

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 3 月 9 日(09.03.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/038760 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 401/14 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/787 (2006.01) *C07K 1/13* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/075183
- (22) 国際出願日: 2016 年 8 月 29 日(29.08.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-169448 2015 年 8 月 28 日(28.08.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 金井 求(KANAI Motomu); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 川島 茂裕(KAWASHIMA Shigehiro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 山次 健三(YAMATSUGU Kenzo); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 天本 義史(AMAMOTO Yoshifumi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 青井

勇樹(AOI Yuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 須藤 宏城(SUTO Hiroki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 永島 臨(NAGASHIMA Nozomu); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 胡桃坂 仁志(KURUMIZAKA Hitoshi); 〒1628480 東京都新宿区若松町 2 - 2 学校法人早稲田大学 先端生命医学センター内 Tokyo (JP). 越阪部 晃永(OSAKABE Akihisa); 〒1628480 東京都新宿区若松町 2 - 2 学校法人早稲田大学 先端生命医学センター内 Tokyo (JP). 有村 泰宏(ARIMURA Yasuhiro); 〒1628480 東京都新宿区若松町 2 - 2 学校法人早稲田大学 先端生命医学センター内 Tokyo (JP).

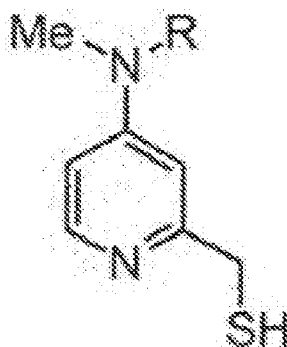
(74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所(CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031 東京都中央区京橋 2 - 8 - 2 1 喜久家ビル 9 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,

[続葉有]

(54) Title: ARTIFICIAL CATALYST SYSTEM FOR SELECTIVE ACYLATION OF CHROMOSOMAL PROTEIN

(54) 発明の名称: 選択的な染色体タンパク質のアシル化を行うための人工触媒システム



(57) Abstract: A compound having structure is an acyl-CoA activation catalyst capable of binding to a target acylation domain. An artificial catalyst system capable of acylating a chromosomal protein with high selectivity can be established successfully by utilizing a combination of the compound with acyl-CoA or a derivative thereof. (R represents an arbitrary molecule capable of binding to a target acylation domain.)

(57) 要約: 下記構造を有する化合物は標的アシル化領域結合性を有するアシル CoA 活性化触媒であり、アシル CoA 若しくはその誘導体との組み合わせを利用することで、高い選択性で染色体タンパク質をアシル化できる人工触媒システムを確立することに成功した。(Rは、標的アシル化領域への結合性を有する任意の分子を示す。)



WO 2017/038760 A1



MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー

ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

選択的な染色体タンパク質のアシル化を行うための人工触媒システム

技術分野

[0001] 本発明は、生体内のアシル化機能と置き換えられる人工触媒システムに関し、特に、選択的な染色体タンパク質のアシル化を行うための人工触媒システムに関する。

背景技術

[0002] 生体内におけるタンパク質翻訳後修飾は生体機能制御において大きな役割を担っている。翻訳後修飾にはメチル化、リン酸化など種々の反応があるが、代表的な例としてヒストンのアセチル化がある。ヒストンは、染色体を構成する主要なタンパク質であり、DNAを折りたたんで核内に収納する役割を持つだけでなく、ヒストン中のリジン残基がヒストンアセチル化酵素によるアセチル化やヒストン脱アセチル化酵素による脱アセチル化を受けることで、染色体構造とそれに伴う遺伝子転写の動的制御に積極的に関与している（非特許文献1）。

[0003] ヒストンのアセチル化の亢進が遺伝子転写の亢進につながることから、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害することによりがん抑制遺伝子の転写を促進する抗がん剤の開発が行われてきている。その代表例として、皮膚T細胞リンパ腫の薬剤であるZolinzaが挙げられる（非特許文献2）。

[0004] 疾病の治療を目的とした低分子医薬の多くは、生体が内在的に持つ酵素の機能調節、特に阻害によってその薬効を発揮する。しかしながら、このような作用を持つ低分子医薬を用いた手法では、酵素自体の欠損や失活が疾病の原因である場合、その治療効果が期待できないという問題がある。例えば、ある種のB細胞リンパ腫では内在性ヒストンアセチル化酵素が失活しているため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による処置では、アセチル化の亢進が期待できないことが危惧されている（非特許文献3）。

[0005] さらに、最近になり、ヒストンにおけるアセチル化以外のアシル化修飾として、マロニル化、スクシニル化、グルタリル化、ブチリル化、2-ヒドロキシイソブチリル化、ビオチニル化が見出され、これらの修飾がヒストンの構造や機能などに関係していることが示唆されている（非特許文献4～9）。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1: Brownell, J.E. et al., Cell 1996, 84, 843-851
非特許文献2: Richon, V.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 5705-5708
非特許文献3: Pasqualucci, L. et al., Nature 2011, 471, 189-195
非特許文献4: Xie, Z. et al., Mol Cell Proteomics. 2012 May;11(5), 100-107
非特許文献5: Peng, C. et al., Molecular & Cellular Proteomics 2011, 10, M111.012658.
非特許文献6: Tan, M.J. et al., Cell Metabolism 2014, 19, 605-617
非特許文献7: Chen, Y. et al., Molecular & Cellular Proteomics 2007, 6, 812-819
非特許文献8: Dai, L.Z. et al., Nature Chemical Biology 2014, 10, 365-370
非特許文献9: Stanley, J.S., Griffin, J.B. & Zemleni, J., European Journal of Biochemistry 2001, 268, 5424-5429

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 細胞は統合された化学反応の場であり、生命活動は触媒の一種である酵素の活性によって支えられている。従って、仮に、生体内の酵素機能と置き換えられる人工触媒システムが開発できれば、上記のような酵素の欠損や失活

に起因する疾患の治療を効果的に行うことが可能となる。そこで、本発明は、生体内の酵素機能と置き換えられる人工触媒システムを開発し、当該システムを細胞内に導入することにより、「触媒医療」という新たな概念に基づく医療を実現することを目的とする。

[0008] この「触媒医療」の一例として、本発明は、生体内のアシル化機能と置き換えられる人工触媒システムを提供することを目的とする。本発明は、特に、選択的な染色体タンパク質のアシル化を行うことが可能な人工触媒システムを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、まず、各種アセチル化剤について、細胞質タンパク質に対するアセチル化の選択性につき検討を行った。その結果、EG5-PTAやN-メトキシジアセトアミド（NMD）は多くのタンパク質を非選択的にアセチル化する一方、生体が用いているアセチル基供与体であるアセチルCoAやその類縁体であるTEG-Acは非選択的なアセチル化を引き起こさないことが判明した（図1B）。この事実は、仮に、アセチルCoAのような非選択的反応の抑えられた低反応性アセチル基供与体を活性化しうる触媒を開発できれば、高い選択性でアセチル化し得る人工触媒システムの構築が可能であることを意味する。

[0010] そこで、本発明者らは、アセチルCoAを活性化しうる触媒について鋭意検討を行い、遂に新規触媒DMAP-SH(以下、「DSH」と略すことがある)を用いたアセチルCoA活性化機構を構想するに至った（図2）。この機構においては、DSHに導入されたチオール基がアセチルCoAのチオエステル基とチオール-チオエステル交換反応を起こすことにより、DSHがアセチル基を触媒分子内に取り込み、分子内反応を経てアセチル基を活性化する。ここで、本発明者らは、さらに、DSHに染色体上の特定領域に結合性を有する分子を導入し、DSHを標的部位の周辺領域に結合させることにより、高い選択性で標的部位をアセチル化しうるのではないかと考えた。

[0011] そこで、DNA配列特異的認識結合分子であるピロールイミダゾールポリアミ

ド (PIP) (Dervan, P.B., Bioorganic & Medicinal Chemistry 2001, 9, 2215-2235) とヒストンタンパク質結合分子であるLANA (Barbera, A. J. et al., Science 2006, 311, 856-861) を導入した触媒 (それぞれ「LANA-DSH」、「PIP-DSH」と称する) を合成し、それらを用いて上記構想の実現性の検証を行った。

[0012] まずタンパク質選択性について評価した結果、LANA-DSHあるいはPIP-DSHを用いることでヒストン選択的にアセチル化できることが判明した (図3A)。アセチルCoAに代えて、アセチルCoAの一部を切り出した誘導体を用いて実験を行った場合でも、同様にヒストン選択的なアセチル化が認められた。

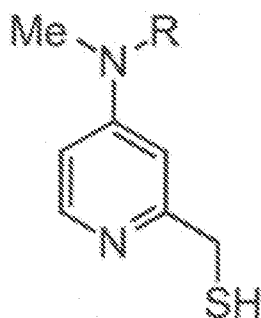
[0013] 次に、ヒストン中のリジン残基間選択性について評価したところ、LANA-DSHにおいては特にヒストンH2Bの120番目のリジン残基 (H2BK120) が、PIP-DSHにおいては特にヒストンH3の36番目のリジン残基 (H3K36) および56番目のリジン残基 (H3K56) およびヒストンH4の77番目のリジン残基 (H4K77) がアセチル化されていることが判明した (図3B、5、6)。これらアセチル化部位は、X線結晶構造から導かれるヌクレオソーム上のLANAとPIPの結合部位の近傍であった (図7、8)。以上から、標的アセチル化領域に結合性を有する分子が導入されたDSHとアセチルCoAとを組み合わせることで、標的部位を高い選択性でアセチル化できることが実証された。

[0014] さらに、本発明者らは、上記触媒と組み合わせるアシル基供与体として、アセチルCoA以外の各種アシルCoAを用いて検証した結果、マロニル化、グルタリル化、ブチリル化、2-ヒドロキシイソブチリル化、ピオチニル化といったアセチル化以外の各種アシル化を選択的に行うことも可能であることを見出した (図9)。

[0015] すなわち、本発明は、標的アシル化領域への結合性を有する新規なアシルCoA活性化触媒 (以下、「標的アシル化領域結合性触媒」と称する)、並びに当該触媒とアシルCoA若しくはその誘導体との組み合わせを利用した高選択性染色体タンパク質アシル化システムに関し、より詳しくは、以下を提供するものである。

[0016] (1) 下記構造を有する化合物。

[0017] [化1]



[0018] (Rは、標的アシル化領域への結合性を有する任意の分子を示す。)

(2) (1) に記載の化合物とアシルCoA若しくはその誘導体との組み合わせを含む、染色体タンパク質をアシル化するための薬剤。

発明の効果

[0019] 本発明により、標的アシル化領域結合性触媒とアシルCoA若しくはその誘導体との組み合わせを用いた高選択性染色体タンパク質アシル化システムが提供された。生体内で他のタンパク質との相互作用などを通じて機能を発揮している酵素の機能を、このような人工的な触媒システムで置き換えることができたということは、それ自体、極めて画期的で驚くべきことである。

[0020] 本発明の人工触媒システムにおいては、触媒に導入する標的アシル化領域結合性分子を変更するだけで、アミノ酸残基レベルでアセチル化部位を自由に選択することができる。また、同一の触媒を用いながら、組み合わせるアシルCoA若しくはその誘導体の種類を変更するだけで、標的部位において、アセチル化やマロニル化などを含む各種のアシル化を行うことができる。従って、本発明の人工触媒システムは、高い汎用性と優れた実用性をも兼ね備えたシステムであるといえる。

[0021] 本発明の人工触媒システムにより誘導されるアシル化は、生体内の酵素に非依存的であることから、当該システムにより、生体内の酵素を標的とした従来の医薬品とは本質的に作用機序が異なる新たな医療を提供することができる。これにより、例えば、染色体タンパク質のアシル化の異常に起因する

疾患の治療において、従来の医薬品では治療効果を発揮し得ない患者をも対象とした医療への途を切り開くことができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]アセチル基供与体の構造と反応性の比較を示す図である。Aは、各アセチル基供与体の構造を示し、Bは、細胞質タンパク質に対する各アセチル基供与体の反応性の比較を示す写真である。

[図2]本発明の触媒（DSH）の基本構造とその反応機構を示す図である。Aは、本発明の触媒（DSH）の基本構造を示し、Bは、DSHによるアセチルCoAの想定活性化機構を示す。

[図3]本発明の触媒（PIP-DSHとLANA-DSH）による再構成ヌクレオソームのアセチル化能を解析した結果を示す図である。Aは、タンパク質選択的アセチル化を検出した結果を示す写真であり、Bは、リジン残基選択的アセチル化を検出した結果を示す写真である。

[図4]LC-MS/MSによる収率決定およびリジン残基選択性の網羅的解析の概要を示す図である。

[図5]本発明の触媒（LANA-DSH）による再構成ヌクレオソームのアセチル化を網羅的に検出した結果を示す図である。

[図6]本発明の触媒（PIP-DSH）による再構成ヌクレオソームのアセチル化を網羅的に検出した結果を示す図である。

[図7]本発明の触媒（LANA-DSH）に利用したLANAのヌクレオソーム上の局在が表現されたX線結晶構造を示す図である。

[図8]本発明の触媒（PIP-DSH）のヌクレオソーム上の局在が表現されたX線結晶構造を示す図である。この局在は、PIPの配列から予測した。

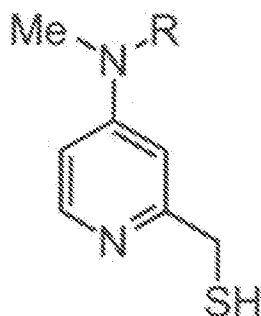
[図9]本発明の触媒（LANA-DSH）による各種アシル化能を解析した結果を示す図である。上は、各種アシル化を検出した結果を示す写真であり、下は、各種アシル化後のリジン残基の構造を示す。

発明を実施するための形態

[0023] <標的アシル化領域結合性触媒>

本発明は、標的アシル化領域結合性触媒、具体的には、下記の構造を有する化合物を提供する。

[0024] [化2]



[0025] (Rは、標的アシル化領域への結合性を有する任意の分子を示す。)

本発明の標的アシル化領域結合性触媒は、本発明の人工触媒システムの一つの構成要素であり、アシルCoA若しくはその誘導体との組み合わせで、高い選択性でタンパク質のアシル化を行うことができる。

[0026] 本発明において「アシル化」とは、置換可能な水素原子をもった官能基にアシル基を導入することを意味する。本発明におけるアシル化としては、例えば、アセチル化、マロニル化、グルタリル化、ブチリル化、2-ヒドロキシイソブチリル化、ピオチニル化が挙げられるが、これらに制限されない。

[0027] 本発明において「標的アシル化領域」とは、標的アシル化部位およびその周辺領域を意味する。ここで「周辺領域」とは、本発明の触媒が結合した場合に標的アシル化部位においてアシル化反応が生じる程度に、標的アシル化部位との近接性を有する領域を意味する。合成した触媒が標的アシル化部位の周辺領域に結合性を有するか否かは、例えば、本実施例に記載の方法で、合成した触媒が標的アシル化部位をアシル化しうるか否かで評価すればよい。

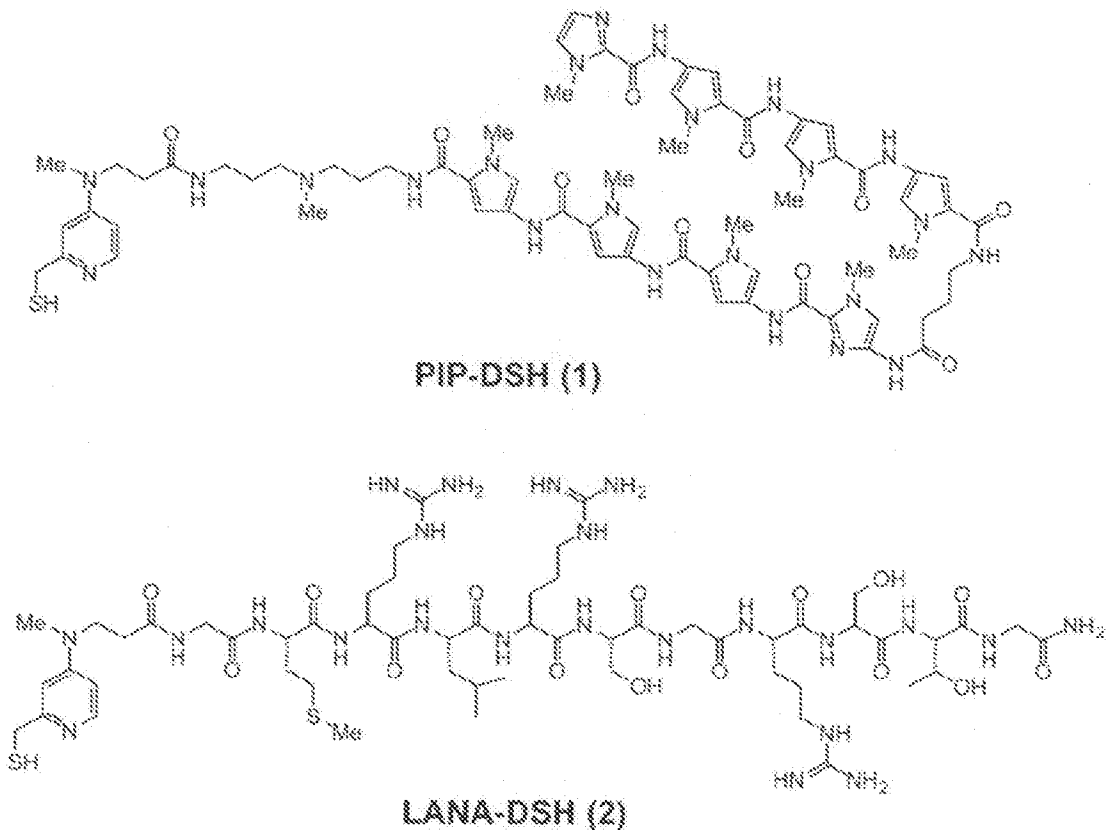
[0028] 標的アシル化部位が特定の染色体タンパク質内に存在する場合、本発明の触媒は、当該標的アシル化部位の周辺領域に存在する染色体DNAに結合しても、当該標的アシル化部位の周辺領域に存在する染色体タンパク質に結合しても、それら両方に結合してもよい。

[0029] 本発明の標的アシル化領域結合性触媒には、標的アシル化領域への結合性を有する任意の分子を導入することができることから、当該分子の構造に応じて、標的アシル化領域を複数箇所設定することもできる。

[0030] 標的アシル化領域への結合性を有する分子を、標的アシル化領域結合性触媒に導入する場合、リンカーを介して導入してもよい。リンカーとしては、合成される標的アシル化領域結合性触媒における標的アシル化領域への結合能とアシルCoA若しくはその誘導体の活性化能を阻害しない限り、特に制限はない。

[0031] 本発明の標的アシル化領域結合性触媒の2つの例を以下に示す。

[0032] [化3]



[0033] PIP-DSHは、染色体DNAに結合する本発明の触媒の一態様である。PIPは、DNA配列特異的認識結合分子であり、分子構造内にピロールとイミダゾールを適切に配置することによって、任意の塩基配列特異性を付与することが可能である。従って、標的アシル化部位の周辺領域に存在する染色体DNA上の塩基配

列を基にPIPを分子設計して、本発明の触媒に導入することにより、当該標的アシル化部位におけるアシル化を効率的に行うことができる。本実施例において用いたPIP-DSHでは、特に、ヒストンH3の36番目のリジン残基（H3K36）および56番目のリジン残基（H3K56）およびヒストンH4の77番目のリジン残基（H4K77）がアシル化されたが、当業者であれば、PIP内のピロールとイミダゾールの配置を適宜変更することにより、他のリジン残基を標的としてアシル化しうることは理解されたい。

[0034] 一方、LANA-DSHは、染色体タンパク質に結合する本発明の触媒の一態様である。LANAは、ヒストンタンパク質結合分子であり、そのN末端領域がクロマチンのH2A-H2Bダイマーと結合する（図7）。従って、本発明の触媒にLANAを導入することにより、上記結合部位の周辺に存在するアシル化部位、特にヒストンH2Bの120番目のリジン残基（H2BK120）をアシル化することができる。

[0035] 標的アシル化領域への結合性を有する分子としては、上記以外にも、例えば、ペプチド核酸（PNA）、アプタマー、あるいはCRISPR-Cas9システムのガイドRNAなどの利用も考えられる。ペプチド核酸（PNA）は、DNAの塩基と相補鎖を形成してDNA配列特異的に結合する分子である（Hyrup B. & Nielsen P.E., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1996, 1, 5-23）。アプタマーは、標的に結合するような3次構造を持ったDNAあるいはRNA鎖であり、ヒストンテイルに結合するDNAアプタマーが報告されている（Hanyang Yu, et al., *ChemBioChem* 2011, 12, 2659-2666）。CRISPR-Cas9システムのガイドRNAは、標的DNAと相補鎖塩基対を形成することで、DNA配列特異的に標的へと結合する（Hsu P.D. et al., *Cell* 2014, 157, 1262-1278）。本発明の触媒にこれらの分子を導入することで、染色体タンパク質における様々な部位をアシル化の標的とすることができる。

[0036] 本発明の標的アシル化領域結合性触媒は、導入されたチオール基がアセチルCoAのチオエステル基とチオール-チオエステル交換反応を起こすことにより、アセチル基を触媒分子内に取り込み、分子内反応を経てアセチル基を活性化する（図2）。この活性化機構により、アセチルCoA以外の各種アシルCoA

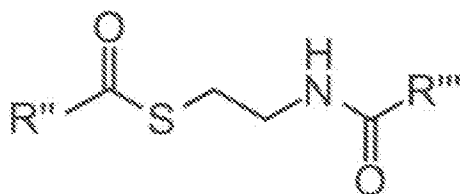
を活性化することもできる（図9）。

[0037] <組み合わせ剤>

本実施例において、標的アシル化領域結合性触媒とアシルCoA若しくはその誘導体との組み合わせにより、染色体タンパク質をアシル化できることが見出された。従って、本発明は、上記標的アシル化領域結合性触媒とアシルCoA若しくはその誘導体との組み合わせを含む、染色体タンパク質をアシル化するための薬剤を提供する。また、本発明は、当該組み合わせを用いる、染色体タンパク質をアシル化する方法を提供する。

[0038] ここで「アシルCoAの誘導体」とは、アシルCoAの構造の一部が修飾された化合物であって、標的アシル化領域結合性触媒により活性化されることによりアシル基供与体として機能する化合物を意味する。アシルCoAの誘導体は、典型的には、以下の構造を有する。

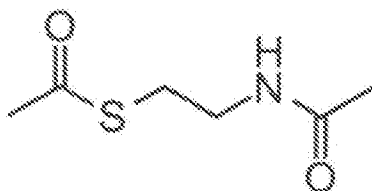
[0039] [化4]



[0040] ここで、R''およびR'''は、任意の置換基を示す。R''は、アシル基を構成する置換基であり、目的とするアシル化の種類に応じて適宜選択すればよい。R'''としては、上記化合物が標的アシル化領域結合性触媒により活性化されることによりアシル基供与体として機能することを阻害しない限り、特に制限はない。

[0041] 本実施例に用いたアシルCoA誘導体（アセチルCoA誘導体）の一例を以下に示す。

[0042] [化5]



- [0043] 当該アセチルCoA誘導体が、アセチルCoAと同様に、アセチル基供与体として機能することが本実施例により証明されている。この事実は、アシル基供与体として機能する上でR'の構造の自由度が高いことを示すものである。
- [0044] アシル化される「染色体タンパク質」は、主としてヒストン（例えば、ヒストンH3およびH4）である。本発明の標的アシル化領域結合性触媒は、上記の通り、標的アシル化部位に応じて理論的な設計が可能であり、染色体上の様々な部位に結合特異性をもたせることができる。従って、ヒストン以外の染色体タンパク質のアシル化を目的とした利用も可能である。
- [0045] 染色体タンパク質のリジン残基のアシル化は、例えば、抗アシル化リジン抗体を用いたウェスタンブロッティング法により評価することが可能である（「材料と方法」における「ウェスタンブロッティング」の項を参照のこと）。特定のリジン残基（例えば、H3K56、H4K77）のアシル化を評価する場合には、アシル化された当該特定のリジン残基に特異的な抗体を用いればよい。
- [0046] 本発明の薬剤は、染色体タンパク質のアシル化のための試薬として、また、染色体タンパク質のアシル化の低下に起因する疾患などの治療のための医薬として用いることができる。
- [0047] 染色体タンパク質のアシル化（特にアセチル化）とがんとの関係が知られていることから、「染色体タンパク質のアシル化の低下に起因する疾患」は、好ましくはがんである。ある種のB細胞リンパ腫では内在性ヒストンアセチル化酵素が失活しているため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による処置では、アセチル化の亢進が期待できないことが危惧されている（Pasqualucci, L. et al., Nature 2011, 471, 189-195）。本発明の薬剤によれば、内在性ヒストンアセチル化酵素が失活している場合でも、その機能を補うことが可能であり、従来のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤ではなし得ない薬効を発揮することができる。
- [0048] また、本発明の薬剤は、他の抗がん剤や他のがん治療法（例えば、放射線療法、免疫療法）と併用してもよい。ヒストンのアセチル化がクロマチン構

造を弛緩させることによりDNAの露出度を増大させ、DNA傷害性薬剤や放射線に対する染色体DNAの感受性を高めることが示唆されている (Oleinick et al., Int. J. Radiat. Biol. 1994, 66, 523-529、Gorisch SM, et al., J Cell Sci 2005, 118, 5825-5834、Camphausen K, et al. Int J Cancer 2005, 114, 380-366、Karagiannis TC & El-Osta A. Oncogene 2006, 25, 3885-3893、Kim MS, et al., Exp Cell Res 2005, 306, 94-102、Kim MS, et al., Cancer Res 2003, 63, 7291-7300、Piacentini P, et al., Virchows Arch 2006, 448, 797-804)。本発明の薬剤は、染色体タンパク質に作用して、標的部位のクロマチン構造を弛緩させることが考えられることから、DNAを標的とする薬剤（例えば、DNA傷害作用を有する抗がん剤）やDNAを標的とする治療法（例えば、放射線療法）と併用すれば、相乗効果も期待できる。

[0049] 本発明の薬剤は、治療上の有用な特性を増進する補助部分と結合してもよい。代表的な有用な特性としては、例えば、標的領域(例えば、腫瘍)に対する化合物の送達を促進すること、標的領域において化合物の治療濃度を持続させること、化合物の薬物動態特性や薬力学的特性を改変すること、または化合物の治療指数または安全性プロファイルを改善すること、が挙げられる。

[0050] 本発明の薬剤を医薬として用いる場合には、有効成分である標的アシル化領域結合性触媒およびアシルCoA若しくはその誘導体を、公知の製剤学的方法で製剤化することができる。本発明の薬剤が標的アシル化領域結合性触媒とアシルCoA若しくはその誘導体との「組み合わせを含む」とは、標的アシル化領域結合性触媒とアシルCoA若しくはその誘導体の双方を有効成分として含む単剤の形態であっても、標的アシル化領域結合性触媒を有効成分とする製剤とアシルCoA若しくはその誘導体を有効成分とする製剤との併用剤の形態であってもよいことを意味する。

[0051] 製剤化において用いられる薬理学上許容される担体としては、例えば、滅菌水や生理食塩水、植物油、溶剤、基剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安

定剤、香味剤、芳香剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、無痛化剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤などが挙げられるが、これらに制限されない。上記有効成分は、治療目的などに応じて、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤などの各種形態とすることができる。また、リポソーム送達系の形態で投与することもできる。当該リポソームには、治療上の有用な特性を増進する上記補助部分（例えば、抗体やリガンドなど）を付加することもできる。

[0052] 患者への投与は、経口的な投与でも非経口的な投与でも可能である。非経口的な投与としては、例えば、静脈投与、動脈投与、筋肉内投与、胸腔内投与、腹腔内投与、標的部位（例えば、腫瘍）への直接投与などが挙げられる。本発明の薬剤が併用剤の場合には、各製剤は、同時に投与されてもよく、また、併用の効果を減殺しない範囲内で時間差をおいて投与されてもよい。

[0053] 投与量は、目的の疾患を治療するのに有効な量であれば特に制限はなく、患者の年齢、体重、症状、健康状態、疾患の進行状況などに応じて、適宜選択すればよい。投与頻度としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、1日あたりの投与量を、1日に1回で投与してもよいし、複数回に分けて投与してもよい。本発明の薬剤をヒトに投与する場合、有効成分の投与量の範囲は、1日当たり、通常、約0.01mg/kg体重～約500mg/kg体重、好ましくは、約0.1mg/kg体重～約100mg/kg体重である。ヒトに投与する場合、好ましくは、1日あたり1回、あるいは2～4回に分けて投与され、適当な間隔で繰り返すことが好ましい。

[0054] なお、本発明の薬剤をアシル化のための試薬として用いる場合、上記有効成分の他、必要に応じて、滅菌水や生理食塩水、緩衝剤、保存剤など、試薬として許容される他の成分を含むことができる。当該試薬は、目的に応じた対象（例えば、細胞やその分画物、組織、実験動物など）に投与して、染色体タンパク質をアシル化させることができる。

実施例

[0055] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0056] [A. 材料と方法]

1. 細胞分画

約 10^6 個の細胞をトリプシン処理により培養ディッシュより剥がし、PBSで洗浄後、細胞ペレットを冷却したcell lysis buffer [50mM Tris(pH7.5), 300mM NaCl, 0.3% Triton X-100, protease inhibitor cocktail および1mM PMSF]で懸濁し、30分氷上に静置した。遠心 (4°C, 1500rpmで2分間) 後、上清を細胞質画分として回収した。

[0057] 2. ウェスタンブロッティング

タンパク質を4-20% SDS-PAGEゲルで分離し、PVDF膜に転写した後、TBSTに懸濁した5%スキムミルクによりブロッキングを行い、PVDF膜に1次抗体を反応させた。用いた1次抗体は以下の通りである。

[0058] Acetylated-lysine antibody(#9441, Cell Signaling), anti-acetyl histone H4(Lys77)(ABE186, Millipore), anti-acetyl histone H2B(Lys120)(ab176430, Abcam), malonylated-lysine antibody(PTM-901, PTM Biolabs), glutarylated-lysine antibody(PTM-1151, PTM Biolabs), butyrylated-lysine antibody(PTM-301, PTM Biolabs), 2-hydroisobutyrylated antibody(PTM-801, PTM Biolabs), streptavidin-HRP(#3999S, Cell Signaling)。

[0059] TBSTで洗浄後、2次抗体 (Anti-Rabbit IgG, HRP-linked, NA934V, GE) と反応を行った。化学発光検出試薬Luminata Forte Western HRP Substrate(Millipore)によりPVDF膜を処理し、ImageQuantLAS 4000(GE healthcare life sciences)で検出を行った。

[0060] 3. アセチル基供与体の反応性の比較

緩衝液 (50mM HEPES, 150mM NaCl, 0.01% Triton, pH7.5) に細胞質画分 (20%) とアセチル基供与体 (1mM) を加え、室温で10時間反応させた後、抗アセチルリジン抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

[0061] 4. タンパク質およびリジン残基選択的アシル化反応

再構成ヌクレオソーム (33 μ g/mL 601 DNA) および細胞質画分 (15%) を含む緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH7.5) に、Ligand-DSH (2~5 μ M), アシルCoA (1mM), TCEP (100 μ M) を加え、室温で5時間反応させた後、ウエスタンブロッティングを行った。

[0062] 5. LC-MS/MSによる収率決定およびリジン残基選択性の網羅的解析

(1) サンプル調製

Ligand-DSH (2 μ M), アセチルCoA (1mM), TCEP (100 μ M) を緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH7.5) 中で1時間反応させた後、再構成ヌクレオソーム (33 μ g/mL 601 DNA) を加えてさらに5時間反応させた (最終液量150 μ L)。冷却したトリクロロ酢酸 (30 μ L) を加えて、氷上で30分間静置し、遠心後 (4°C, 15000 rpmで5分間) 上清を捨てた。さらに遠心 (4°C, 15000 rpmで1分間) して再度上清を捨てた。冷却したアセトン (450 μ L) を加え、遠心後 (4°C, 15000 rpmで5分間) 上清を捨て、さらに遠心 (4°C, 15000 rpmで1分間) して再度上清を捨てた。これをもう一度繰り返した。遠心エバポレーターで10分間乾燥した後、MilliQ (89 μ L), 10X DNase buffer (10 μ L), DNase I (1 μ L, #2270A, Takara) を加えて、37°Cで30分間反応させた。1M硫酸 (25 μ L) を加えて氷上で1時間静置した後、遠心 (4°C, 15000 rpmで5分間) して上清を回収した。再び遠心 (4°C, 15000 rpmで1分間) して上清を回収し、先の上清と合わせた。そこに冷却したアセトン (500 μ L) を加えてよく攪拌したのち、-30°Cで一晩静置した。遠心後 (4°C, 15000 rpmで5分間) 上清を捨て、さらに遠心 (4°C, 15000 rpmで1分間) して再度上清を捨てた。遠心エバポレーターで10分間乾燥した後、重炭酸アンモニウム水溶液 (0.1M, 20 μ L) を加え、そこに直前に調製したプロピオン酸無水物とメタノールの混合物 (1:3, 20 μ L) を加え、さらにアンモニア水 (15 μ L) を加えて室温で30分間静置した。遠心エバポレーターで75分間乾燥した後、消化酵素で処理した。

[0063] トリプシンの場合：重炭酸アンモニウム水溶液 (0.1M, 50 μ L) およびトリプシン (1 μ g) を加えて37°Cで21時間反応させた。

[0064] キモトリプシンの場合：100mM Tris-HCl, 10mM CaCl₂(50 μL, pH8.0)およびキモトリプシン (8 μg) を加えて25℃で21時間反応させた。

[0065] 5% ギ酸水溶液 (25 μL) を加えた後、遠心エバポレーターで75分間乾燥した。残渣を0.1% ギ酸水溶液 (15 μL) に溶かし、これをLC-MS/MSに用いた。

[0066] (2)LC-MS/MSのセットアップ

AB Sciex Triple TOF 4600

Eksigent ekspert™ MicroLC 200

カラム: 3C18-CL-120(0.3mm ID x 150mm)

直線勾配 2%-35%アセトニトリル/0.1%ギ酸, 25分, 5 μL/分

サンプル量: 5 μL

ESI-Q-TOF MS, positive-ion mode.

(3)収率の決定方法

収率の決定方法の概要を図4に示した。

[0067] Method A

プリカーサーイオンを指定し、それぞれのプリカーサーイオンに対し最も強度の高い2つから4つのMS/MSフラグメントイオンを選択した。指定したプリカーサーイオンおよびMS/MSフラグメントイオンでイオン抽出 (±0.5Da) し、以下の式に従って収率を算出した。それを選択したMS/MSフラグメントの全てについて行い、それらの平均を最終収率として決定した。

[0068] 収率 (%) = $[A / (A + P)] \times 100$

(ここで、Aはアセチル化ペプチドのピークエリアを示し、Pはプロピオニル化ペプチドのピークエリアを示す)

ひとつのペプチド断片に3つのリジンを含む場合、中央のリジンの収率は [端2つのリジンどちらかにアセチル化が進行した収率-最端のリジンの収率] として計算した。

[0069] 用いたプリカーサーイオンおよびフラグメントイオンは以下の通り。

[0070]

[表1]

残基	消化酵素	ペプチド断片	プリカーサーイオン (Pr/Ac)	フラグメントイオン
H2AK13	Trypsin	12-17	393.75/398.74	b ₁ , y ₁ , y ₂
H2AK15	Trypsin	12-17	393.75/398.74	b ₁ , y ₁ , y ₂
H2AK36	Trypsin	36-42	438.22/455.22	y ₁ , y ₂ , y ₃ , y ₄
H2AK118	Chymotrypsin	116-123	594.82/587.81	b ₁ , y ₁
H2AK119	Chymotrypsin	116-123	594.82/587.81	b ₁ , y ₁
H2BK108	Chymotrypsin	107-121	586.65/581.98	b ₁ , b ₂ , b ₃ , b ₄
H2BK116	Chymotrypsin	107-121	586.65/581.98	b ₁ , b ₂ , b ₃ , b ₄
H2BK120	Chymotrypsin	107-121	586.65/581.98	b ₁ , y ₁ , y ₂ , y ₃
H3K9	Trypsin	9-17	507.29/500.28	b ₁ , y ₁ , y ₂ , y ₃
H3K14	Trypsin	9-17	507.29/500.28	b ₁ , y ₁ , y ₂ , y ₃
H3K37	Trypsin	27-40	534.64/529.97	b ₁ , y ₁ , y ₂ , y ₃
H3K38	Trypsin	27-40	534.64/529.97	b ₁ , y ₁ , y ₂ , y ₃
H4K37	Trypsin	27-40	534.64/529.97	b ₁ , y ₁
H3K56	Trypsin	54-63	653.87/648.86	b ₁ , y ₁ , y ₂ , y ₃
H4K77	Trypsin	68-78	439.56/444.89	y ₁ , y ₂ , y ₃ , y ₄

[0071] Method B

Information Dependent Acquisition Modeで測定を行うことで得られたクロマトグラムに対し、プリカーサーイオンを指定してイオン抽出 ($\pm 0.5\text{Da}$) したピークエリアから以下の式に従って収率を決定した。

[0072] 収率 (%) = $[A / (A + P)] \times 100$

(ここで、Aはアセチル化ペプチドのピークエリアを示し、Pはプロピオニル

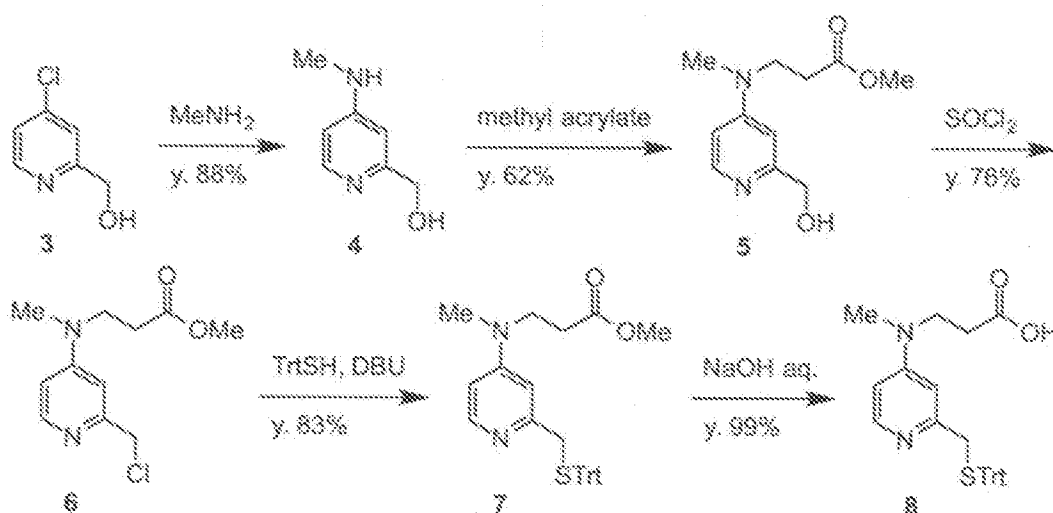
化ペプチドのピークエリアを示す)

Method C

Information Dependent Acquisition Modeで測定を行うことで得られたクロマトグラムにおいて、プロピオニル化ペプチド断片は観測されるが、アセチル化ペプチド断片は観測されなかった。このため、サンプルを希釈することでプロピオニル化ペプチド断片の検出限界を算出し、アセチル化収率はその検出限界以下であるとして見積もった。

[0073] (4)合成

[0074] [化6]



[0075] (4-(Methylamino)pyridin-2-yl)methanol (4):

化合物3 (2.30g, 16.0mmol) を12Mメチルアミン水溶液 (26.7ml) に溶解し、封管中、120度で18時間加熱した。溶媒を減圧留去したのち、残渣を塩化メチレン/メタノール溶液 (4/1) に溶解し、炭酸カリウム (5g) を加えて4時間攪拌した。炭酸カリウムを濾過により除き、ろ液を濃縮することで化合物4 (2.01g, 14.5mmol, 88%収率) を得た。

[0076] ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz) δ 7.90(d, J = 6.2Hz, 1H), 6.67(d, J = 2.8Hz, 1H), 6.38(dd, J = 2.8, 6.2Hz, 1H), 4.51(s, 2H), 2.80(s, 3H); ^{13}C NMR(CD_3OD , 100 MHz) δ 161.7, 157.7, 148.9, 106.6, 104.3, 65.4, 29.2; ESI-MS m/z 139 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Methyl 3-((2-(hydroxymethyl)pyridin-4-yl)(methyl)amino)propanoate (5):

化合物4 (1.38g, 10.0mmol) をアクリル酸メチル (22.5ml) に溶解し、80度で18時間加熱した。溶媒を減圧留去したのち、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/メタノール=1/0~0/1) で精製し、化合物5 (1.39g, 6.20mmol, 62%収率) を得た。

[0077] ^1H NMR(CD_3OD , 400MHz) δ 7.96(d, J = 6.2Hz, 1H), 6.77(d, J = 2.8Hz, 1H), 6.51(dd, J = 2.8, 6.2Hz, 1H), 4.52(s, 2H), 3.71(t, J = 7.3Hz, 2H), 3.61(s, 3H), 2.98(s, 3H), 2.58(t, J = 7.3Hz, 2H); ^{13}C NMR(CD_3OD , 100 MHz) δ 173.8, 161.8, 155.9, 149.1, 106.5, 104.1, 65.4, 52.3, 48.2, 37.9, 32.4; ESI-MS m/z 225 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Methyl 3-((2-(chloromethyl)pyridin-4-yl)(methyl)amino)propanoate (6):

化合物5 (640mg, 2.85mmol) を塩化メチレン (14.0ml) に溶解し、塩化チオニル (0.311ml, 4.28mmol) をゆっくりと滴下した。室温で10時間攪拌した後、炭酸カリウム水溶液を注意深く加え、水層を塩化メチレンで抽出、有機層を濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/メタノール=1/0~0/1) で精製し、化合物6 (529mg, 2.18mmol, 76%収率) を得た。

[0078] ^1H NMR(CD_3OD , 500MHz) δ 8.04(d, J = 6.3Hz, 1H), 6.80(d, J = 2.3Hz, 1H), 6.61(dd, J = 2.3, 6.3Hz, 1H), 4.54(s, 2H), 3.75(t, J = 6.9Hz, 2H), 3.65(s, 3H), 3.02(s, 3H), 2.62(t, J = 6.9Hz, 2H); ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz) δ 173.8, 157.6, 156.0, 149.7, 109.0, 107.5, 52.3, 48.2, 47.4, 37.9, 32.4; ESI-MS m/z 243 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Methyl 3-(methyl(2-((tritylthio)methyl)pyridin-4-yl)amino)propanoate (7):

化合物6 (922mg, 3.80mmol) を塩化メチレン (19.0ml) に溶解し、TrtSH

(1.58g, 5.72mmol) およびDBU (0.852ml, 5.70mmol) を加え、室温で10時間攪拌した。炭酸カリウム水溶液を注意深く加え、水層を塩化メチレンで抽出、有機層を濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（酢酸エチル/ヘキサン=1/1～酢酸エチル/メタノール=20/1）で精製し、化合物7（1.53g, 3.17mmol, 83%収率）を得た。

[0079] ^1H NMR(CD_3OD , 500MHz) δ 7.90(d, J = 6.3Hz, 1H), 7.40–7.38(m, 6H), 7.22–7.19(m, 6H), 7.14–7.11(m, 3H), 6.38(dd, J = 2.3, 6.3Hz, 1H), 6.08(d, J = 2.3Hz, 1H), 3.56(s, 3H), 3.51(t, J = 6.9Hz, 2H), 3.33(s, 2H), 2.78(s, 3H), 2.43(t, J = 6.9Hz, 2H); ^{13}C NMR(CD_3OD , 125MHz) δ 173.5, 158.1, 155.3, 149.4, 145.9, 130.8, 129.0, 127.9, 107.1, 106.4, 68.6, 52.3, 48.0, 39.6, 37.8, 32.3; ESI-MS m/z 483 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

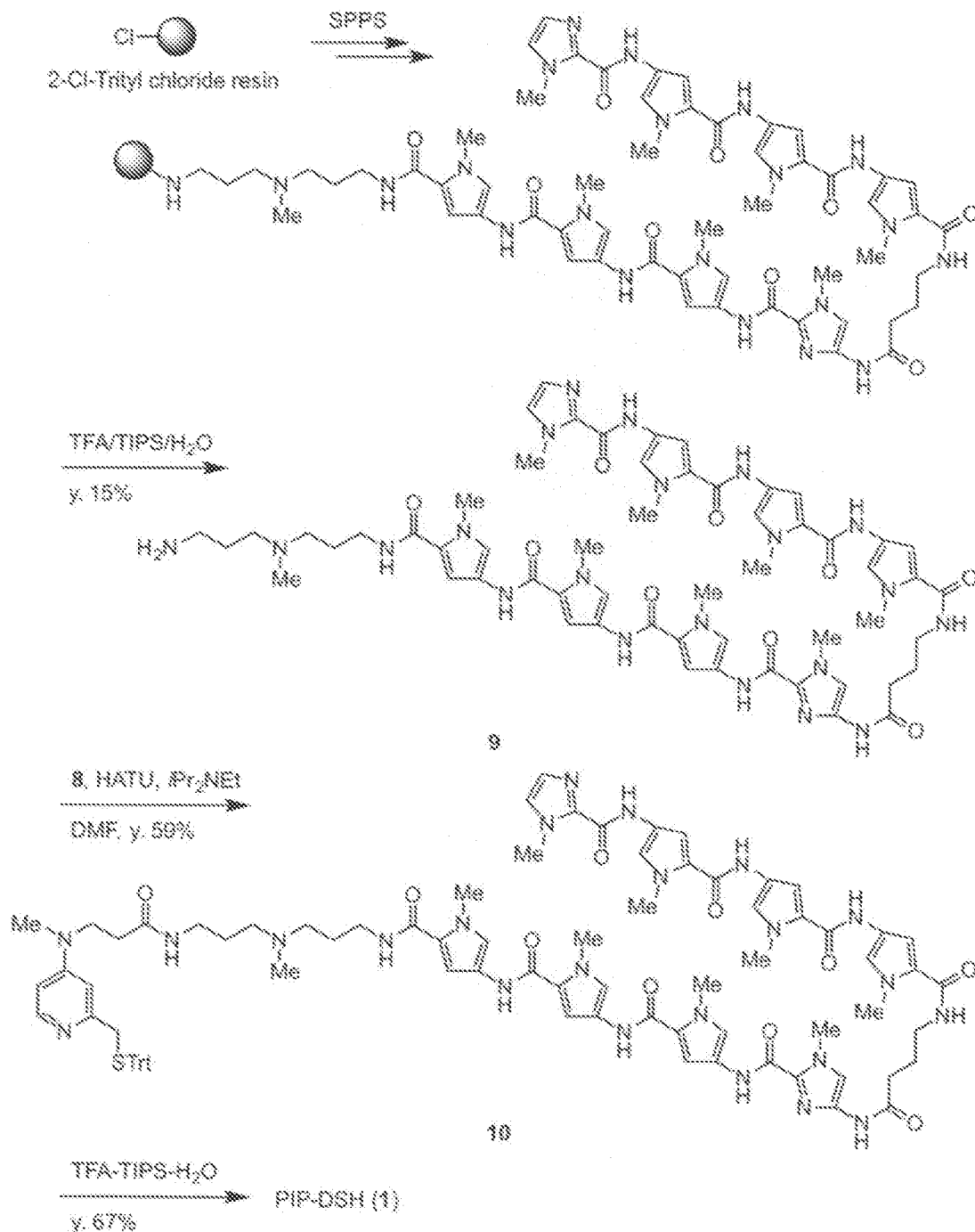
3-(Methyl(2-((tritylthio)methyl)pyridin-4-yl)amino)propanoic acid (8):

化合物7（1.45g, 3.00mmol）をメタノール（15ml）に溶解し、2M水酸化ナトリウム水溶液（7.50ml, 15.0mmol）を加えて、室温で3時間攪拌した。1M塩酸で中和した後、溶媒を留去し、シリカゲルクロマトグラフィー（酢酸エチル/メタノール=4/1～1/2）で精製し、化合物8（1.39g, 2.97mmol, 99%収率）を得た。

[0080] ^1H NMR(CD_3OD , 500MHz) δ 7.79(d, J = 6.9Hz, 1H), 7.36–7.34(m, 6H), 7.24–7.20(m, 6H), 7.17–7.13(m, 3H), 6.58(dd, J = 2.7, 6.9Hz, 1H), 6.08(d, J = 2.7Hz, 1H), 3.60(t, J = 6.9Hz, 2H), 3.51(s, 2H), 2.94(s, 3H), 2.34(t, J = 6.9Hz, 2H); ^{13}C NMR(CD_3OD , 100MHz) δ 179.1, 156.9, 154.7, 145.6, 144.3, 130.8, 129.1, 128.1, 107.2, 106.5, 68.8, 50.4, 38.2, 37.0, 35.8; ESI-MS m/z 469 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0081]

[化7]



[0082] PIP-amine (9):

HATU, iPr₂NEtを縮合剤、1-Methyl-1H-imidazole-2-carboxylic acid, 4-Amino-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxylic acid, 4-[(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)amino]butanoic acidをビルディングブロックとして用いて、通常のFmoc-ペプチド固相合成法に従い2-Chlorotrityl chloride resin (100

mg, 1.3mmol/g, 0.133mmol) 上にPIP鎖を伸長した。TFA/TIPS/H₂O(95/2.5/2.5)で樹脂からの切り出しを行い、HPLC (10% アセトニトリル/0.1% TFA水溶液→直線勾配10-100% 40分, flow: 10ml/分, 230nm, YMC-Pack ODS-AM: 20mm ID x 250mm) で精製しPIP-amine (9, 31.4mg, 0.0204mmol, 15%収率) を得た。

[0083] MALDI-TOF MS m/z Calcd: 1193.57 [M + H]⁺, Found: 1193.48.
保持時間: 19.9分.

PIP-DSTrt (10):

PIP-amine (15.4mg, 0.0100mmol) をDMF (0.18ml) に溶解し、8 (23.4mg, 0.0500mmol), HATU (19.0mg, 0.0500mmol), iPr₂NEt (0.0200ml, 0.15mmol) を加えて室温で9時間攪拌した。反応液を濃縮後、HPLC (10% アセトニトリル/0.1% TFA水溶液→直線勾配10-100% 40分, flow: 10ml/分, 230nm, YMC-Pack ODS-AM: 20mm ID x 250mm) で精製しPIP-DSTrt (10, 11.7mg, 0.00587mmol, 59%収率) を得た。

[0084] MALDI-TOF MS m/z Calcd: 1643.75[M+H]⁺, Found: 1643.88. 保持時間: 26.1分.

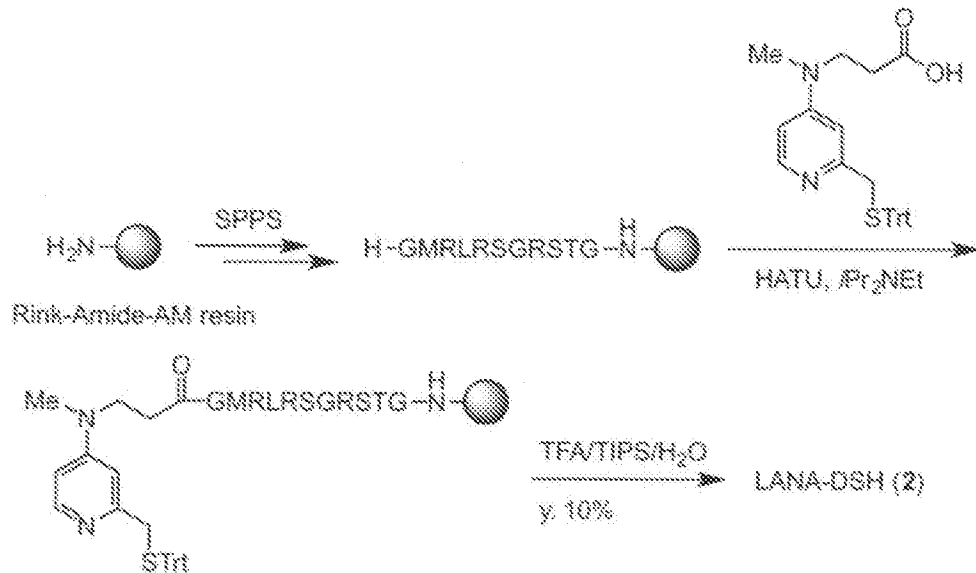
PIP-DSH (1):

PIP-DSTrt (11.7mg, 0.00580mmol) にTIPS (20μl), MilliQ water (20μl) およびTFA (0.160ml) を加え、室温で30分攪拌した。反応液を濃縮後、HPLC (10% アセトニトリル/0.1% TFA水溶液→直線勾配 10-100% 40min, flow: 10ml/min, 230nm, YMC-Pack ODS-AM: 20mm ID x 250mm) で精製しPIP-DSH (1, 6.85mg, 0.00393mmol, 67%収率) を得た。

[0085] MALDI-TOF MS m/z Calcd: 1401.64 [M+H]⁺, Found: 1401.76. 保持時間: 22.3分.

[0086]

[化8]



[0087] LANA-DSH (2):

DIC, HOBtを縮合剤として用いて、通常のFmoc-ペプチド固相合成法に従い Rink-Amide-AM resin (75.3mg, 0.73mmol/g, 0.055mmol) 上にH-GMRLRSGRSTG-を合成した。HATU, iPr_2NEt を用いてN末端に化合物8を縮合させることで、樹脂状に保護LANA-DSHを合成した。TFA/TIPS/ H_2O (95/2.5/2.5)で脱保護および切り出しを行い、HPLC (直線勾配; 0-75% アセトニトリル/0.1% TFA水溶液, flow: 7ml/分, 30分, 254nm, YMC-Pack ODS-AM: 20mm ID x 250mm) で精製しLANA-DSH (2, 10.5mg, 0.00570mmol, 10%収率) を得た。

[0088] ESI-MS m/z Calcd: 346.9 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, Found: 347.0. 保持時間: 28.2分。

[B. 結果]

まず用いるアセチル化剤の反応性について検討した (図1)。数種類のアセチル化剤 (図1A) について、生細胞より取得した細胞質画分と混合し、アセチル化リジン抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。その結果、EG5-PTAやNMDは多くのタンパク質を非選択的にアセチル化した一方、生体が用いているアセチル基供与体であるアセチルCoAやその類縁体であるTEG-Acはそ

のような非選択的なアセチル化を引き起こさないことが判明した（図1B）。

[0089] 上記の結果は、アセチルCoAのような非選択的反応の抑えられた低反応性アセチル基供与体を活性化できる触媒を開発することができれば、選択性の高い触媒系の構築が可能であることを意味する。

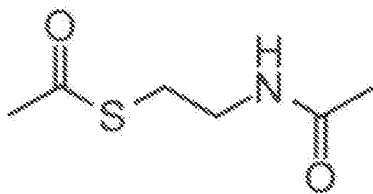
[0090] 今回開発した新規触媒DMAP-SH(DSH)の構造を図2Aに、想定されるアセチルCoA活性化機構を図2Bに示した。DMAPはアセチルCoAを活性化できないが、新規触媒DMAP-SHは新たに導入したチオール基とアセチルCoAのチオエステル基が、チオール-チオエステル交換反応を起こすことによりアセチル基を触媒分子内に取り込み、分子内反応を経てアセチル基を活性化する。ここで適切なR基を選択することにより、標的タンパク質を選択性高くアセチル化することが可能であると考えられた。

[0091] 本実施例では、DNA配列特異的認識結合分子としてPIP (Dervan, P. B., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2001, 9, 2215-2235) を、ヒストンタンパク質結合分子としてLANA (Barbera, A. J. et al., *Science* 2006, 311, 856-861) を選択し、それぞれをDMAP-SHに結合させた分子を触媒として用いることとした。

[0092] まずタンパク質選択性について評価した。既知の方法 (Tachiwana, H. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, 107, 10454-10459) に従って調製した再構成ヌクレオソームと生細胞より取得した細胞質画分を混合し、新たに開発した触媒がヒストンを選択的にアセチル化できるかを、アセチル化リジン抗体を用いたウエスタンブロットで評価した（図3A）。その結果、先の実験と同様、アセチルCoAのみを用いたときにはアセチル化が進行しなかったが、LANA-DSHあるいはPIP-DSHを用いることでヒストン選択的アセチル化を達成することができた。なお、アセチルCoAに代えて、アセチルCoAの一部を切り出した下記構造の分子を用いて実験を行ったところ、同様にヒストン選択的なアセチル化が認められた。

[0093]

[化9]



[0094] 次に、ヒストン中のリジン残基間選択性について評価した。同様の反応を残基選択的アセチル化リジン抗体を用いたウエスタンブロットにて評価したところ、LANA-DSHにおいてはH2BK120が、PIP-DSHにおいてはH4K77が強くアセチル化されることが判明した（図3B）。

[0095] 反応収率を決定し、残基選択性についてさらに詳細に調べる目的で、反応後のヌクレオソームを消化酵素で処理し、生じたペプチド断片をLC-MS/MSで解析した（図5、6）。その結果、LANA-DSHを用いた場合には、H2BK120が54%の収率でアセチル化され、また、リジン残基選択性が極めて高いことが判明した（図5）。PIP-DSHを用いた場合には、H3K36が14%、H3K56が9%、H4K77が14%の収率でアセチル化され、同様にリジン残基選択性が高いことが判明した（図6）。これらの結果は、X線結晶構造からも合理的に裏付けられた。すなわち、LANAはH2A-H2Bダイマーに結合することが知られているが（Barbera, A. J. et al., Science 2006, 311, 856-861）、本触媒系でアセチル化されたH2BK120はLANAとヌクレオソームの共結晶構造から予想される触媒位置の近傍に位置づけられた（図7）。同様に、用いたPIPの配列およびヌクレオソームの結晶構造（Vasudevan, D., Chua, E.Y.D. & Davey, C. A., Journal of Molecular Biology 2010, 403, 1-10）から予想されるPIP-DSHのDNA結合部位とアセチル化が進行したH3K56およびH4K77は近傍に位置づけられた（図8）。これらの結果は、開発した触媒に適切なリガンドを導入することにより、リガンドに応じて標的とするリジン残基を選択性高くアセチル化できること、すなわち、構造ベースの論理的なデザインが可能であることを示している。

[0096] 特にPIPはその配列を適切にデザインすることで標的とするDNA配列を自由

に選択することができる。従って、PIPを利用することにより、ヌクレオソームの構造に大きな影響を与えることが知られているDNA-ヒストン相互作用部位に位置するリジン（Tropberger, P. & Schneider, R., *Nature Structural & Molecular Biology* 2013, 20, 657-661）を、自在に位置を定めてアセチル化できる可能性がある。

[0097] 近年、アセチル化以外のアシル化がヒストンに生じていることが明らかとなり注目を集めている。しかしながらその機能についてはほぼ未解明であり、エピジェネティクスにおける近年の重要課題となっている（Kebede, A. F., Schneider, R. & Daujat, S., *Febs Journal* 2015, 282, 1658-1674）。従って、これらアシル化を位置選択的にヒストンに導入することができる手法は、それらの機能解明を進める強力なツールとなることが予想される。

[0098] そこで、開発した触媒により、アセチル化以外のアシル化が可能であることを検証した。その結果、LANA-DSHと各種アシルCoAを用いることで、マロニル化（非特許文献5）、グルタリル化（非特許文献6）、ブチリル化（非特許文献7）、2-ヒドロキシイソブチリル化（非特許文献8）、ピオチニル化（非特許文献9）が可能であることが判明した（図9）。

産業上の利用可能性

[0099] 本発明の人工触媒システムは、触媒と組み合わせるアシル基供与体を変更するだけで、選択的な各種アシル化が可能である。また、触媒に導入する標的アシル化領域に結合性を有する分子を変更するだけで、様々な部位を標的として高い選択性でアシル化を行うことが可能である。従って、高い汎用性と優れた実用性を兼ね備えたシステムであると言える。

[0100] また、触媒医療の概念に基づく本発明の人工触媒システムは、生体内の酵素が関与する様々な反応に応用することが可能である。特に、生体内の酵素の欠損や失活が特定の疾患に関与している場合には、当該酵素の機能を代替する人工触媒システムにより、当該疾患の治療を行うことが可能となるため、本発明は広く医療分野に貢献しうる。

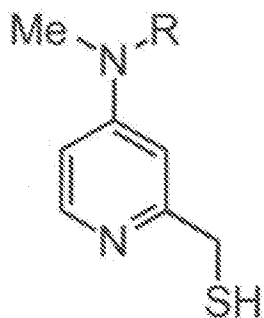
[0101] 標的アシル化領域結合性触媒とアシルCoA若しくはその誘導体との組み合わせを用いた人工触媒システムは、例えば、染色体タンパク質のアセチル化の低下に起因する疾患の治療に利用可能であり、特に、従来のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が薬効を発揮し難い、ヒストンアセチル化酵素の失活に起因する疾患において高い利用価値を有する。

本発明は、触媒医療という概念に基づく新たな人工触媒システムの確立に成功したものであり、内在性酵素の機能調節という従来の医療概念と本質的に異なる新たな医療への途を切り開くものである。

請求の範囲

[請求項1] 下記構造を有する化合物。

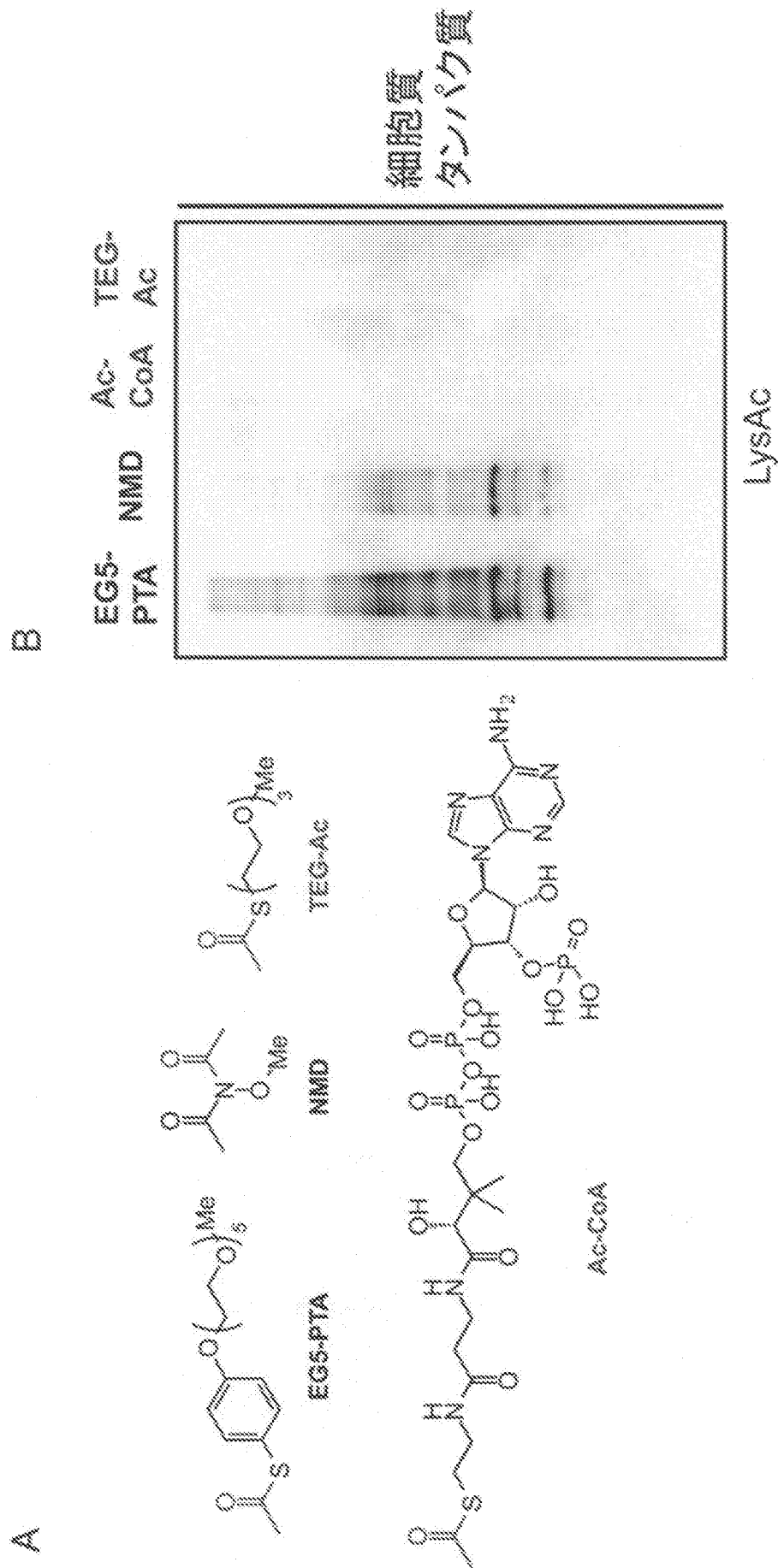
[化1]



(Rは、標的アシル化領域への結合性を有する任意の分子を示す。)

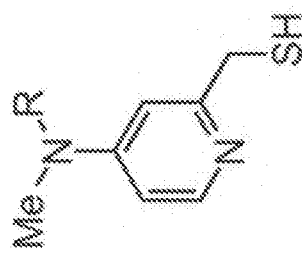
[請求項2] 請求項1に記載の化合物とアシルCoA若しくはその誘導体との組み合わせを含む、染色体タンパク質をアシル化するための薬剤。

[図1]

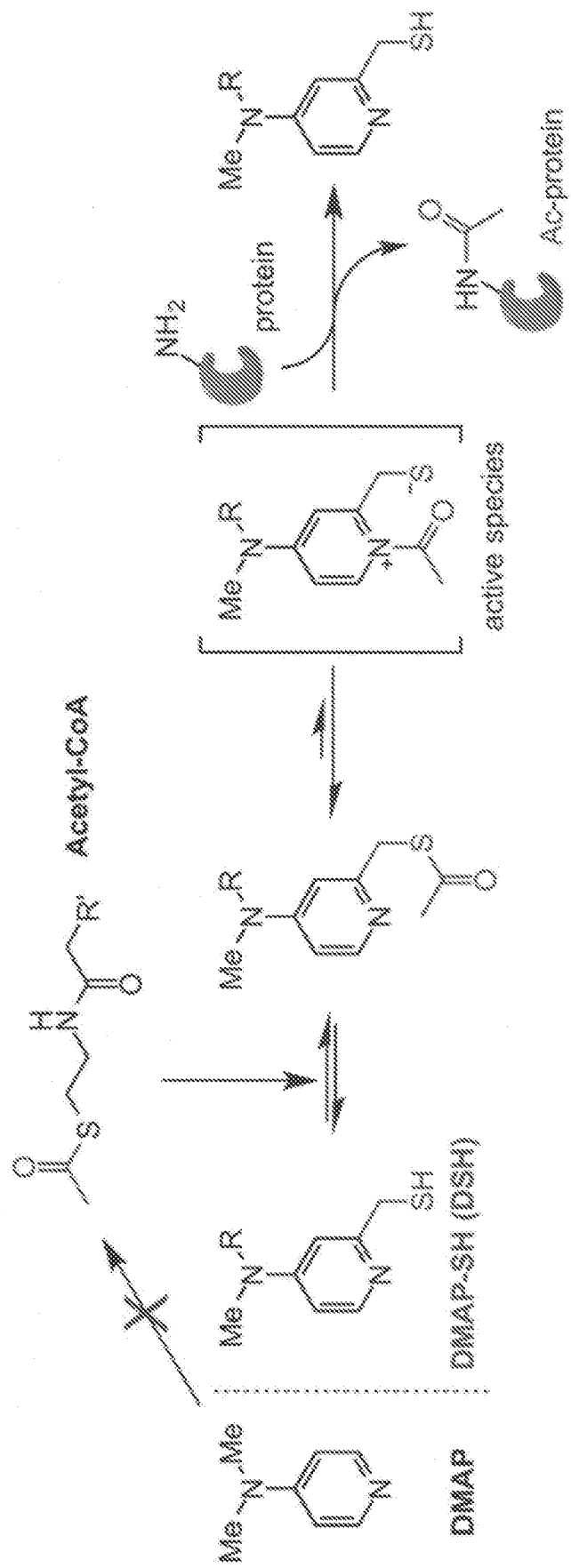


[図2]

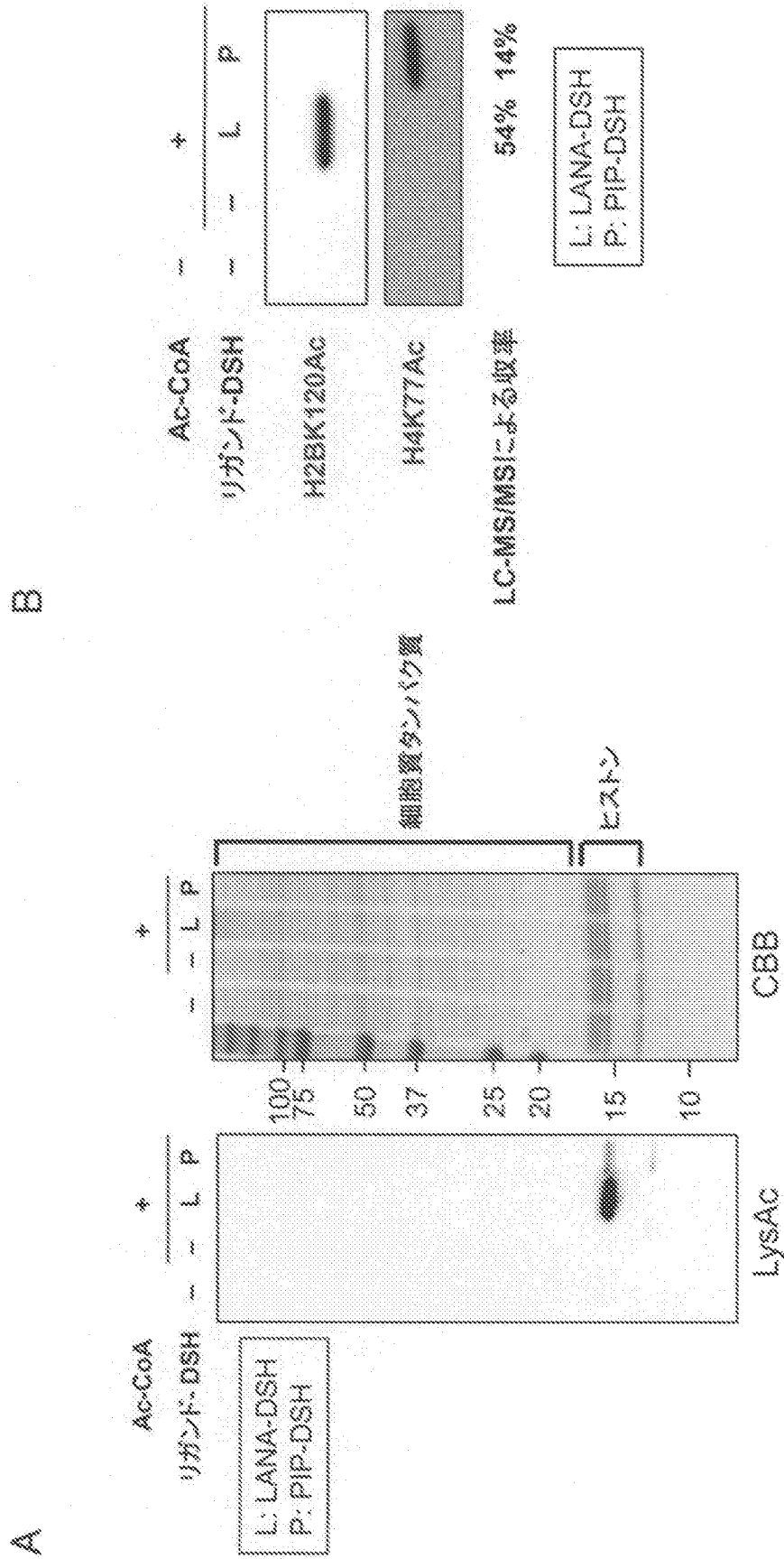
A



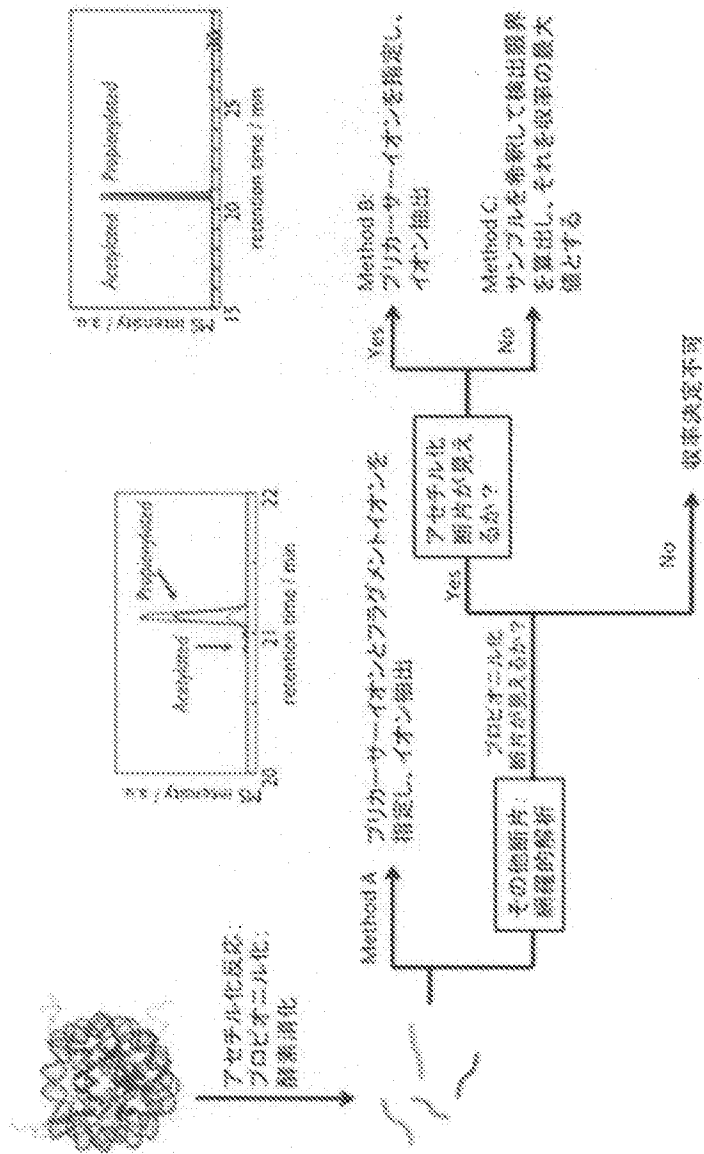
B



[図3]



[図4]



[図5]

決定方法
Method A
Method B
Method C

Enzyme
t: Trypsin
c: Chymotrypsin

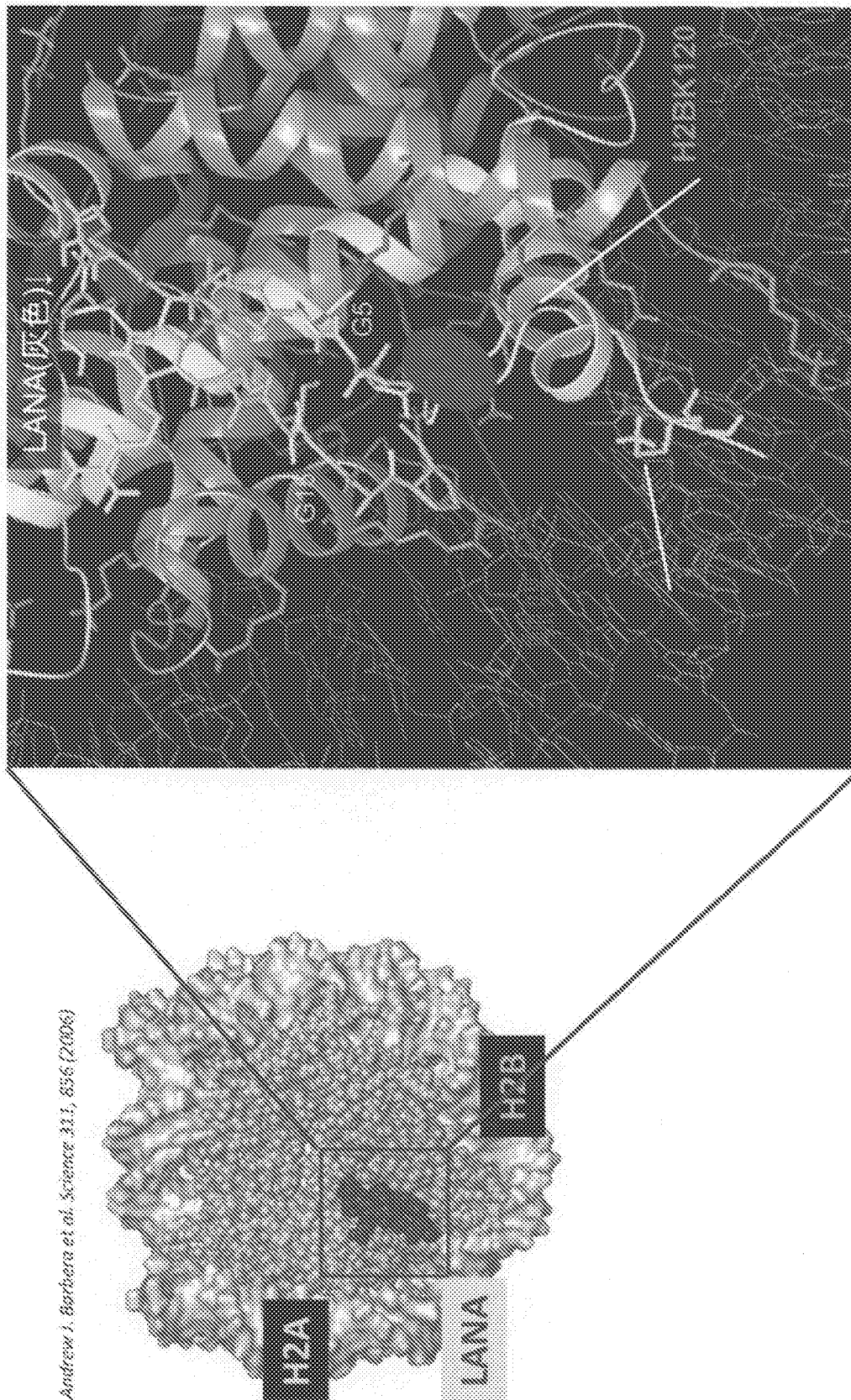
Histone	Residue	Yield (%)	Enzyme	Histone	Residue	Yield (%)	Enzyme
H2A	K5	<0.5	t	H2B	K5	<2.0	t
	K9	<0.5	t		K11	<2.0	t
	K13	0.4	t		K12	<2.0	t
	K15	1.0	t		K15	<2.0	t
	K36	<0.5	t		K16	<2.0	t
	K34	<0.5	t		K20	<2.0	t
	K75	<0.5	t		K23	<2.0	t
	K95	0.4	t		K24	<2.0	t
	K118	<2.0	c		K27	<2.0	t
	K118	<2.0	c		K28	<2.0	t
	K125	<5.0	c		K30	ND	
	K127	<5.0	c		K34	ND	
	K129	<5.0	c		K43	ND	
					K48	<2.0	c
					K57	<2.0	c
H3				H4	K55	<1.0	t
	K4	ND			K108	2.9	c
	K9	<0.5	t		K116	1.3	c
	K14	<0.5	t		K120	54.4	c
	K18	<0.5	t		K125	ND	
	K23	<0.5	t				
	K27	51.1	t		K5	51.2	t
	K36	51.1	t		K9	51.2	t
	K37	51.1	t		K12	51.2	t
	K56	<0.5	t		K16	51.2	t
	K64	<0.5	t		K20	ND	
	K79	<0.5	t		K31	0.3	t
	K115	<5.0	c		K44	<5.0	c
	K122	<0.5	t		K59	<0.5	t
					K77	<0.5	t
					K79	<0.5	t
					K91	<0.5	t

[図6]

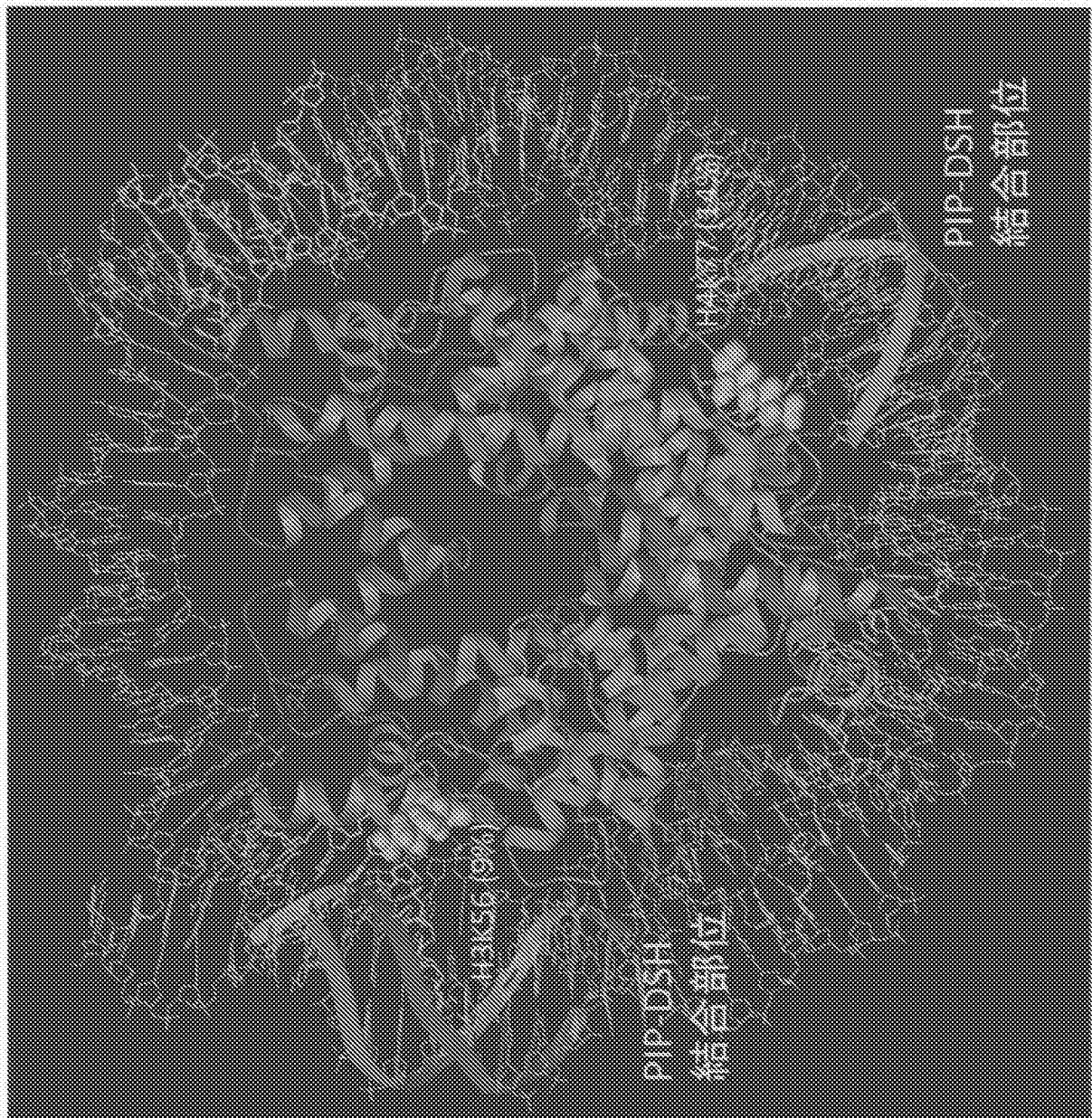
決定方法		Enzyme	
Method A		a. Trypsin	
Method B		b. Chymotrypsin	
Method C			

Histone	Residue	Yield (%)	Enzyme	Histone	Residue	Yield (%)	Enzyme
H2A	K5	< 0.5	t	H2B	K5	< 10	t
	K8	< 0.5	t		K11	< 10	t
	K13	ND	t		K12	< 10	t
	K15	ND	t		K15	< 10	t
	K36	1.5	t		K16	ND	
	K74	< 0.5	t		K20	ND	
	K75	< 0.5	t		K23	< 0.5	t
	K95	0.8	t		K24	< 0.5	t
	K118	1.0	c		K27	< 0.5	t
	K119	3.8	c		K28	< 0.5	t
	K125	< 0.5	c		K30	ND	
	K127	< 0.5	c		K34	ND	
	K128	< 0.5	c		K43	< 5	t
					K46	< 1	c
					K57	< 1	c
					K55	< 0.5	t
					K108	< 0.5	t
					K116	< 0.5	t
					K120	< 0.5	t
					K125	< 5	t
H3	K4	ND		H4	K5	< 0.5	t
	K8	2.1	t		K8	< 0.5	t
	K14	2.4	t		K12	< 0.5	t
	K18	< 0.5	t		K16	< 0.5	t
	K23	< 0.5	t		K20	ND	
	K27	3.0	t		K31	1.8	t
	K36	14.1	t		K44	ND	
	K37	1.8	t		K58	< 0.5	t
	K56	6.9	t		K77	13.7	t
	K84	< 0.5	t		K78	< 0.5	t
	K79	< 0.5	t		K91	< 0.5	t
	K115	ND					
	K122	< 0.5	t				

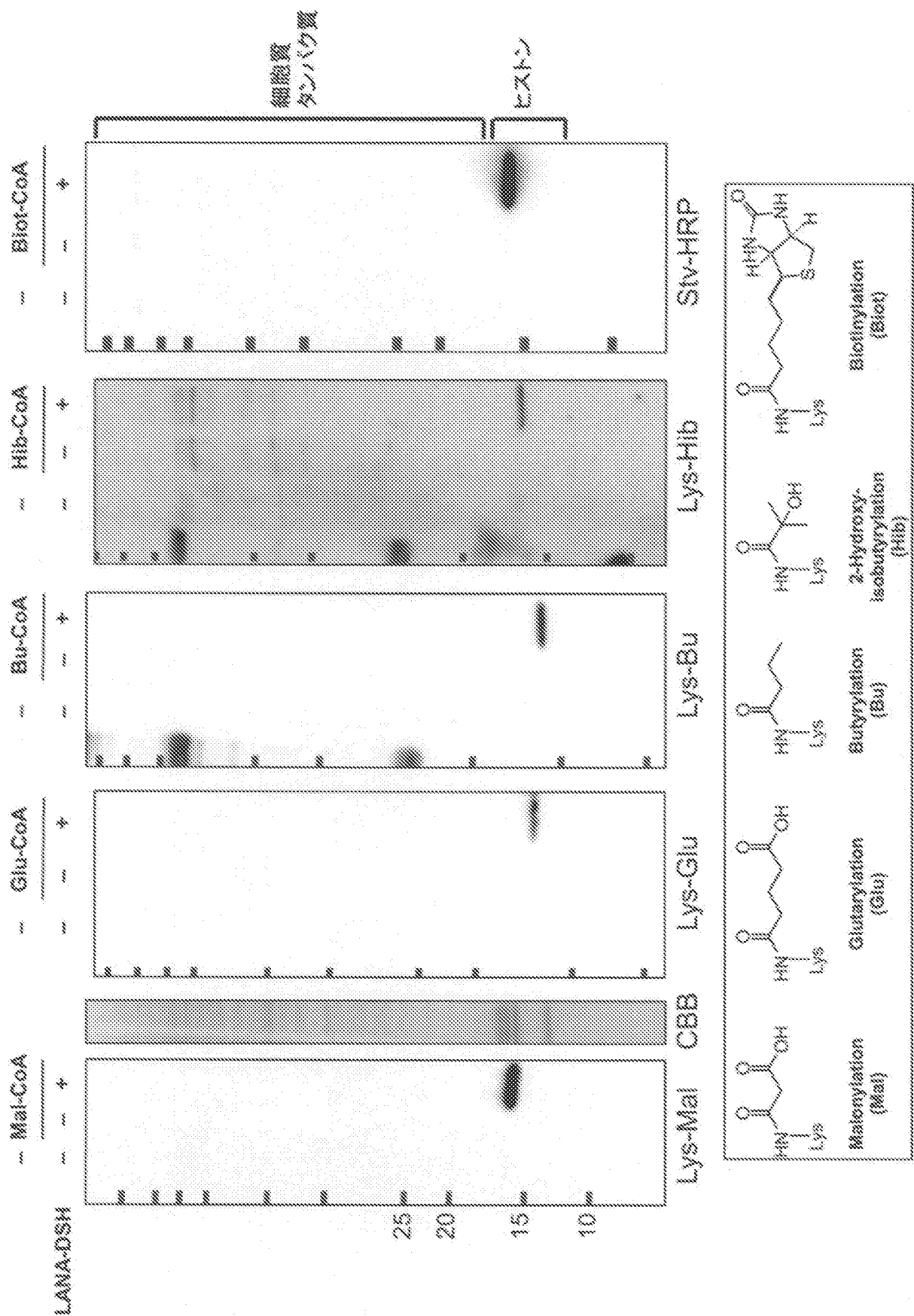
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D401/14(2006.01)i, A61K31/4439(2006.01)i, A61K31/787(2006.01)i,
A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K1/13
(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D401/14, A61K31/4439, A61K31/787, A61K38/00, A61P35/00, A61P43/00,
C07K1/13

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, H. et al, Journal of the American Chemical Society, 2011, Vol.133, pp.12220-12228	1-2
A	KOSHI, Y. et al, Journal of the American Chemical Society, 2008, Vol.130, pp.245-251	1-2
A	WO 2012/100176 A2 (University of Rochester), 26 July 2012 (26.07.2012), entire text; all drawings; particularly, fig. 12 & EP 2665744 A1 & US 2013/0330773 A1	1-2
A	WO 2010/001933 A1 (Nihon University), 07 January 2010 (07.01.2010), entire text; all drawings & EP 2311494 A1 & US 2011/0160399 A1 & JP 4873510 B	1-2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 October 2016 (28.10.16)

Date of mailing of the international search report
08 November 2016 (08.11.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075183

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiroshi SUGIYAMA, "Histone Deacetylase Sogai Kassei o Motsu Pyrrole-Imidazole Polyamide ni yoru Tokutei Idenshi no Kasseika", Research Reports of Uehara Memorial Foundation, 2009, vol.23, pages 1 to 5, page 1, columns of 'Introduction', 'Method and Result'	1-2
P,A	WO 2015/186785 A1 (The University of Tokyo), 10 December 2015 (10.12.2015), entire text; all drawings (Family: none)	1-2
P,A	WO 2016/129680 A1 (Kyoto University), 18 August 2016 (18.08.2016), entire text; all drawings (Family: none)	1-2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07D401/14(2006.01)i, A61K31/4439(2006.01)i, A61K31/787(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K1/13(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07D401/14, A61K31/4439, A61K31/787, A61K38/00, A61P35/00, A61P43/00, C07K1/13

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WANG, H. et al, Journal of the American Chemical Society, 2011, Vol. 133, pp. 12220-12228	1-2
A	KOSHI, Y. et al, Journal of the American Chemical Society, 2008, Vol. 130, pp. 245-251	1-2
A	WO 2012/100176 A2 (University of Rochester) 2012.07.26, 全文全図、とくに FIG. 12 & EP 2665744 A1 & US 2013/0330773 A1	1-2

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 8 . 1 0 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

0 8 . 1 1 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

東 裕子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 2

4 P

9 7 0 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2010/001933 A1 (学校法人日本大学) 2010. 01. 07, 全文全図 & EP 2311494 A1 & US 2011/0160399 A1 & JP 4873510 B	1-2
A	杉山 弘, ヒストンデアセチラーゼ阻害活性をもつピロール・イミ ダゾールポリアミドによる特定遺伝子の活性化, 上原記念生命科学 財団研究報告集, 2009, Vol. 23, pp. 1-5, 第 1 頁「緒言」「方法及び 結果」欄	1-2
P, A	WO 2015/186785 A1 (国立大学法人東京大学) 2015. 12. 10, 全文全図 (ファミリーなし)	1-2
P, A	WO 2016/129680 A1 (国立大学法人京都大学) 2016. 08. 18, 全文全図 (ファミリーなし)	1-2