

2023年度（第48回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	星 薬 科 大 学	研究所名等	医 薬 品 化 学 研 究 所	
研 究 課 題	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		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 標的タンパク質分解誘導薬、② PROTAC、③ 作用機序、④ 複合分子			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
叶 直 樹	星薬科大学・薬学部、 医薬品化学研究所	教 授	研究代表者・研究統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 竹 史 明	星薬科大学・薬学部、 先端生命科学研究所	特任准教授	細胞生物学実験・データ整理・論文作成
横 江 弘 雅	星薬科大学・薬学部、 医薬品化学研究所	助 教	有機合成化学実験・データ整理・論文作成
成 田 年	星薬科大学・薬学部、 先端生命科学研究所	教 授	薬剤評価実験・データ整理・論文作成
森 田 博 史	星薬科大学・薬学部	教 授	新規複合分子の分離精製・データ整理・論文作成
平 澤 祐 介	星薬科大学・薬学部	講 師	新規複合分子の分離精製・データ整理・論文作成

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

(1) 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

- ① PROTAC 特有の細胞内への送達過程と作用機序の解明：本研究の第一の目的は、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である。PROTAC は中分子（従来型の低分子医薬と比べて分子量が大きい分子）であることから、PROTAC 特有の細胞内への送達過程と、タンパク質分解誘導活性の相関を明らかにする。
- ② PROTAC の作用機序に関わる未同定重要因子の探索とその役割の解明：PROTAC の作用機序にはまだ不明な点が残されている。我々は2021年に、ある種の PROTAC が介するユビキチン鎖の伸長には、PROTAC 分子の設計時に想定した E3 ユビキチンリガーゼとは異なる、別の E3 ユビキチンリガーゼの働きが重要であることを報告した。更なる未同定重要因子の存在も考えられるため、これら未同定重要因子を探索し、その役割の解明を行う。

(2) 新規重要因子を制御する原理や PROTAC 特有の作用機序を組み込んだ新規複合分子の創製

- ① PROTAC 特有の作用機序を考慮した分子設計法の確立：本研究の第二の目的は、上記の研究で解明した重要因子や作用機序を制御する原理を薬剤設計に応用し、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。そこでまず、中分子である PROTAC 特有の作用機序を考慮した分子設計手法を確立する。
- ② 重要因子の活性を制御する機能を組み込んだ複合分子の創製：前述の通り、我々は既に標的タンパク質分解誘導を亢進する重要因子と、その重要因子の分解を担う因子（分解因子）を同定しているため、これらの活性を制御する機能を組み込んだ複合分子を創製する。また、上記の目的（1）②項で新たな重要因子が同定できた場合にも、これらの活性を制御する機能を組み込んだ複合分子を創製する。
- ③ E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の創製：近年、がん治療領域で標的タンパク質と共有結合を形成する医薬品が注目を集めている。そこで、このコンセプトを本研究に応用したE3ユビキチンリガーゼ結合型コバレントPROTACを創製する。

2. 研究の計画

(1) 三価 PROTAC テンプレートを用いた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

- ① PROTAC の細胞内への送達過程と作用機序の解析：既に我々は、各種官能基の導入が可能な三価 PROTAC テンプレート（4種の3置換ベンゼン異性体）を創出しているため、このテンプレートを用いて標的タンパク質分解誘導に関わる未同定因子の探索と、PROTAC 特有の細胞内への送達過程と作用機序を明らかにする。まず、三価 PROTAC テンプレートに長さや性質の異なるリンカーを介して多様な官能基や原子団を導入した PROTAC プローブを合成し、その溶解性、脂質二重膜透過性、標的タンパク質分解誘導活性を精査する。
- ② PROTAC テンプレートと標的タンパク質と E3 ユビキチンリガーゼからなる三者複合体の評価：4種の PROTAC テンプレートと標的タンパク質および E3 ユビキチンリガーゼとの三者複合体の安定性を精査する。

- ③ PROTAC 分子設計手法の確立：以上の結果を踏まえて、中分子である PROTAC 特有の細胞内への送達過程および作用機序を考慮した分子設計手法を確立する。
- ④ 三価 PROTAC 由来複合型プローブを用いた重要因子の探索と同定：三価 PROTAC テンプレートに、近接すると標識を転移する官能基（近接駆動型標識転移基）を連結した複合型プローブを合成し、これ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、および役割の解明を行う。

(2) PROTAC 特有の作用機序と重要因子の制御法を組み込んだ複合分子の創製

- ① PROTAC 特有の作用機序と重要因子の制御法を三価 PROTAC テンプレートに組み込んだ複合分子の創製：上記の計画 (1) ①～③項で確立した分子設計の方針を用いて、④項で解明した重要因子の制御法を三価 PROTAC テンプレートに組み込んだ複合分子を創製する。
- ② 重要因子の制御法を組み込んだ複合分子の創製：上記の計画 (1) ④項で解明した重要因子の活性を制御する分子を三価 PROTAC テンプレートを用いずに別に創製し、PROTAC との同時投与で PROTAC の機能を向上させる複合分子を創製する。
- ③ E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の創製：三価 PROTAC テンプレートに E3 ユビキチンリガーゼとの共有結合を形成するような仕組みを組み込んだ複合分子を創製する。

3. 研究の成果

(1) 三価 PROTAC テンプレートを用いた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

- ① PROTAC の細胞内への送達過程と作用機序の解析：三価 PROTAC テンプレートを用いてこれまでに創製した約30種類の PROTAC 群について、バッファー中への溶解性試験、人工膜を用いた膜透過性試験 (Parallel artificial membrane permeability assay : PAMPA)、および標的タンパク質分解誘導活性試験を、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (AMED-BINDS) の支援を受けて実施した。その結果、(a) PROTAC 群の標的タンパク質分解誘導活性と膜透過性には直接的な相関が見られないこと、(b) 4種の三価 PROTAC テンプレート間でもバッファー溶解性と膜透過性は大きく異なること、(c) PROTAC 中の1原子の置換や1箇所の立体化学反転が PROTAC のバッファー溶解性と膜透過性に大きな影響を与えること、(d) 極性官能基の導入は PROTAC の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。
- ② PROTAC テンプレートと標的タンパク質と E3 ユビキチンリガーゼからなる三者複合体の評価：これまでに4種の PROTAC テンプレート間で標的タンパク質分解誘導活性の違いが見られていたが (*Bioconjugate Chem.* **2022**, 33, 142)、成果 (1) ①項 a, b の結果から、この違いが PROTAC テンプレートの物理化学的性質の違いによるものなのか、または細胞内での働きの違いによるものなのかを総合的に精査する必要が生じた。この精査は PROTAC の分子設計に大変重要である。そこで、PROTAC テンプレートの三者複合体形成能の評価を文献 (Bartoschik, T. *et al. Method Mol. Biol.*, **2021**, 2365, 115) の報告例に基づき、マイクロスケール熱泳動 (MST) アッセイを用いて実施した。市販の標的タンパク質 (Brd4^{BD2}) およびE3ユビキチンリガーゼ複合体 (VCB)、更には国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (AMED-BINDS) の支援により供給いただいた標的タンパク質 (Brd4^{BD2}) を用いて詳細に検討したが、残念ながら、上記の材料はおろか、文献に報告されているものと同じ標準化合物およびタンパク質を用いても文献の結果を再現することができなかった。その理由は不明であるが、この解析に多大な時間と労力を要したため、計画 (1)

③項と④項、および計画 (2) ①項と②項を十分実施することができなかった。

(2) PROTAC 特有の作用機序と重要因子の制御法を組み込んだ複合分子の創製

- ③ E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の創製：三価 PROTAC テンプレートを用いて E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC を創製するため、VHL 中の共有結合形成が可能なアミノ酸残基と、それと反応する官能基のペアを探索したところ、VHL タンパク質の Glu146 と Asp144 に存在するカルボン酸と、光反応により活性化してカルボン酸と選択的に反応する 2-aryl-5-carboxytetrazole (*J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14609) が使える可能性が示唆された。そこで、この文献を参考に、数種の 2-aryl-5-carboxytetrazole と、E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の合成中間体を合成した。

4. 研究の反省・考察

(1) 三価 PROTAC テンプレートを用いた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

- ① 三価PROTACテンプレートから作成した PROTAC 群を用いて、溶解性や膜透過性などの詳細な情報が得られたことは、最終年度の PROTAC 設計のためにも重要な前進であったと考えられる。
- ② 一方、三者複合体解析に関する論文の実験を再現できないというのは予期せぬ結果であった。この検討に時間を費やしたにも関わらず、十分な成果が得られなかったのは大変歯痒く、かつ残念であったが、PROTAC 設計のための重要な知見を得るための努力としては仕方がなかったと考える。マイクロスケール熱泳動 (MST) アッセイを用いた三者複合体解析は興味深い手法ではあるが、当該論文 (Bartoschik, T. *et al. Method Mol. Biol.*, **2021**, 2365, 115) 以外には報告例がないため、現在、報告例がより豊富な表面プラズモン共鳴法を用いた解析や、ビオチン体を用いたプルダウン実験などを計画している。このような別の方向からPROTAC テンプレートの三者複合体形成能の評価を実施し、計画 (1) ③項と④項、および計画 (2) ①項と②項の実施に繋げたい。

(2) PROTAC 特有の作用機序と重要因子の制御法を組み込んだ複合分子の創製

- ① 研究計画 (2) ①項と②項の実施に関しては前述の通りであり、③項で述べた E3 ユビキチンリガーゼ結合型コバレント PROTAC の創製も進める予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表

- ① 第 67 回日本薬学会関東支部大会 (明治薬科大学、2023 年 9 月 16 日)
Brd4 分解誘導薬 MZ-1 を基盤とした三価 PROTAC 群の合成と評価
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 日本薬学会第 144 年会 (横浜、2024 年 3 月 28-31 日)
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
黄 一帆, 三瓶 茉莉奈, 横江 弘雅, 大竹 史明, 叶 直樹

(3) 出版物
なし