

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32676

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19117

研究課題名（和文）PROTAC特有の標的タンパク質分解誘導機構を探索する分子プローブ群の創製と活用

研究課題名（英文）Design, synthesis, and utilization of molecular probes for exploring the PROTAC-specific mechanism of targeted protein degradation

研究代表者

叶 直樹（Kanoh, Naoki）

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40317293

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質分解誘導薬（PROTAC）の作用機序はユビキチン-プロテアソーム系が生理的基質タンパク質を分解する機構に則ったモデルで説明されてきた。しかしごく最近になって、PROTACが誘導する標的タンパク質分解は、既存の過程とは異なる過程を含むことが分かってきた。そこで本研究では、PROTAC特有のタンパク質分解誘導機構や、細胞内でのPROTACおよびタンパク質分解誘導に関わる重要因子の挙動を探索・解明するため、PROTACの蛍光プローブ、発蛍光性プローブ、フォトアフィニティー標識プローブを設計し、独自に開発した三価のPROTAC合成法を用いてこれらの合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PROTACは、世界中の製薬会社・ベンチャー企業による開発・臨床試験が進行している新しい薬のモダリティである。一方、その基本概念実証に関する最初の論文報告からまだ20年ほどしか経っていないため、未だよく分かっていないことも多く、中分子であるPROTACの標的部位および細胞内への移行性に関する情報も十分ではない。本研究で創製された複数のPROTACプローブは、基礎科学の観点から、PROTAC特有のタンパク質分解誘導機構や、細胞内でのPROTACおよびタンパク質分解誘導に関わる重要因子の挙動を探索・解明するために有用であり、本研究から得られた情報はタンパク質分解誘導薬の社会実装に大きく役立つ。

研究成果の概要（英文）：The mode of action of proteolysis-targeting chimeric molecules (PROTACs) has been solely explained according to the protein degradation mechanism via a ubiquitin-proteasome system. However, recent studies indicated that PROTAC-induced protein degradation included additional mechanisms specific to a PROTAC utilized. To clarify such as-yet-unknown PROTAC-specific mechanisms and cellular behaviors of the factors involved in PROTAC-induced target protein degradation, we designed and synthesized PROTAC fluorescent probes, turn-on fluorescent probes, and photoaffinity probes based on our originally developed trivalent PROTAC synthesis technology.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：標的タンパク質分解誘導薬 PROTAC 分子プローブ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、望みの細胞内タンパク質を選択的に分解できるキメラ型タンパク質分解誘導薬 (Proteolysis-targeting chimera: PROTAC) が世界で注目を集めている。PROTAC を介して E3 リガーゼと POI が三者複合体を形成すると、E3 リガーゼ上の E2 酵素から POI へのユビキチン (Ub) の転移が繰り返し起こる。Ub 鎖が付加された POI は、プロテアソームに認識され、分解される。この作用機序は、ユビキチン-プロテアソーム系が細胞内タンパク質 (生理的基質) を分解する機構に則ったモデルであり、これに基づき世界中の企業と研究機関が抗がん剤をはじめとした医薬品の開発を進めている。

(2) 一方、ごく最近になって、PROTAC が誘導する標的タンパク質分解は、ユビキチン-プロテアソーム系が生理的基質を分解する過程とは異なる過程を含むことが分かってきた。例えば、研究協力者らは、PROTAC が介する POI のユビキチン鎖の伸長には、想定される E3 リガーゼ以外の因子が関与することを発見した。他にも新規因子が報告されだしており、別の因子や機序が存在する可能性も示唆されている。また、三者複合体の細胞内局在・動態は、極めて人工的な系で解析されているため、理解が限定的である。よって、新規因子や細胞内動態を発見・理解し、PROTAC 特有の作用機序を明らかにすれば、薬剤設計の革新に繋がる大きな波及効果が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、独自に設計した分子プローブ群を創製し、これらを用いてタンパク質分解誘導薬特有のタンパク質分解誘導の仕組みを探索・解明することである。

### 3. 研究の方法

(1) これまでに、標的タンパク質分解誘導活性を保持しながら機能性官能基の追加が可能な PROTAC テンプレートの創製に成功している。これらのテンプレートは、最初に POI : PROTAC : E3 三者複合体の結晶構造が解かれた Brd4 タンパク質分解誘導剤 MZ-1 を基盤として設計した化合物群である。E3 リガンドと POI リガンドを繋ぐ PEG リンカー部に 3 置換ベンゼンを挿入しているため、配向性を規定しながら機能性官能基を追加できる。そこでまず、このテンプレートを用いて、蛍光色素を導入した蛍光プローブ群を合成する。合成した蛍光プローブをヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 に投与して、細胞内局在・挙動解析を行う。

(2) 次に、近接駆動型標識転移基を連結したプローブ群を合成し、これらを用いて三者複合体にリクルートされる因子の探索と同定を行う。すなわち、近接駆動型標識転移基から転移した蛍光色素、アジド基、またはビオチン基を指標としたタンパク質の探索を実施する。新規因子が同定されたら、標的タンパク質分解誘導におけるそれらの役割を明らかにする。

(3) 最後に、常時蛍光性の蛍光プローブ群と、三者複合体形成時に各因子 (タンパク質) に転移後、蛍光を発する発蛍光性プローブ群を複合的に利用して、PROTAC と三者複合体 (成分) および新規因子の時間依存的細胞内挙動を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 各種プローブ群の合成と評価: まず、PROTAC テンプレート合成に必要な合成フラグメントの大量合成を実施し、三置換ベンゼン異性体である 4 種の PROTAC テンプレートを大量合成した。これらに、常時蛍光性を示す 4-メチルクマリン、ピレン、N-ニトロベンゾオキサジアゾール (N-NBD) を、それぞれ各種鎖長のオリゴエチレングリコールリンカーを介して連結し、蛍光プローブとして 4-メチルクマリンプローブ、ピレンプローブ、および N-NBD プローブを合成した。また、近接駆動型標識転移基である酸素連結型 NBD 基 (O-NBD 基) を連結した発蛍光型 O-NBD プローブも合成した。

(2) 蛍光プローブの細胞内局在解析: 蛍光プローブをヒト繊維肉腫由来 HT-1080 細胞に処理し、細胞内局在を観察したところ、細胞内の微小な小胞に蛍光団由来の蛍光が局在する様子が観測された。より鮮明な蛍光画像を得るために蛍光プローブの添加濃度を上げたところ、培地中でプローブが析出する傾向が確認された。

(3) PROTAC テンプレート誘導体および PROTAC テンプレート由来プローブ群の物理化学的性質の解析と標的タンパク質分解誘導活性との相関解析: 上記の結果から、本プローブ群のバッファ

への溶解性が低いことが明らかとなった。また、プローブ化した化合物群の標的タンパク質分解誘導活性の低下も確認された。これらの結果から、PROTAC の細胞内局在解析のみならず、三者複合体にリクルートされる因子の探索と同定、および PROTAC と三者複合体（成分）や新規因子の時間依存的細胞内挙動解析を効果的に実施するためには、十分なバッファー溶解性、細胞内移行性、および標的タンパク質分解誘導活性を保持する PROTAC プローブが必要とされた。そこで、上で作成したプローブに加えて、PROTAC テンプレートに各種リンカーや官能基（原子団）を導入した誘導体群（計 30 種類）のバッファー溶解性試験と並行人工膜透過試験（PAMPA assay）を実施した。その結果、誘導体群の標的タンパク質分解誘導活性と脂質膜透過性には直接的な相関が見られないこと、4 種の PROTAC テンプレート間でバッファー溶解性と脂質膜透過性は大きく異なること、PROTAC 中の一原子の置換や 1 箇所の立体化学を反転させただけでもバッファー溶解性と脂質膜透過性に大きな影響を与えること、極性官能基の導入は標的タンパク質分解誘導活性に負の影響を与えるが中性官能基の導入は許容されること、が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黄 一帆, 横江 弘雅, 相馬(海保) 愛, 高橋 万紀, 平澤 祐介, 森田 博史, 齋藤大明, 大竹 史明, 叶 直樹
2. 発表標題 Brd4 分解誘導剤MZ1を基盤とした三価PROTACテンプレートの設計と合成、活性評価
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 叶 直樹
2. 発表標題 標的タンパク質分解誘導剤と人工多能性幹分子創製への取り組み
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会 有機化学系シンポジウム「薬学の未来を拓く有機化学」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yifan Huang, Hiromasa Yokoe, Ai Kaiho-Soma, Kazunori Takahashi, Yusuke Hirasawa, Hiroshi Morita, Hiroaki Saito, Fumiaki Ohtake, Naoki Kanoh
2. 発表標題 Design, Synthesis, and Evaluation of Trivalent PROTAC Templates Based on Brd4 Degradator MZ1
3. 学会等名 Future Drug Discovery Empowered by Chemical Biology (ChemBioNara2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三瓶 茉莉菜, 黄 一帆, 横江 弘雅, 白葉 賢太郎, 平塚 彩水, 成田 年, 大竹 史明, 叶 直樹
2. 発表標題 Brd4 分解誘導薬 MZ-1 を基盤とした三価 PROTAC 群の合成と評価
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黄 一帆, 三瓶 茉莉菜, 横江 弘雅, 大竹 史明, 叶 直樹
2. 発表標題 Brd4 分解誘導薬 MZ-1 を基盤とした三価 PROTAC 群の合成と評価
3. 学会等名 第40回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黄 一帆, 三瓶 茉莉奈, 横江 弘雅, 大竹 史明, 叶 直樹
2. 発表標題 Brd4分解誘導薬MZ1を基盤とした三価PROTAC群の物理化学的性質とタンパク質分解活性との相関関係
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大竹 史明  (Ohtake Fumiaki)  (60447373)	星薬科大学・先端生命科学研究所・准教授   (32676)	
研究協力者	横江 弘雅  (Yokoe Hiromasa)  (10613622)	星薬科大学・薬学部   (32676)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------