

博士論文

Manipulation of Biomolecular Interactions with  
Molecular Glues and Their Biomedical Applications

(分子糊を用いた生体分子間相互作用の制御と生医学的応用)

茂垣 里奈

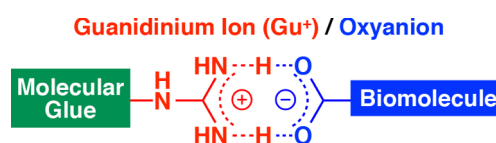
## 【1】 緒言

生物現象の根幹は生体分子間の結合／解離にある。生物現象に関わる生体分子は、ホルモンや神経伝達物質などの低分子化合物から、タンパク質や核酸といった生体高分子まで多岐にわたる。これら生体分子間の相互作用が、生体内という動的な環境で時空間的に精密に制御されることで、我々の生命が維持されている。したがって、任意の生体分子間相互作用を制御する方法論が確立できれば、分子レベルでの生物機能の解明や疾患治療などへの応用につながる。これまでに、内在性リガンド分子の構造を模した低分子化合物や、抗体などの生体高分子を用いる手法が広く展開されているが、標的とする生体分子に応じて適切な化学構造をもたせる必要があるため汎用性に乏しく、また、分子設計における自由度が低いいため刺激応答性などの機能を付加することが難しい。

当研究グループでは、グアニジニウム基 ( $\text{Gu}^+$ ) を多数有する一連の高分子化合物が、オキシアニオン性官能基と多価的に塩橋 (Figure 1) を形成することで生体高分子表面に強く接着する『分子糊』として働くことを見出してきた<sup>[7]</sup>。オキシアニオン性官能基は生体高分子表面に普遍的に存在しているため、分子糊は多様な生体高分子に接着することができる。分子糊は骨格とする構造に大きな制約がなく、分子設計における自由度が高いため、多様な機能団を組み込むことも可能である。

本研究では、『分子糊』を基盤とした生体分子間相互作用の制御手法を開拓することを目的とした。分子糊の接着を相互作用制御の足場とすることで、標的の分子構造に依存しない汎用的な手法が確立できる。ここでは特に、タンパク質-低分子 (1, 2)、分子糊-細胞膜 (3)、およびタンパク質-タンパク質 (4) 間相互作用の制御に焦点を置いた。本研究は以下の4項目で構成される。

- (1) 酵素の低分子阻害剤に分子糊を連結することで、阻害剤の結合力および阻害効果を増強できることを見出した。
- (2) 上記(1)の発見を基に、分子糊と低分子阻害剤を光応答性スペーサーで連結した『接着性光スイッチ』を開発し、標的酵素に対する阻害剤の結合／解離を可逆的に光制御することに成功した。
- (3) 分子糊の  $\text{Gu}^+$  基を光開裂性ユニットによって保護することで細胞膜透過性を一時的に抑制した『ケージド分子糊』を開発し、これがゲスト分子の細胞内局在を光制御できる「輸送タグ」として機能することを明らかにした。
- (4) デンドリマー型分子糊の分岐点に光開裂性スペーサーを有する『光分解性分子糊』を開発し、標的タンパク質への接着および光刺激に伴う分子糊の解離によって、タンパク質-タンパク質間相互作用およびそれによって誘導される細胞機能の光制御に成功した。



**Figure 1.** A salt-bridge between guanidinium ion ( $\text{Gu}^+$ ) of molecular glue and an oxyanion on biomolecular surfaces.

## 【2】分子糊の連結による酵素阻害剤の結合力・阻害効果の増強<sup>[1]</sup>

薬剤の多くは、疾患の原因となる生体分子（主としてタンパク質）に結合し、その機能を阻害または活性化するリガンド分子である。一般的な薬剤開発では、既知のリガンド分子の構造を基に、その分子骨格や置換基を改変することでより結合力・生物活性の高いものを探索する。しかし、一般にリガンド分子は複雑な分子構造をもち、誘導体の合成には多段階の煩雑な化学的プロセスを経る必要がある。そのため、候補化合物を合成・検討し、効果の高い分子構造に至るまでには膨大なコスト・時間を要する。

本研究では、生体高分子表面に非特異的に接着する分子糊を、標的タンパク質と低分子リガンド間の結合を補強するための汎用的なモチーフとして用いることを考えた (Figure 2)。ここでは、ペプチド加水分解酵素の一つであるトリプシンをモデル酵素とし、トリプシンの阻害剤として知られるベンズアミジン (BA) に分子糊を連結した (Glue<sub>n</sub>-BA; Figure 3a)。

はじめに、トリプシンに対する Glue<sub>n</sub>-BA (数平均重合度  $n = 10$ ) の接着を評価した。トリプシン溶液に Glue<sub>10</sub>-BA を添加したところ、トリプシンの円偏光二色性 (CD) スペクトルに変化が見られた。この変化は、接着部位を持たないベンズアミジンを添加した場合と同様の挙動を示した。こ

この CD スペクトル変化から会合定数を求めたところ、接着部位を持たないベンズアミジンの会合定数 ( $K_{\text{assoc}} = 1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) と比較して、Glue<sub>10</sub>-BA は 35 倍高い結合力 ( $K_{\text{assoc}} = 5.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) を示し、分子糊の接着作用によって標的タンパク質に対する結合が増強されることが明らかになった。

トリプシンの酵素活性は、 $N^{\epsilon}$ -トシル-L-アルギニンメチル塩酸塩 (TAME) を反応基質とし、生成物の吸収波長である 247 nm の吸光度変化から評価した。この反応に対する阻害効果を評価したところ、接着部位を持たないベンズアミジンの半数阻害濃度 ( $\text{IC}_{50} = 79 \mu\text{M}$ ) と比較して、Glue<sub>10</sub>-BA ではベンズアミジン部位の阻害効果が 13 倍増強される ( $\text{IC}_{50} = 6.2 \mu\text{M}$ ) ことが明らかになった (Figure 3b)。一方、ベンズアミジン部位を持たない分子糊は高濃度 (200  $\mu\text{M}$ ) においても阻害効果を示さなかった。すなわち、分子糊そのものは酵素反応に影響を与えず (Figure 3b)、この阻害効果の増大は、期待通り阻害剤-標的タンパク質間の結合が分子糊の接着によって補強されたことを示している。

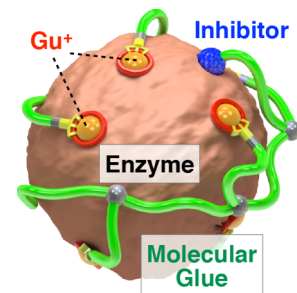


Figure 2. Enhanced binding of inhibitor to an enzyme by conjugation with molecular glue.

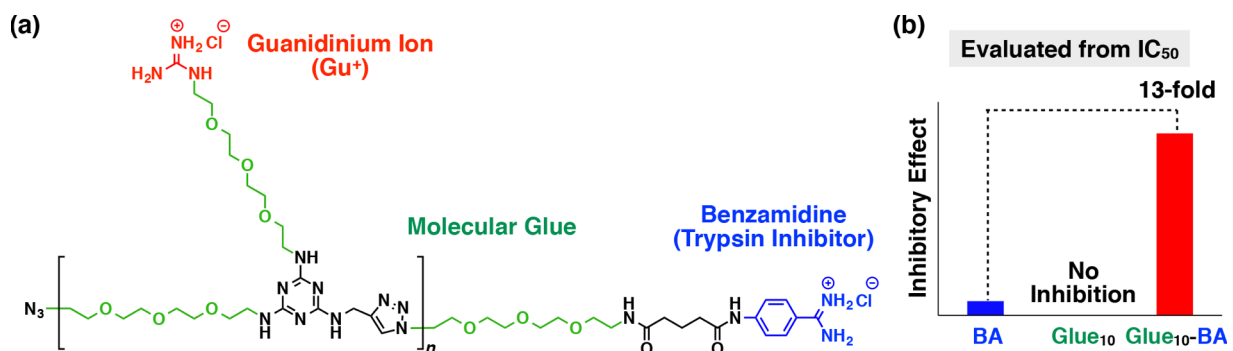
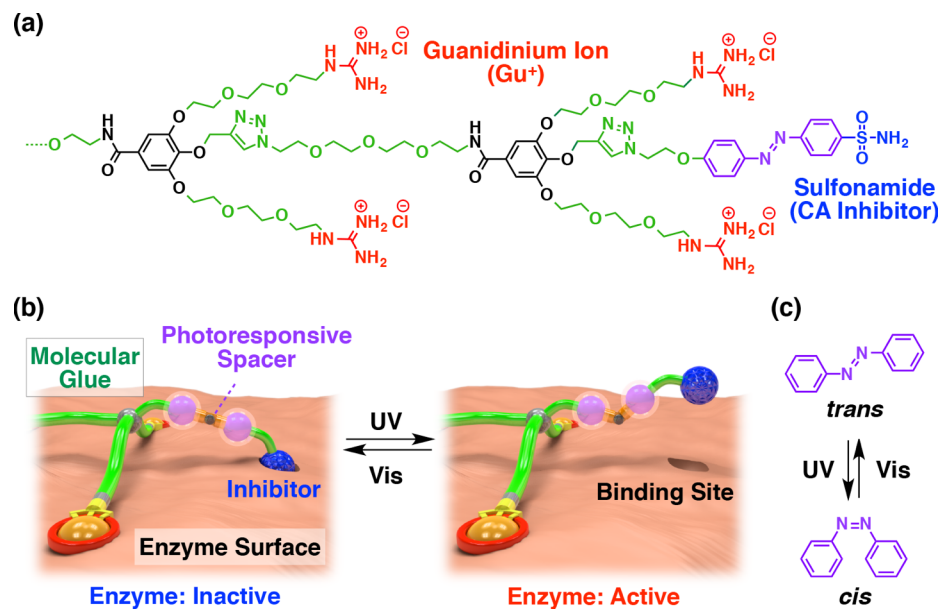


Figure 3. (a) Molecular structure of Glue<sub>n</sub>-BA. (b) Enhanced inhibition of enzymatic activity by conjugation of BA to molecular glue (Glue<sub>10</sub>-BA).

### [3] タンパク質機能を可逆的に制御する『接着性光スイッチ』の開発<sup>[2]</sup>

光は高い時空間分解能で扱うことのできる刺激であり、外部から生体内に働きかけるための手段として有用である。近年、タンパク質機能を遠隔制御する方法として「光スイッチ」が提案され、数々の報告がなされている。光スイッチは (i) 光刺激に応答して構造を変化させる「光応答性スペーサー」および (ii) 標的タンパク質に対するリガンド分子（阻害剤）から構成され、標的タンパク質表面のリガンド結合部位近傍に共有結合的に導入して用いる。光刺激によってスペーサーに構造変化が生じると、リガンド分子の結合／解離がスイッチされ、その結果、タンパク質の機能が ON/OFF される。しかし、光スイッチの共有結合的な導入には、反応の足場となるアミノ酸残基が適切な位置に存在している必要があり、ほとんどの場合、遺伝子工学的に改変したタンパク質にその適用範囲が限定される。

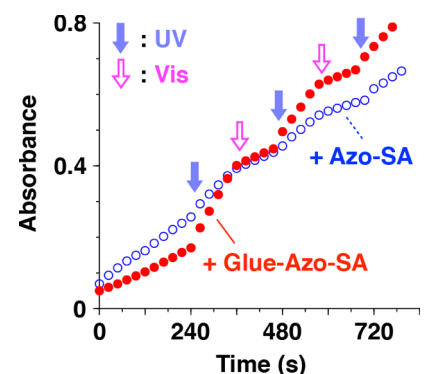
本研究では、前項 [2] の「分子糊の接着がリガンド分子を支持する足場になる」という発見を基に、分子糊と阻害剤分子を光応答性スペーサーで連結した『接着性光スイッチ』（Figure 4a, b）を考案し、“遺伝子工学的手法を必要としない”タンパク質機能の光制御を目指した（Figure 4b）。炭酸脱水酵素（CA）をモデル酵素とし、(i) 分子糊、(ii) 光応答性スペーサーとして紫外／可視光照射に応じて異



**Figure 4.** (a) Molecular structure of “adhesive photoswitch”, Glue-Azo-SA. (b) Reversible activation and deactivation of an enzyme by “adhesive photoswitch” consisting of molecular glue, a photoresponsive spacer, and an inhibitor. (c) Photoisomerization of azobenzene.

性化するアゾベンゼン（Figure 4c）、(iii) CA の阻害剤であるスルホンアミド（SA）の三者を連結した（Glue-Azo-SA; Figure 4a）。

CA の酵素活性は、*p*-ニトロフェニル酢酸（PNPA）を反応基質とし、生成物に由来する 405 nm の吸光度の変化から評価した。CA（1  $\mu$ M）を Glue-Azo-SA（2.5  $\mu$ M）と混合することで、紫外／可視光照射によって酵素活性を可逆的に増減させることに成功した（Figure 5, ●）。一方、分子糊部位を持たない光スイッチ（アゾベンゼン＋スルホンアミド; Azo-SA, 2.5  $\mu$ M）を用いた場合、酵素活性は光刺激の影響をほとんど受けなかった（Figure 5, ○）。Glue-Azo-SA の分子糊および阻害剤部位それぞれの CA に対する会合定数を評価した結果、SA の CA に対する高い親和性（ $K_{\text{assoc}} \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ ）によって分子



**Figure 5.** Absorption spectral changes at 405 nm of a mixture of PNPA (1.2 mM) and CA (1  $\mu$ M) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.2) at 37  $^{\circ}$ C in the presence of Glue-Azo-SA (2.5  $\mu$ M, ●) and Azo-SA (2.5  $\mu$ M, ○).

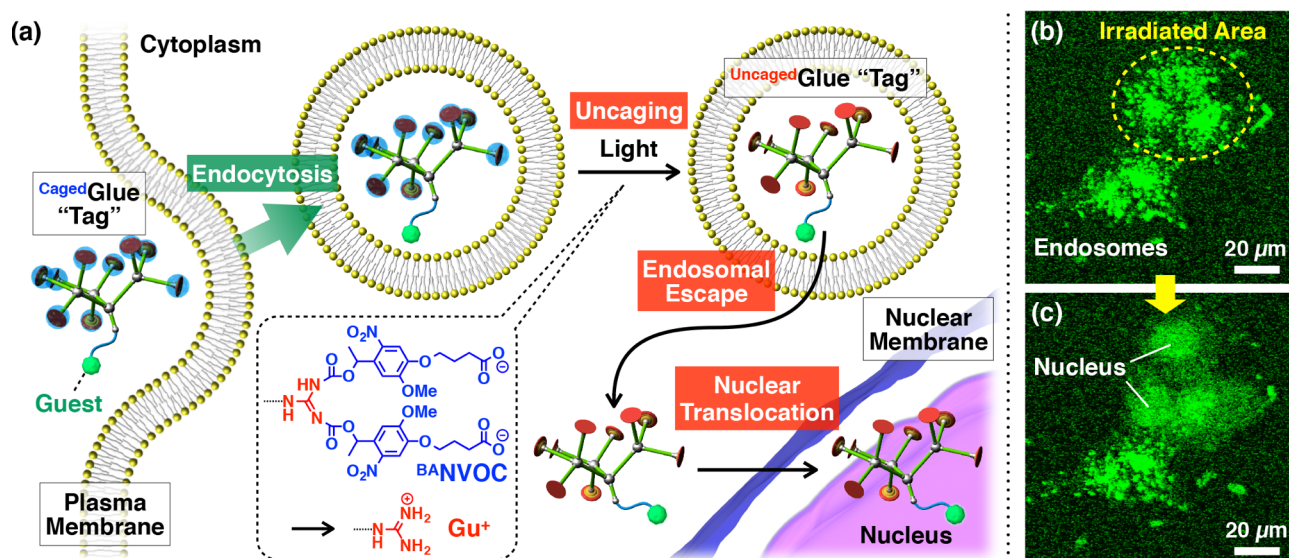
糊部位が CA 表面へと誘導され、結合部位近傍に接着する ( $K_{\text{assoc}} \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) ことで SA の結合／解離の足場として機能していることが示唆された。事実、Glue-Azo-SA を用いた酵素活性の光制御は細胞溶解液中という複雑タンパク質存在下においても可能であった。

#### 【4】 光照射により細胞核内へ移行する『ケージド分子糊』の開発<sup>[3,5]</sup>

細胞核は遺伝子の保存と伝達を担う小器官であり、多くのタンパク質は核内における遺伝子の転写を起点として発現される。そのため、標的細胞の核内に核酸や遺伝子発現に関わるタンパク質を輸送することができれば、特定のタンパク質の発現を介して様々な生物現象を制御することが可能となる。外因性の物質を細胞核に輸送するためには、細胞膜やエンドソーム膜、そして核膜を透過する必要がある。Gu<sup>+</sup>基に富む分子の多くはそれらの膜を透過できる細胞核への輸送タグとして機能することが知られているが、標的以外の細胞にも無作為に取り込まれてしまうという選択性の欠如が実用化への課題である。

分子糊は細胞膜中のリン脂質や核移行タンパク質と強く接着する結果、高い細胞膜透過性および核移行性を示す。そこで本研究では、光で接着性を変化させる分子糊を「輸送タグ」として用いることで、ゲスト分子の細胞膜透過および核移行を任意の部位・タイミングで誘起することを狙った。この目的のため、デンドリマー型分子糊の Gu<sup>+</sup>基を光開裂性保護基であるブタン酸置換ニトロベラトリルオキシカルボニル基 (B<sup>A</sup>NVOC 基; Figure 6a) で保護した『ケージド分子糊』 (Caged Glue-R; Figure 6a) を設計・合成した。

コアに蛍光色素であるニトロベンゾオキサジアゾール (NBD) を連結したケージド分子糊 (Caged Glue-NBD) を用いて細胞内取込み実験を行った。ヒト肝癌由来 Hep3B 細胞に Caged Glue-NBD (10 μM) を添加した後、37 °C で 3 時間インキュベートしたところ、エンドサイトーシス経路による取込みに典型的な粒状の蛍光が観察された (Figure 6b)。ケージド分子糊は表面にアニオン性の B<sup>A</sup>NVOC 基をもち、同じくアニオン性であ



**Figure 6.** (a) Schematic illustration of light-triggered nuclear translocation of guests conjugated with a Caged Glue tag. (b, c) Confocal laser scanning micrographs of Hep3B cells after 3-h incubation at 37 °C in EMEM containing Caged Glue-NBD (10 μM) followed by rinsing with D-PBS. Micrographs were recorded upon excitation at 488 nm ( $\lambda_{\text{obs}} = 500\text{--}530 \text{ nm}$ ) before (b) and after (c) two-photon irradiation at 710 nm for 2 min (30 s x 4). The dashed circle in (b) represents the irradiated area.

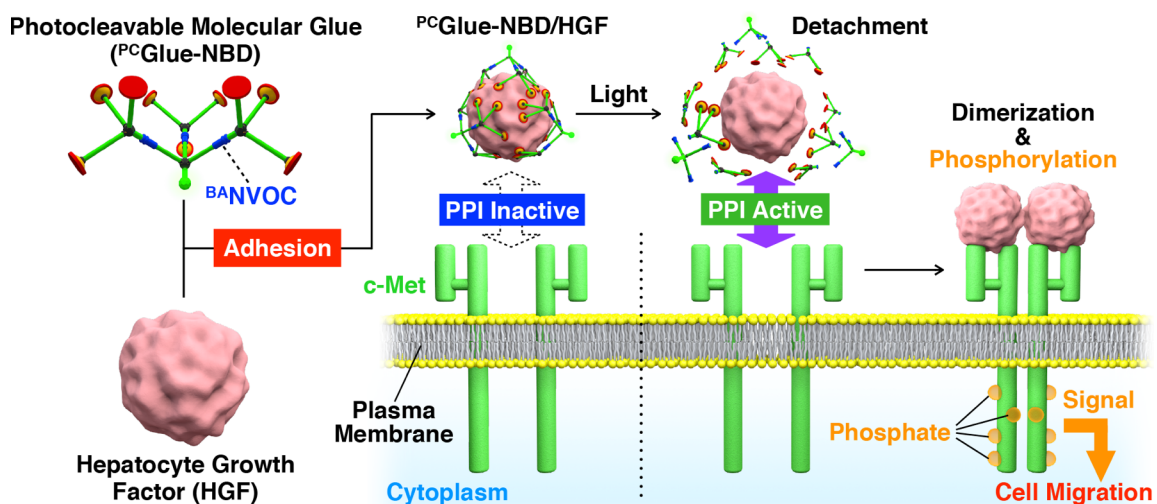
る細胞膜との親和性が小さいため、細胞膜を直接透過せずにエンドサイトーシスを介して細胞に取込まれ、エンドソーム内に滞留した (Figure 6a) と推定される。ここで紫外光 (365 nm, 2 min) を照射すると、NBD由来の蛍光が細胞質全体に広がり、細胞核内にまで達した。さらに、顕微鏡下で一部の細胞にのみ近赤外光による二光子励起 (710 nm, 30 s × 4) を行うことで、光照射した細胞選択的に分子糊の細胞核移行を誘起することに成功した (Figure 6c)。輸送するゲストとして量子ドット ( $D_H = 15\text{--}20\text{ nm}$ ) を用いた場合にも ( $^{\text{Caged}}$ Glue-QD)、紫外光照射による細胞核移行に成功した。

### [5] タンパク質-タンパク質間相互作用の光制御を指向した『光分解性分子糊』の開発<sup>[6]</sup>

タンパク質-タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction; PPI) は2つのタンパク質間に生じる相互作用であり、遺伝子発現やシグナル伝達などにおいて重要な役割を担っている。一般に PPI の相互作用面は広く ( $1,500\text{--}3,000\text{ \AA}^2$ ) 扁平であるため、相互作用面積の小さい ( $300\text{--}1,000\text{ \AA}^2$ ) 低分子リガンドでは PPI に働きかけることが難しい。抗体を用いて標的とする PPI を阻害することは可能だが、目的の抗体を得ることは容易ではない。また、抗体の抗原認識能はその精緻な表面構造に依拠しており、化学修飾による抗体への機能付加は多くの場合、結合能の著しい低下につながる。

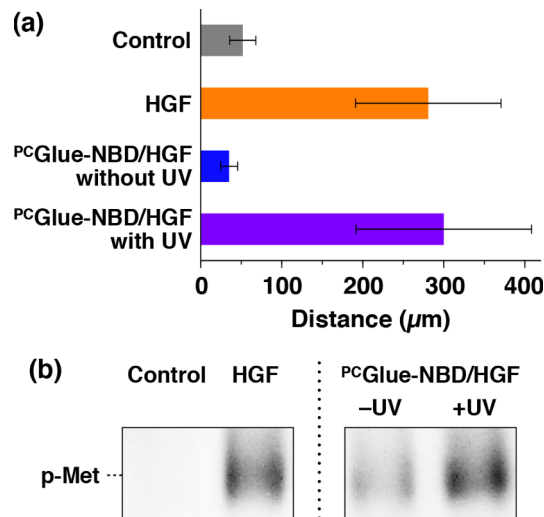
本研究では、PPI の光制御を目指し、 dendrimer 型分子糊の分岐点に光開裂性リンカーとして前述の  $^{\text{BA}}$ NVOC 基を有する『光分解性分子糊』 ( $^{\text{PC}}$ Glue-NBD; Figure 7) を設計・合成した。光刺激によって分子骨格を分解し、 $\text{Gu}^+$ 基の多価性を減少させることで、タンパク質表面への接着→解離を光制御する (Figure 7)。モデルタンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA,  $20\text{ }\mu\text{M}$ ) に  $^{\text{PC}}$ Glue-NBD ( $50\text{ }\mu\text{M}$ ) を混合し、ゼータ電位を測定したところ、BSA のみの場合 ( $-18 \pm 5\text{ mV}$ ) よりも電位値が正にシフトした ( $-7 \pm 4\text{ mV}$ )。ここに紫外光 (365 nm, 2 min) を照射すると、ゼータ電位が再び減少した ( $-15 \pm 4\text{ mV}$ )。これらの結果は、BSA 表面に接着した分子糊が光刺激により解離したことを示唆している。

肝細胞増殖因子 (HGF) とその受容体 (c-Met) 間の相互作用を標的とし、PPI 制御を試みた。HGF が c-



**Figure 7.** Photomodulation of HGF/c-Met interaction by photocleavable molecular glue ( $^{\text{PC}}$ Glue-NBD).  $^{\text{PC}}$ Glue-NBD adheres to the surface of HGF and inhibits its interaction with c-Met. Upon photoirradiation,  $^{\text{PC}}$ Glue-NBD is degraded and liberates HGF. Then, HGF binds to c-Met, followed by its dimerization and phosphorylation, which induces cell migration.

Met に結合すると、c-Met の二量化に伴うリン酸化を起点としてシグナルが伝達され、細胞遊走が誘導される (Figure 7)。ヒト前立腺癌由来 DU145 細胞に HGF (500 pM) を添加し、位相差顕微鏡下、37 °C で 12 時間観察を行ったところ、細胞の遊走が確認された (平均総移動距離  $d_{ave} = 281 \mu\text{m}$ , Figure 8a)。HGF (500 pM) と  $^{14}\text{C}$ Glue-NBD (2  $\mu\text{M}$ ) の混合溶液を添加した場合、細胞の移動距離は HGF 非添加の場合 ( $d_{ave} = 52 \mu\text{m}$ ) とほぼ同程度であった ( $d_{ave} = 35 \mu\text{m}$ , Figure 8a)。一方、上記の混合溶液に紫外光 (365 nm, 2 min) を照射した後に細胞に添加すると、HGF 添加の場合とほぼ同様の遊走が観察された ( $d_{ave} = 300 \mu\text{m}$ , Figure 8a)。DU145 細胞溶解液のウェスタンブロットング解析から、 $^{14}\text{C}$ Glue-NBD/HGF を添加した細胞においては、紫外光照射の有無で c-Met のリン酸化に有意な差が生じていることが明らかになった (Figure 8b)。これらの結果は、 $^{14}\text{C}$ Glue-NBD の接着/解離によって HGF/c-Met の相互作用を制御できることを示している。



**Figure 8.** (a) Average total migration distances of DU145 cells ( $n = 30$ ) after 12 h at 37 °C in RPMI1640 (0.5% FBS) in the absence and presence of HGF (500 pM) or  $^{14}\text{C}$ Glue-NBD/HGF ( $[^{14}\text{C}$ Glue-NBD] = 2  $\mu\text{M}$ , [HGF] = 500 pM) before and after UV irradiation (365 nm, 2 min). (b) Western blotting profiles of phosphorylated c-Met (p-Met) obtained from DU145 cells. The cells were incubated for 60 min at 37 °C in the absence and presence of HGF (500 pM) or  $^{14}\text{C}$ Glue-NBD/HGF ( $[^{14}\text{C}$ Glue-NBD] = 5  $\mu\text{M}$ , [HGF] = 500 pM) before and after UV irradiation (365 nm, 2 min).

## [6] 結言

本研究では、生体高分子表面に強い接着性を示す『分子糊』を基盤とした生体分子間相互作用の制御手法開拓に取り組んだ。特に、光応答性部位を組み込んだ分子糊を種々設計することで、様々な生体分子間相互作用の遠隔操作に成功した。本研究で開拓した手法は、いずれも分子糊の“接着”という普遍性の高い現象を活用して実現したものであり、特異的結合に基づいた従来のアプローチでは困難な対象にも適用可能である。本研究のさらなる発展により、制御可能な生体分子間相互作用の範囲は大きく拡張され、分子レベルでの生物現象の理解や疾患治療法の開発が加速的に進むものと期待している。

## [7] 発表論文

### 原著論文

- [1] R. Mogaki, K. Okuro, T. Aida, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2802–2805.
- [2] R. Mogaki, K. Okuro, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10072–10078.
- [3] A. Arisaka,† R. Mogaki,† K. Okuro, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2687–2692. (†Equally Contributed.)
- [4] K. Okuro, H. Nemoto, R. Mogaki, T. Aida, *Chem. Lett.* **2018**, *47*, 1232–1235.
- [5] R. Mogaki, K. Okuro, A. Arisaka, T. Aida, *J. Vis. Exp.* **2018**, *in press*.
- [6] R. Mogaki, K. Okuro, R. Ueki, S. Sando, T. Aida, *to be submitted*.

### 総説

- [7] R. Mogaki, P. K. Hashim, K. Okuro, T. Aida, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6480–6491.
- [8] K. Okuro, R. Mogaki, *Bio Industry* **2017**, *34* (10), 11–22.