

2024年度（第49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	准 教 授	細胞生物学実験・データ整理・論文作成
横 江 弘 雅	横浜薬科大学 薬学部	准 教 授	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 標的タンパク質分解誘導薬 (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、細胞内でのPROTACの活性発現におけ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。2021年に本研究組織の研究分担者は、ある種のPROTACが介するユビキチン鎖の伸長には、PROTAC分子設計時に想定したE3ユビキチンリガーゼとは異なる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を解析するプローブの作成: 昨年度までに創製した30種類以上のPROTACの構造と活性、および物理化学的性質の相関を、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) の支援を受けて解析した。そこで得られた結果を活用して近接駆動型標識転移基などを有する作用機序解析用プローブを作成する。
- 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 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：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などを合成し、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）①～②項などで確立した分子設計の方針を用いて、③項など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）③項で解明した重要因子の活性を制御する分子を創製し、PROTACの機能を向上させる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を解析するプローブの作成：近接駆動型標識転移基として *o*-nitrobenzoxadiazole (*o*-NBD) ユニットを持つ複数のPROTACプローブを、昨年度得た構造—活性—物理化学的相関情報をもとに設計・合成した。本プローブの標的タンパク質分解誘導活性を評価し、テンプレートと同様な活性を保持していることが確認できた。よって、標的タンパク質分解誘導活性を持つ近接駆動型標識プローブの創製に成功した。また、PROTACの細胞内動態解析に使うことができる、標的タンパク質分解誘導活性を保持した蛍光PROTACの創製にも成功した。
- 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：4種のPROTACテンプレートから作成した、標的タンパク質分解誘導活性を保持したビオチン化PROTACと表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いることで、標的タンパク質またはE3ユビキチンリガーゼとビオチン化PROTACとの二者複合体の結合安定性、およびこれら三者から成る三者複合体の結合安定性評価が可能となった。
- ③ 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：上記の成果（1）①項にて創製した近接駆動型標識プローブは、近傍に存在するタンパク質のリジン残基にNBD基を転移させ、結果的にそのタンパク質を蛍光性のNBD基で標識できるプローブである。本プローブをヒト培養細胞に添加した結果、添加時間依存的に標識される複数のタンパク質の検出に成功した。

(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

- 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：創製したPROTAC類はどれも膜透過性が低いことが判明したため、新たに三価PROTACテンプレートを抗体に組み込んだ複合分子を設計し、その合成に成功した。

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 研究期間中に新規因子を解明するには至らなかったが、上記の成果 (1) ①項および③項で得られた結果は今後の新しい展開が期待できるものであり、本課題の研究期間終了後も研究を進めていく予定である。ところでごく最近、本研究と同様な三価PROTACのコンセプトを使ってタンパク質分解誘導薬の新しい細胞内送達機構を明らかにした論文が *Cell* 誌に報告された (Z. Wang *et al.* *Cell*, **2025**, *in press*, DOI: 10.1016/j.cell.2025.03.036)。ビオチンプローブや蛍光プローブなど、いずれも本研究で我々が創製したものとコンセプトが同じであるため、先を越された感は拭えないが、今後はこの論文の結果の検証も含めて研究を進める予定である。

(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 こちらも、研究期間中に担がんマウスで *in vivo* 活性を持つ複合分子の創製には至らなかったが、抗体複合体や、E3リガーゼと共有結合を形成するコバレントPROTACなどのプロトタイプの創製には成功しているため、これらの研究を今後も継続する予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表

- ① 第 24 回フロンティア生命化学研究会一次世代を探る生命化学研究の最前線― (ホテル鬼怒川御苑、12 月 16 日)
タンパク質分解誘導剤と多能性天然物に関する最近の話題
叶 直樹

(3) 出版物

- ① タンパク質分解医薬の実用化に向けた基盤技術と評価
Development and Evaluation of Protein Degraders: Technologies and Methods
(株)シーエムシー・リサーチ、2025年5月30日発行予定、ISBN 978-4-910581-65-1
第V編 タンパク質分解医薬品の実用化を後押しする支援技術
5.1キメラ型タンパク質分解医薬と周辺技術の研究動向 (2024年に報告されたPROTAC論文の統計学的調査と考察)