ、コントロールの XSP に比べてその効率は大きく低下した(Fig. 6)。Ac-XSP 上での DNA 複製因子のクロマチン結合を調べた結果、複製開始前複合体(pre-RC)の形成は行われる一方で、pre-RC の活性化が阻害されていること、また核膜孔複合体の形成に伴う DNA 複製因子の核内輸送を促進する因子 ELYS タンパク質のクロマチンへの結合が顕著に低下することが明らかになった。これらの結果は、本触媒システムによる過剰なアセチル化が核膜孔複合体の形成不全を誘導し、核内輸送の異常を介して DNA 複製を阻害していることを示唆している。

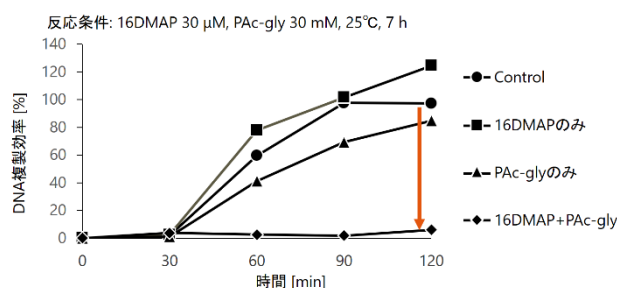


Fig. 6: Ac-XSPのDNA複製効率

#### 【総括】

本研究において私は、新たなアセチルドナー分子として PAc-gly を開発した。PAc 骨格は DMAP から求核攻撃を受けると、六員環遷移状態を介して反応活性種であるアセチルピリジニウムイオンの生成と、脱プロトン化によるリジンの活性化が同時に起きることで、効率的にアセチル化を進行させることが示唆された。PAc-gly を用いた触媒システムは、rNuc や XSP のヒストンを最大で 90%を超える超高収率でアセチル化することに成功した。

さらに、高度にアセチル化した XSP をカエル卵抽出液に加えると、DNA 複製が顕著に阻害されることを見出した。今後、ELYS タンパク質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。

#### 【参考文献】

1. Ishiguro, T.; Amamoto, Y.; Tanabe, K.; Liu, J.; Kajino, H.; Fujimura, A.; Aoi, Y.; Osakabe, A.; Horikoshi, N.; Kurumizaka, H.; Yamatsugu, K.; Kawashima, S. A.; Kanai, M. *Chem* **2017**, *2*, 840-859.