

Fig. 1. Structure of 3-NBA.

cancer has led to considerable interest in assessing their potential cancer risk to humans [International Agency for Research on Cancer, 1989; Tokiwa et al., 1993; Purohit and Basu, 2000].

3-nitrobenzanthrone (3-NBA; 3-nitro-7*H*-benz[de]anthracen-7-one; Fig. 1) was recently detected in diesel exhaust and in airborne particulate matter and might originate both from incomplete combustion of fossil fuels and from reaction of the parent aromatic hydrocarbon with nitrogen oxides in the atmosphere [Enya et al., 1997; Feilberg et al., 2002; Seidel et al., 2002; Murahashi, 2003]. As a likely consequence of atmospheric washout, 3-NBA has also been detected more recently in surface soil and rainwater [Murahashi et al., 2003a, 2003b; Watanabe et al., 2003]. The uptake of 3-NBA in humans has been demonstrated by the detection of 3-aminobenzanthrone (3-ABA), a major metabolite of 3-NBA, in the urine of salt mine workers occupationally exposed to diesel emissions [Seidel et al., 2002]. 3-NBA is one of the most potent bacterial mutagens known to date, inducing 0.2 and 6.3 million revertants per nmol in *Salmonella typhimurium* TA98 and YG1024, respectively [Enya et al., 1997]. Moreover, 3-NBA induces micronuclei in mouse and in human cells and exhibits DNA strand-breaking activity in human cells [Enya et al., 1997; Phou-songphouang et al., 2000; Arlt et al., 2004; Lamy et al., 2004]. Furthermore, 3-NBA is also an effective mutagen in human cells and preliminary data suggest that 3-NBA is carcinogenic in rats [Adachi et al., 2000; Phou-songphouang et al., 2000].

3-NBA forms specific DNA adducts in different *in vitro* systems, in cells, and *in vivo* in rats [Bieler et al., 1999, 2003; Borlak et al., 2000; Kawanishi et al., 2000; Arlt et al., 2001, 2002, 2003a, 2003b, 2003c], and these adducts may play an important role in the initiation of mutagenesis and carcinogenesis. Although the structures of the DNA adducts remain to be characterized, the major DNA adducts formed *in vitro* and in rats are products derived from reductive metabolites bound to purine bases without carrying an *N*-acetyl group [Arlt et al., 2001, 2003a, 2003c].

Despite the strong mutagenicity of 3-NBA in bacteria, little is known about its mutagenicity *in vivo*. Transgenic mutation assays are a powerful tool to study chemical mutagenesis in experimental animals [Suzuki et al., 2000;

Kohara et al., 2002a, 2002b; Itoh et al., 2003]. In addition, molecular analyses of induced mutations may reveal chemical-specific mutation spectra. To evaluate the mutagenicity of 3-NBA, a transgenic mouse model, Muta Mouse, was used and mutations in the *cII* gene were assessed. In addition, DNA adduct formation was investigated using ³²P-postlabeling.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of 3-NBA

3-NBA was synthesized as described recently [Arlt et al., 2002]. The authenticity of 3-NBA was confirmed by UV, electrospray mass spectra (ES-MS), and high-field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Animal Experiments

Male Muta Mouse animals were supplied by Covance Research Products (Denver, PA) and were acclimatized for 1 week before use. 3-NBA was dissolved in olive oil (2.5 mg/ml). Five mice (7- to 8-week-old, ~ 25 g body weight) were treated with 25 mg/kg body weight once a week for 4 weeks by intraperitoneal injection (10 ml/kg). Five mice received olive oil only at the same time and in the same manner. Mice were killed 3 days after the last treatment, and lung, liver, kidney, bladder, spleen, colon, and testis tissues were collected. Tissue samples were stored at -80°C until DNA isolation. DNA was extracted by a standard phenol extraction method.

Peripheral Blood Micronucleus Assay

Forty-eight hours after the first (week 1) and second injection (week 2), peripheral blood (5 µl) was collected without anticoagulant from a tail blood vessel, placed on an acridine orange-coated glass slide, covered with a coverslip, and stained [Hayashi et al., 1990]. One thousand peripheral blood reticulocytes (RETs) per animal were analyzed by fluorescence microscopy within a few days of slide preparation, and the number of cells with micronuclei was recorded.

Lambda *cII* Mutation Analysis

The MutaPlax *cII*-Select Kit (Epicentre Technologies, Madison, WI) was used for the lambda *cII* assay. The kit contained lambda packaging extracts and cultures of *hfl*⁻ *Escherichia coli* G1225 for both recovered phage titer and selection of mutant phages. Lambda packaging and positive selection for *cII* mutants was performed according to the protocol of the manufacturer with minor modifications as described previously [Jakubczak et al., 1996]. Briefly, 500 µl of the packaged phage solution were incubated with 1 ml of G1225 cells (OD₆₀₀ = 1.0) at room temperature for 30 min, mixed with 14 ml Luria broth top agar, and plated on five 9 cm dishes containing 10 ml bottom agar. The plates were incubated at 25°C for 48 hr. For total virus titer, a 5 µl portion of the packaged phage was mixed with 200 µl of strain G1225 cells and 6 ml LB top agar, plated on two dishes, and incubated at 37°C for 24 hr. Wild-type phage recovered from Muta Mouse has a *cI*⁻ phenotype, which permitted plaque formation on the *hfl*⁻ strain at 37°C but not at 25°C. The mutant frequency (MF) was determined by dividing the number of mutant plaques by the total number of recovered phage evaluated from each animal.

Sequencing of *cII* Mutants

Mutations in the lambda *cII* transgene were analyzed using the DNA cycle sequencing method described previously [Suzuki et al., 2000]. The *cII* gene region (294 base pairs) was PCR-amplified directly from mutant plaques using the primer pair 5'-AAAAAGGGCATCAAATTAACC-3' and 5'-CCGAAGTTGAGTATTTTGCTGT-3'. A 446 base pair PCR product was purified and used for the sequencing reaction with a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan). PCR amplification and DNA sequencing was performed using a Minicycler PTC-150-25 (MJ Research, Watertown, MA) and an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), respectively. Statistical analysis of the mutation spectra for differences between treated and control spectra was conducted using the Adams-Skopek algorithm [Cariello et al., 1994].

³²P-Postlabeling Analysis and High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of ³²P-Labeled 3',5'-Deoxyribonucleoside Bisphosphate Adducts

³²P-postlabeling analyses using nuclease P1 digestion, butanol extraction, and autoradiography were performed as described [Arlt et al., 2002]. Chromatographic conditions for thin-layer chromatography (TLC) on polyethyleneimine-cellulose (PEI-cellulose) were D1, 1.0 M sodium phosphate, pH 6.0; D3, 4 M Li-formate, 7 M urea, pH 3.5; D4, 0.8 M LiCl, 0.5 M Tris, 8.5 M urea, pH 8.0. DNA adduct levels (relative adduct labeling; RAL) were calculated from the adduct cpm, the specific activity of [³²P]ATP and the amount of DNA (pmol of DNA-P) used. Results were expressed as DNA adducts/10⁶ nucleotides. Individual adduct spots detected by the ³²P-postlabeling assay, or the origins after D1 only, were excised from the TLC plates, extracted, and cochromatographed on HPLC with reference bisphosphate adducts essentially as described previously [Arlt et al., 2001].

Preparation of Reference Compounds for ³²P-Postlabeling

Deoxyadenosine (dA) and deoxyguanosine (dG) 3'-monophosphates or calf thymus DNA (4 μmol/ml; Sigma) were incubated with 3-NBA (0.3 mM) in a reaction containing xanthine oxidase (1 U/ml; Sigma, Gillingham, U.K.) in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, in the presence of 1 mM hypoxanthine (Sigma) as described previously [Bieler et al., 1999; Arlt et al., 2001]. The resulting adducted deoxypurine 3'-monophosphates were used as reference compounds in ³²P-postlabeling experiments.

RESULTS

Micronucleus Induction in Peripheral Blood of Muta Mouse

The frequencies of micronucleus formation in peripheral blood RETs after treatment of Muta Mouse with 25 mg/kg body weight 3-NBA are shown in Table I. Significant increases in the frequency of micronucleated RETs were observed 48 hr after the first (week 1) and the second (week 2) treatment. This result confirms data on micronucleus formation observed in another mouse strain using the same amount of 3-NBA [Enya et al., 1997].

TABLE I. Micronucleus Induction in Mouse Peripheral Blood Reticulocytes of Muta Mouse Treated With 3-NBA

Treatment	Micronucleated RETs per 1,000 RETs after the first and second i.p. injection of 3-NBA (mean ± SD) ^a	
	Week 1	Week 2
Control	3.0 ± 0.8	3.0 ± 1.2
3-NBA	7.5 ± 2.8 ^b	8.4 ± 3.0 ^b

^aValues represent the mean ± SD of five animals.

^bSignificantly different from untreated control animals at $P < 0.05$ (t-test).

TABLE II. Mutant Frequency in the *cII* Gene From Various Organs of Muta Mouse Treated With 3-NBA

Organ	Mean MF × 10 ⁻⁶ ± SD ^a	
	Control	3-NBA
Lung	38.1 ± 24.4	38.5 ± 14.2
Liver	30.5 ± 12.1	147.4 ± 49.4 ^b
Kidney	36.2 ± 13.4	37.6 ± 13.4
Colon	36.7 ± 17.6	258.7 ± 106.4 ^b
Spleen	28.8 ± 9.6	34.4 ± 11.1
Testis	15.2 ± 7.4	22.8 ± 6.3
Bladder	13.1 ^c	54.4 ^c

^aResults represent the mean ± SD of five animals.

^bSignificantly different from untreated control animals at $P < 0.001$ (t-test).

^cResults represent the mean of two animals only.

Mutagenic Specificity of 3-NBA in Muta Mouse

DNA was isolated from lung, liver, kidney, bladder, colon, spleen, and testis 3 days after the last treatment. The results of the *cII* MF analyses are shown in Table II (mouse-by-mouse data are given in the Appendix). The MF was significantly increased above spontaneous levels in colon and liver, with 7.0- and 4.8-fold increases, respectively. A 4.1-fold increase was also seen for bladder, but because only two control and two treated mice were evaluated for this tissue, this difference was not tested for significance. No increase in MF above control levels was seen in the other tissues.

Since the metabolic activation of 3-NBA due to hepatic enzymes has been intensively studied, the mutagenic specificity of 3-NBA was examined in liver tissue only. Forty-one 3-NBA-induced mutants from the liver were sequenced, together with 32 spontaneous mutants from the livers of untreated mice. The mutation spectra are summarized in Table III. Spontaneous mutations consisted mainly of base substitutions (26 of 32 mutations). Among them, G:C→A:T transitions (21 of 26 transitions) predominated and almost all of them (18 of 21 mutations) occurred at CpG sites. 3-NBA-induced mutations also consisted mainly of base substitutions (33 of 41 mutations). Comparing to the control, G:C→A:T transitions were decreased (10% vs. 66%) and G:C→T:A transversions were increased (49% vs. 6%).

TABLE III. Classification of 3-NBA-Induced and Spontaneous *cII* Mutations From Liver of Muta Mouse

Mutation type	Spontaneous		3-NBA-induced	
	Number	%	Number	%
Total	32	100	41	100
Base substitutions	26	81	33	80
Transitions	21	66	6	15
G:C→A:T (at CpG)	21 (18)	66 (56)	4 (2)	10 (5)
A:T→G:C	0	0	2	5
Transversions	5	16	27	66
A:T→T:A	2	6	4	10
A:T→C:G	0	0	1	2
G:C→T:A	2	6	20	49
G:C→C:G	1	3	2	12
Frameshifts (-1)	2	6	5	12
Frameshifts (+1)	2	6	0	0
Deletions	0	0	1	2
Insertions	0	0	0	0
Complex	2	6	2	5

The distribution of mutations in the liver is shown in Figure 2. 3-NBA-induced mutations were distributed over all the *cII* gene and no apparent hot spots were observed. Statistical analysis of the mutational spectra data demonstrated that the differences between 3-NBA-treated and control spectra were significant ($P = 0.0041$).

DNA Adduct Formation of 3-NBA in Muta Mouse

DNA adduct formation in Muta Mouse was analyzed in liver, in which MF was increased, and in lung, where no increase in MF was observed. As shown in Figure 3, 3-NBA induced essentially the same DNA adduct pattern as those observed in different in vitro activation systems, including cytosolic nitroreductases and human liver microsomes, in human cells, and in rats [Arlt et al., 2001, 2003a, 2003c]. Using butanol enrichment, the observed pattern consisted of a cluster of five adducts (spots 1–5). Analyses using nuclease P1 enrichment resulted in a cluster of four adducts (spots 1–3 and 6). No DNA adducts were observed in DNA isolated from tissues of control animals treated with vehicle (olive oil) only (data not shown). Although the structures of these adducts have yet to be elucidated, all adduct spots detected in this study on TLC plates were chromatographically indistinguishable from adduct spots found in incubations with dA (adduct 1 and 2) and dG 3'-monophosphates (adduct 3, 4, and 5) generated by 3-NBA activated by xanthine oxidase [Arlt et al., 2001]. As a second, independent chromatographic procedure, we also employed reversed-phase HPLC analysis to confirm the identities of adduct spots formed by 3-NBA (Fig. 4). The results thus obtained confirmed the findings from chromatography on TLC plates. DNA binding in lung and liver ranged from 8.8 to 15.9 and from 268.0 to 282.7 adducts per 10^8 nucleotides for total DNA adducts, respectively (Fig. 5A). Levels of

individual adduct spots are given in Figure 5B. In particular, adduct spot 3 was the predominant adduct formed in both tissues.

DISCUSSION

There are increasing concerns over the carcinogenic risk of diesel exhaust. 3-NBA is a potent mutagen identified in diesel exhaust and airborne particulate matter, and preliminary data indicate that 3-NBA is carcinogenic in rodents [Enya et al., 1997; Adachi et al., 2000; Seidel et al., 2002]. 3-NBA is highly mutagenic in the *Salmonella typhimurium* strains TA98 and YG1024, producing mutagenic responses comparable to those of 1,8-dinitropyrene, one of the most mutagenic nitro-PAH reported to date [Enya et al., 1997]. In addition, previous data also indicate that 3-NBA is an efficient mutagen in human lymphoblastoid-derived MCL-5 cells at the *TK* and *HPRT* loci [Phouongphouang et al., 2000]. These observations suggest that 3-NBA may also be mutagenic in vivo. Therefore, we investigated the in vivo mutagenicity of 3-NBA after intraperitoneal treatment of transgenic Muta Mouse. The mutagenicity of 3-NBA in vivo was clearly demonstrated by this assay using the *cII* gene as target sequence. Simultaneously, the clastogenicity of 3-NBA was evaluated by the peripheral blood micronucleus assay. The assay for micronuclei showed a significant increase in the frequency of micronucleated reticulocytes, confirming previous data obtained in another mouse strain and in human cells [Enya et al., 1997; Phouongphouang et al., 2000; Arlt et al., 2004; Lamy et al., 2004].

In our study, 3-NBA increased the MF in colon, liver, and bladder, whereas no increase in MF was observed in lung, kidney, spleen, and testis. Human exposure to 3-NBA is thought to occur primarily via the respiratory tract and it is possible that the tissue-specific distributions of MF would differ after inhalation or intratracheal treatment with 3-NBA. On the other hand, different tissues will respond at different rates after exposure to a mutagen, rates of metabolism aside. Mutation fixation time may be different in different tissues, depending on cell turnover rate in a tissue, with colon being a rapid responder and lung being much slower [Heddle et al., 2003; Thybaud et al., 2003]. This could explain why 3-NBA did not induce mutations in the lung in the present study. In a recent study with rats, we found that after a single dose of 3-NBA (2 mg/kg body weight, i.p.), DNA binding by 3-NBA was higher in lung compared to liver [Arlt et al., 2003a]. Moreover, preliminary results also indicate that binding by 3-NBA in rat DNA is much higher in lung compared to liver after treatment with a single dose of 3-NBA (2 mg/kg body weight) by intratracheal instillation (data not shown). Therefore, the results of the present study may suggest that tissue-specific DNA adduct formation in mice is different to those observed in the rat model, different dosing and administration aside.

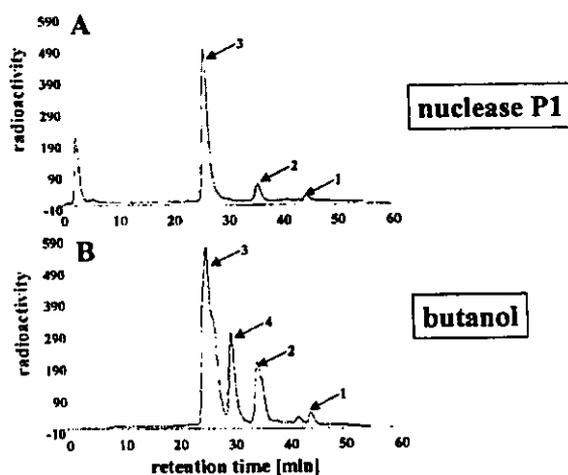


Fig. 4. Separation of ^{32}P -postlabeled 3',5'-bisphosphate adducts on a phenyl-modified reversed-phase column. HPLC autoradiograms show digests of liver DNA of Muta Mouse treated with 3-NBA using the nuclease P1 (A) and butanol (B) enrichment versions of the ^{32}P -postlabeling assay. Origins after D1 only were excised and extracted from the TLC plates, dissolved, and injected. Chromatographic conditions are described in text.

O-acetylation catalyzed by *N*-acetyltransferases and/or O-sulfonation catalyzed by sulfotransferases, seems to be the major pathways of bioactivation for 3-NBA leading to DNA adduct formation [Bieler et al., 1999, 2003; Borlak et al., 2000; Arlt et al., 2001, 2002, 2003a, 2003b, 2003c]. Using the ^{32}P -postlabeling assay, we observed a similar DNA adduct pattern in vivo in mice to those observed in vitro, in cell culture, and in rats [Bieler et al., 1999, 2003; Arlt et al., 2001, 2002, 2003a, 2003b, 2003c]. Comparative analyses of the major DNA adducts obtained in mice with those detected in vitro and in vivo in rats revealed that these 3-NBA-DNA adducts were chromatographically indistinguishable. Moreover, previous work has shown that the major DNA adducts are products derived from reductive metabolites bound to dA (adducts 1 and 2) or dG (adducts 3, 4, and 5) [Arlt et al., 2001, 2003c]. Further structural characterization of these 3-NBA-DNA adducts is currently being undertaken. Preliminary data indicate that 3-NBA forms the same DNA adducts in *Salmonella typhimurium* (data not shown). Therefore, these results support the conclusion that some or all of the major 3-NBA-DNA adducts (adducts 1–5) detected in the present study in mice represent premutagenic lesions involved in the mutagenic process, not only in *Salmonella*, but also in rodents.

There were variations in MFs among animals that might be derived from clonal (jackpot) mutations. The possibility of clonal mutations can be evaluated by sequencing the mutants. Sequence analysis was performed on the mutants recovered from liver, since the metabolic activation of 3-NBA due to hepatic enzymes has been intensely studied using cytosolic and microsomal enzymes from both rats and humans [Bieler et al., 1999; Arlt et al., 2002, 2003b, 2003c].

Base substitution mutations predominated for both the 3-NBA-treated and the untreated groups (about 80%). The site of mutation was distributed widely along the *cII* gene. The main changes in the mutation spectrum after 3-NBA treatment were a reduction in the proportion of G:C→A:T transitions (from 66% to 10%) and an increase in the proportion of G:C→T:A transversions (from 6% to 49%). Similar changes in the *cII* mutation spectrum were found after treatment with dinitropyrenes [Kohara et al., 2002a]. In the latter study, the authors concluded that the induction of G:C→T:A transversions correlated with the predominant formation of DNA adducts by 1,6- and 1,8-dinitropyrene at guanine residues. In contrast, aristolochic acid, another nitroaromatic compound, induces mainly A:T→T:A transversion mutations and binds preferentially to adenine residues [Kohara et al., 2002b], indicating that the mutational specificity of a compound may serve as indirect evidence for the interaction of the mutagen with specific DNA sequences. As was also observed with heterocyclic amines [Nagao et al., 1996], guanine-C8 adducts induce G:C→T:A transversion mutations probably by inserting adenine opposite to the uninformative or apurinic sites (the A-rule) [Strauss, 1991]. 3-NBA-DNA adducts at guanine residues account for around 70–80% of total DNA binding in liver DNA. Moreover, adduct 4 formed by 3-NBA (around 15% of total DNA binding at guanine residues in liver) is sensitive to digestion with nuclease P1, which is indicative of a guanine-C8 adduct [Bieler et al., 1999; Arlt et al., 2001]. Thus, the induction of G:C→T:A transversion mutations due to 3-NBA may be explained by intrinsic properties of the DNA polymerase that inserts dA opposite the lesion during DNA replication. Site-specific mutagenesis studies may provide new insights into the mutagenic activity of individual 3-NBA-DNA adducts.

It is noteworthy that the only DNA adduct derived from 3-NBA that has yet been characterized spectroscopically was synthesized by reacting the activated ester of *N*-acetyl-*N*-hydroxy-3-aminobenzanthrone (*N*-Ac-*N*-OH-ABA) with dG [Enya et al., 1998]. The adduct formed was an unusual guanine-C8 adduct, *N*-acetyl-3-amino-2-(2'-deoxyguanosine-8-yl)benzanthrone (dG-*N*-Ac-ABA). Kawanishi et al. [1998] investigated the mutagenic specificity of *N*-acetoxy-*N*-acetyl-3-aminobenzanthrone (*N*-Aco-*N*-Ac-ABA) in the *supF* gene in different human fibroblast cell lines. Base sequence analysis revealed that the majority of the mutations were base substitutions (around 80–90%), with G:C→T:A transversions (40–50%) being the most frequent mutation. In addition, a plasmid polymerase-stop assay in the *supF* gene showed that *N*-Aco-*N*-Ac-ABA preferentially bound to guanine residues [Kawanishi et al., 1998]. The results of this in vitro study have striking similarities to the results of the present in vivo study. However, it is important to point out that all 3-NBA-DNA adducts detected in the present study are dA and dG adducts that do not carry an *N*-acetyl group. dG-*N*-Ac-ABA was not detected in vivo

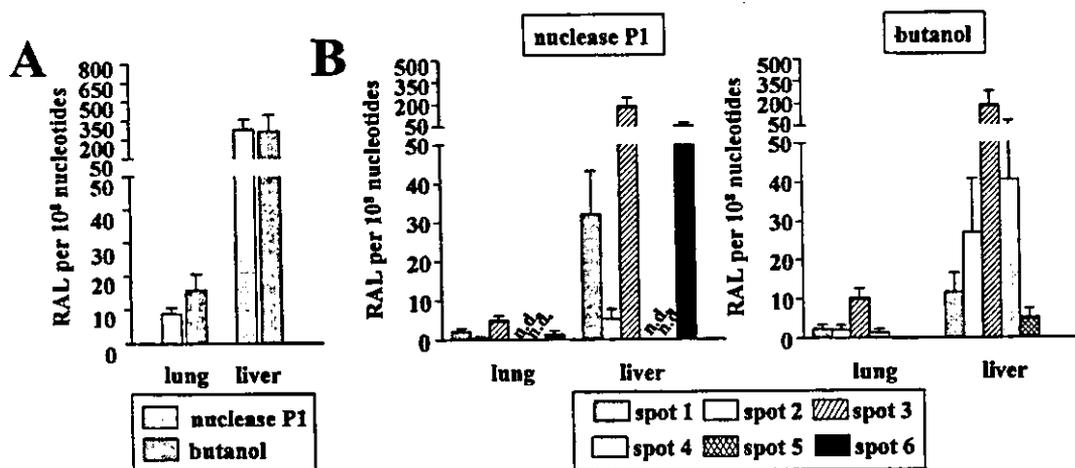


Fig. 5. RAL of total DNA adducts in liver and lung tissue of Muta Mouse (A) treated with 3-NBA. RAL of individual DNA adducts in lung and liver tissue (B). Values represent the mean \pm SD of five animals, the DNA from each organ being postlabeled twice. n.d., not detected.

either in mice (present study) or in rats or in cell culture [Arlt et al., 2001, 2002, 2003a, 2003c], suggesting that acetylated 3-NBA-DNA adducts and activation pathways reported earlier [Enya et al., 1998] based on in vitro synthesis might not entirely represent the in vivo situation.

Recently, an increased MF was reported in lung of Big Blue rats after exposure to diesel exhaust, providing important evidence for the mutagenicity of diesel exhaust in vivo [Sato et al., 2000]. A G:C \rightarrow T:A transversion mutation hot spot was found at base 211 of the *lacI* gene. The surrounding sequence of this site (gattGgcg) is identical to the *cII* sequence at position 206–213, but no mutation was recovered at the corresponding guanine after treatment with 3-NBA. Only one mutation at this sequence site was observed after treatment with dinitropyrenes [Kohara et al., 2002a]. In addition, the major mutations induced by diesel exhaust in the *lacI* gene were A:T \rightarrow G:C and G:C \rightarrow A:T transitions. Therefore, as reported previously for dinitropyrenes [Kohara et al., 2002a], based on the present study there was no direct evidence for a contribution of 3-NBA to the mutagenicity of diesel exhaust. However, the different mutation spectra between diesel exhaust and 3-NBA may be attributed to different routes of exposure (inhalation vs. intraperitoneal injection), dosing, or species differences. On the other hand, transgenes may behave differently to each other. Mutation analysis in one transgene may not permit a precise extrapolation to other transgenic reporter genes [Thybaud et al., 2003]. 3-NBA induces a large variety of different DNA adducts derived both from dG and dA. To date, we can only speculate on the mutagenic specificity of 3-NBA in tumorigenesis and the mutagenic activity of individual 3-NBA-DNA adducts. However, preliminary data indicate that 3-NBA is carcinogenic in rats after intratracheal administration [Adachi et al., 2000]. Since 3-NBA has

been shown to induce specific 3-NBA-DNA adducts in various rat tissues after both oral and intraperitoneal treatment with 3-NBA [Arlt et al., 2001, 2003a], we suggest that 3-NBA-DNA adduct formation is not only critical for the mechanism of 3-NBA mutagenicity (present study) but also for its carcinogenicity.

In summary, the transgenic mouse mutation assay demonstrated that 3-NBA is mutagenic in various organs. In addition, 3-NBA induced chromosomal aberrations in blood reticulocytes. The induction of G:C \rightarrow T:A transversion mutations in liver was associated with strong DNA binding by 3-NBA, predominantly at guanine residues, indicating that these mutations are probably caused by 3-NBA through an incorporation of dA opposite the adduct. This is important for the estimation of 3-NBA mutagenicity (and carcinogenicity) for humans. Our present study strongly suggests a genotoxic potential of 3-NBA for humans. To better understand the potential role of 3-NBA-DNA adducts in induction of mutations and cancer, our results require confirmation by larger animal studies that monitor the dose-dependent formation and persistence of 3-NBA-DNA adducts in susceptible target tissues.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Alan Hewer (Institute of Cancer Research) for help with HPLC analysis.

REFERENCES

- Adachi S, Kawanura K, Takemoto K, Suzuki H, Hisamatsu Y. 2000. Carcinogenicity of 3-nitrobenzanthrone, a potent mutagen in diesel exhaust: preliminary results in F344 rats after intratracheal administration. In: Heinrich U, Mohr U, editors. Relationships between

- respiratory disease and exposure to air pollution. Washington, DC: ILSI Press. p 315-319.
- Arlt VM, Bieler CA, Mier W, Wiessler M, Schmeiser HH. 2001. DNA adduct formation by the ubiquitous environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone in rats determined by ^{32}P -postlabeling. *Int J Cancer* 93:450-454.
- Arlt VM, Glatt HR, Muckel E, Pabel U, Sorg BL, Schmeiser HH, Phillips DH. 2002. Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. *Carcinogenesis* 11:1937-1945.
- Arlt VM, Sorg BL, Osborne M, Hewer A, Seidel A, Schmeiser HH, Phillips DH. 2003a. DNA adduct formation by the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone and its metabolites in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 300:107-114.
- Arlt VM, Glatt H, Muckel E, Pabel U, Sorg BL, Seidel A, Frank H, Schmeiser HH, Phillips DH. 2003b. Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites by human acetyltransferases, sulfotransferases and cytochrome P450 expressed in Chinese hamster V79 cells. *Int J Cancer* 105:583-592.
- Arlt VM, Stiborova M, Hewer A, Schmeiser HH, Phillips DH. 2003c. Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: evidence for reductive activation by human NADPH:cytochrome P450 reductase. *Cancer Res* 63:2752-2761.
- Arlt VM, Cole KJ, Phillips DH. 2004. Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-damaging species in human B-lymphoblastoid MCL-5 cells. *Mutagenesis* 19:149-156.
- Bieler CA, Wiessler M, Erdinger L, Suzuki H, Enya T, Schmeiser HH. 1999. DNA adduct formation from the mutagenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Mutat Res* 439:307-311.
- Bieler CA, Arlt VM, Wiessler M, Schmeiser HH. 2003. DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone in V79 cells expressing human cytochrome P450 enzymes. *Cancer Lett* 200:9-18.
- Bofetta P, Dosemeci M, Gridley G, Bath H, Moradi T, Silverman D. 2001. Occupational exposure to diesel engine emissions and risk of cancer in Swedish men and women. *Cancer Causes Control* 12:365-374.
- Borlak J, Hansen T, Yuan Z, Sikka HC, Kumar S, Schmidbauer S, Frank H, Jacob J, Seidel A. 2000. Metabolism and DNA-binding of 3-nitrobenzanthrone in primary rat alveolar type II cells, in human fetal bronchial, rat epithelial and mesenchymal cell lines. *Polycyclic Aromat Compds* 21:73-86.
- Cariello NF, Piegorsch WW, Adams WT, Skopek TR. 1994. Computer program for the analysis of mutational spectra: application to p53 mutations. *Carcinogenesis* 15:2281-2285.
- Enya T, Suzuki H, Watanabe T, Hirayama T, Hisamatsu Y. 1997. 3-nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhausts and airborne particulates. *Environ Sci Technol* 31:2772-2776.
- Enya T, Kawanishi M, Suzuki H, Matsui S, Hisamatsu Y. 1998. An unusual DNA adduct derived from the powerfully mutagenic environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone. *Chem Res Toxicol* 11:1460-1467.
- Feilberg A, Ohura T, Nielsen T, Poulsen MWB, Amagai T. 2002. Occurrence and photostability of 3-nitrobenzanthrone associated with atmospheric particles. *Atmos Environ* 36:3591-3600.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M Jr. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res* 245:245-249.
- Heddle JA, Martus HJ, Douglas GR. 2003. Treatment and sampling protocols for transgenic mutation assays. *Environ Mol Mutagen* 41:1-6.
- International Agency for Research on Cancer. 1989. Evaluation of carcinogenic risk to humans: diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Itoh T, Kuwahara T, Suzuki T, Hayashi M, Ohnishi Y. 2003. Regional mutagenicity of heterocyclic amines in the intestine: mutation analysis of the *cII* gene in λ lacZ transgenic mice. *Mutat Res* 539:99-108.
- Jakubczak JL, Merlino G, French JE, Muller WJ, Paul B, Adhya S, Garges S. 1996. Analysis of genetic instability during tumor progression using a novel selection-based assay for in vivo mutations in a bacteriophage λ transgene target. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9073-9078.
- Kawanishi M, Enya T, Suzuki H, Takebe H, Matsui S, Yagi T. 1998. Mutagenic specificity of a derivative of 3-nitrobenzanthrone in the *supF* shuttle vector plasmids. *Chem Res Toxicol* 11:1468-1473.
- Kawanishi M, Enya T, Suzuki H, Takebe H, Matsui S, Yagi T. 2000. Postlabelling analysis of DNA adducts formed in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone. *Mutat Res* 470:133-139.
- Kohara A, Suzuki T, Honma M, Oomori T, Ohwada T, Hayashi M. 2002a. Dinitropyrenes induce gene mutations in multiple organs of the λ lacZ transgenic mouse (Muta Mouse). *Mutat Res* 515:73-83.
- Kohara A, Suzuki T, Honma M, Ohwada T, Hayashi M. 2002b. Mutagenicity of aristolochic acid in the λ lacZ transgenic mouse (Muta Mouse). *Mutat Res* 515:63-72.
- Lamy E, Kassie F, Gminski R, Schmeiser HH, Mersch-Sundermann V. 2004. 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2 cells) cells. *Toxicol Lett* 146:103-109.
- Murahashi T. 2003. Determination of mutagenic 3-nitrobenzanthrone in diesel exhaust particulate matter by three-dimensional high-performance liquid chromatography. *Analyst* 128:42-45.
- Murahashi T, Watanabe T, Otake S, Hattori Y, Takamura T, Wakabayashi K, Hirayama T. 2003a. Determination of 3-nitrobenzanthrone in surface soil by normal-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 992:101-107.
- Murahashi T, Iwanaga E, Watanabe T, Hirayama T. 2003b. Determination of the mutagen 3-nitrobenzanthrone in rainwater collected in Kyoto, Japan. *J Health Sci* 49:386-390.
- Nagao M, Wakabayashi K, Ushijima T, Toyota M, Totsuka Y, Sugimura T. 1996. Human exposure to carcinogenic heterocyclic amines and their mutational fingerprints in experimental animals. *Environ Health Perspect* 104(Suppl 3):497-501.
- Phousongphouang PT, Grosovsky AJ, Eastmond DA, Covarrubias M, Arey J. 2000. The genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and the nitropyrene lactones in human lymphoblasts. *Mutat Res* 472:93-103.
- Purohit V, Basu AK. 2000. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chem Res Toxicol* 13:673-692.
- Sato H, Sone H, Sagai M, Suzuki KT, Aoki Y. 2000. Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis* 21:653-661.
- Seidel A, Dahmann D, Krekler H, Jacob J. 2002. Biomonitoring of polycyclic aromatic compounds in the urine of mining workers occupationally exposed to diesel exhaust. *Int J Hyg Environ Health* 204:333-338.
- Strauss BS. 1991. The "A-rule" of mutagen specificity: a consequence of DNA polymerase bypass of non-instructional lesions? *Bioessays* 13:79-84.
- Suzuki T, Wang X, Miyata Y, Sacki K, Kohara A, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni M. 2000. Hepatocarcinogen quinoline induces G:C to C:G transversions in the *cII* gene in the liver of λ lacZ transgenic mice (Muta Mouse). *Mutat Res* 456:73-81.
- Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW.

- Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirsalis JC, Suzuki T, Yajima N. 2003. In vivo transgenic mutation assays. *Mutat Res* 540:141-151.
- Tokiwa H, Ohnishi Y. 1986. Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *CRC Crit Rev Toxicol* 17:23-60.
- Tokiwa H, Sera N, Horikawa K, Nakanishi Y, Shigematu N. 1993. The presence of mutagens/carcinogens in the excised lung and analysis of lung cancer induction. *Carcinogenesis* 14:1933-1938.
- Watanabe T, Hasei T, Yoshifumi T, Otake S, Murahashi T, Takamura T, Hirayama T, Wakabayashi K. 2003. Mutagenic activity and quantification of nitroarenes in surface soil in the Kinki region of Japan. *Mutat Res* 538:121-131.
- World Health Organization. 2003. World cancer report. Lyon: International Agency for Research on Cancer Press.
- Yaffe D, Cohen Y, Arey J, Grosovsky AJ. 2001. Multimedia analysis of PAHs and nitro-PAH daughter products in the Los Angeles basin. *Risk Anal* 21:275-294.

APPENDIX. Mutant Frequencies in the *cH* Gene From Various Organs of Individual Muta Mouse Treated With 3-NBA Are as Follows.

Organ	Treatment	ID	Total plaques	Mutants	MF × 10 ⁻⁶	Mean MF ± SD	
Lung	Control	11	523500	10	19.1	38.1 ± 24.4	
		12	332250	12	36.1		
		13	534000	9	16.9		
		14	322500	25	77.5		
		15	441000	18	40.8		
	3-NBA	31	475500	13	27.3		
		32	478500	28	58.5		
		33	538500	13	24.1		
		34	921000	43	46.7		
		35	307500	11	35.8		
Liver	Control	11	1455000	34	23.4	30.5 ± 12.1	
		12	468000	18	38.5		
		13	576000	12	20.8		
		14	939000	45	47.9		
		15	507000	11	21.7		
	3-NBA	31	No packaging				
		32	111000	18	162.2		
		33	45750	4	87.4		
		34	68250	14	205.1		
		35	66750	9	134.8		
Kidney	Control	11	627000	25	39.9	36.2 ± 13.4	
		12	2175000	42	19.3		
		13	2445000	62	25.4		
		14	2166000	97	44.8		
		15	2199000	113	51.4		
	3-NBA	31	1134000	66	58.2		
		32	1566000	41	26.2		
		33	978000	41	41.9		
		34	1368000	35	25.6		
		35	888000	32	36.0		
Colon	Control	11	1047000	51	48.7	36.7 ± 17.6	
		12	2724000	60	22.0		
		13	3132000	55	17.6		
		14	672000	40	59.5		
		15	2232000	80	35.8		
	3-NBA	31	1119000	442	395.0		
		32	1725000	338	195.9		
		33	No packaging				
		34	2136000	333	155.9		
		35	1222500	352	287.9		
Spleen	Control	11	153000	51	33.3	28.8 ± 9.6	
		12	736500	100	135.8*		
		13	1275000	26	20.4		
		14	1194000	48	40.2		
		15	708000	15	21.2		
	3-NBA	31	816000	30	36.8		
		32	723000	17	23.5		
		33	460500	22	47.8		
		34	2175000	49	22.5		
		35	627000	26	41.5		

APPENDIX. *Continued*

Organ	Treatment	ID	Total plaques	Mutants	MF × 10 ⁻⁶	Mean MF ± SD
Testis	Control	11	1189500	23	19.3	15.2 ± 7.4
		12	1119000	7	6.3	
		13	489000	4	8.2	
		14	724500	15	20.7	
		15	694500	15	21.6	
	3-NBA	31	633000	14	22.1	
		32	913500	28	30.7	
		33	766500	17	22.2	
		34	673500	9	13.4	
		35	664500	17	25.6	
Bladder	Control	12	1587000	27	17.0	22.8 ± 6.3
		13	873000	8	9.2	
	3-NBA	32	943500	58	61.5	
		34	1908000	90	47.2	

*Value was excluded for mean ± SD.

ヒストン脱アセチル化酵素 阻害剤開発の最前線

鈴木 孝禎

Takayoshi SUZUKI

名古屋市立大学大学院薬学研究科助手

宮田 直樹

Naoki MIYATA

名古屋市立大学大学院薬学研究科教授

1.はじめに

2003年4月にヒトゲノム配列の解読完了が宣言された。DNA情報がRNAに転写され、さらにタンパク質へ翻訳されるというセントラルドグマに従うと、ヒトゲノム配列の読解により生命機能を担うすべてのタンパク質が分かれば生命現象がすべて理解できるはずである。しかし、実際にはDNAの塩基配列だけでは理解できない生命現象は多く存在する。例えば、一つの受精卵からの細胞の分化である。すべての細胞は同じ塩基配列のDNAを持っているにも関わらず、異なる形態や機能を持つ細胞へと分化していく。これは、DNAの塩基配列が同じであっても発現する遺伝子の種類が異なるためである。最近の研究により、ヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化やDNAのメチル化などの修飾が塩基配列に依存せず遺伝子の発現を制御することが明らかになってきた。このような後天的な修飾により遺伝子発現が制御されることに起因する遺伝学あるいは分子生物学の研究分野は「エピジェネティクス」と呼ばれる。エピジェネティックな制御を行う化合物は、生命現象を理解するための重要なツールとなるであろうし、エピジェネティックな異常は癌などの疾病をもたらすことも明らか

になっていることから、治療薬として応用できる可能性もある。本稿では、エピジェネティックな制御を行う物質の一つとして最近注目されているヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の開発について最近の動向を概説する。

2.HDACの機能と構造

HDACはヒストンのN末端テールのアセチル化されたリシン残基からアセチル基を除去する反応を触媒している(図1)。その逆反応、すなわちヒストンのリシン残基をアセチル化する反応は、ヒストンアセチル化酵素(HAT)が担っている。HDACとHATによるヒストンリシン残基の可逆的アセチル化により多くの遺伝子の発現が制御されている。¹⁾一般に、ヒストンが脱アセチル化された状態では転写は抑制され、ヒストンのアセチル化が亢進すると転写は活性化される。いかにしてヒストンのアセチル化が転写を促進しているかについては、不明な点が多かった。しかし最近、転写基本因子TFIIDの構成成分であるTAF_{II}250とヒストンH4のアセチル化部分の結合がX線結晶構造解析により明らかにされたことから、転写因子がヒストンのアセチル化されたリシン残基を認識し、特定の遺伝子のプロモーターに近づきやすくなることで転写の活性化に寄与していると考えられるようになった(図2)。²⁾

1996年にSchreiberらによって、ヒトヒストン脱アセチル化酵素の精製、クローニングが行われ、それが出芽酵母の転写因子Rpd3のホモログであることが明らかにされた。³⁾それ以来、今日までに複数のヒトHDACが見つかっており、構造上、酵母の転写因子であるRpd3に近いクラスI(HDAC1, 2, 3, 8, 11)、酵母のHda1に類似しているクラスII(HDAC4, 5, 6, 7, 9, 10)、酵母のタンパク質silent information regulator 2 (Sir 2)に相同性を示すクラスIII(SIRT1~7)の3つのグループに分類されている。⁴⁾これら各HDACの機能については、細胞内局在、標的選択性などに焦点が当てられ、盛んに研究が進められている。

近年、HDACの構造研究に関しては、大きな進展が見られた。1999年、FinninらによりヒトHDACホモログであるHDLP(HDAC-like protein)とヒドロキサム酸系HDAC阻害剤として知られるトリコスタチンA(TSA, 1)及びスベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA, 2)(図3)の複合体の結晶構造が、⁵⁾2004年にはヒトHDACのアイソザイムの一つであるHDAC8とヒドロキサム酸系阻害剤の複合体の結晶構造が発表された。⁶⁾酵素活性ポケットの内壁は疎水性残基によって形成され、ポケットの底部にはZn²⁺イオンが存在していることが明らかとなった。ヒドロキサム酸系HDAC阻害剤のヒドロキサム酸部分のカルボニル基とヒドロキシル基の酸素が

Zn²⁺に配位しており、さらにカルボニル基の酸素は Tyr306 (HDAC8 の番号) と、窒素原子に付いた水素は His143 と、ヒドロキシル基の水素は His142 とそれぞれ水素結合を形成していることが明らかにされている (図 4)。また、この結晶構造から図 4 に示すような HDAC によるヒストン脱アセチル化のメカニズムが推定されている。まず、Zn²⁺ 及び His により活性化され求核性を増した水分子が、Zn²⁺ に配位することにより求電子性の高まったヒストンリシン残基のアセタミドのカルボニル基を求核攻撃する。ここでカルボニルの炭素は四面体構造をとるが、最終的に C-N 結合の開裂が起きて脱アセチル化が完結する。HDAC の三次元構造が明らかになり作用機序が推定されたことにより、その後の HDAC 阻害剤の開発研究は加速した。

3.HDAC 阻害剤

3-1.HDAC 阻害剤の抗癌作用

HDAC 阻害剤により HDAC の機能を停止させると相対的に HAT の働きが強くなり、ヒストンは過剰にアセチル化された状態となる。ヒストンのアセチル化により、多くの遺伝子の転写活性化が起こるが、その中で最も注目されている遺伝子が癌抑制に関わる p21 遺伝子である。⁷⁾p21 は、cyclin-dependent kinase-2 を阻害し、細胞周期を停止することが知られている。また、caspase-3 や FAS などアポトーシス誘導に関与する遺伝子の発現も上昇することが報告されている。⁸⁾実際に、TSA(1) や SAHA(2) などの HDAC 阻害剤は、癌細胞の細胞周期の停止、アポトーシスの誘導などの生物活性を示し、動物実験のレベルでも癌の増殖を抑えることが分かっている。⁹⁾それゆえに HDAC 阻害剤は、HDAC の機能を調べるためのプローブとしてだけでなく、新たな作用機序の抗癌剤としても期待されている。以下に HDAC 阻害剤の最近の進展について述べるが、SIRT (Sir2) 阻害剤については参考文献を参照されたい。¹⁰⁾

3-2.ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害剤

Streptomyces 属の真菌から単離された TSA(1) が HDAC を阻害することが吉田らにより報告されて以来、¹¹⁾TSA(1) をモデルに SAHA(2) など、多くの HDAC 阻害剤が開発されてきた。HDAC 阻害剤は、酵素の活性中心において亜鉛にキレートする zinc-binding group (ZBG) 部位、ポケットの入り口付近で疎水性相互作用をすると考えられている cap 部位、その二つをつなぐ linker 部位の三つのパーツから構成される (図 3)。

これまでに最も多く報告されているのが、ZBG としてヒドロキサム酸を持つ HDAC 阻害剤である (図 6)。TSA、SAHA の linker 部位、cap 部位を変換することにより活性や安全性の改善された阻害剤が見出されている。吉田らにより開発された CHAP31(3)、¹²⁾上里、

長岡らにより見出された *N*-ヒドロキシベンズアミド(4)、¹³⁾Richon らにより報告された Pyroxamide(5)、¹⁴⁾Novartis 社で研究開発された NVP-LAQ824(6)、¹⁵⁾Schreiber らによりコンビナトリアルライブラリーから見出された tubacin(7)¹⁶⁾などが知られている。ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害剤の中では、SAHA(2)、Pyroxamide(5)、NVP-LAQ824(6)が、現在抗癌剤として臨床試験が進められている。また、tubacin(7)は細胞内で HDAC6 を選択的に阻害することが報告されており、HDAC の機能をより詳しく解明するのに役立つことが期待されている。

3-3.非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害剤

ZBG としてヒドロキサム酸を持たない HDAC 阻害剤もいくつか報告されている (図 7)。三井製薬 (現・日本シエーリング) で創製され、現在臨床開発中である MS-275(8)は、ZBG としてアミノアニリド構造を持つ。この構造の HDAC 阻害剤もいくつか開発されており、MethylGene 社のスルホンアミド化合物 (9)は動物実験レベルでも高い抗癌活性を示すこと、¹⁷⁾また、Schreiber らにより見出された histacin(10)及び PAOA(11)は、細胞内の HDAC6 に対し阻害活性を示さない HDAC 阻害剤であることが報告されている。¹⁸⁾

Abbott 社により、 α -ケトアミド(12)などの求電子性ケトンをも有する化合物が HDAC 阻害活性を持つことが報告された。¹⁹⁾求電子性ケトンは容易に水和され、1,1-ジオールとなり、その 2 つの酸素原子が酵素の活性部位の亜鉛に配位することにより HDAC 阻害活性を示すと考えられている。しかし、これらの求電子性ケトンは、生体内で容易に還元され不活性なアルコール体に代謝されてしまうという欠点がある。

Schultz らは、酵素の三次元構造を基にした設計により SAHA のヒドロキサム酸が *N*-ホルミルヒドロキシルアミンに置換された TWZ105(13)を見出した。²⁰⁾TWZ105(13)は、ホルミル基の酸素原子とヒドロキシルアミノ基の酸素原子が酵素活性部位の亜鉛に配位して、HDAC 阻害活性を示すと考えられている。*N*-ホルミルヒドロキシルアミン誘導体は、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤においては、ヒドロキサム酸に比べ体内動態が優れていることから、HDAC 阻害剤においても同様の効果が期待される。

我々は、酵素活性中心に存在する亜鉛イオンが高い硫黄親和性を持つことに着目し、新規 HDAC 阻害剤としてチオール(14)を見出した。²¹⁾さらに linker 部位、cap 部位の構造最適化及びプロドラッグ化の検討により見出されたチオエステル(15)は、癌細胞増殖抑制試験で SAHA に匹敵する強い活性を示した。また、西野らはマクロサイクリックジスルフィド(16)が還元条件で強い HDAC 阻害作用を示すことを報告している。²²⁾藤沢薬品 (現・アス

テラス製薬) は、シュードモナス菌から単離した FK228(17)を臨床試験に進めているが、FK228(17)でも細胞内の還元条件下で生成したチオールが HDAC を阻害すると考えられている。²³⁾

HDAC の触媒メカニズムを基にした HDAC 阻害剤の設計も行われており、現在までにホスホネート、スルホンメチル、メルカプトアセタミドを ZBG に持つ化合物が HDAC 阻害能を有することが分かっている。特に我々が基質アナログとして見出したメルカプトアセタミド(18)は、SAHA と同等の HDAC 阻害活性を示すことから、新たなバイオプローブ、抗癌剤開発に向けたリード化合物として期待できる。²⁴⁾

4.展望

現在までに 18 種類の HDAC が同定されているが、それぞれの HDAC のアイソザイムの詳しい機能は不明な点も多い。HDAC のアイソザイムに特異性の高い阻害薬は、あらゆる生命現象を理解するために必要な生物学研究の重要なツールとして利用できるであろうし、副作用の少ない抗癌剤としても期待できる。すでにアイソザイム特異的な HDAC 阻害剤の探索研究も始まっている。^{12),16),18),25)}興味深いことに、非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬は HDAC6 に対する感受性が低いことが最近報告され、²⁵⁾非ヒドロキサム酸系 ZBG のアイソザイム特異性における重要性が示された。今後、これらの知見を基にアイソザイム特異的な HDAC 阻害剤が見出され、生物学研究及び癌治療の分野に大きく貢献することが期待される。

参考文献

- 1) Grozinger, C. M. *et al.*, *Chem. Biol.*, **9**, 3(2002).
- 2) Jacobson, R. H. *et al.*, *Science*, **288**, 1422(2000).
- 3) Taunton, J. *et al.*, *Science*, **272**, 408(1996).
- 4) 小杉浩史, *医学のあゆみ*, **208**, 264(2004).
- 5) Finnin, M. S. *et al.*, *Nature*, **401**, 188(1999).
- 6) Somoza, J. R. *et al.*, *Structure*, **12**, 1325(2004).
- 7) Sambucetti, L. C. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **274**, 34940(1999).
- 8) Klisovic, D. D. *et al.*, *Invest. Ophth. Vis. Sci.*, **44**, 2390(2003).
- 9) Yoshida, M. *et al.*, *BioEssays*, **17**, 423(1995).
- 10) Posakony, J. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **47**, 2635(2004).
- 11) Yoshida, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 17174(1990).

- 12) Furumai, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 87(2001).
- 13) Maeda, T. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 4351(2004).
- 14) Butler, L. M. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **7**, 962(2001).
- 15) Remiszewski, S. W. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **46**, 4609(2003).
- 16) Haggarty, S. J. *et al.*, *Chem. Biol.*, **10**, 383(2003).
- 17) Fournel, M. *et al.*, *Cancer Res.*, **62**, 4325(2002).
- 18) Wong, J. C. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 5586(2003).
- 19) Wada, C. K. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3331(2003).
- 20) Wu, T. Y. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 449(2004).
- 21) Suzuki, T. *et al.*, *J. Med. Chem.*, **48**, 1019(2005).
- 22) Nishino, N. *et al.*, *Org. Lett.*, **5**, 5079(2003).
- 23) Furumai, R. *et al.*, *Cancer Res.*, **62**, 4916(2002).
- 24) Suzuki, T. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 331(2005).
- 25) Glaser, K.B. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 683(2004).

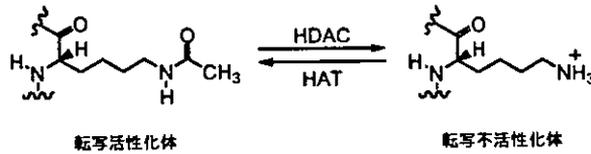


図1 ヒストンの可逆的アセチル化による遺伝子発現制御機構

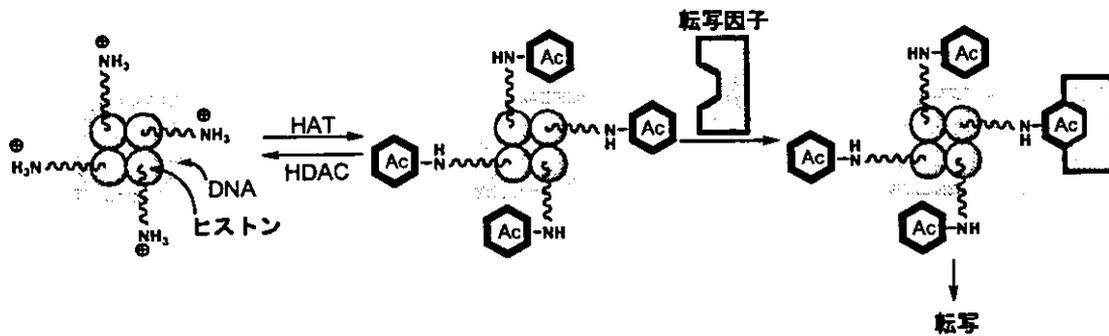


図2 ヒストンのアセチル化による転写活性化の機構
転写因子はアセチル基を認識し、特定遺伝子の転写を活性化する。

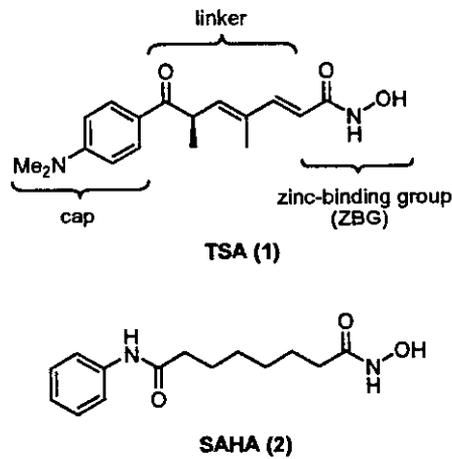


図3 TSA と SAHA の構造

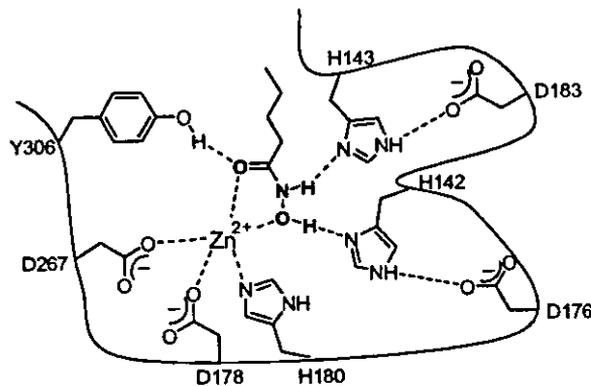


図4 ヒドロキサム酸とHDAC活性中心を構成するアミノ酸、亜鉛イオンとの相互作用

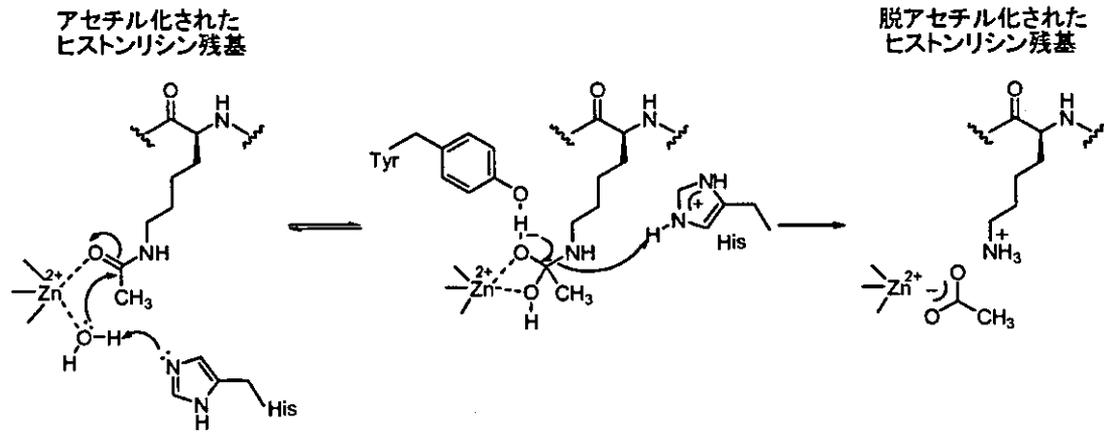


図5 HDACによるヒストン脱アセチル化の推定機構

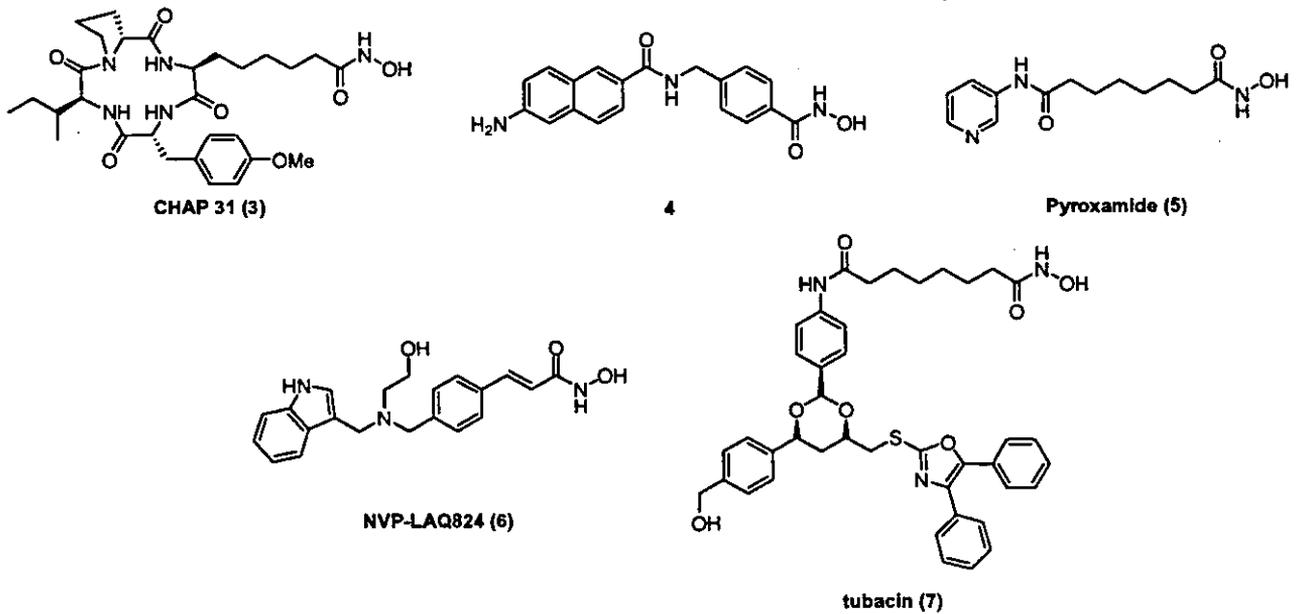


図6 ヒドロキサム酸系HDAC阻害剤

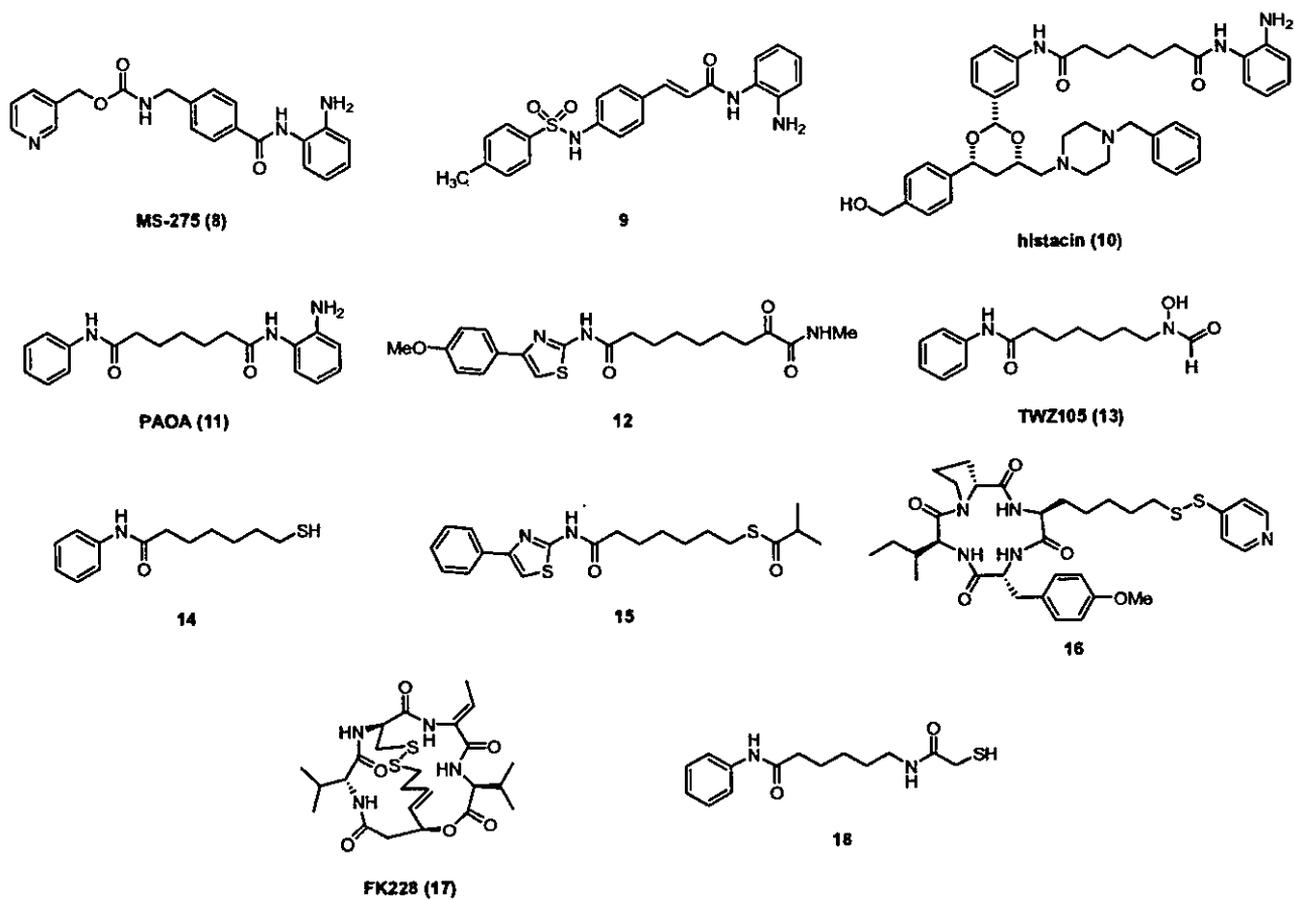


図7 非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害剤

癌の分子標的治療薬の開発

—非ヒドロキサム酸系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の設計, 合成と生物活性評価—

Molecularly Targeted Approach to Cancer Therapy: Design, Synthesis and Biological Activity of Non-hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors

鈴木 孝禎*, 中川 秀彦, 宮田 直樹*

Takayoshi Suzuki*, Hidehiko Nakagawa and Naoki Miyata*

*名古屋市立大学大学院薬学研究科創薬生命科学専攻薬化学教室

(467-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

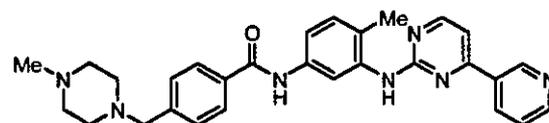
(3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya, Aichi 467-8603)

As part of our studies towards molecularly targeted cancer therapy, we developed novel non-hydroxamate histone deacetylase (HDAC) inhibitors. A series of compounds modeled after suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) was designed as follows: (i) structure-based drug design; (ii) design applying the thiophilicity of zinc ion; (iii) design based on the structure of the transition state; (iv) design based on the enzyme catalysis mechanism; and (v) irreversible inhibition-oriented design. In this series, compound 7, in which the hydroxamic acid of SAHA is replaced by a thiol, was found to be as potent as SAHA, and optimization of this series led to HDAC inhibitors 43, 47, 52 and 53, which were more potent than SAHA. In cancer cell growth inhibition assay, *S*-acyl derivative 68, a prodrug of thiol 48, showed strong activity, and its potency was comparable to that of SAHA. Kinetic enzyme assay and molecular modeling study suggested that the thiol interacts with the zinc ion in the active site of HDACs.

Keywords: molecularly targeted cancer therapy, histone deacetylase, inhibitor, hydroxamic acid, non-hydroxamate, zinc protein, drug design

はじめに

世界一の長寿国となった現在の日本において、主要死因別死亡率のトップは癌である。故に今日の癌研究では、患者の quality of life (QOL) 向上のため、より副作用の少ない抗癌剤の合成や探索が行われている。このような状況の中、最近注目されているのが分子標的治療薬である。最近のヒト細胞のバイオサイエンス研究の急速な進歩により、癌細胞の増殖あるいは悪性化の分子機構が明らかにされつつある。癌細胞の増殖に関与する分子の機能を制御することにより癌治療を行うという新しいコンセプトが癌の分子標的治療である。癌の分子標的治療薬は、癌細胞の異常増殖の原因となる分子あるいはそのシグナル伝達経路など、癌の原因により近い分子を標的とするため、従来の治療薬に比べ副作用が少ないことが期待される。現在、乳癌細胞に特異的に高発現する ErbB2 を標的とした癌抗体薬剤 trastuzumab¹⁾や BCR/ABL タンパクチロシンキナーゼ阻害剤 imatinib (図 1)²⁾などが癌の分子標的治療薬として日本で使用されている。



imatinib

Fig.1 Structure of imatinib.

最近、癌治療における標的分子の一つとして注目されているのがヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) である。本稿では、新たな癌の分子標的治療薬の開発を目的として、我々が見出した非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬の設計, 合成及び生物活性について述べる。

1. HDAC とは

1.1 HDAC の機能, 構造と触媒メカニズム

HDAC はヒストンのアセチル化されたリシン残基からアセチル基を除去する反応を触媒し、遺伝子発現を調節する重要な酵素である³⁾。1999年に報告されたヒト HDAC ホモログである HDLP (HDAC-like protein)

の結晶構造⁴⁾, 2004年に発表されたヒトHDACのアイソザイムの一つであるHDAC8の結晶構造⁵⁾から, HDACの構造についてはある程度の知見が得られている。基質結合部位の内壁は疎水性残基によって形成され, 酵素活性中心には亜鉛イオンが存在しており, それに水分子が配位していることが明らかになっている。また, この結晶構造からHDACによるヒストン脱アセチル化のメカニズムは次のように推定されている。まず, 亜鉛及びHis140 (HDAC1の番号)により活性化された水分子が亜鉛に配位したヒストンのアセチル化されたリシン残基のカルボニル基を求核攻撃する。カルボニルの炭素は四面体構造をとり, 最終的にC-N結合の開裂が起きて, Asp191-His141から電荷移動によりプロトンを受け取り, 脱アセチル化が完了する(図2)。

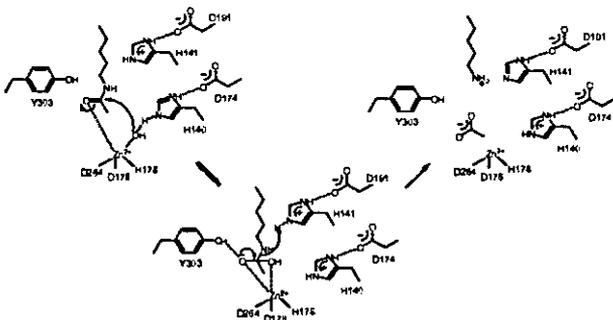


Fig.2 Proposed catalytic mechanism of acetylated lysine (H = His, D = Asp, Y = Tyr).

1.2 HDAC 阻害薬

HDACを阻害すると相対的にヒストンアセチル化酵素(HAT)の働きが強くなり, ヒストンは過剰にアセチル化された状態となる(図3)。このヒストンハイパーアセチレーションにより, 多くの遺伝子の転写活性化が起こる⁶⁾。HDAC阻害により転写活性化される遺伝子の中で最も注目されているのが癌抑制に関わるp21遺伝子である。p21は, cyclin-dependent kinase-2を阻害し, 癌の細胞周期を停止する⁷⁾。このような癌抑制に関わる遺伝子の発現を制御するHDAC阻害薬は, 新たな癌の分子標的治療薬となり得る。

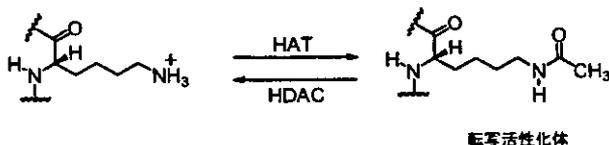


Fig.3 Mechanism of gene expression by the reversible acetylation of histone lysine residues.

これまでに報告されたHDAC阻害薬⁸⁾のほとんどはトリコスタチンA (TSA)⁹⁾やスベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)¹⁰⁾(図4)に代表されるようなヒ

ドロキサム酸系化合物であり, ヒドロキサム酸が酵素活性中心にある亜鉛に配位し, 基質であるアセチル化されたリシンに拮抗して阻害活性を示すと考えられている。しかしながら, 一般にヒドロキサム酸をzinc-binding group (ZBG)として持つ化合物は体内動態が悪く, 毒性の懸念も多い¹¹⁾。それ故に, より体内動態の改善した抗癌剤, より副作用の少ない抗癌剤になり得る非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の開発が望まれている。

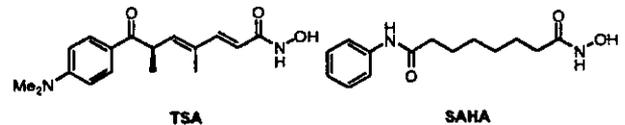


Fig.4 Structures of TSA and SAHA.

これまでに, Harvard大学のSchreiberらが報告した α -アミノアニリド¹²⁾やAbbott社で開発されたトリフルオロメチルケトン^{2¹³⁾}, Scripps研究所のSchultzらが見出したN-ホルミルヒドロキシアミン^{3¹⁴⁾}などの非ペプチド系低分子化合物がHDAC阻害活性を示すことが分かっているが(図5), それらの化合物は活性面でヒドロキサム酸系HDAC阻害薬を凌駕するものではない。このような背景を踏まえた上で, 我々は, 新たな癌の分子標的治療薬の開発を目的とし, 非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の創製を行った。

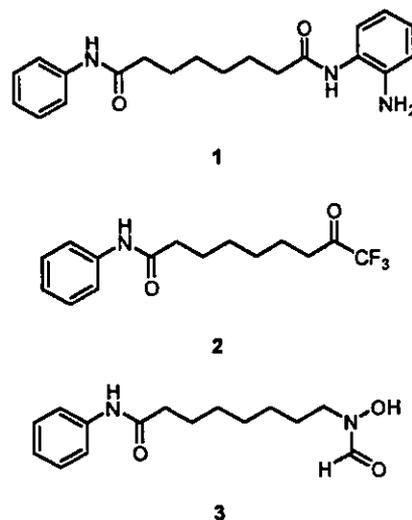
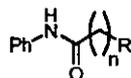


Fig.5 Previously reported non-hydroxamate HDAC inhibitors.

2. 非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の設計

我々は, 以下の5つの概念により図6に示すような非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の設計を行った。



- | | |
|--|--|
| 4 : R = -NHCONHOH, n = 5 | 12 : R = -NHCOCH ₂ NH ₂ , n = 5 |
| 5 : R = -NHCONHNH ₂ , n = 5 | 13 : R = -NHCOCH ₂ OH, n = 5 |
| 6 : R = -SO ₂ NHOH, n = 6 | 14 : R = -NHCOCH ₂ SH, n = 5 |
| 7 : R = -SH, n = 6 | 15 : R = -NHCOCH ₂ SAc, n = 5 |
| 8 : R = -SAC, n = 6 | 16 : R = -NHCH ₂ C≡CH, n = 5 |
| 9 : R = -SMe, n = 6 | 17 : R = -N(CH ₂ C≡CH) ₂ , n = 5 |
| 10 : R = -NHSO ₂ Me, n = 5 | 18 : R = -NHCOCH ₂ Br, n = 5 |
| 11 : R = -SO ₂ Me, n = 6 | |

Fig.6

2.1 酵素の三次元構造を基にした設計

HDLPあるいはHDAC8とSAHAの複合体のX線結晶構造解析の結果から、ヒドロキサム酸はHDACの活性中心にある亜鉛イオンに二座配位し、さらにチロシン及び2つのヒスチジン残基と水素結合することが分かっている(図7)^{4,5}。我々は、このデータを基に、亜鉛、チロシン、ヒスチジンと同様の相互作用をすることを考えられるヒドロキシウレア4、セミカルバジド5、ヒドロキシスルホンアミド6を設計した¹⁵。

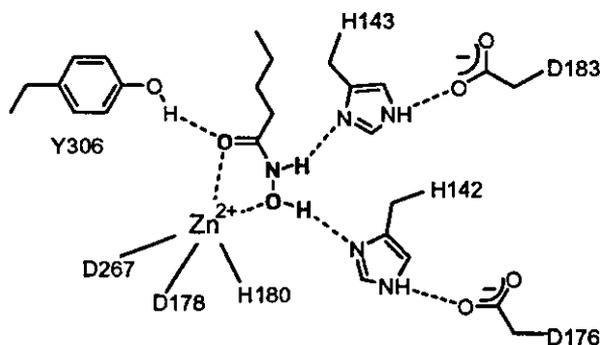


Fig.7

2.2 亜鉛の硫黄親和性の高さを利用した設計

亜鉛イオンは硫黄親和性が高いことが知られており、特にチオールは他の亜鉛含有酵素阻害薬でZBGとしてよく用いられる官能基である¹⁷。我々は、低分子HDAC阻害薬でも同様の効果が期待できると考え、SAHAのヒドロキサム酸をチオールに変換した化合物7及びチオエステル8、メチルスルフィド9を設計した¹⁶。

2.3 遷移状態アナログの設計

HDACの基質であるアセチル化されたリシンがHDACにより脱アセチル化される際の遷移状態構造は、アミドカルボニルが亜鉛に配位した水分子から求核攻撃を受け、テトラヘドラルな炭素を含む構造になると考えられている(図2, 図8a)^{4,5}。我々は、このテトラヘドラルな炭素を硫黄に置き換えた構造、すなわちスルホン誘導体が遷移状態構造に類似していることに着目し(図8b)¹⁹、スルホンアミド10、スルホン11を遷移状態アナログとして設計した¹⁸。

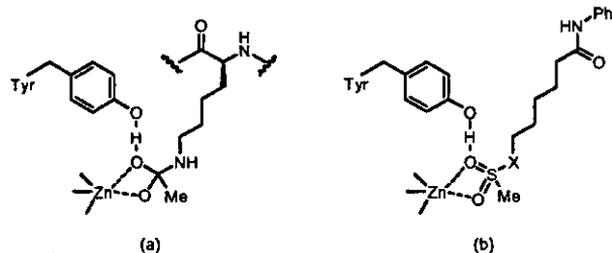


Fig.8 The transition state proposed for HDACs (a), and models for the binding of sulfone derivatives (b).

2.4 酵素の触媒メカニズムを基にした設計

酵素反応部位に取り込まれた基質のアセチル化されたリシンは、亜鉛に配位した水分子から求核攻撃を受け、脱アセチル化されると考えられている(図2, 図9a)^{4,5}。そこで我々は、アセタミドのカルボニルのα位に不対電子をもつヘテロ原子を導入すれば、その原子が亜鉛に配位することにより、脱アセチル化に必要な水分子を加水分解の反応点から追い出してHDACを阻害することができると考え(図9b)、ヘテロ原子の置換したアセタミド12-15を基質アナログとして設計した¹⁸。

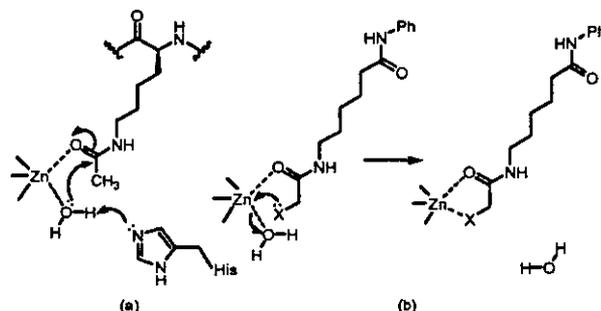


Fig.9 The mechanism proposed for the deacetylation of acetylated lysine substrate (a), and a model for the binding of hetero atom-containing substrate analogues to zinc ion (b).

2.5 不可逆的阻害を意図した設計

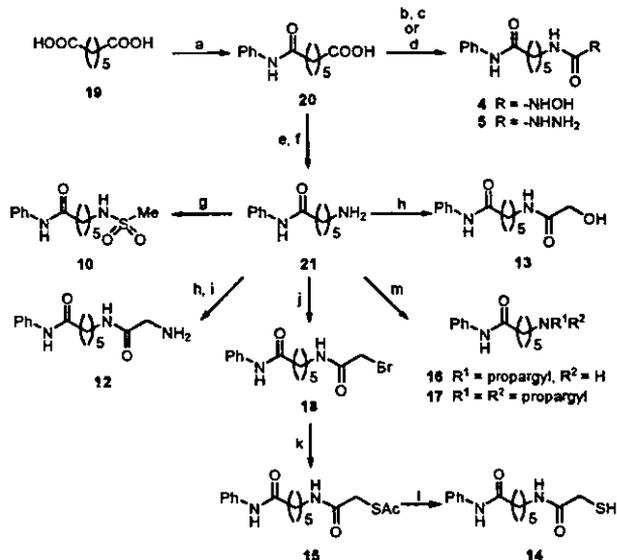
HDLP, HDAC8の3次元構造から、酵素の活性中心はヒスチジンなどの求核性の高いアミノ酸から構成されていることが分かっている^{4,5}。我々は、それらのアミノ酸残基と共有結合を形成し、不可逆的に酵素を阻害し得る化合物としてプロパルギルアミン16, 17, プロモアセタミド18を設計した¹⁵。

3. 非ヒドロキサム酸系化合物の合成

スキーム1に化合物4, 5, 10, 12-18の合成ルートを示す。化合物4, 5は、ジカルボン酸19から合成した。19をモノアミド化した後、Curtius転位により生成したイソシアネートにO-テトラヒドロピラニルヒドロキシルアミンあるいはヒドラジンを反応させ、O-テトラヒドロピラニルヒドロキシウレア及びセミカルバジド5を得た。O-テトラヒドロピラニルヒドロキシウレアを酸性条件で脱保護することによりヒドロキシ

ウレア **4** を合成した。

化合物 **10** 及び **12-18** は、共通の中間体であるアミン **21** から合成した。まず、カルボン酸 **20** を Curtius 転位を用いアミン **21** に変換し、**21** をメシル化することによりスルホンアミド **10** を得た。アミノアセタミド **12** は、アミン **21** と *N*-tert-ブトキシカルボニルグリシンをカップリングさせた後、脱保護を行うことにより、またヒドロキシアセタミド **13** は、**21** とグリコール酸をカップリングすることにより合成した。アミン **21** をプロモアセチルブロマイドと反応させ、プロモアセタミド **18** を得、つづいてポタシウムチオアセテートと反応させ、チオエステル **15** に導いた後、脱アセチル化を行い、メルカプトアセタミド **14** を得た。モノ及びジプロパルギル体 **16, 17** は、アミン **21** をプロパルギルブロマイドと反応させることにより合成した。

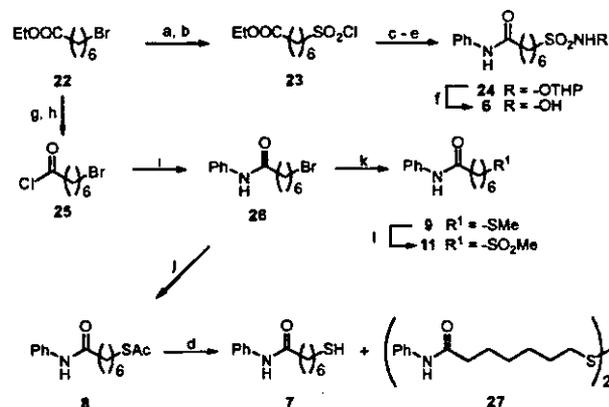


(a) aniline, 180°C, 49%; (b) diphenylphosphoryl azide (DPPA), Et₃N, toluene, reflux, and then *O*-(2-tetrahydropyranyl)hydroxylamine, reflux, 69%; (c) TsOH, MeOH, rt, 32%; (d) DPPA, Et₃N, benzene, reflux, and then hydrazine monohydrate, reflux, 52%; (e) DPPA, Et₃N, benzene, reflux, and then BrOH, reflux, 63%; (f) H₂, 5%Pd-C, MeOH, rt, 96%; (g) MsCl, pyridine, rt, 71%; (h) HOCH₂COOH or BocNHCH₂COOH, EDCl, HOBT, DMF, rt, 70% for **12**, 99% for **13**; (i) TFA, CHCl₃, rt, 84%; (j) BrCH₂COBr, Et₃N, THF, rt, 23%; (k) AcSK, EtOH, rt, 99%; (l) K₂CO₃, MeOH, rt, 62%; (m) propargyl bromide, K₂CO₃, MeOH, rt, 51% for **16**, 23% for **17**.

Scheme 1

化合物 **6-9** 及び **11** は、スキーム 2 に従い、ブロマイド **22** から合成した。**22** を亜硫酸ナトリウムでスルホン酸ナトリウムに変換後、塩化チオニルにより塩化スルホニル **23** へと導いた。**23** と *O*-テトラヒドロピラニルヒドロキシルアミンからスルホンアミドを得、エステルの加水分解、アミド化により得た **24** のテトラヒドロピラニル基を脱保護することでヒドロキシスルホンアミド **6** を合成した。チオール **7**, チオアセテート **8**, メチルスルフィド **9** 及びスルホン **11** の合成は、以下のように行った。まず、**22** を 7-プロモヘプタン

酸クロライド **25** に誘導し、アニリンと反応させることによりアミド体 **26** を得た。**26** のプロモ基をチオアセテートに置換し **8** を得た後、加水分解することにより、目的のチオール **7** を合成した。チオール **7** の合成の際、副産物としてジスルフィド **27** もわずかに (4%) 生成した。チオアセテート **8** を合成した時と同様の置換反応によりスルフィド **9** を得、*m*-クロロ過安息香酸で酸化することによりスルホン **11** に導いた。



(a) Na₂SO₃, EtOH, H₂O, reflux; (b) SOCl₂, DMF, toluene, reflux, 93% (two steps); (c) *O*-(2-tetrahydropyranyl)hydroxylamine, 4-(dimethylamino)pyridine, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 94%; (d) 2N aq NaOH, EtOH, rt, 86% for **6**, 87% for **7**; (e) aniline, EDCl, HOBT, DMF, rt, 88%; (f) TFA, CH₂Cl₂, 60°C, 61%; (g) LiOH·H₂O, EtOH, THF, H₂O, rt, 99%; (h) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂, rt; (i) aniline, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 87%; (j) AcSK, EtOH, reflux, 98%; (k) 15% aq NaSMe, EtOH, rt, 99%; (l) *m*-chloroperoxybenzoic acid, CH₂Cl₂, rt, 70%.

Scheme 2

4. HDAC 阻害活性評価

4.1 非ヒドロキサム酸系化合物の酵素阻害活性評価

設計・合成した非ヒドロキサム酸系化合物 **4-18** の HDAC 阻害活性評価は、HDAC Activity Assay/Drug discovery Kit (AK-500, BIOMOL)を用いて行った。結果を表 1 に示す。

既知の HDAC 阻害薬である SAHA と α -アミノアニリド **1** の IC₅₀ 値は、それぞれ 0.28 μ M, 120 μ M であった。また、トリフルオロメチルケトン **2**, *N*-ホルミルヒドロキシアミン **3** は、それぞれ 6.7 μ M, 2.8 μ M の IC₅₀ 値で HDAC を阻害することが報告されている^{13,14}。

酵素の三次元構造を基に設計した化合物の中では、ヒドロキシウレア **4**, セミカルバジド **5** に HDAC 阻害活性が見られた¹⁵。しかしながら、それらの活性は、 α -アミノアニリド **1** と同等であったものの、SAHA やトリフルオロメチルケトン **2**, *N*-ホルミルヒドロキシアミン **3** には及ばなかった。

つぎに、亜鉛の硫黄親和性を利用して設計したチオール **7** の活性を調べた。チオールは一座配位で亜鉛にキレートするため、二座配位でキレートするヒドロキサム酸よりも亜鉛への配位能は小さいと考えられている。実際に、別の亜鉛含有酵素であるマトリックスポ

ロテイナーゼの阻害薬においては、チオール系阻害薬はヒドロキサム酸系阻害薬に比べ約 10 倍弱い酵素阻害活性しか示さないことが分かっている^{17b)}。しかしながら、チオール7はHDACに対しては予想以上の強い阻害活性を示した¹⁶⁾。チオール7のHDAC阻害活性は、 $IC_{50} = 0.21 \mu\text{M}$ と既知の非ヒドロキサム酸系阻害薬である α -アミノアニリド1、トリフルオロメチルケトン2、*N*-ホルミルヒドロキシルアミン3の活性を上回り、SAHAの活性と同等以上であった。S-アセチル体8、S-メチル体9では活性が减弱したことから、生理条件下で生成するチオレートアニオンが亜鉛の配位に関与していることが予想された。

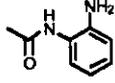
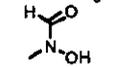
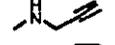
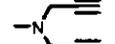
遷移状態アナログとしてHDACを阻害することを期待したスルホン誘導体10、11では、スルホン10が $IC_{50} = 230 \mu\text{M}$ でHDACを阻害したが¹⁸⁾、活性はSAHAや既知の非ヒドロキサム酸系阻害薬1-3には及ばなかった。

酵素の触媒メカニズムを基に設計したアセタミド12-15では、アミノアセタミド12、ヒドロキシアセタミド13は阻害活性を示さなかったが、メルカプトアセタミド14に強い活性が見られた¹⁸⁾。その活性は、 α -アミノアニリド1、トリフルオロメチルケトン2、*N*-ホルミルヒドロキシルアミン3を上回り、SAHAに匹敵した。S-アセチル体15では活性が低下したことから、チオール7の場合と同様にチオールのイオン化が活性発現の重要な要素であることが示唆された。

不可逆的阻害を意図して設計した化合物16-18の中では、プロモアセタミド18がHDAC阻害活性を示した¹⁹⁾。しかし、活性は、 α -アミノアニリド1を上回ったが、SAHAには及ばなかった。

以上の結果から、低分子HDAC阻害薬において、チオール及びメルカプトアセタミドがヒドロキサム酸に匹敵する活性を持つZBGであることが分かった。これら両官能基は、低分子HDAC阻害薬において、ヒドロキサム酸と同等の活性を示した初めてのZBGである。

Table 1 HDAC Inhibition Data for SAHA and SAHA-based Non-hydroxamates^a

compd	R	n	% inhbtn at 100 μM	IC_{50} (μM)
SAHA ^a	-CONHOH	6	100	0.28
1 ^c		6	48	120
2	-COCF ₃	6	ND	6.7 ^d
3		7	ND	2.8 ^e
4	-NHCONHOH	5	58	80
5	-NHCONHNH ₂	5	35	150
6	-SO ₂ NHOH	6	14	>100
7	-SH	6	100	0.21
8	-SAc	6	85	7.1
9	-SMe	6	11	>100
10	-NHSO ₂ Me	5	10	7500
11	-SO ₂ Me	6	33	230
12	-NHCOCH ₂ NH ₂	5	6	>100
13	-NHCOCH ₂ OH	5	0	>100
14	-NHCOCH ₂ SH	5	99	0.39
15	-NHCOCH ₂ SAc	5	72	22
16		6	16	>100
17		6	8	>100
18	-NHCOCH ₂ Br	6	79	14

^a Values are means of at least three experiments. ^b Prepared as described in ref 20. ^c Prepared as described in ref 12. ^d Data taken from the literature (ref 13). ^e Data taken from the literature (ref 14). ND = No Data.

4.2 酵素阻害機構の解析

今回我々が見出した低分子HDAC阻害薬は、酵素の活性中心にある亜鉛との相互作用を意図して設計したものである。そこで、最も高いHDAC阻害活性が見られたチオール7存在下での酵素反応速度の解析を行い、Lineweaver-BurkのプロットによりHDAC阻害機構を調べた(図10)²¹⁾。反応速度の逆数を縦軸に、基質濃度の逆数を横軸にとり、チオール7の濃度を変化させてプロットしたところ、それらの直線は縦軸上で交わり、その結果、チオール7のHDAC阻害機構は可逆的競合阻害であることが明らかとなった($K_i = 0.11 \mu\text{M}$)。システインは、HDACの基質結合部位を構成するアミノ酸には含まれていないことから、化合物7のスルフィドリル基はHDACのシステイン残基とジスルフィド結合を形成することなく、活性中心の亜鉛と相互作用していると考えられる。