

# 生体分子の構造変換ダイナミズムへの人的介入 を目指した触媒研究

東京大学・大学院薬学系研究科

金井 求

## 1. はじめに

生体は、タンパク質や核酸といった生体高分子が基質として、酵素が触媒として、それぞれ機能する化学反応の場であり、生命はシステム化された化学反応のネットワークによって発現・維持されている。逆に病態は、生体内化学反応ネットワークの異常が原因の一つであると見なすことができる。このような視点を基に我々は、酵素反応を補完・代替しうる人工触媒系を生体内に組み込むことで、生体の化学秩序に合成的かつ積極的に介入して疾病を治療する概念の確立を目指して研究を行っている（**触媒医療**）。長期的な目標としては生物学や病態治療への展開を掲げているものの、**触媒医療の根幹は純粋に化学の問題**である。すなわち、安定な分子を穏和な条件で活性化し、原子効率や標的・位置選択性が高く、無保護の多官能基性の複雑な基質に対しても水中37度で適用でき、かつ毒性の低い触媒の開発が求められる。これらの要請はすべて、今日の有機合成化学の根本課題であり、翻って、触媒医療の課題の解決は、複雑な構造を有する医薬品等の多官能基性低分子の効率的合成法の創出という最先端の化学合成の進歩にも必ずや貢献するものと確信している。一方で、化学も生物学も物理学の基礎定理を破ることはできないので、安定な分子を活性化するためには相当するエネルギーが必要である。生命を見据えた我々の触媒開発においては、安定分子を活性化するエネルギー源として、生命を培っている可視光や酸素といった地球環境因子を利用することが適当であると考えている。

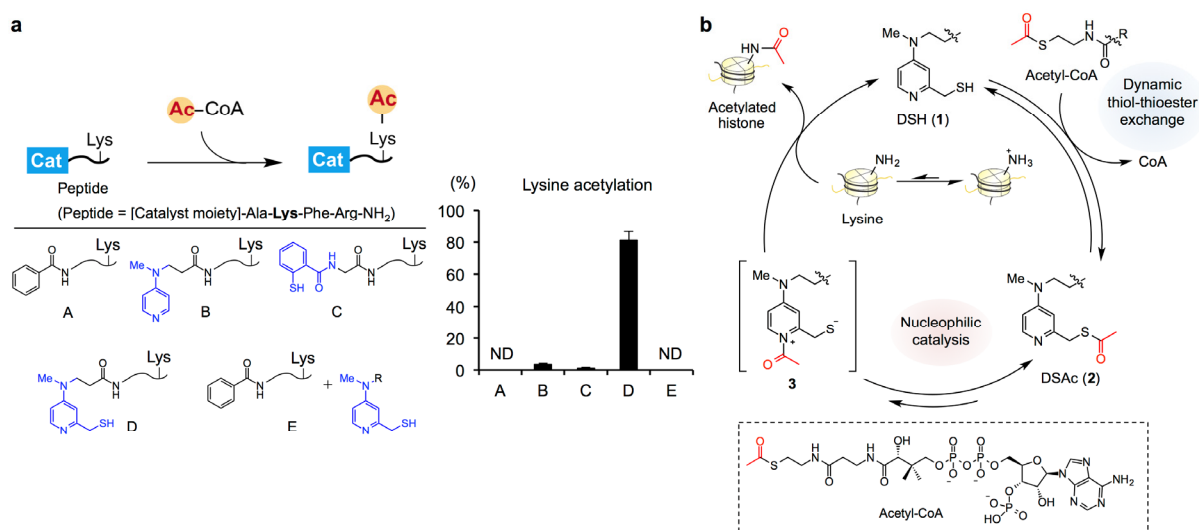
以上の背景をもとに今回の講演では、ヒストンタンパク質の残基選択的アシル化触媒と凝集アミロイドβペプチドの選択的光酸素化触媒の開発、およびこれらの触媒反応の病態治療への応用可能性について議論したい。

## 2. ヒストン残基選択的アシル化触媒

染色体の構造体タンパク質であるヒストンは、DNAとともにヌクレオソームと呼ばれる構造単位を形成し、様々な翻訳後修飾を受けることで染色体機能を制御している。中でもリジン残基のアセチル化は、染色体の動的構造変化や遺伝子転写への関与が示唆されている重要な翻訳後修飾である。しかし、ヒストンには50種類以上のリジン残基が存在し、多くのアセチル化リジン残基の機能は未解明である。さらに、近年の質量分析技術の発展に伴って、リジン残基にはアセチル化以外の様々なアシル化が起こっていることが発見されてきている。従来、これらヒストンアシル化の機能解析は、*in vitro*で該当修飾のみを持つヒストンを調製し、それを用いて再構成ヌクレオソームを構築することで行われてきた。しかし、翻訳後修飾はそれ単独ではなく、他の修飾と協調して機能する場合が多いため、当該修飾単独を持つヌクレオソームではなく、様々な翻訳後修飾を有する内在性の染色体に直接かつ残基選択的に目的とするアシル化修飾を導入し機能解析することが、より深い理解に繋がると考えられる。さらに、そのような手法を開発できれば、ヒストンへの翻訳後

修飾の人為導入による遺伝子転写を介した生体機能制御が可能になると考えられる。我々は、ヒストンアセチル化酵素がヌクレオソーム結合部位とアセチル CoA 活性化部位をあわせ持つことに着目し、ヌクレオソーム結合部位とアセチル CoA を活性化する化学触媒部位を共役した分子を開発し、それによって内在性染色体の直接的かつ位置選択的なアシル化反応を実現することを目標として研究を開始した。

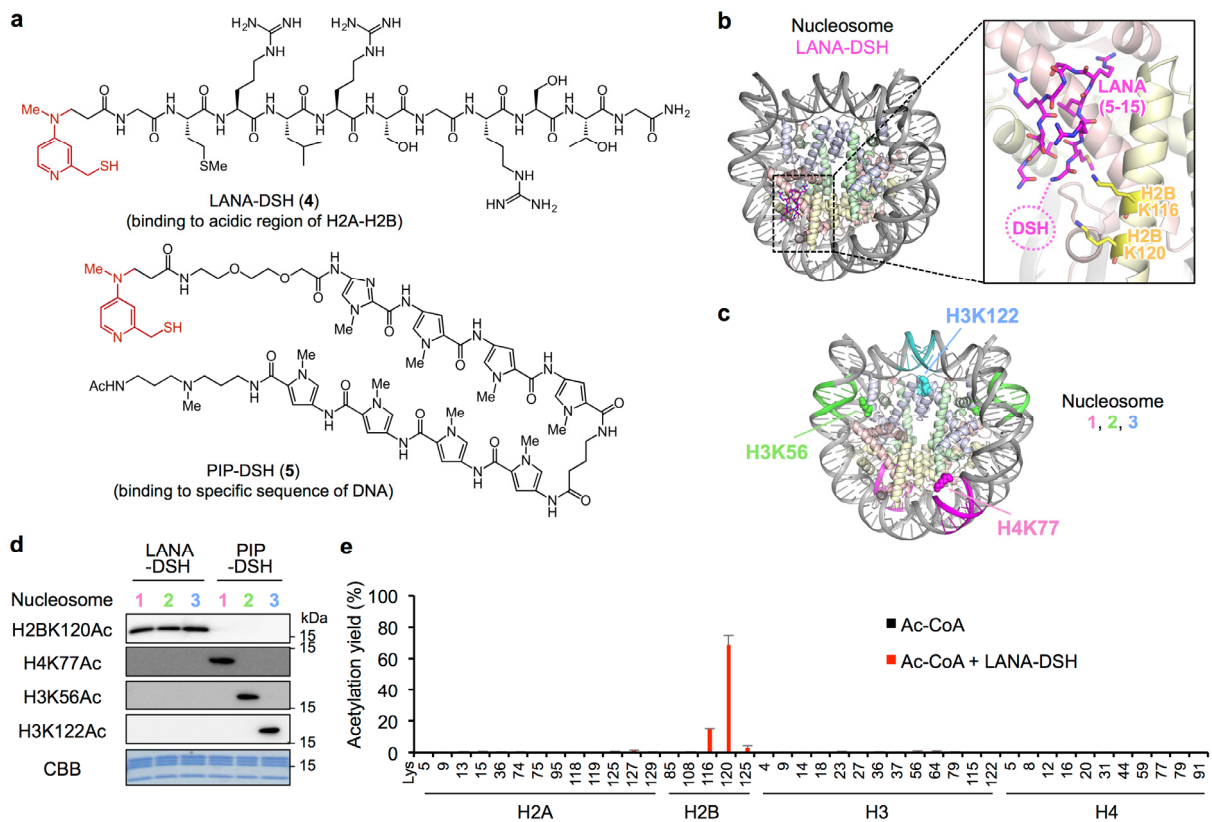
アセチル CoA を含むアシル CoA を一般性高くかつ高効率で活性化する化学触媒は存在しなかったため、まずそれを開発することから研究を開始した。ヌクレオソーム結合部位による近接効果のモデルとして分子内アシル化反応を設定し、基質となるリジン残基および触媒候補部位を含むペプチドをアセチル CoA と混合した時に、アセチル CoA から効率的にリジン残基へとアセチル基を転移させる触媒部位を探索した (Figure 1a)。その結果、触媒部位を持たない場合 (A)、単純な DMAP を用いた場合 (B)、アセチル CoA からタンパク質に対してアセチル基を転移させると報告のあるチオサリチル酸アミドを用いた場合 (C) には、ほとんど反応が進行しなかったが、DMAP の 2 位にメルカプトメチル基を持つ触媒 DSH を開発しそれを用いた場合 (D) には、円滑なリジン残基アセチル化の進行が確認された。興味深いことに、DSH をリジンと切り離した場合 (E) には反応が全く進行しないことから、近接効果が本反応に重要であることがわかる。DSH の想定触媒メカニズムを Figure 1b に示した。DSH (1) とアセチル CoA が動的チオール・チオエステル交換反応を行うことで、DSAc (2) を生じる。これにより単純な DMAP を用いた場合に分子間反応では活性化が不可能であったアセチル CoA のアセチル基を、分子内反応によって活性化することが可能となり、活性中間体であるアセチルピリジニウムイオン (3) を生じる。その後、近傍に存在するリジン残基に活性化されたアセチル基を転移し、触媒が再生する<sup>1</sup>。



**Figure 1.** DSH as Ac-CoA-Activating, Regioselective Histone Acetylation Catalyst

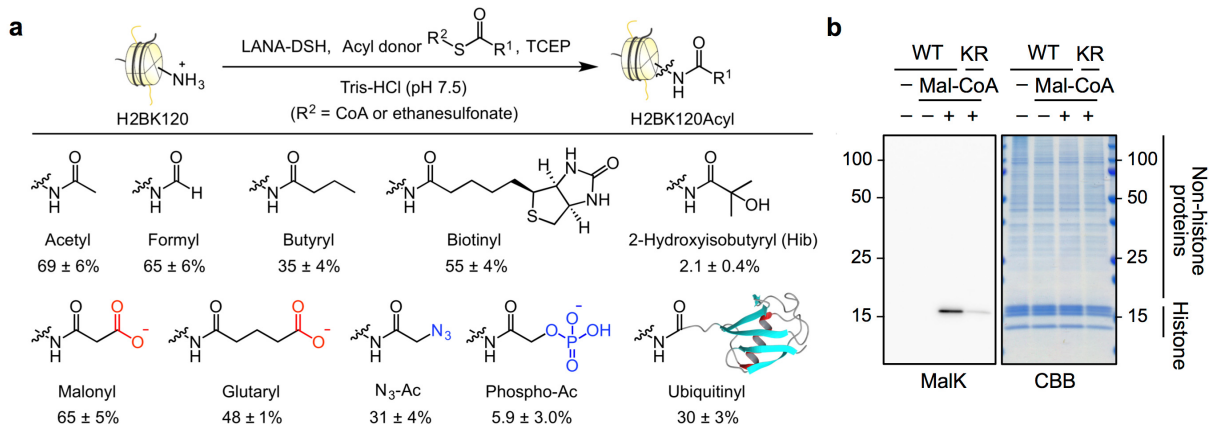
続いて、DSH をヌクレオソームの特異的な位置に結合する化合物と共役し、再構成ヌクレオソーム中のヒストンの位置選択的なアセチル化を試みた。ヌクレオソームに結合する化合物として、ヒストン H2A-H2B ダイマーの酸性パッチに結合するペプチドである LANA、および DNA を塩基配列特異的に認識する分子である Pyrrole-Imidazole-Polyamide (PIP) を用いた (Figure 2a)。再構成ヌクレオソームと

LANA-DSH (4) の共結晶を取得し X 線結晶構造解析を行ったところ、DSH 部位の電子密度は観測できなかったが、LANA-DSH の DSH 部位は H2B の 120 番目のリジン残基 (H2BK120) の近傍に存在することが示唆された (Figure 2b)。また、用いる再構成ヌクレオソームとして PIP-DSH (5) が認識する DNA 配列をそれぞれ異なる位置に持つ 3 種類のヌクレオソーム (Nucleosome 1,2,3) を用いた (Figure 2c)。その結果、LANA-DSH を用いた際にはヌクレオソームの種類によらず H2BK120 のアセチル化が進行し、PIP-DSH を用いた際にはヌクレオソームの種類に応じて、触媒結合部位近傍のリジン残基が選択的にアセチル化された (Figure 2d)。アセチル化反応後にヒストンを酵素消化し LC-MS/MS を用いて残基選択性の詳細な解析を行ったところ、LANA-DSH を用いた時に確かに H2BK120 が選択的に、かつ高効率でアセチル化されていることが確認できた (Figure 2e)。



**Figure 2.** Regio-divergent Histone Acetylation in Recombinant Nucleosomes by Ligand-Conjugated DSH

本触媒系は、アセチル CoA を他のアシル CoA に代えるのみで様々なアシル基を促進することが出来る。LANA-DSH を用いて、ブチリル基のような疎水性のアシル基や、マロニル基のようなアニオン性のアシル基、ユビキチンのようなタンパク質性のアシル基も導入可能であった (Figure 3a)。また、人工触媒であることの特徴を活かし、アジドアセチル基のような非天然型のアシル基を導入することも可能であった。標的である H2BK120 をアルギニンに変えた変異ヌクレオソームを用いると顕著にアシル化が抑制されることから、これらアシル化も H2BK120 選択的に進行していることが示唆される (Figure 3b)。

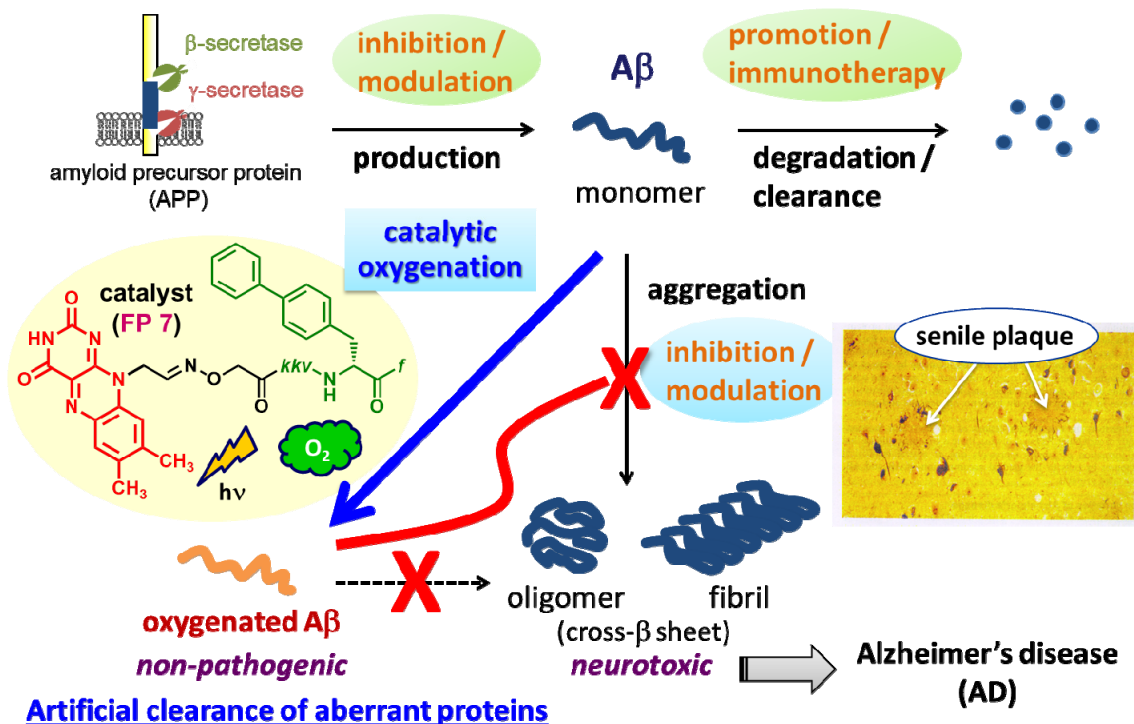


**Figure 3.** Regiospecific Introduction of Various Histone Acylations by LANA-DSH

なお、ヒストンテール部位を幅広くアシル化し、試験管内で染色体を転写されやすい構造に変換できる SynCAc という別の触媒システムの開発もおこなわれている<sup>2</sup>。

### 3. 凝集アミロイドβ光酸素化触媒

タンパク質はフォールディングすることにより固有の立体構造を形成して生命機能を担う一方、タンパク質の種類によってはミスフォールディングを起こしアミロイド凝集体とよばれるオリゴマーや線維の凝集体を形成する。アミロイド凝集体の高次構造はクロスβシートとよばれ、一次構造によらず共通してβシート構造の特異な積み重なりを特徴とする。また、これらアミロイド凝集体は細胞傷害性を呈することで様々な疾患を引き起こす。アルツハイマー病におけるアミロイドβ (Aβ) はその代表例である。Aβの凝集がアルツハイマー病発症の引き金であるとする「ア



**Figure 4.** Artificial Photooxygenation of Aβ as Potential Therapeutic Strategy to Treat Alzheimer Disease



ミロイド仮説」が、広く受け入れられている。A $\beta$ は40残基前後のペプチドであり、そのアミロイド凝集体は、アルツハイマー病患者脳内において特徴的に見られる老人斑を構成する。これまで、本仮説に基づきA $\beta$ を標的とした予防・治療法の開発研究が精力的に進められているが、なかなか成功に至っていない。そこで、A $\beta$ の選択的な代謝経路を人工触媒を用いて作り出すことができないかと考えた。

この着想の下に我々は、光触媒であるリボフラビン6を用いた酸化反応を利用することによって、A $\beta$  1-42の凝集性および神経毒性を軽減できることを報告した<sup>3</sup>。特に、フラビン分子にA $\beta$ 親和性ペプチドであるD-[KLVF(4-phenyl)F]<sup>4</sup>を結合した触媒7は、生細胞存在下においてもA $\beta$ を酸化し、その毒性を低減することができた(Figure 4)。さらに、光酸化によって生じた酸化A $\beta$  1-42は、酸化を受けていないA $\beta$  1-42の凝集を阻害することを見出した。従って、A $\beta$ の酸化が部分的にでも進行すれば、毒性のあるA $\beta$ 凝集体の濃度を大幅に低減できる可能性がある。しかしながら、触媒6や7は光照射下では常に酸化活性を有するため、*in vivo*において生体分子への非特異的な反応とそれに起因する毒性発現が否めないと想定された。そこで、病原性の凝集A $\beta$  1-42に対して選択的に酸化活性を発現する新たな光触媒の開発を目指した。

蛍光色素であるチオフラビンT(8、ThT, Figure 5)が、クロス $\beta$ シート構造からなるアミロイド凝集体を特異的に検知し、蛍光を発することに着目した。8は、電子受容性のベンゾチアゾール部位と電子供与性のN,N-ジメチルアニリン部位が炭素-炭素単結合で連結した、ドナー/アクセプター型の蛍光分子である。クロス $\beta$ シート構造を有する凝集A $\beta$ が存在しないときは、8を光励起してもこの単結合が回転して、励起状態は無放射過程で基底状態に戻り、蛍光を発しない。一方、クロス $\beta$ シート構造が存在すると、8はこれに結合することでドナー/アクセプター間の単結合の回転自由度が低下し、その結果、励起状態の長寿命化がおこり、蛍光を放出しながら励起状態から基底状態に緩和する。この蛍光発光機構に基づき、クロス $\beta$ シート構造に結合したときのみ酸化触媒活性が発現する、新しい触媒9を設計した。

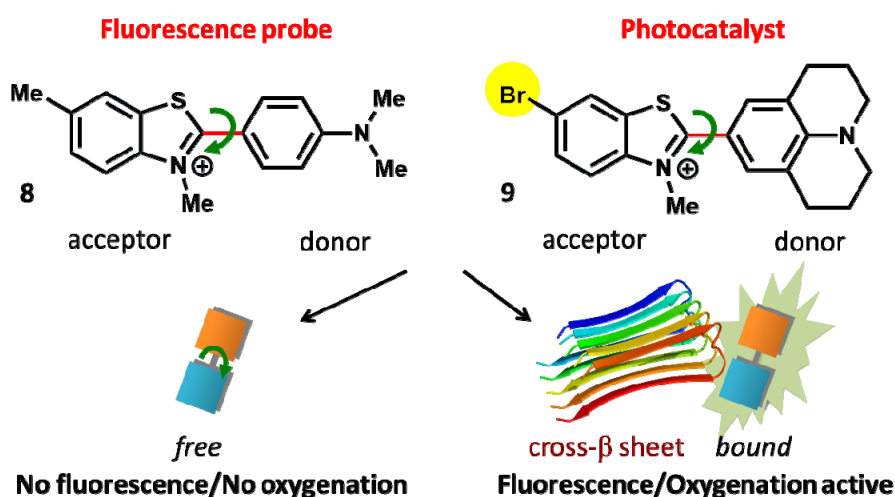
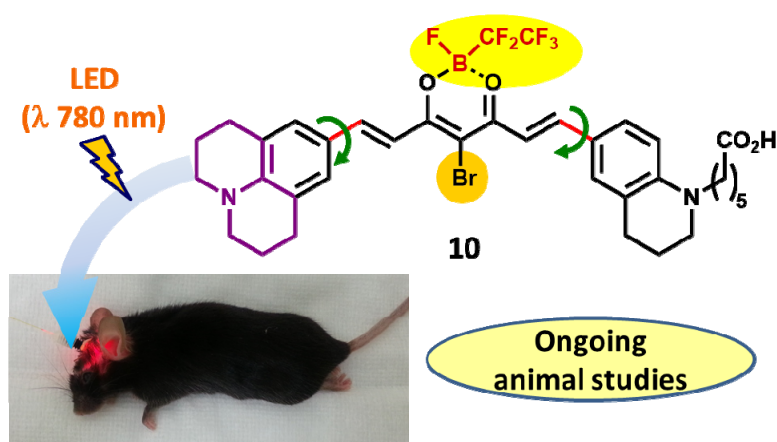


Figure 5. Target-Sensing Fluorescence Probe 8 and Catalyst 9

すなわち、蛍光分子8を光酸化触媒9へと改変するために、項間交差を促進する重原子である臭素原子をアクセプター側に導入した。また、細胞毒性の少ない長波長の光で励起できるよう、HOMO/LUMO間のエネルギー差を低下させるべく、ド

ナー性の高いジュロリジン部位を導入した。**8**と同様に、クロスβシート構造が存在しないときに触媒**9**を光励起しても、ドナー/アクセプター間の単結合の回転により緩和がおり、光酸化触媒活性は発現しない。一方で、**9**が凝集Aβのクロスβシート構造に結合すると、ドナー/アクセプター間の単結合の回転が阻害されるために励起状態の寿命が延長し、項間交差を経て励起三重項へと移行し、光酸素化活性が発現する。この機構 (Target-Sensing Catalyst Activation : TaSCAc) により、凝集Aβに対する高い反応選択性が実現できるものと期待した。実際、**9**は凝集Aβに対して極めて高い選択性を発現した<sup>5</sup>。

さらに、触媒**9**を改良して、生体にやさしく、組織透過性の高い近赤外光で活性化できる触媒**10**を創製した<sup>6</sup>。触媒**10**は、アルツハイマーモデルマウスの脳内で光酸素化反応を進行させて、凝集Aβを減少させた。現在、アルツハイマー病モデルマウスの脳におけるAβの光酸素化反応と、この人工化学反応の治療効果について検討を行っている。



**Figure 6.** Photooxygenation of Aβ in Living Mouse Brain Catalyzed by **10** Comprising TASCAC Switch under Near-Infrared Irradiation

#### 参考文献

1. (a) Amamoto, Y.; Aoi, Y.; Nagashima, N.; Suto, H.; Yoshidome, D.; Arimura, Y.; Osakabe, A.; Kato, D.; Kurumizaka, H.; Kawashima, S. A.; Yamatsugu, K.; Kanai, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7568. (b) Yamatsugu, K.; Kawashima, S. A.; Kanai, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* in press.
2. (a) 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. (b) Tanabe, K.; Liu, J.; Kato, D.; Kurumizaka, H.; Yamatsugu, K.; Kanai, M.; Kawashima, S. A. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2656.
3. Taniguchi, A.; Sasaki, D.; Shiohara, A.; Iwatsubo, T.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1382.
4. Arai, T.; Araya, T.; Sasaki, D.; Taniguchi, A.; Sato, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8236.
5. Taniguchi, A.; Shimizu, Y.; Oisaki, K.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 974.
6. Ni, J.; Taniguchi, A.; Ozawa, S.; Hori, Y.; Kuninobu, Y.; Saito, T.; Saido, T. C.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Chem* in press.