

公開

研究終了報告書

「タンパク分解ツールボックスの確立」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：友重 秀介

1. 研究のねらい

近年、化合物による標的タンパク質分解を誘導する技術が注目を集めている。この技術では、生体を持つタンパク質分解経路を化合物(タンパク質分解薬)によって利用することで標的タンパク質の分解を誘導する。本技術は特に創薬の分野で新規モダリティとして期待されている。従来の創薬手法は酵素阻害など創薬標的の生化学的機能の調節を基盤としており、凝集性タンパク質や転写因子など、生化学的機能を持たないタンパク質には対応できない。一方、タンパク質分解薬は標的タンパク質自身の機能に関わらず標的タンパク質を分解除去できるため、凝集性タンパク質や転写因子などの従来では undruggable とされてきたタンパク質に対しても有効であり、私達を含む様々なグループが凝集性タンパク質や転写因子の分解を達成している。

生体にはプロテアソームとリソソームの2つの主要なタンパク質分解機構が存在し、標的タンパク質がこれらに至るまでの分解経路としてユビキチン-プロテアソーム系やオートファジーをはじめとする様々なものが知られている。既存のタンパク質分解薬ではそのうちのいくつかの経路を利用できるものの、全てを網羅できていないのが現状である。また、プロテアソームおよびリソソーム以外のタンパク質分解機構を利用するタンパク質分解薬は開発されておらず、プロテアソームやリソソームを持たない細菌やミトコンドリアのタンパク質は、現時点で本技術の空白地帯である。タンパク質の多様な局在・性質を考えると標的タンパク質に合わせて最適なメカニズムのタンパク質分解薬を選択できるツールボックスがあることが理想といえる。そこで本研究では、未踏のタンパク質分解経路・機構を利用する複数の新規タンパク質分解薬の開発に取り組み、タンパク質分解ツールボックスを確立することを目指した。具体的には、①シャペロン介在型オートファジー(CMA)、②小胞体関連分解(ERAD)、③細菌やミトコンドリアの持つプロテアーゼ複合体 ClpP のそれぞれを利用する3種類の新規タンパク質分解薬の創製を目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

CMA、ERAD、ClpP それぞれを誘導または利用する分解薬として HaloTag やマトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP2)、monomeric ストレプトアビジン (mSA) などを標的とする種々の化合物を設計・合成した。その内 HaloTag を標的とする CMA 誘導薬、そして mSA を標的とする ClpP 利用分解薬が標的タンパク質を減少させる活性を持つことを見出した。

HaloTag を標的とする CMA 誘導薬として設計した化合物は、細胞系において HaloTag の存在量を顕著に減少させた。また、リソソーム阻害剤との併用実験によって本化合物の活性がキャンセルされたことから、リソソームを介した分解を誘導していることが示唆された。しかしながら、その後の検討において所望の CMA 経路で機能するタンパク質の関与を確認することはできず、CMA を誘導していることは実証できなかった。リソソーム分解を誘導する分解薬は少ないため、メカニズムは未知ながらこの方法論の一般性を確認すべく他のタンパク質を標的としたリソソーム利用分解薬を新たに設計・合成し、研究を進めているところである。

mSA を標的とする ClpP 利用分解薬の研究は当初の計画には無く、新たに2年目から開始した。細胞ではなく精製タンパク質を用いた *in vitro* 試験による活性評価を行った。その結果、本化合物は mSA を顕著に減少させた。また、競合実験やプルダウン実験など、種々のメカニズム解析を行ったところ、この化合物は目論見通りに標的タンパク質と ClpP を人工的に接近させて分解へと導いていることを明らかにした。現在、細胞系での mSA 分解活性を評価すべく、評価系の構築を行っている。

以上、2年半にわたる ACT-X 研究により、ClpP を利用する新しいタンパク質分解技術の方法論を提案することができた。加えて、今後のメカニズム解析などが必要ではあるものの、既存のタンパク質分解薬とは異なる全く新しい分子設計指針によって HaloTag および MMP2 の存在量を減少させる化合物を見出した。これらはタンパク質分解ツールボックスの確立に資する成果であり、新しい作用機序の分解薬の可能性を拓くことができた。

(2) 詳細

テーマ①CMA 誘導薬の創製

CMA は選択的オートファジーの一種で、シャペロンである熱ショック関連タンパク質 Hsc70 によって不要なタンパク質がリソソームへ輸送され、分解されるタンパク質分解経路である。Hsc70 は KFERQ などの CMA モチーフと呼ばれる特定の配列を認識していることが知られていることから、本テーマでは標的タンパク質と CMA モチーフを連結した化合物を用いれば、標的タンパク質を人工的に Hsc70 に認識させ、CMA 経路による分解へと導くことができると考えた(図1)。まずは概念実証として人工タンパク質 HaloTag を標的とした CMA 誘導薬の創製を進めた。CMA モチーフとして VKKDQKFERQ 配列を HaloTag リガンドであるクロロヘキサンに連結した CMA 誘導薬 1 を設計・合成した(図1)。

HaloTag を安定発現するヒト胎児腎臓細胞株 HEK293 を用いて化合物 1 の活性を評価した。ウェスタンブロッティングによる比較において、化合物 1 の24時間処理によって HaloTag の存在量が濃度依存的に減少した(図2A)。続いて、作用機序の解析を行った。CMA ではリソソームがタンパク質分解を担うため、リソソーム阻害剤である NH₄Cl、ペプスタチン、またはバフィロマイシン A1 を併用処理したところ、化合物 1 の活性がキャンセルされた(図2B)。この結果から、化合物 1 の作用にはリソソームが関与していることが示された。CMA では Hsc70 が基質をリソソームへ輸送する際、リソソーム膜上に発現する LAMP2a が膜孔を形成し、これを通してリソソーム内へ基質が運ばれることが知られている。そこで、LAMP2a の RNA 干渉実験を行ったが、化合物 1 の活性はキャンセルされなかった。この結果から、化合物 1 は CMA 以外の経路でリソソームを介した分解を誘導していることが示唆された。化合物 1 は当初の目的であった CMA 誘導薬ではなさそうだが、リソソームを利用する分解薬を新たに創製することができた。

CMA モチーフに立脚した分解薬が HaloTag 以外のタンパク質にも適用可能かを調査するため、他のタンパク質を標的とする分解薬の開発を進めている。神経変性疾患の原因となる凝集性タンパク質に対する分解薬として化合物 2 を設計・合成した(図3)。化合物 2 の合成と並行して、その活性評価系の構築も行った。具体的には、緑色蛍光タンパク質を融合した変異 huntingtin(mHtt-EGFP)の遺伝子をコードしたプラスミドを細胞にトランスフェクションし

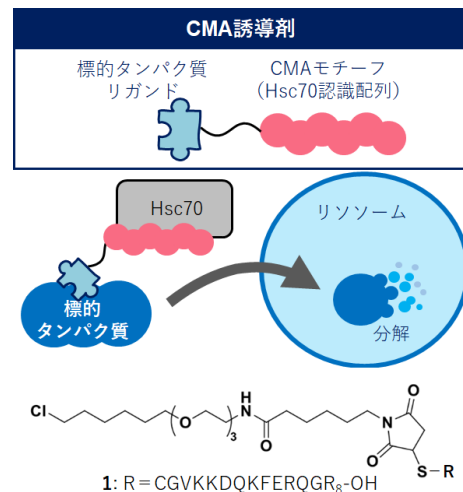


図1. CMA 誘導薬のコンセプトと化合物 1 の構造。

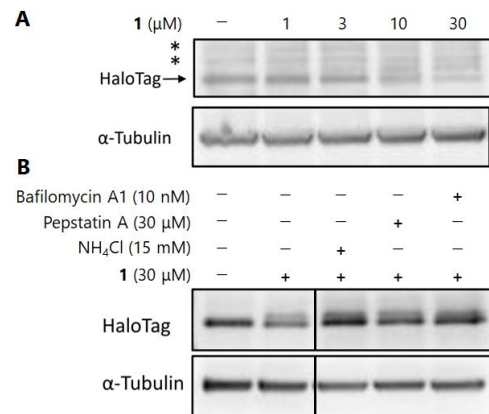


図2. 化合物 1 の HaloTag 減少活性(A) およびメカニズム解析(B)。

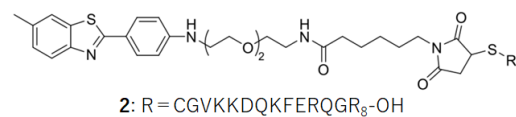


図3. 化合物 2 の構造。

て一過性発現させ、細胞ライセートの蛍光強度を定量することで評価する方法を確立した。

以上より、本テーマでは当初の目的を達成できなかったものの、リソソームを利用する HaloTag 分解薬を新たに創製することができた。現時点ではメカニズムや一般性について情報不足であり、更なる検討が必要である。

テーマ②ERAD 誘導薬の創製

ERAD は小胞体 (ER) で起こる膜/分泌タンパク質の分解機構である。膜/分泌タンパク質は合成されると ER に移行し、ゴルジ体を経由して局在場所へ輸送される。その際、フォールディング異常などがある場合は ER に滞留させられ、ERAD により分解される。したがって、標的タンパク質リガンドと ER 局在シグナルからなる連結化合物は標的タンパク質選択的に ERAD を誘導できるのではないかと考えた (図4)。ER に滞留させる方法として、ER 局在シグナルに着目した。ER 局在シグナルとして KDEL 配列 (ER 内腔で機能する C 末端 KDEL-OH) や di-lysine 配列 (細胞質で機能する C 末端含 Lys 配列、今回は DEKKMP-OH) が知られており、この二つを利用することにした。以上を踏まえ、DEKKMP 配列により EGFR を、KDEL 配列により MMP2 を ER に滞留させて ERAD へ導く化合物 3、4 を設計・合成した (図4)。

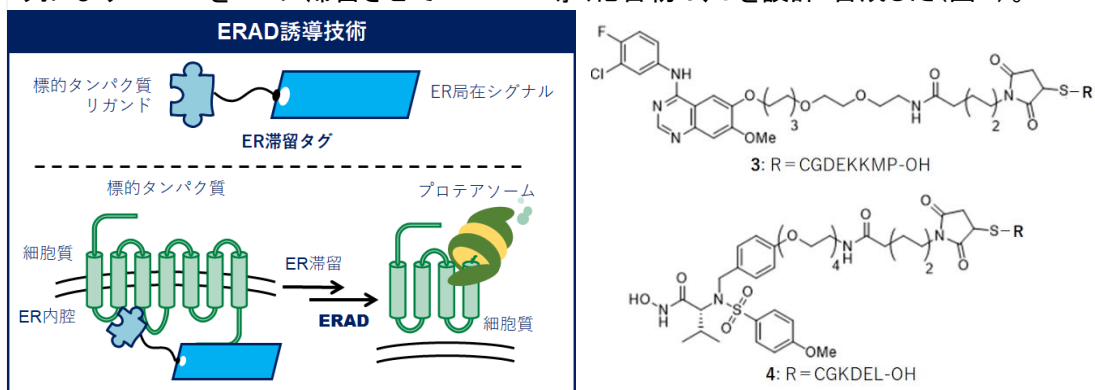


図4. ERAD 誘導技術と化合物 3、4 の構造.

まず、化合物 3 の活性評価から開始した。化合物 3 をヒト子宮頸がん細胞株 HeLa に処理したところ、いずれの条件でも EGFR の存在量は変化しなかった。細胞膜を透過できていない可能性を疑ったが、化合物 3 の部分構造に由来する EGFR の自己リン酸化阻害活性が確認されたため、細胞膜は透過できていると考えられる。

テーマ③ClpP 利用分解薬の創製

細菌やミトコンドリアでは、プロテアーゼ複合体 ClpP が主要なタンパク質分解を担う分解機構の一つとして働いている。本テーマでは、標的タンパク質のリガンドと ClpP 活性化剤を連結した化合物を用いることで標的タンパク質を ClpP に接近させて分解へ導くことができるという作業仮説を立て、これに基づいて研究を遂行した (図5)。まず概念実証のため、標的タンパク質を人工タンパク質である mSA に設定し、mSA リガンドであるデスチオビオチン (DTB) とミトコンドリア ClpP (mitoClpP) 活性化剤 TR79 または細菌 ClpP 活性化剤 ACP1b と連結した化合物 6、7 をそれぞれ設計・合成した (図5)。

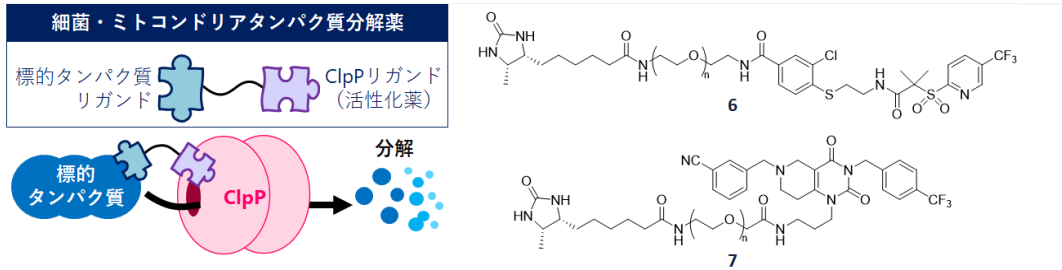


図5. ClpP 利用分解薬のコンセプトと mSA を標的とする分解薬 6、7 の構造。

合成した化合物の活性評価を行うにあたり、細菌やミトコンドリアでのタンパク質分解実験の前例や実績が無かったため、まずは精製タンパク質を用いた *in vitro* 実験で評価を行った。

化合物 6 の mSA 分解活性を評価したところ、化合物 6 は 100 nM 以上の濃度で顕著に mSA を減少させた(図6A)。

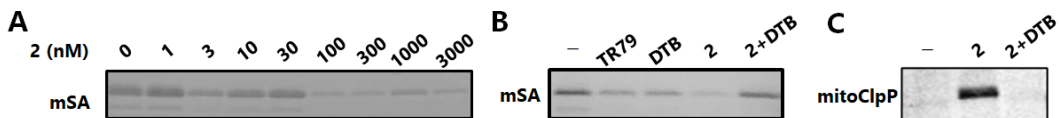


図6. 化合物 6 の mSA 分解誘導活性評価. (A) 濃度依存的に減少させる. (B) 連結構造の重要性の検証および競合実験. (C) プルダウン実験による三者複合体形成の検証.

また、各リガンド部分構造である DTB や TR79 と活性を比較したところ、化合物 6 はより強力に mSA を減少させたことから、化合物 6 の mSA 分解誘導活性には DTB と TR79 を連結させた構造が重要であることが示された(図6B)。DTB と併用することで競合し、化合物 6 の活性がキャンセルされることも同時に確認している。これら連結構造の重要性や競合実験の結果から、化合物 6 は mSA-6-ClpP 三者複合体を形成していることが示唆された。これを実証すべく、SA 担持ビーズと化合物 6 を用いた mitoClpP のプルダウン実験を行ったところ化合物 6 存在下で mitoClpP がプルダウンされた(図6C)。これらの結果を総合すると、当初の作業仮説の通り mSA と ClpP が化合物 6 を介して三者複合体を形成することで mSA が分解されていると考えられる。

さらに、in vitro の実験条件に細胞ライセートを混合した夾雑条件では、化合物 6 は mSA 選択的にタンパク質存在量を減少させた(図7)。

以上の結果より、ミトコンドリアにおいて機能する次世代タンパク質分解薬の概念実証に成功したと言える。本成果により、既存のタンパク質分解薬では不可能であったミトコンドリアへとタンパク質分

解技術の適用範囲を広げるための礎を築くことができた。また、本テーマではプロテアーゼ複合体である ClpP を直接利用する分解薬を創製した。既存のタンパク質分解薬はいずれもプロテアソームやリソソームを間接的に利用する一方で、本テーマで見出した化合物はタンパク質分解機構の直接利用を達成した初の例であり、タンパク質分解薬の新たな分子設計指針の創出にもつながる成果である。

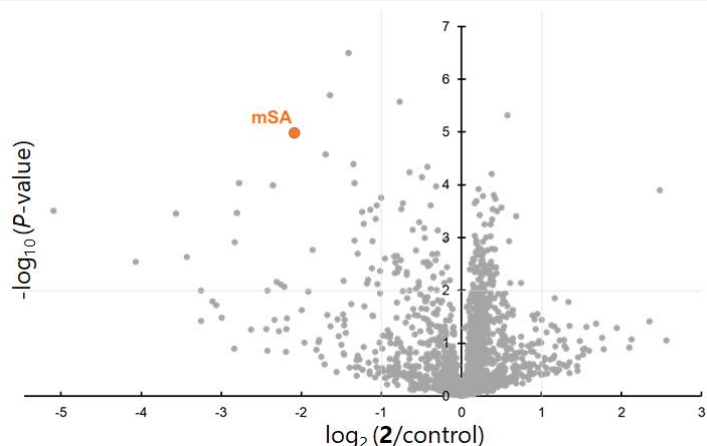


図7. 夾雑条件における化合物 6 の活性. LC-MS/MS による比較プロテオミクス解析を基にした volcano plot.

3. 今後の展開

ACT-X でまいた種から、2年半にわたる研究を経てリソソームを利用する分解薬ならびに ClpP を利用する分解薬の創製を達成した。これまでユビキチン-プロテアソーム系を利用するタンパク質分解薬 PROTAC の研究を行ってきたが、本研究を通して新しいアプローチを開拓することができ、研究の幅を広げることができたと考えている。ACT-X 研究での経験や成果を基に、今後の具体的な展開として以下の2つを計画している。

・**ClpP 利用分解薬の創薬への展開**: テーマ③ ClpP 利用分解薬の創製では、in vitro 実験により概念実証に成功した。今後は、標的タンパク質は mSA のまま、実証した方法論を in vitro から細胞系(細菌や哺乳動物細胞)へ展開し、1年程度の期間で実用性を検証していく。

また、細菌やミトコンドリアで機能するタンパク質分解薬は薬剤耐性菌や神経変性疾患の克服につながる可能性がある。実際、PROTAC が薬剤耐性変異を獲得したがん関連タンパク質に有効であるという報告や、神経変性疾患の原因となるタンパク質がミトコンドリアに移行して分解されるという報告がある。そこで第二段階として、実際に創薬標的となる細菌またはミトコンドリアに内在するタンパク質を標的とした ClpP 利用分解薬の開発を2年程で進め、さらに3年程度の期間をかけて薬剤耐性菌感染症や神経変性疾患に対する創薬へ展開させる。

・**リソソーム利用分解薬の一般化**: テーマ① CMA 誘導薬の創製では、当初の目的であった CMA の誘導には至らなかったものの、リソソームを介する HaloTag 誘導薬を創製することができた。リソソームはオルガネラの分解も担うなど、プロテアソームに比べてより多様な基質を分解することができるというメリットがあるため、今後本テーマをさらに掘り下げる。現時点でリソソームを利用することしかわかっていないため、1年ほどメカニズム解析を続けて標的タンパク質がリソソ

ームに至るまでの経路を明らかにする。また、メカニズムを解明できれば、方法論の一般化も可能と考えており、CMA モチーフ配列部分の最適化や低分子化も視野に入れて研究を進めていく。

4. 自己評価

・**研究目的の達成状況**: 当初の目的であるタンパク質分解ツールボックスの確立を 100%達成することはできなかったが、ミトコンドリアで機能するタンパク質分解薬の創製に成功したため、ツールボックスの確立に向けて前進することができた。また、ACT-X 研究で見出したリソソーム利用分解薬や BiP リガンド連結化合物は今後タンパク質分解ツールボックスの確立のためのタネとして期待でき、ACT-X 研究終了後の自身の研究に新たな展望を持つことができた。

・**研究の進め方**: ACT-X で進めた3つのテーマの内、成果が出たものと出なかったものを分析すると、ペプチド性の化合物を設計したテーマは進捗が遅く、低分子性リガンドからなる連結化合物を用いたテーマで成果が出やすい傾向にあった。ペプチド性化合物を用いたのは ACT-X 研究のテーマが初めてであり、より堅実に進めるにはペプチドの利用は避けるべきだったかもしれない。しかし、今回の挑戦でペプチド性化合物の取り扱いなども理解を深めることができ、今後につながる良い経験になった。

・**研究成果の波及効果**: ACT-X 研究を通して ClpP を利用する新しい方法論を提案することができ、タンパク質分解技術のイノベーションにつながる成果を得ることができた。さらに、今後の検討が必要ではあるものの、リソソームを利用する方法論の提案につながりうる研究のタネも見出すことができた。タンパク質分解技術の研究分野は近年爆発的に加速しており、既存研究のフォローも増えている。ACT-X 研究で得られた成果を起点として、私達以外の別グループも本成果のフォローとして研究を進めることが期待される。また、得られた成果は既存法とは全く異なる方法論であるため、既存のタンパク質分解技術では不可能だったことを可能とし、新しい創薬や生命科学研究への展開も期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Keigo Hirai, Hiroko Yamashita, Shusuke Tomoshige, Yugo Mishima, Tatsuya Niwa, Kenji Ohgane, Mayumi Ishii, Kayoko Kanamitsu, Yui Ikemi, Shinsaku Nakagawa, Hideki Taguchi, Shinichi Sato, Yuichi Hashimoto, Minoru Ishikawa “Conversion of a PROTAC Mutant Huntingtin Degradator into Small-Molecule Hydrophobic Tags Focusing on Drug-like Properties”, ACS Medicinal Chemistry Letters, vol. 13, No. 3, pp.396-402, 2022

これまでに神経変性疾患治療を目指して、凝集性タンパク質の分解を誘導する PROTAC の開発に成功している。ただし、神経変性疾患の病巣は中枢だが、PROTAC の構造や物性から脳移行性は乏しいと予想された。そこで本論文では PROTAC の脳移行性向上を目指した構造展開を行い、脳移行性を示す新規タンパク質分解薬を見出した。ACT-X 研究で構築した EGFP 融合変異 huntingtin (mHtt-EGFP) の発現系を活性評価に用いた。



(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. 友重秀介 “タンパク質構造の安定性制御を基盤とした神経変性疾患克服の試み” 日本薬学会第 143 年会 シンポジウム「構造薬科学—創薬を見据えた“分子”の立体構造操作—」(2023 年 3 月 26 日)
2. 友重秀介 “タンパク質分解誘導に基づいた神経変性疾患に対する創薬の試み” 第 26 回ケムステ V シンポ (2022 年 6 月 24 日)
3. 友重秀介 “タンパク質分解誘導薬の神経変性疾患治療への展開” 第 10 回有機・生命・計測化学交流セミナー (2021 年 9 月 6 日)

受賞

1. 大正製薬研究企画賞 (有機合成化学協会、2022 年、12 月 12 日)
2. 研究奨励賞 (東北大学 大学院生命科学研究科、2021 年 12 月 17 日)