

標的タンパク質分解誘導を促進・高効率化する 新規複合分子の創製

1. 研究の目的

本研究の目的は、標的タンパク質分解誘導薬に係る未知の作用機序の解明と、そこで得られた知見を活用して、標的タンパク質分解を促進・高効率化する新規複合分子を創製することである。

- (1) 我々はこれまでに、標的タンパク質分解誘導活性を保持しながら各種官能基の導入・連結が可能な PROTAC テンプレートの合成に成功している。そこで、
 - ① このテンプレートに、近接すると標識を転移する官能基を連結した複合型プローブ（未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブ）を合成し、活性評価を実施する。
 - ② 未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブを活用して、三者複合体にリクルートされる重要因子の探索と同定、およびその役割の解明を行う。
- (2) 次に、得られた知見を標的タンパク質分解誘導法の高効率化に応用するため、新規因子の活性制御法をテンプレートに組み込んだ複合分子を創製する。我々は既に、標的タンパク質分解誘導を亢進する TRIP12 と、その分解を担う因子 UBR5 を同定しているため、
 - ① まずは、TRIP12 分解因子である UBR5 の活性を調節する化合物を組み込んだ複合分子を創製する。
 - ② 本研究にて新しく同定する因子に関しても同様に、その活性制御法を組み込んだ複合分子を創製する。

2. 研究の計画

(1) 未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブの合成と活性評価

- ① 我々はこれまでに、E3 リガーゼ VHL のリガンド (*(S, R, S)*-AHPC) と、癌治療標的タンパク質 Brd4 に対するリガンド (JQ1) から構成された、Brd4 分解誘導薬 MZ-1 を独自に構造展開し、Brd4 分解誘導活性を保持した4種の PROTAC テンプレート群を合成している。テンプレート群は、4種の三置換ベンゼン異性体からなっており、それぞれ親化合物である MZ-1 からの極端な活性低下無しに機能性官能基の導入が可能である。そこで、機能性官能基として、袖岡らにより報告された発蛍光性基 *o*-ニトロベンゾオキサジアゾールや、浜地らにより報告されたビオチン基を有する近接駆動型標識転移基を組み込んだ未同定因子探索用の新規複合型 PROTAC プローブ群を合成する。理化学研究所・袖岡らにより開発された *o*-ニトロベンゾオキサジアゾールは、近接するタンパク質のリジン残基に転移すると蛍光性の *N*-ニトロベンゾオキサジアゾールとなる近接駆動型発蛍光基であり、また、京都大学・浜地らにより開発された近接駆動型標識転移基は、近接するタンパク質の求核性アミノ酸残基にビオチンを転移させることができる。よって、PROTAC 特有の三者複合体形成時に、三者複合体にリクルートされる因子は、複合体成分と共に、蛍光基やビオチンで標識されると期待される。
- ② 合成したプローブ群の Brd4 タンパク質分解誘導活性を、HT-1080 などのヒト培養細胞を用いて評価し、これらが PROTAC テンプレートと同等の活性を保持することを確認する。万一、活性の大幅な低下が見られた場合には、テンプレートと *o*-ニトロベンゾキ

サジアゾールや近接駆動型標識転移基を繋ぐリンカーの鎖長と性質（親水性、疎水性）を改変し、最適化する。この過程を経て、未同定因子探索に有用なプローブを創製する。

(2) プローブを利用した未同定因子候補の探索

- ① 活性を保持したプローブを、ヒト培養細胞に一定時間処理した後、回収した細胞の抽出液から蛍光性の *N*-ニトロベンゾオキサジアゾール基やビオチン基が転移したタンパク質を検出する。検出には Western blot 法や質量分析法を用いる。検出されたタンパク質のうち、既知の三者複合体構成因子以外のタンパク質を、未同定重要因子候補として選別する。

3. 研究の成果

(1) 未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブの合成と活性評価

- ① 申請計画に従い、活性テンプレート群から、未同定因子探索用複合型プローブの合成を検討した。前回申請後の詳細な解析により、1,2,5-三置換ベンゼンを有する活性テンプレートの標的タンパク質分解誘導に係る時間と速度が、元の PROTAC とほぼ同じであったことから（本研究の成果:Bioconjugate Chem. 2022, 33, 142）、最初に 1,2,5-三置換ベンゼンを有する活性テンプレートからのプローブ合成を実施した。これまでに、蛍光性プローブの合成を完了しており、未同定因子探索用複合型プローブの合成も最終工程を残すのみである。
- ② これまでに合成した誘導体およびプローブ群（15種類）の Brd4 タンパク質分解誘導活性を、ヒト培養細胞 HT-1080 を用いて評価した。この際、予想に反して分解活性を失った誘導体およびプローブが数種類確認された。

(2) プローブを利用した未同定因子候補の探索

- ① 合成した蛍光プローブをヒト培養細胞 HT-1080 に処理して、蛍光顕微鏡を用いて経時的に細胞内局在の観察を実施した結果、細胞内器官に蛍光の蓄積が見られた。

4. 研究の反省・考察

(1) 未同定因子探索用複合型 PROTAC プローブの合成と活性評価

- ① PROTAC テンプレートの量的供給とプローブへの変換の検討にやや時間を要したが、2023年度より本研究課題の研究分担者として参画頂く研究者の協力により、これらの問題は解決された。
- ② 我々の予想に反して、分解活性を失った誘導体およびプローブが数種類確認されたことから、化合物の溶解性や細胞膜透過性を改めて検討する必要がある。既に、バッファー（緩衝液）への溶解性と細胞膜透過性を評価する術は得ており、これらのパラメータを考慮しながら分子構造の最適化を実施する予定である。

(2) プローブを利用した未同定因子候補の探索

- ① 蛍光プローブを用いて細胞内局在の観察を実施したが、まだ未同定因子探索にまでは至っていない。引き続き、溶解性や細胞膜透過性を加味した上で、高い活性を保持したプローブの設計と創製を行う必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 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」
(横浜薬科大学、9月17日)
「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」 (招待講演)
叶 直樹

(3) 出版物

なし