

## 審査の結果の要旨

氏名 石原 慧

本論文は、ユビキチン化を介さずに標的タンパク質のプロテアソーム分解を誘導する方法論の創出を目的としたものである。プロテアソームに分解標的タンパク質をリクルートしさえすれば、ユビキチン化非依存的に標的タンパク質の分解を誘導できることに着目し、プロテアソームリガンドと標的タンパク質リガンドからなるキメラ化合物にユビキチンの役割を代替させることを構想した。新たに同定した Rpn10 リガンドと Halo タグリガンドをつないだキメラ化合物は、わずかではあるがプロテアソーム依存的に Halo タグ融合タンパク質の分解を促進し、ユビキチン化を介さない標的タンパク質のプロテアソーム直接分解誘導法が新たな創薬モダリティとなる可能性を見出すに至った。

26S プロテアソームは 33 種類 66 個のサブユニットからなる巨大な酵素複合体であり、ユビキチンシステムと関連した時空間的に厳密に制御されたタンパク質分解を通じて、細胞周期、転写制御、シグナル伝達など多様な生命現象で必須の役割を担っている。プロテアソームはほぼ全ての細胞内タンパク質を分解可能であり、ユビキチン・プロテアソーム系(ubiquitin-proteasome system, UPS)を利用して特定のタンパク質を分解誘導する化合物の開発が近年盛んに行われている。これらの化合物は作用機序をもとに PROTAC/SNIPER と E3 モジュレーターに大別されるが、ともに E3 に標的タンパク質を近接させることで強制的なユビキチン化と引き続くプロテアソームによる分解を誘導する。一般的に酵素活性を持たない細胞内タンパク質に対する阻害剤開発は難しいとされるが、PROTAC をはじめとする protein degrader は標的タンパク質の細胞内における存在量自体を低減させるため、これまで undruggable とされていた酵素活性を持たない疾患関連タンパク質に対しても有効と考えられる。しかし、これらの技術は利用する E3 の発現に依存することや、リクルートされた標的タンパク質が E3 で効率よくユビキチン化されるか否かは標的タンパク質の立体構造やアミノ酸配列に依存するなどの弱点も存在する。UPS におけるユビキチン化の役割は標的タンパク質をプロテアソームに運搬することであるから、標的タンパク質をプロテアソームにリクルートすることさえできれば、ユビキチン化非依存的に標的タンパク質を分解誘導することも可能である。そこで、PROTAC/SNIPER における E3 リガンドをプロテアソームリガンドと置き換えれば、ユビキチン化を介さずに標的タンパク質を分解誘導できると考えた。

本研究では、まず新規のプロテアソームリガンドを探索した。プロテアソームにリクルートされた標的タンパク質が分解される最初のステップは、標的タンパク質に存在する約 30 アミノ酸残基以上の長さの非構造領域がプロテアソームの ATPase リング入口に捕捉されることである。つまり、効率的な分解誘導のためには標的タンパク質がリクルートされた際にその非構造領域がプロテアソームの適切な位置に来ることが望ましい。多様な標的タンパク質の分解を可能とするためには、プロテアソーム上の異なる部位に結合する化合物をそろえておき、標的タンパク質の違いにより使い分ける必要が生じると考えられる。

プロテアソーム ATPase リング近傍に位置するサブユニットの中から、ATPase リング入口との距離や角度、リガンドの入り込める可能性のあるポケット構造の有無、隣接するサブユニットとの会合部位などを検討した結果、Rpn1 の N 末端側(1~341a.a.)、Rpn3 の N 末端側(18~263a.a.)、Rpn10 の N 末端側(1~191a.a.)、VWA ドメイン)および C 末端側(194~377a.a.)、UIM ドメイン)がプロテアソームリガンドの有望な結合部位になり得ると考え、大腸菌からの組換えタンパク

質として精製した。

精製した上記 4 つのリコンビナントタンパク質に対して、理化学研究所天然化合物バンク NPDepo が保有する 22,618 種類の化合物を固定化したアレイによるスクリーニングを実施し、結合可能性を示した化合物の affinity を表面プラズモン共鳴 (SPR) により評価した。最終的に、Rpn3 との解離定数  $K_D = 16.2 \mu\text{M}$  の化合物 A、Rpn10VWA との  $K_D = 28.3 \mu\text{M}$  の化合物 B、 $K_D = 14.5 \mu\text{M}$  の化合物 C を新たに同定した。

選択した 3 つのプロテアソームリガンド候補と標的タンパク質リガンドのキメラ化合物の合成は共同研究者が行うため、3 つの化合物に優先順位をつけて研究を進めていくことが求められた。まず、プロテアソームのモデル基質である ZsGreen-mODC の分解を指標に化合物がプロテアソーム阻害作用を持つか調べたが、いずれの化合物も ZsGreen-mODC を蓄積させなかった。しかし、化合物 A は  $20 \mu\text{M}$  において一定の細胞毒性を示し、Rpn3 への特異性が懸念されたことから化合物 A をキメラ化する優先度は低いと予想された。次に、化合物 B、C と Rpn10VWA との結合様式を AutoDock4.2 および AutoDockVina を用いたドッキングシミュレーションにより予測したところ、化合物 C の方がより確度の高い結合モデルが得られた。

プロテアソームと標的タンパク質の両者への結合能を保持したキメラ化合物を作出するには、選択した化合物のプロテアソームとの結合に必要な構造を予め推定し、その構造を保存する形でキメラ化合物をデザインすることが必要である。信頼性の高い結合モデルが得られた化合物 C はキメラ化に使用可能な官能基を予想しやすく、論理的に合成戦略を立てられる。以上から、本研究では化合物 C のキメラ化を優先して進めることとした。

キメラ化合物を用いた分解誘導の成否は、標的とするタンパク質の選定に大きく左右されると考えられる。そのため、コンセプトの実証には多様な標的タンパク質を用意できることが望ましいが、標的タンパク質ごとにキメラ化合物を合成するのは容易でない。そこで本研究では、アルキルクロライドが Halo タグと共有結合を形成することに着目し、まずは化合物 C とアルキルクロライドを長さの異なるリンカーで繋いだキメラ化合物 C1 および C2 を作出した。作出したキメラ化合物が Rpn10VWA との結合活性を保持していることは SPR により確認された。

キメラ化合物の細胞における効果を調べるために、N 末端側に Halo タグと Flag タグ、C 末端側に出芽酵母シトクロム b2 由来の 94 アミノ酸からなる非構造領域と 5xHis タグを付加した superfolder 型 GFP (Halo-Flag-sfGFP-tail) を HEK293T 細胞で発現させ、その分解を GFP の蛍光強度を指標にフローサイトメトリーで評価した。cIAP1 リガンドと Halo タグリガンドをつないだ SNIPER 化合物 ST441 をポジティブコントロールとして用いたが、SNIPER 化合物でも 12% 程度の分解誘導効果しか見られず、Halo-Flag-sfGFP-tail は分解を評価する基質としてあまり好ましくなかった可能性がある。しかし、化合物 C と Halo タグリガンドを短いリンカーでつないだキメラ化合物 C1 は、わずかながら Halo-Flag-sfGFP-tail の分解を促進した。さらに、その分解促進作用はプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの添加によって消失したことから、キメラ化合物 C1 はプロテアソーム依存的な分解を誘導することが示唆された。

以上の研究から、石原慧は以下の成果を示した。プロテアソーム ATPase リング近傍に位置するサブユニット Rpn1、Rpn3、Rpn10 (N 末端側 VWA ドメインと C 末端側 UIM ドメインに分割して扱った) に対する結合化合物スクリーニングを、理化学研究所が保有する約 2 万の NPDepo ライブラリーを用いて実施し、Rpn3 に対して 1 つ、Rpn10VWA に対して 2 つの結合化合物を新たに同定した。そして、同定した Rpn10 リガンドと Halo タグリガンドをリンカーでつないだキメラ化合物を作出し、キメラ化合物によってプロテアソーム依存的に標的タンパク質を分解誘導可能なことを示した。今後キメラ化合物の作用機序の詳細を明らかにし、より高い活性を持つキメラ化合物を作出することができれば、本研究で用いた手法は有望な創薬モダリティとなることが期待される。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。