

博士論文

標的タンパク質のリガンドを必要としない
プロテインノックダウン法

友重 秀介

まえがき

生物学の目的は、我々生命の成り立ちや仕組み、現象を理解することにある。また、生命現象の異常は疾患の発症につながることから、生物学の発展は医学・医療の進歩にも密接に関わる。すなわち、生命現象の解明は人類を含む様々な生命の繁栄にも貢献するものである。

人類は、長い歴史の中で生命現象を解明するための手法をいくつも開発し、洗練させてきた。その過程で、研究手段が充実するにつれ、研究対象はより微視的なものへとシフトしていき、現在ではタンパク質や RNA の機能や仕組みを解明するための手段やツールの開発・研究が行われている。現在、タンパク質の機能を解析する手段としてタンパク質の存在量を制御する手法よく利用されており、タンパク質の存在量を増加あるいは減少させることでどのような表現型となるかを解析することで、タンパク質の機能解明が行われている。こうした背景から、ここ数十年から数年の間に、タンパク質の存在量を制御する手法がいくつか開発され、DNA や RNA を生物学的に操作することでタンパク質の存在量を制御する手法が現在主流となっている。

近年、学問の細分化が進んだ結果、学問同士の境界は徐々に曖昧なものとなり、1980 年代には、ハーバード大学の Stuart L. Schreiber によって化学的見地から生物学を研究する境界学問領域「ケミカルバイオロジー」が提唱された。上述したように生物学における研究対象がより微視的になったため、元来微視的なものを扱う学問である化学は生物学との親和性が高くなり、ケミカルバイオロジー研究は年々隆盛の一途をたどっている。そして最近では、化学的にタンパク質の存在量を制御する手法がいくつか開発され、実際に化学的手法を用いることで、タンパク質の機能を明らかにした例も報告されている。化学的手法は現在主流となっている生物学的手法とは異なる特徴・利点を有しており、その進展が期待されている。

所属研究室は過去に、タンパク質の存在量を化学的に制御する手法として「プロテインノックダウン法」を開発した。本手法は、生体に備わっているタンパク質分解経路、ユビキチン-プロテアソーム系を有機小分子によって誘導するものである。本手法はこれまでに様々なタンパク質の分解を誘導しているものの、適用範囲に制限があった。そこで筆者は本手法の適用範囲拡張を目指し、博士課程において2つの研究課題を遂行した。

本論文は筆者の博士課程における研究についてまとめたものである。本論文の第1章では、研究背景として、タンパク質の存在量を制御する手法についてタンパク質の一生と絡めて概説した。第2章では、1つ目の研究課題として、神経変性疾患の1つである Huntington 病の治療を指向し、原因タンパク質のプロテインノックダウンについてまとめた。第3章では、2つ目の研究課題として、HaloTag を利用した汎用プロテインノックダウンシステムの構築についてまとめた。

本論文にまとめた研究成果により、筆者はプロテインノックダウン法の適用範囲を、限定的

ではあるが、拡張できる方法論の考案と実証を達成できた。本研究によって見出された知見は、現在黎明期にあるタンパク質存在量の化学制御の進展の礎となると考えている。

なお、本論文の第3章の内容については、一部を以下の学術論文として公表済みである。

Shusuke Tomoshige, Mikihiro Naito, Yuichi Hashimoto and Minoru Ishikawa,

“Degradation of HaloTag-fused nuclear proteins using bestatin-HaloTag ligand hybrid molecules”

Organic & Biomolecular Chemistry **2015**, *13*, 9746 - 9750.

目次

まえがき	i
略語表	v
1. 研究背景	1
1.1 タンパク質の一生	1
1.2 タンパク質存在量の制御手法：逆遺伝学的アプローチ	4
1.3 タンパク質存在量の制御手法：化学的アプローチ	9
1.4 プロテインノックダウン法	13
1.5 プロテインノックダウン法の問題点と本研究の目的	18
1.6 参考文献	19
2. タンパク質の凝集を標的とする方法論：	
Huntington 病原因タンパク質のプロテインノックダウン	25
2.1 背景：神経変性疾患と Huntington 病	26
2.2 研究目的・作業仮説	29
2.3 分子設計・合成	30
2.4 活性評価	35
2.5 メカニズム解析	37
2.6 考察	40
2.7 まとめと今後の展望	41
2.8 参考文献	42
2.9 実験項	46

3. リガンドと結合部位を付与する方法論：	
HaloTag を利用した汎用分解誘導システムの構築55
3.1 背景：プロテインノックダウン法のその他の問題点56
3.2 目的・作業仮説56
3.3 分子設計・合成59
3.4 活性評価61
3.5 考察64
3.6 まとめと今後の展望64
3.7 参考文献65
3.8 実験項67
4. 結論75
謝辞77

略語表

A β	amyloid β
AcOH	acetic acid
Ago	Argonaute
AMP	adenosine monophosphate
AR	androgen receptor
BACE	β -site APP cleaving enzyme
BBr ₃	boron tribromide
BCA	bicinchonic acid
BIR	baculoviral IAP repeat
BIRC	BIR containing
Boc	tertialy-butoxycarbonyl
br	broad
BRCA	breast cancer susceptibility gene
cAMP	cyclic AMP
Cas	CRISPR associated protein
CDPK	calcium-dependent protein kinase
CHIP	C terminus of Hsc70-interacting protein
cIAP	cellular IAP
CRABP	cellular retinoic acid binding protein
CRBN	cereblon
Cre	cre recombinase
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
crRNA	CRISPR RNA
d	doublet
DCM	dichloromethane
dd	double doublet
DD	destabilizing domain
DIABLO	direct IAP-binding protein with low pI
DIEA	diisopropylethylamine
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DNA	deoxyribonucleic acid

dq	double quartet
DSB	DNA double-stranded brake
dsRBP	double strand RNA binding protein
EDC	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	estrogen receptor
ES	embryonic stem
ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
FAB	fast atom bombardment
FBS	fetal bovine serum
FDA	food and drug administration
Flp	flippase
FRS2 α	fibroblast growth factor receptor substrate 2 α
FRT	flippase recognition target
GST	glutathione S-transgerase
HD	Huntington's disease
Her	human epidermal growth factor receptor
HIF	hypoxia inducible factor
HRMS	high resolution mass spectrometry
HRP	horseradish peroxidase
Htt	huntingtin
HyT	hydrophobic tag
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IB	Immunoblot
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LB	lysogeny broth
Lin	lineage defective
loxP	locus of crossover in P1
Me	methyl
metAP	methionine aminopeptidase
mHtt	mutant Htt
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
MS	mass spectrometry
Ms	methanesulfonyl
NMR	nuclear magnetic resonance

Pam	protospacer-adjacent motif
PBS	phosphate buffered saline
PET	positron emission tomography
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PPh ₃	triphenylphosphine
PROTAC	proteolysis-targeting chimeric molecule
PVDF	polyvinilidene difluoride
RAR	retinoic acid receptor
RING	really interesting new gene
RIPK	receptor interacting protein kinase
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
rRNA	ribosome RNA
r.t.	room temperature
s	singlet
SCF ^{β-TRCP}	Skp, Cullin, F-box (β-transducin repeat containing) containing complex
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis
SERDs	selective estrogen receptor downregulators
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SNIPER	specific and nongenetic IAP-dependent protein eraser
SPECT	single photon emission computed tomography
t	triplet
TACC	transforming acidic coiled-coil
TALEN	transcription activator-like effector nuclease
TBS-T	Tris-buffered saline containing Tween 20
THF	tetrahydrofuran
ThS	thioflavin S
ThT	thioflavin T
TLC	thin layer chromatography
TMR	tetramethylrhodamine
TNF	tumor necrosis factor
tracrRNA	transactivating crRNA
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

tRNA	transfer RNA
Ub	ubiquitin
UPS	ubiquitin-proteasome system
VHL	von Hippel-Lindau
WST	water-soluble tetrazolium: 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt
XIAP	X-chromosome linked IAP
ZFN	zinc finger nucleases

1

研究背景

1.1 タンパク質の一生¹

タンパク質は、20 種類のアミノ酸から構成されるペプチド性高分子である。したがってタンパク質の産生から分解は、一言で言えばアミノ酸の連結と開裂である。しかしタンパク質が複雑な機能を発現するには、高度に制御され、かつ高精度な環境でタンパク質の産生から分解が行われる必要がある。本節では、タンパク質の一生を担う、高度に組み上げられた複雑な機構について概説する。

1.1.1 タンパク質の産生

機械がその機能を発揮するように組み立てられるには、その構成を精密に指示する設計図が必要である。タンパク質でも同じであり、タンパク質の設計図に当たるのが DNA である。タンパク質の産生機構は、設計図である DNA から、設計図の内容を指示する RNA へと“転写”された後、タンパク質合成酵素リボソームによって指示通りに“翻訳”される、といういわゆる“セントラルドグマ”に則って行われる (Fig. 1)。

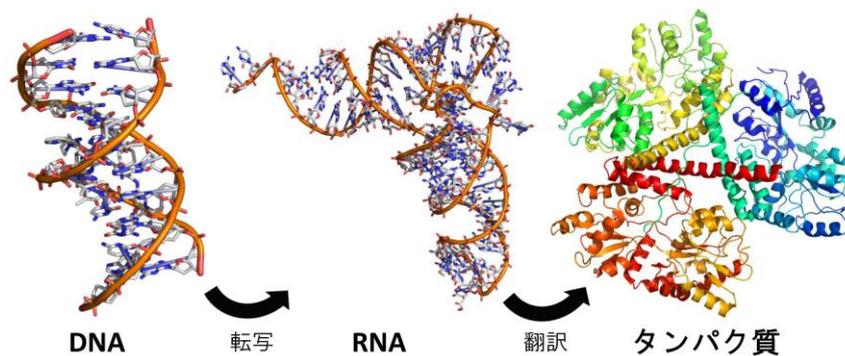


Figure 1. “セントラルドグマ”の模式図.

DNA と RNA はどちらも核酸と呼ばれ、リン酸、糖、塩基の 3 つが規則的に重合した高分子である。DNA では塩基としてアデニン、グアニン、シトシン、チミン、糖としてデオキシリボースによって構成され、RNA では上述の 4 つの塩基のうちチミンがウラシルに、デオキシ

ノ酸を補充するという側面も持つ。タンパク質は通常、リソソームと呼ばれる細胞小器官か、プロテアソームと呼ばれるプロテアーゼ複合体によって分解される。

リソソームは、細胞内に存在する脂質二重膜によって隔離された液胞である。内部は細胞質内よりも pH の低い酸性状態であり、酸性条件を至適環境とするプロテアーゼ群が存在する。リソソームでは主にエンドサイトーシスで取り込んだ細胞外要素や、オートファジーによって取り込んだ細胞質内要素の分解を担っている。エンドサイトーシスでは、取り込まれた細胞外要素はエンドソームと呼ばれる液胞として細胞内に存在し、エンドソームがリソソームと融合することで、内容物が分解されるようになる (Fig. 4)。

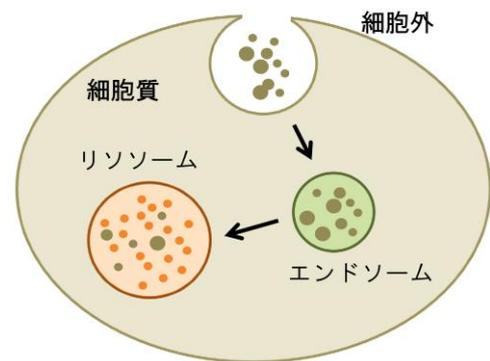


Figure 4. リソソームによる分解経路.

細胞質に存在するタンパク質の分解のほとんどは、プロテアソームが担っている。プロテアソームによる分解経路はリソソームによる分解よりも体系的であり、ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) と呼ばれる。UPS では分解すべきタンパク質の Lys 残基に対し、ユビキチンと呼ばれる小さなタンパク質が修飾され、これを目印としてプロテアソームによって選択的に分解が行われる。タンパク質のユビキチン化 (Ub 化) は、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン転移酵素 (ユビキチンリガーゼ、E3) の3つの酵素によって行われている。分解されるタンパク質に結合したユビキチンは、その Lys 残基に対してさらに Ub 化を受け、polyUb 鎖となってプロテアソームに認識される (Fig. 5)。

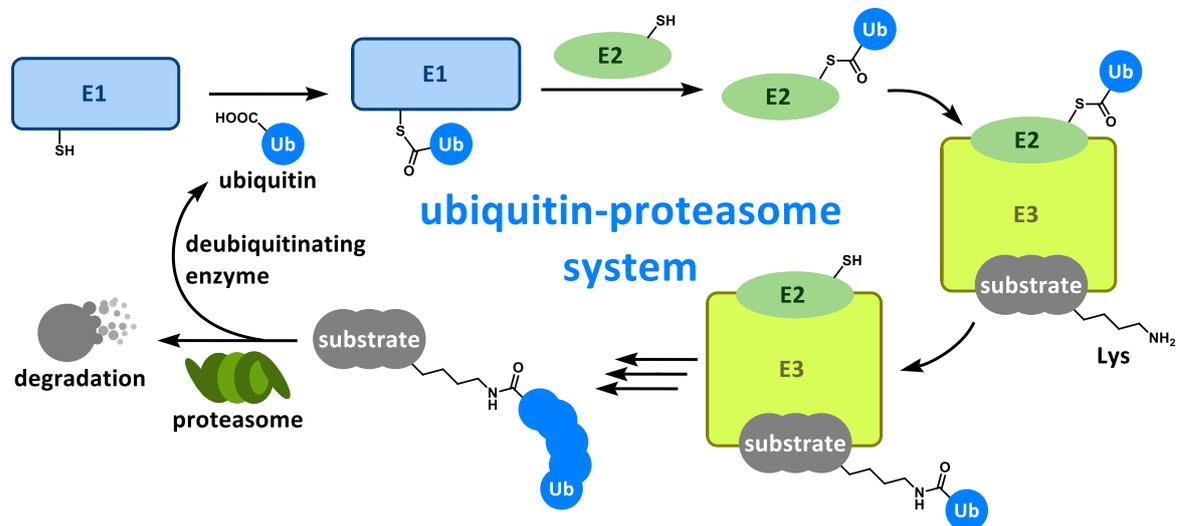


Figure 5. UPS によるタンパク質の分解.

ユビキチンは Lys6、Lys11、Lys27、Lys29、Lys33、Lys48、Lys63 の7つの Lys 残基を有しており、どの Lys 残基において連結するかによって polyUb 鎖の役割が変わる。プロテアソームに認識されるのは Lys48 で連結していく Lys48 結合性 polyUb 鎖である²。その他の Lys 結合性 polyUb 鎖がどのような役割を担っているかについては不明な点が多いが、Lys63 結合性 polyUb 鎖はキナーゼ活性化やタンパク質の凝集促進など様々な機能が報告されている^{3,4}。

1.2 タンパク質存在量の制御手法：逆遺伝学的アプローチ

タンパク質の機能解析における遺伝学的アプローチは、変異動物の表現型をもとに原因遺伝子の特定およびタンパク質の機能解析を行う“順遺伝学”と、動物や細胞の特定の遺伝子改変による表現型からタンパク質の機能解析を行う“逆遺伝学”の2つに大別することができる⁵。逆遺伝学的手法は標的遺伝子の配列が分かっているのであれば特に制限なく利用できるため、全ヒトゲノムが解読された現在では、逆遺伝学的手法はタンパク質の機能解析や生命現象解明において非常に強力な手段となっている。

逆遺伝学的手法の具体例としては、遺伝子破壊による標的タンパク質の減少や、変異型対立遺伝子の導入による正常タンパク質の機能阻害（ドミナントネガティブ）、標的遺伝子の導入によるタンパク質の過剰発現などが挙げられるが、本節では、これらのうち1つ目に挙げたタンパク質の存在量を減少させる手法について述べる。

1.2.1 遺伝子ノックアウト

遺伝子ノックアウトは、対象の遺伝子を完全に欠損させ、そのタンパク質の発現を完全に抑える手法である。対象のタンパク質が完全に発現しないため、表現型を変化させるには非常に信頼性が高い。また、遺伝子ノックアウトは人間と同じ哺乳動物であるマウスに対して適用可能であるため、ヒトのタンパク質の機能解析や生命現象解明における“モデル”としてノックアウトマウスが頻繁に用いられている。

ノックアウトマウスは、①相同組み換えによるES細胞中の対立遺伝子の破壊、②偽妊娠マウス初期胚への①のES細胞の導入およびヘテロ接合体マウスの取得、③ヘテロ接合体マウスの交配を経てホモ接合体マウスとしてノックアウトマウスが作製される⁶ (Fig. 6)。

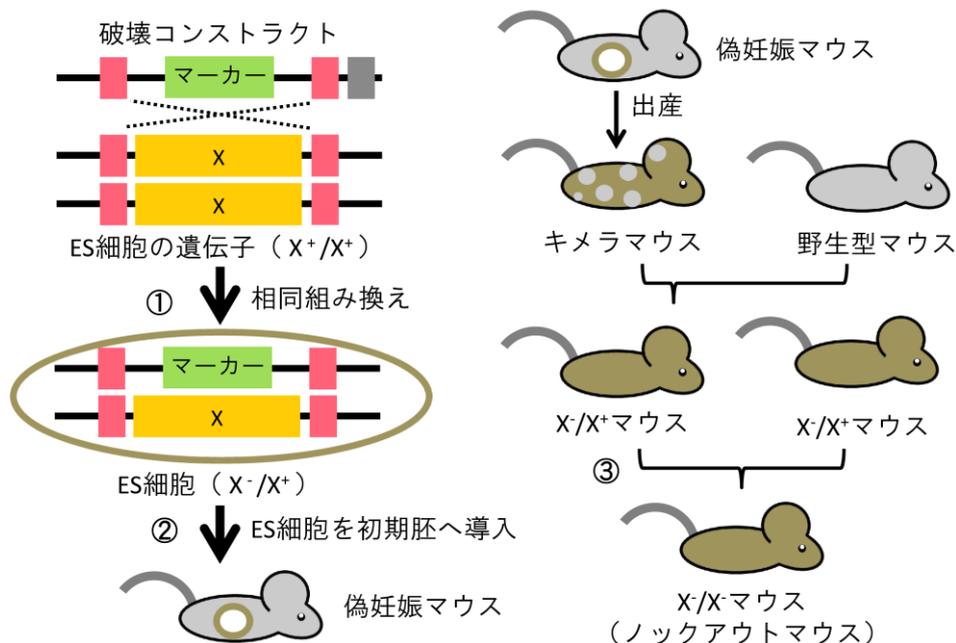


Figure 6. ノックアウトマウスの作製手順模式図。

上述したように、ノックアウトマウスは様々な研究領域においてヒトのモデルとして用いられている。例えば BIRC タンパク質のノックアウトマウスを用いた研究では BIRC タンパク質と TNF のシグナリングにおけるメカニズム解析や BIRC タンパク質とグルコース恒常性に関する解析が行われ⁷、また、sirtuin 3 のノックアウトマウスを用いた研究ではアルコール肝疾患におけるミトコンドリアタンパク質のアセチル化について解析が行われている⁸。

上記の遺伝子ノックアウト手法以外にも、バクテリオファージ P1 の Cre-*loxP* 部位特異的組み換えや *S. cerevisiae* の Flp-FRT 部位特異的組み換え⁹を応用した、条件的ノックアウトと呼ばれる手法も開発されている。この手法は、組み換え酵素 Cre または Flp によって特定の標的配列 (*loxP* or *FRT*) で挟んだ部分を組み換える、すなわち Cre または Flp の発現がトリガーとなる手法であるため、原理上、ノックアウトの時空間制御が可能である。

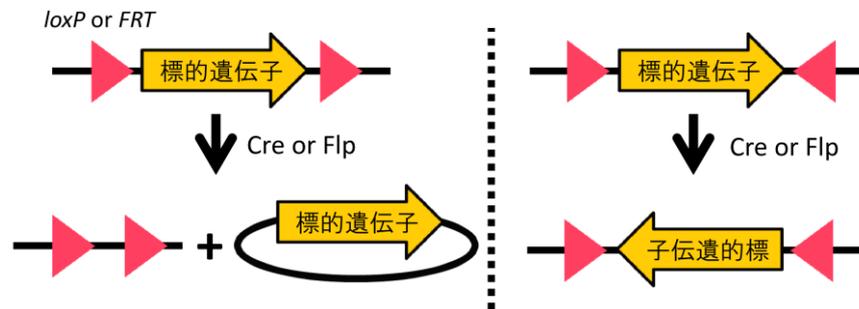


Figure 7. Cre-*loxP*/Flp-FRT 部位特異的組み換えの模式図。

時空間制御が可能であるという特徴から、条件的ノックアウトは生存に必須な遺伝子を一時的にノックアウトしたい場合などによく用いられる。例えば、乳がんのリスク遺伝子である BRCA1 を遺伝子ノックアウトすると、ホモ接合体（ノックアウトマウス）は着床後致死となり生まれてこない。そのため、BRCA1 の遺伝子ノックアウトは条件的ノックアウト手法によって行われる¹⁰。

ここまで述べたように、遺伝子ノックアウト手法はタンパク質の発現を完全に消失させるため、非常に信頼性の高い手法である。しかし、相同組み換えからホモ接合体を得るまでに比較的煩雑な操作と長期的な計画を立てる必要がある点は本手法の短所といえる。

1.2.2 RNA 干渉 (RNAi)¹¹

RNAi は、siRNA あるいは miRNA によって任意の mRNA が破壊され、対象のタンパク質の発現が抑制される現象である。RNAi を利用したタンパク質の存在量減少は、上述の遺伝子ノックアウトと比して迅速に、低価格で、そしてスループットよく行えるため、簡易的手法として生物学研究において用いられている。ただし、RNAi では対象のタンパク質の発現がある程度残ってしまうことから、タンパク質の発現を完全に消失させる“遺伝子ノックアウト”に対して“遺伝子ノックダウン”と称される。RNAi は植物や動物に広く保存された機構であり、ヒトにも存在する。

現在、RNAi の発見から約 20 年経つが、この間に RNAi のメカニズムについて多くの知見が得られた。現在わかっている RNAi のメカニズムについて Fig. 8 に示す。

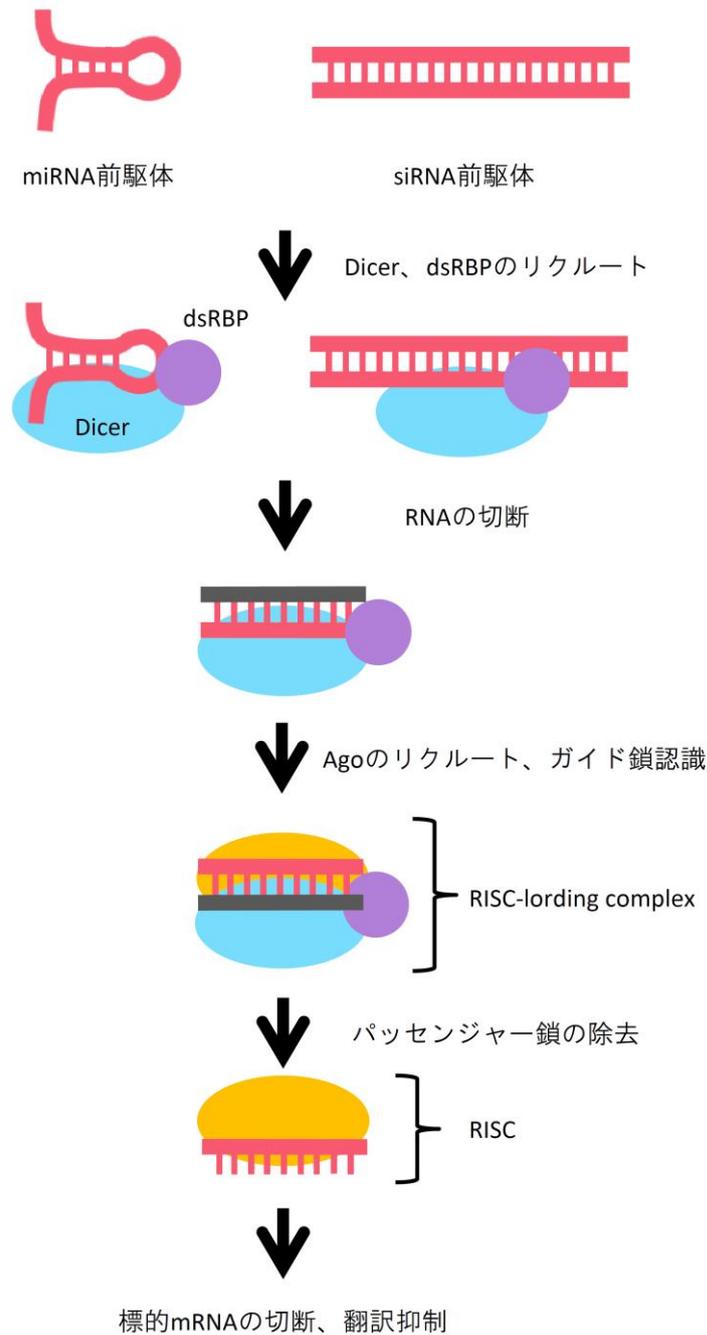


Figure 8. RNAi の模式図.

siRNA は外部から導入される二重鎖 RNA である。siRNA の導入では、siRNA 前駆体をそのまま産生するプラスミドベクターを導入する方法と、shRNA を産生するプラスミドベクターを導入した後、生体内で shRNA を siRNA に変換させる手法がある。miRNA は生体内で産生される、分子内相互作用によってヘアピン構造をとる一本鎖 RNA である。どちらもガイド鎖とパッセンジャー鎖から成っており、パッセンジャー鎖は RNAi の過程で取り除かれる。

RNAi ではまず、Dicer および dsRBP による siRNA および miRNA の成熟から始まる。これらはさらに Ago タンパク質と結合し、複合体 RISC-loading complex を形成する。次に RLC において siRNA/miRNA は Ago 側にガイド鎖を向け、Dicer と dsRBP が解離し、Ago によってパッセンジャー鎖が除去されることで、Ago とガイド鎖から成る複合体 RISC を形成する。RISC はガイド鎖と相補的な標的 mRNA へとリクルートされ、標的 mRNA の切断や翻訳抑制を行うことで、タンパク質の発現を抑制する。

RNAi は遺伝子ノックアウトとは異なり、siRNA の導入さえできれば比較的容易に標的タンパク質の存在量を減少させることができるため、がんや神経変性疾患など様々な疾患に対する医薬としての応用が検討されている^{12, 13}。例えばがんに対する治療研究では、頭頸部扁桃上皮がんの細胞株においてプロテインキナーゼ C ϵ に対する siRNA を用いると、がん細胞株の浸潤・転移が抑制されると報告されている¹⁴。また、神経変性疾患に対する治療研究では、アルツハイマー病のモデルマウスにおいて疾患原因タンパク質の産生酵素 BACE1 に対する siRNA を用いると、原因タンパク質の産生が抑制され、症状の改善が認められると報告されている¹⁵。

このように RNAi の医薬応用が検討されている一方で、実際に実用化するには siRNA (あるいはそのプラスミドベクター) の血中での安定性や細胞内への取り込みなどの点で問題がある。そのため最近では、siRNA の生体への導入を容易にするための手法の開発を目指した研究も行われている¹⁶。

1.2.3 ゲノム編集と CRISPR/Cas システム

ゲノム編集は、DNA 中の特定の箇所において、ある遺伝子を挿入したり、置き換えたり、除去したりする技術である。この技術は RNAi よりも後に開発され、現在隆盛の一途をたどっている非常に新しい遺伝子改変技術である。ゲノム編集には様々な手法があるが、その中でも ZFN、TALEN、そして CRISPR/Cas システムは特に注目されている技術である¹⁷。いずれも標的配列特異性を有する人工あるいは天然のヌクレアーゼによって DNA 二重鎖を切断 (DSB) し、相同組み換えまたは非相同性末端結合による DNA 修復を利用する。本項では CRISPR/Cas システムについて述べる。

元々、CRISPR/Cas システムはバクテリアやアーキア (古細菌) の持つ外部 DNA の侵入に対する獲得免疫機構であり、取り込んだ外部 DNA から転写された RNA をガイドとして、標的 DNA 特異的に DSB を起こす機構である。CRISPR/Cas システムでは Type I から Type III の3つのメカニズムが知られており、ゲノム編集において利用されているのは Type II のメカニズムである (Type II で働く Cas9 はそれ単体で DSB に必要な機能を有するため¹⁸)。Type II のメカニズムでは、ファージ感染などによって侵入した外部 DNA はまず、外部 DNA 中の特定の 2~5 塩基程度の配列 PAM の 5'側に存在する 20 塩基対 (protospacer) が Cas1 および Cas2 の複合体によって、何らかの機構で CRISPR と呼ばれるリピート配列とスペーサー配列の繰り返しの中に組み込まれる。この時、リピートの複製も起こる¹⁹。CRISPR リピートからは

crRNA の前駆体 pre-crRNA と tracrRNA が転写され²⁰、これらと Cas9 および RNase III の四者複合体が形成される。この四者複合体中で pre-crRNA は各繰返し単位に切断され、crRNA となり、リピート配列部分で tracrRNA と結合した二重鎖となる。この二重鎖 RNA は Cas9 と複合体を形成したままであり、標的となる外部 DNA へのガイドとして働く。外部 DNA へとリクルートされた Cas9 は外部 DNA の DSB を行い、遺伝子発現を抑制する (Fig. 9)²¹。

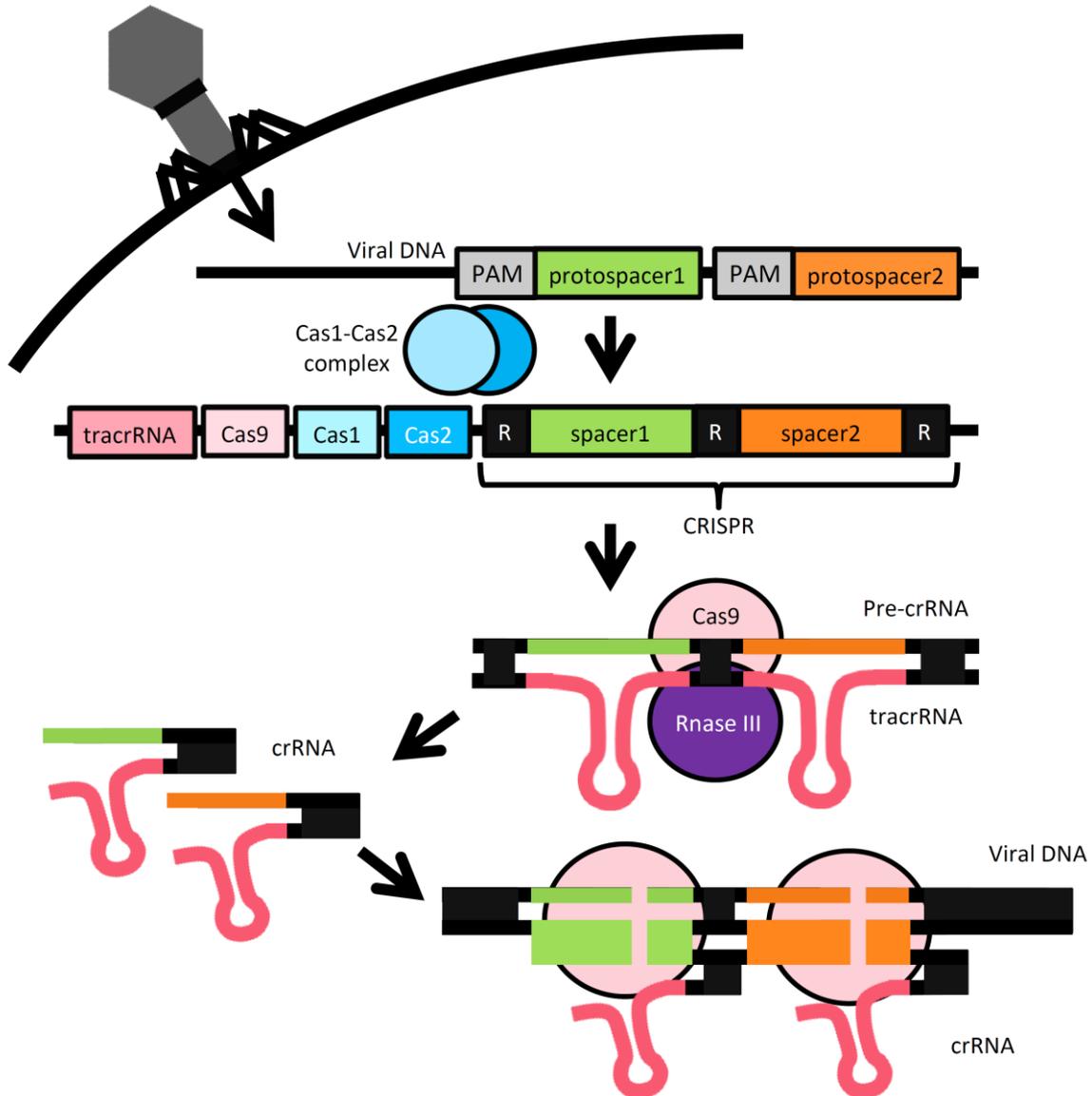


Figure 9. CRISPR/Cas システム (Type II) 模式図.

ゲノム編集で利用する際、CRISPR は必要なく、標的遺伝子の配列をコードした crRNA と tracrRNA を融合した遺伝子と Cas9 の遺伝子を有するプラスミドを導入し、これによって標的遺伝子の改変を行う。CRISPR/Cas システムによる遺伝子ノックダウンは、がんに関連するタンパク質の機能解析²²や B 型肝炎ウイルスに対する医薬応用²³などが試みられている。

本手法も RNAi 同様、生体へ応用するには、生理的条件においてプラスミドの導入が難しい点や核酸試薬が不安定であるといった点が問題となる。また、RNAi や CRISPR/Cas システムによって発現抑制を行っても、すでに発現したタンパク質が分解されるまでは存在量が減少しないため、特に半減期の長いタンパク質に対しては siRNA やプラスミドの導入から効果が表れるまでにタイムラグがある点も短所である。

1.3 タンパク質存在量の制御手法：化学的アプローチ

前節では、タンパク質の存在量を遺伝学的に制御する手法について紹介した。その一方、最近ではタンパク質の存在量を化学的に、翻訳後に制御する手法の開発が行われるようになってきている。これら化学的手法は有機小分子を用いるため、逆遺伝学的アプローチと比較して操作や試薬の導入が簡便であり、また、RNAi などを用いる核酸に比べて試薬が安定といった特徴がある。さらに、翻訳後制御を行う化学的手法では逆遺伝学的アプローチと比較して応答が速いと考えられ、瞬間的な制御や任意のタイミングで存在量を回復させるといったことも期待できる²⁴。現在、化学的手法については Yale 大学の Crews らのグループが精力的に研究を進めている。本節では、Crews らの開発した PROTACs 法および疎水性タグ法に焦点を当てて紹介する。

1.3.1 PROTACs 法

PROTACs 法は、標的タンパク質のリガンドと E3 のリガンドを連結させた有機分子 PROTAC により標的タンパク質に対して UPS を誘導してその存在量を減少させる手法である。PROTACs 法は 2001 年に最初の報告がなされて以降、現在までに 10 を超える論文が発表されており、最近では Crews ら以外のグループも PROTACs 法を用いた研究を行っている。PROTACs 法は用いる PROTAC 分子の性質が徐々に改善されてきているため、世代として分類した (Fig. 10)。

第 1 世代 (2001-2003 年) : 初期の PROTACs 法では、標的タンパク質に対して SCF^{β-TRCP} 複合体によるユビキチン化と分解を誘導している^{25, 26}。これらの研究では、PROTAC 分子によって MetAP-2、ER、AR、の存在量減少を達成している。しかし、これらの PROTAC 分子は SCF^{β-TRCP} 複合体のリガンドとして 16 アミノ酸からなる基質タンパク質上のペプチド断片 GGGGGGDRHDSpGLDspM (Sp はリン酸化セリン) を用いたペプチド性中分子であったため、細胞膜透過性を有しておらず、細胞系での活性を評価するには microinjection 法を利用して PROTAC 分子を細胞に導入する必要があった。

第 2 世代 (2004-2013 年) : 第 2 世代型 PROTAC では、VHL タンパク質の E3 活性を利用して標的タンパク質のユビキチン化と分解を誘導している²⁷⁻²⁹。これらの研究で用いている PROTAC 分子は 7 アミノ酸からなる VHL の基質タンパク質上のペプチド断片 ALAPYIP を用い、その C 末端側に細胞膜透過性ペプチド poly-D-arginine を付属することで、PROTAC 分子

の細胞膜透過性を改善することに成功している。Crews らはこの第2世代型 PROTAC 分子を用い、細胞系において AR、ER、FRS2 α 、PI3K などの存在量減少を達成し、さらにこれらが関与するがんへの治療効果も示している。特に PI3K を減少させる PROTAC 分子では、マウスにおけるがんの治療効果も認められている。

第3世代 (2015年) : Crews らは 2012 年に VHL と特異的に相互作用する低分子リガンドを見出し³⁰、これを用いることで PROTAC 分子の低分子量化に成功した³¹。また、低分子量化によって細胞膜透過性が向上したためか、これまで数十 μ M オーダーで現れていた PROTAC 分子の標的タンパク質減少活性は 100 nM オーダーで認められるようになり、活性の向上にもつながった。小分子 PROTAC に関する報告は 2015 年だけでも 4 つの論文³¹⁻³⁴が発表されており、その注目度の高さがうかがえる。

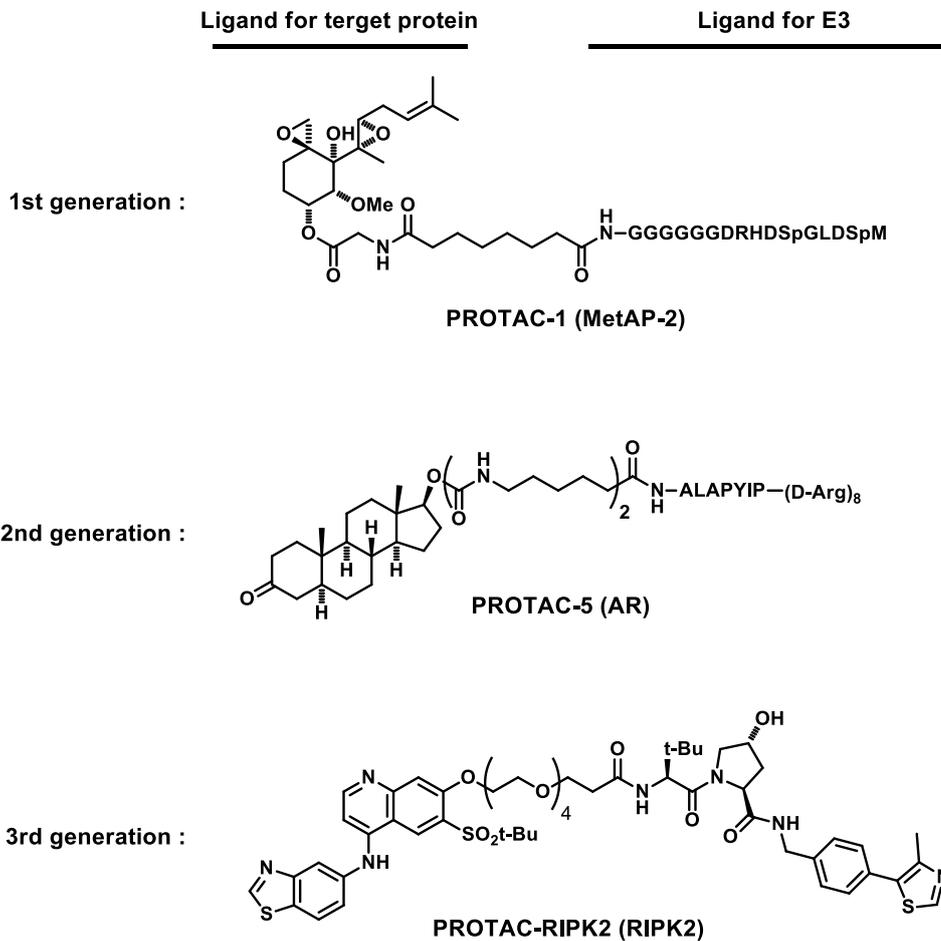


Figure 10. 各世代の代表的な PROTAC 分子の構造。() 内は標的タンパク質の名前。

また、最近ではサリドマイドのターゲットとして知られている CRBN の E3 活性を利用した PROTAC 分子も創製され³⁴⁻³⁶、PROTACs 法に関する研究はより拡大してきている。

1.3.2 疎水性タグ法

ミスフォールディングした不安定なタンパク質では、通常タンパク質内にある疎水性アミノ酸残基がタンパク質表面に露出しており、これを認識したシャペロンタンパク質によってフ

フォールディングが正常に戻される。しかし、シャペロンによる再フォールディングが不可能なほどミスフォールディングしていた場合、タンパク質の品質管理機構、すなわちプロテアソームなどによる分解によってミスフォールディングしたタンパク質は除去される³⁷。疎水性タグ法は、ミスフォールディングタンパク質の品質管理機構を利用して標的タンパク質の存在量を減少させる手法である。具体的には、標的タンパク質のリガンドに疎水性の高いアダマンタンを付属した有機小分子 HyT を用い、標的タンパク質の表面にアダマンタンを露出させ、不安定化と品質管理機構による分解を誘導する (Fig. 11)。

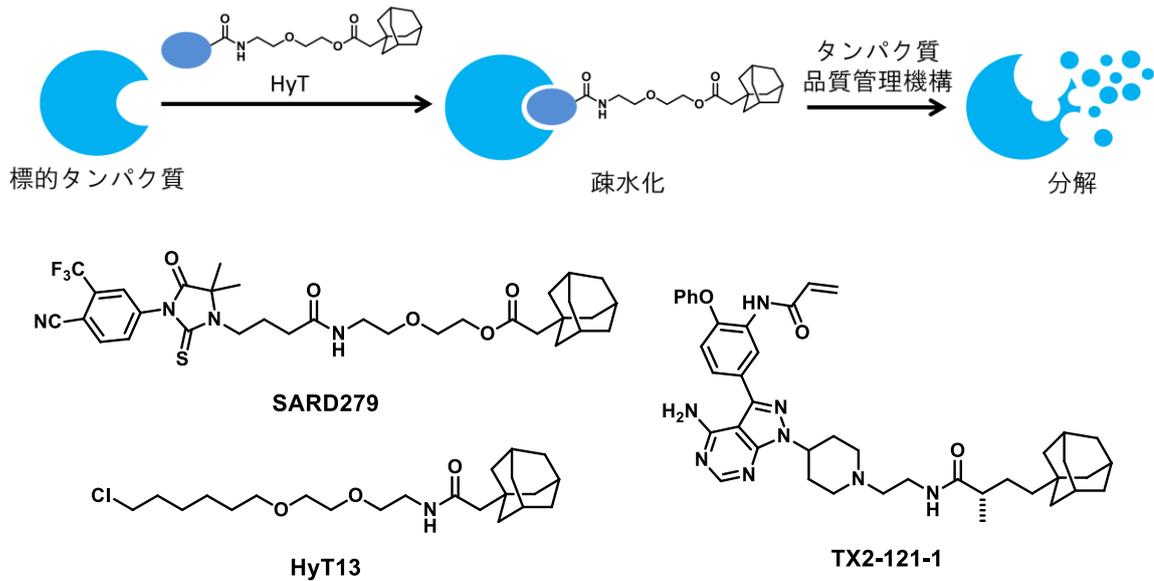


Figure 11. 疎水性タグ法の模式図と代表的な HyT 分子の構造.

Crews らはこの手法によって、細胞系 (SARD279: 標的タンパク質は AR, TX2-121-1: 標的分子は Her3)^{38,39} だけでなくゼブラフィッシュやマウスといった *in vivo* における標的タンパク質の存在量減少 (HyT13: 標的タンパク質は HaloTag) を達成している⁴⁰。また、疎水性タグ法を用いた受容体型チロシンキナーゼ Her3 の存在量減少は、がん治療において非常に重要な意味を持つ研究である³⁹。Her3 は、がん関連タンパク質として有名な EGFR と同じ受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する。がんの分子標的薬としてゲフィチニブ (商品名イレッサ) のような EGFR のキナーゼ活性阻害剤は非常に有力であり、現在もその創製が盛んに行われている。しかし、Her3 は受容体型チロシンキナーゼファミリーに属しながらもキナーゼ活性を持たない特殊なタンパク質であり、上述のキナーゼ阻害剤による Her3 を標的としたがん治療は不可能であった。それに対し、Crews らは TX2-121-1 処理により存在量を減少させることで Her3 によるがんの活性化を阻害しており、がんの治療戦略の拡大につながった。

Crews らのアダマンタン化合物の他に、ER の分解を誘導する SERDs も疎水性タグとして作用する分子に分類できる。SERDs は ER アンタゴニストの一種であり、ER の転写抑制活性と同時に ER の分解を誘導する。その分解誘導機構は上述のアダマンタン化合物と同様で、ER に結合することで ER の不安定化および品質管理機構による分解を誘導する。乳がんの化学療法において ER のアンタゴニスト耐性化が問題になっていることから、ER の分解を誘導する SERDs は有効な乳がん治療薬として注目されている。現在では、ステロイド骨格を有する fluvestrant や非ステロイド骨格の GW7604 など、様々な分子が報告されている (Fig. 12)⁴¹。

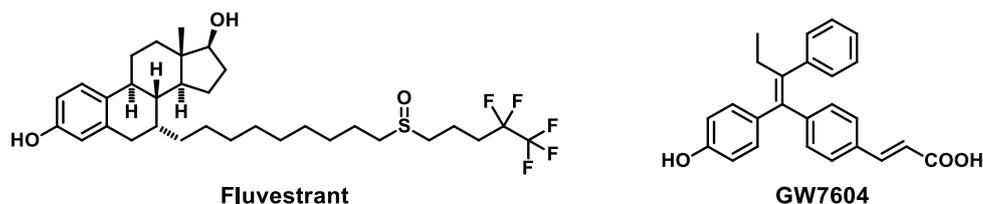


Figure 12. 代表的な SERDs の構造.

疎水性タグ法は、上述の通りタンパク質の存在量減少において成功を取めている一方で、標的タンパク質の安定性に活性が影響されることがわかっている⁴²。そのため、安定性の高いタンパク質を標的とする場合は、PROTACs や次節にて述べるプロテインノックダウン法のような、標的タンパク質に対しユビキチン化を誘導する手法の方が適しているかもしれない。

1.4 プロテインノックダウン法

前節では Crews らが開発したタンパク質の存在量を化学的に制御する手法について述べた。本節では筆者の所属研究室で開発されたもう一つの化学的手法について述べる。

2010年、所属研究室は Crews らに先駆けて有機小分子型 PROTAC 分子として SNIPER およびこれを用いた標的タンパク質分解誘導手法「プロテインノックダウン法」を開発した。プロテインノックダウン法は、IAP の E3 活性を利用して標的タンパク質の存在量を減少させる手法である。本節ではプロテインノックダウン法について、IAP、IAP リガンド、SNIPER の創製に焦点を当てて述べる。

1.4.1 IAP

IAP は、バキュロウイルスの遺伝学的スクリーニングにより発見された、細胞死抑制活性を持つタンパク質である。IAP は BIRC とも呼ばれ、すべての IAP は共通して BIR と呼ばれる zinc finger ドメインを有する。ヒトでは 8 種類の IAP が発見されており、その内の 5 つは E3 活性を担う RING finger ドメインを有している (Fig. 13)⁴³。

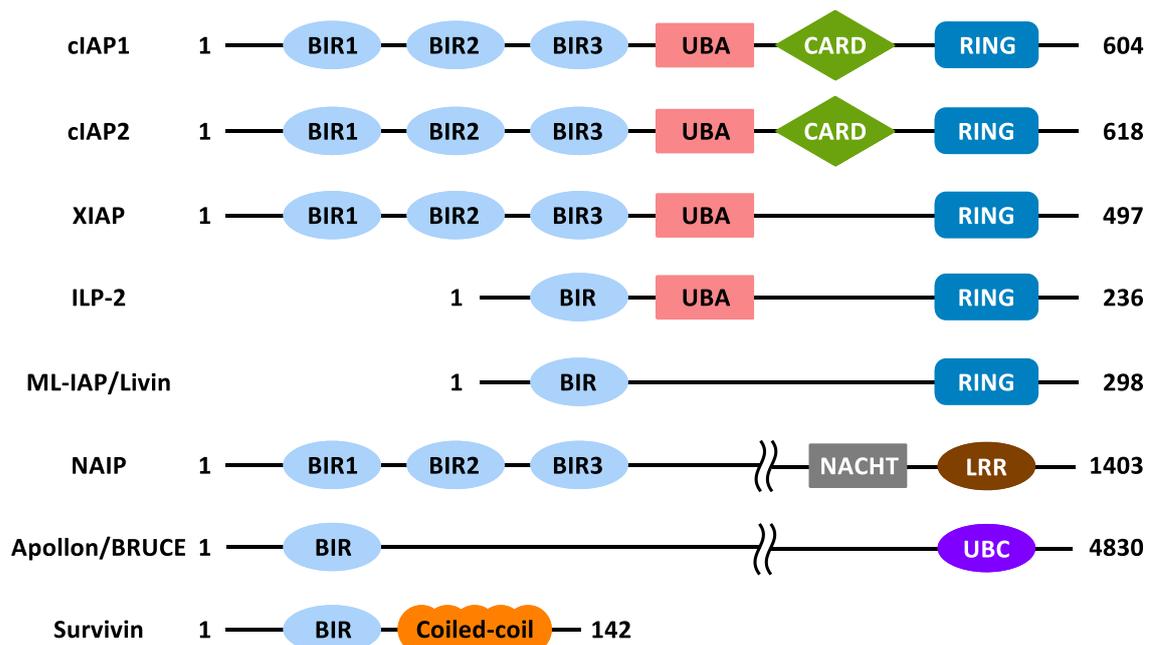


Figure 13. ヒト IAP の構造. ILP-2: IAP-like protein-2; ML-IAP: melanoma IAP; NAIP: neuronal apoptosis inhibitory protein; UBA: ubiquitin associated domain; CARD: caspase recruitment domain; NACHT: domain present in NAIP, MHC class II transactivator(CIITA), 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthase(HET-E) and transition protein 1(TP1); UBC: ubiquitin-conjugating domain ; LRR:leucine-rich repeat domain.

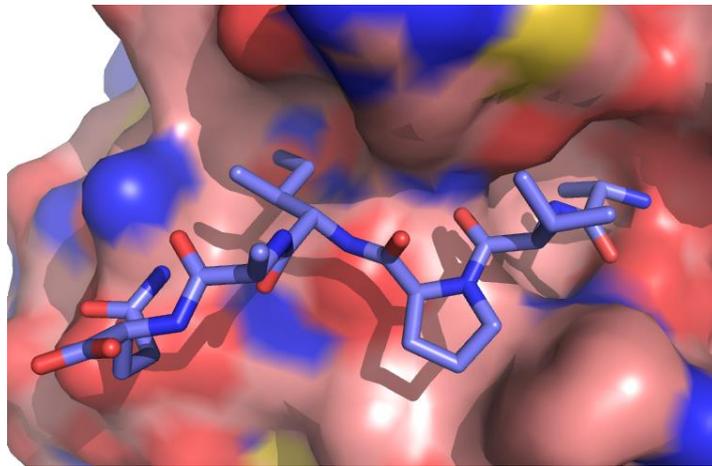
細胞に何らかの異常があった際には、アポトーシスなどのプログラムされた細胞死によって異常な細胞が除去される。IAP は、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼをユビキチン化し、カスパーゼの分解を誘導することで細胞死を抑制する。アポトーシスを誘導する必要

がある場合、Smac/DIABLO と呼ばれるタンパク質が IAP と相互作用し、IAP とカスパーゼの相互作用をアンタゴニスト的に阻害することで IAP のアポトーシス抑制が阻害され、アポトーシスが誘導される⁴⁴。しかし、一部のがん細胞では Smac/DIABLO の発現量低下あるいは IAP の過剰発現によってアポトーシスが強く抑制されている場合があり、がんの治療標的として IAP が注目されている。

1.4.2 低分子 IAP アンタゴニストとベスタチン誘導體

以上の理由から、IAP を治療標的としたがん治療薬として、Smac の IAP 結合モチーフを模した低分子 IAP アンタゴニストの創製が盛んに行われている⁴⁵。Smac タンパク質は N 末端側の APVI 部分で cIAP1、cIAP2、XIAP の BIR3 ドメインと強く結合することが分かっており (Fig. 14a)⁴⁶、低分子 IAP アンタゴニストはいずれも APVI ペプチドから構造展開されたものである (Fig. 14b)。

a



b

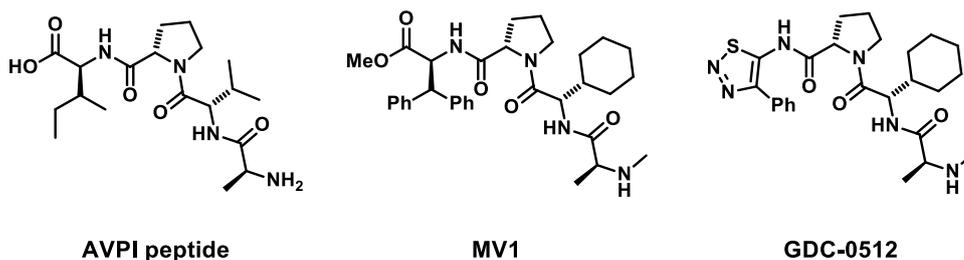


Figure 14. (a) Smac の APVIAQ ペプチドと cIAP1 の BIR3 ドメインの複合体結晶構造 (PDB ID: 3D9U) . APVIAQ の AQ は BIR3 と相互作用していない. (b) Smac の IAP 結合モチーフと低分子 IAP アンタゴニストの構造.

Smac/DIABLO は XIAP、cIAP1 および 2 のアンタゴニストとして作用するだけでなく、IAP の自己 Ub 化とプロテアソームによる分解を誘導することが知られており、低分子 IAP アンタゴニストも Smac/DIABLO と同様にこれらの IAP の分解を誘導する。例えば、強力な IAP アンタゴニストである GDC-0152 は、10 nM の濃度で 15 分処理するだけで A2058 細胞に内在する cIAP1 の存在量をほぼ完全に減少させることができる⁴⁷。

IAP アンタゴニストによる IAP 自己 Ub 化は Fig. 15 に示すメカニズムで起こるとされている。まず、IAP アンタゴニストが BIR3 ドメインに結合すると、BIR ドメインと RING ドメインの分子内相互作用が解除される。続いて、RING ドメインにおいて二量体を形成し、活性化状態となることで自己 Ub 化が誘導される⁴⁵。

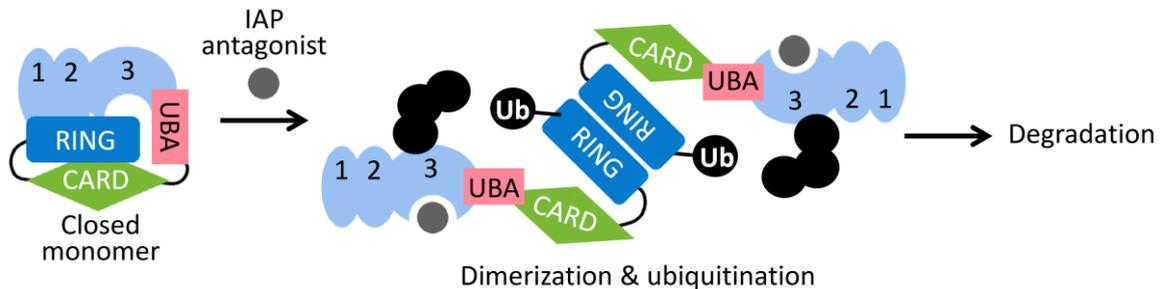


Figure 15. cIAPs の自己 Ub 化機構.

現在、IAP を標的としたがん治療薬の創製研究では、上述の“Smac mimic”な IAP アンタゴニストの創製が圧倒的な割合を占めている。そのような中、国立医薬品食品衛生研究所の内藤らは、Smac mimic ではない IAP 阻害剤として bestatin 誘導体を見出している (Fig. 16)⁴⁸。

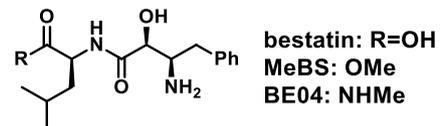


Figure 16. Bestatin とその誘導体の構造.

Bestatin は *Streptomyces olivoreticulithe* から単離された、アミノペプチダーゼ B およびロイシンペプチダーゼに対して阻害活性を有する天然物である⁴⁹。種々の解析の結果、bestatin 誘導体 MeBS は cIAP1 の BIR3 ドメインと選択的に結合することで cIAP1 の自己 Ub 化とプロテアソームによる分解を誘導することが明らかとなった (ただし、自己 Ub 化を誘導する点は IAP アンタゴニストと同様だが、カスパーゼと競合するかは不明)⁵⁰。また、MeBS の類縁体である BE04 は、アミノペプチダーゼ阻害活性が弱く cIAP1 特異的に相互作用することが示唆されており、かつ、cIAP1 の自己ユビキチン化を誘導しないという特徴を有している⁵¹。

1.4.3 SNIPER の創製

以上の知見を基に、所属研究室では bestatin 誘導体や IAP アンタゴニストなどの IAP リガンドと標的タンパク質のリガンドを連結させた低分子化合物「SNIPER」を創製し、これによって標的タンパク質に対するユビキチン化とプロテアソームによる分解を誘導する手法「プロテインノックダウン法」を開発した (Fig. 17)。

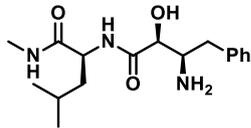
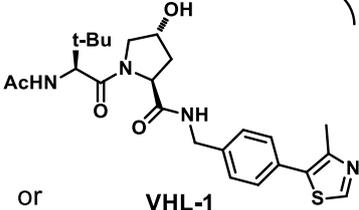
伊藤らはこれまでに種々の SNIPER を創製し、生細胞中で CRABP や RAR、AR、ER の存在量減少を達成した (Fig. 18)^{52,53}。その中で伊藤らは SNIPER の分子設計指針に関わる 2 つの知見を得ている。一つ目は、標的タンパク質のリガンドと IAP のリガンドをつなぐリンカーの長さである。タンパク質の Ub 化は、タンパク質表面にある Lys 残基において起こる。そのため、SNIPER が標的タンパク質と IAP を近づける際に、標的タンパク質の Lys 残基が IAP によって Ub 化しやすい位置に存在する必要がある。これを制御する要素の一つがリンカーの長さであり、長すぎたり短すぎたりすると、SNIPER の活性が弱くなることが分かっている⁵²。

いた SNIPER は bestatin 誘導体を用いたものよりも活性が 10 倍向上する⁵⁶。これについては、MeBS と MV1 の cIAP1 自己 Ub 化活性は MV1 の方が濃度にして 10 倍程度強いことから⁵⁶、MV1 が bestatin 誘導体よりも cIAP1 親和性が高い可能性を考えている。

なお、伊藤らは SNIPER による標的タンパク質分解誘導活性のメカニズム解析も行っており、①cIAP1 の RNAi による SNIPER の活性消失、②プルダウンアッセイによる[GST-BIR3·CRABP SNIPER · CRABP-II]三者複合体の形成確認、③CRABP-II の Ub 化確認、④プロテアソーム阻害剤による SNIPER の活性消失、の 4 つが確認できていることから^{52,57}、SNIPER は作業仮説通りに標的タンパク質に対し cIAP1 による Ub 化とプロテアソームによる分解を誘導することで機能していると考えられる。

IAP の E3 活性を利用するプロテインノックダウン法と、VHL の E3 活性を利用する PROTACs 法は類似のコンセプトで開発されているが、いくつかの点で PROTACs 法における課題が改善されている。これら 2 つの手法の相違点を Table 1 に示す。

Table 1. プロテインノックダウン法と PROTACs 法の相違点。

protein knockdown		PROTACs	
E3	IAPs	VHL	
relation to cancer	oncogene	tumor suppressor	
ligand			
	BE04	peptide from HIF-1	VHL-1
	Molecular Weight: 321.41	Molecular Weight: 1908.27	Molecular Weight: 472.60

分子量を比較すると、先行技術であった第二世代 PROTAC において用いられた VHL リガンドは分子量 1900 程度のペプチド性中分子であり、膜透過性に課題を有していた。またプロテインノックダウン法の後に開発された第三世代 PROTAC と比較しても、プロテインノックダウン法で用いる IAP リガンド BE04 は VHL リガンドよりも分子量が 150 程度低く、より drug-like な標的タンパク質分解誘導剤の創製が期待される。次に、利用している E3 を比較すると、IAP は VHL と同様に全身に発現しているが、その発現量は VHL よりも多く、より効率的な UPS の誘導が期待できる⁵⁸。さらに、上述したように IAP はがんの増悪因子であり、がん細胞において過剰発現していることが知られている。そのため、がん治療を指向したプロテインノックダウンでは、IAP の自己分解を誘導する IAP アンタゴニストを用いることで、IAP とがん関連タンパク質双方の存在量を減少させるという多重薬理的アプローチも可能であり、実際にこれを達成している⁵⁶。

一方で、VHL はがん抑制遺伝子であり、VEGF など一部のがん遺伝子の転写を司る HIF-1 α の Ub 化を行っている⁵⁹。Crews らが見出した VHL リガンドは VHL-HIF-1 α 複合体の形成を阻害する有機小分子であり、PROTACs 法の利用はがん遺伝子の転写が促進されてしまうことも理論上危惧される。加えて、一部のがんでは VHL の不活性変異が認められることから⁶⁰、PROTACs 法のがん治療への利用は制限される可能性がある。

また、所属研究室とは独立して、国立医薬品食品衛生研究所の内藤らや栗原らのグループもプロテインノックダウン法に関する研究に参画し、標的タンパク質リガンドとして ER アンタゴニスト tamoxifen を用いた新たな ER SNIPER⁶¹ や、がん関連タンパク質 TACC3 を標的とした TACC3 SNIPER が創製されている⁶²。

これら様々な SNIPER の中でも、CRABP SNIPER と TACC3 SNIPER についてはがん細胞の増殖や転移を抑制する作用が認められており、プロテインノックダウン法の医薬としての応用も期待される。

1.5 プロテインノックダウン法の問題点と本研究の目的

前節で述べたように、プロテインノックダウン法では様々な標的タンパク質の存在量減少を達成し、医薬応用の可能性も示すことができた。したがって、本手法では標的タンパク質のリガンド、すなわち、内因性リガンドやアゴニスト、アンタゴニスト...などの標的タンパク質に対し特異的に相互作用する有機小分子さえ見出されていれば、幅広いタンパク質に対し、プロテインノックダウン法による存在量減少が期待できる。

しかし、標的タンパク質のリガンドが必要という点は大きな制限になると予想される。なぜなら、機能解析が必要なタンパク質では特異的リガンドが未発見であることが多く、また、そもそも特異的リガンドを持ちえないようなタンパク質もあるためである。したがって、プロテインノックダウン法を実際にタンパク質の機能解析や医薬などに応用しようと試みる場合、標的タンパク質のリガンドを必要としない方法論の確立が求められる。

この問題点を踏まえ、筆者はプロテインノックダウン法における標的タンパク質のリガンドを必要としない方法論の確立を目指し、本研究に着手した。以降では、この研究目的を達成すべく遂行した2つの研究課題とその成果について2章に分けて報告する。

1.6 参考文献

- [1] 石浦 章一, 石川 統, 須藤 和夫, 野田 春彦, 丸山 工作, 山本 啓一 (訳), *分子細胞生物学 第5版*, 東京化学同人, 2005.
(Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Zipursky, S. L.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology, Fifth Edition*, W. H. Freeman & Co., New York, 2003.)
- [2] Sadowski, M.; Suryadinata, R.; Tan, A. R.; Roesley, S. N. A.; Sarcevic, B. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IMBUB Life* **2012**, *64*, 136-142.
- [3] Chen, Z. J.; Sun, L. J. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol. Cell* **2009**, *33*, 275-286.
- [4] Ikeda, F.; Dikic, I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 536-542.
- [5] Silva, J.; Chang, K.; Hannon, G. J.; Rivas, F. V. RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* **2004**, *23*, 8401-8409.
- [6] Hall, B.; Limaye, A.; Kulkarni, A. B. Overview: generation of knockout mice. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2009**, *44*, 12.1-12.17.
- [7] Tan, B. M.; Zammit, N. W.; Yam, A. O.; Slattery, R.; Walters, S. N.; Malle, E.; Grey, S. T. Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing (BIRC) proteins fine-tune TNF-induced nuclear factor κ B and c-jun N-terminal kinase signaling in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* **2013**, *56*, 520-532.
- [8] Frits, K. S.; Galligan, J. J.; Hirschey, M. D.; Verdin, E. Peterson, D. R. Mitochondrial acetylome analysis in a mouse model of alcohol-induced liver injury utilizing SIRT3 knockout mice. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 1633-1643.
- [9] Schweizer, H. P. Applications of the *Saccharomyces cerevisiae* Flp-FRT system in bacterial genetics. *J. Mol. Microbiol. Biotech.* **2003**, *5*, 67-77.
- [10] Deng, C. Conditional knockout mouse models of cancer. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**, doi:10.1101/pdb.top074393
- [11] Wilson, R. C. Doudna, J. A. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 217-239.
- [12] Parsel, S. M.; Grandis, J. R.; Thomas, S. M. Nucleic acid targeting: towards personalized therapy for head and neck cancer. *Oncogene* **2015** in press. doi:10.1038/onc.2015.424
- [13] Boudreau, R. L.; Rodríguez-Lebrón, E.; Davidson, B. L. RNAi medicine for the brain: progresses and challenges. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20* (Review Issue 1), R21-R27.
- [14] Pan, Q.; Bao, L. W.; Teknos, T. N.; Merajver, S. D. Targeted disruption of protein kinase C ϵ reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPase in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9379-9384.

- [15] Singer, O.; Marr, R. A.; Rockenstein, E.; Crews, L.; Coufal, N. G.; Gage, F. H.; Verma, I. M. Masliah, E. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat. Med.* **2005**, *8*, 1343-1349.
- [16] Ku, S. H.; Jo, S. D.; Lee, Y. K.; Kim, K.; Kim, S. H. Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *in press*, doi:10.1016/j.addr.2015.10.015
- [17] Gaj, T.; Gersbach, C. A.; Barbas III, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotech.* **2013**, *31*, 397-405.
- [18] Makarova, K. S.; Wolf, Y. I.; Alkhnbashi, O. S.; Costa, F.; Shah, S. A.; Saunders, S. J.; Barrangou, R.; Brouns, S. J. J.; Charpentier, E.; Haft, D. H.; Horvath, P.; Moineau, S.; Mojica, F. J. M.; Terns, R. M.; Terns, M. P.; White, M. F.; Yakunin, A. F.; Garrett, R. A.; van der Oost, J.; Backofen, R.; Koonin, E. V. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 722-736.
- [19] Dyda, F.; Hickman, A. B.; Mechanism of spacer integration links the CRISPR/Cas system to transposition as a form of mobile DNA. *Mobile DNA* **2015**, *6*, doi:10.1186/s13100-015-0039-3
- [20] Sander, J. D.; Joung, J. K. CRISPR–Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotech.* **2014**, *32*, 347-355.
- [21] Sorek, R.; Lawrence, C. M.; Wiedenheft, B. CRISPR-Mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 237-266.
- [22] Sánchez-Rivera, F. J.; Jacks, T. Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 387-395.
- [23] Lin, G.; Zhang, K.; Li, J. Application of CRISPR/Cas9 Technology to HBV. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 26077-26086.
- [24] Buckley, D. L.; Crews, C. M. Small-molecule control of intracellular protein levels through modulation of the ubiquitin proteasome system. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2312-2330.
- [25] Sakamoto, K. M.; Kim, K. B.; Kumagai, A.; Mercurio, F.; Crews, C. M.; Deshaies, R. J. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2001**, *98*, 8554-8559.
- [26] Sakamoto, K. M.; Kim, K. B.; Verma, R.; Ransick, A.; Stein, B.; C. M.; Crews, Deshaies, R. J. Development of protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 1350-1358.
- [27] Schneekloth, Jr., J. S.; Fonseca, F. N.; Koldobsky, M.; Mandel, A.; Deshaies, R.; Sakamoto, K.; Crews, C. M. Chemical genetic control of protein levels: selective in vivo targeted degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3748-3754.
- [28] Rodriguez-Gonzalez, A.; Cyrus, K.; Salcius, M.; Kim, K.; Crews, C. M.; Deshaies, R. J.; Sakamoto, K. M. Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degradation in breast and prostate cancer. *Oncogene* **2008**, *27*, 7201-7211.
- [29] J. Hines, J. D. Gough, T. W. Corson and C. M. Crews “Posttranslational protein knockdown coupled to receptor tyrosine kinase activation with phosphoPROTACs” *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A* **2013**, *110*, 8942-8947.
- [30] Buckley, D. L.; Molle, I. V.; Gareiss, P. C.; Tae, H. S.; Michel, J.; Noblin, D. J.; Jorgensen, W. L.; Ciulli, A.; Crews, C. M. Targeting the von Hippel–Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1 α interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4465-4468.
- [31] Bondeson, D. P.; Mares, A.; Smith, I. E. D.; Ko, E.; Campos, S.; Miah, A. H.; Mulholland, K. E.; Routly, N.; Buckley, D. L.; Gustafson, J. L.; Zinn, N.; Grandi, P.; Shimamura, S.; Bergamini, G.; Faeltsh-Savitski, M.; Bantscheff, M.; Cox, C.; Gordon, D. A.; Willard, R. R.; Flanagan, J. J.; Casillas, L. N.; Votta, B. J.; den Besten, W.; Famm, K.; Kruidenier, L.; Carter, P. S.; Harling, J. D.; Churcher, I.; Crews, C. M. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 611-617.
- [32] Zengerle, M.; Chan, K.; Ciulli, A. Selective small molecule induced degradation of the BET bromodomain protein BRD4. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1770-1777.
- [33] Buckley, D. L.; Raina, K.; Darricarrere, N.; Hines, J.; Gustafson, J. L.; Smith, I. E.; Miah, A. H.; Harling, J. D.; Crews, C. M. HaloPROTACS: use of small molecule PROTACs to induce degradation of HaloTag fusion proteins. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1831-1837.
- [34] Lai, M.; A. C.; Toure, H.; Hellerschmied, D.; Salami, J.; Jaime-Figueroa, S.; Ko, E.; Hines, H.; Crews, C. M. Modular PROTAC design for the degradation of oncogenic BCR-ABL. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *in press*, doi:10.1002/anie.201507634
- [35] Winter, G. E.; Buckley, D. L.; Paulk, J.; Roberts, J. M.; Souza, A.; Dhe-Paganon, S.; Bradner, J. E. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* **2015**, *348*, 1376-1381.
- [36] Lu, J.; Qian, Y.; Altieri, M.; Dong, H.; Wang, J.; Raina, K.; Hines, J.; Winkler, J. D.; Crew, A. P.; Coleman, K.; Crews, C. M. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 755-763.
- [37] Kubota, H. Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival. *J. Biochem.* **2009**, *146*, 609-616.
- [38] Gustafson, J. L.; Neklesa, T. K.; Cox, C. S.; Roth, A. G.; Buckley, D. L.; Tae, H. S.; Sundberg, T. B.; Stagg, D. B.; Hines, J.; McDonnell, D. P.; Norris, J. D.; Crews, C. M. Small molecule mediated degradation of the androgen receptor through hydrophobic tagging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9659-9662.
- [39] Xie, T.; Lim, S. M.; Westover, K. D.; Dodge, M. E.; Ercan, D.; Ficarro, S. B.; Udayakumar, D.; Gurbani, D.; Tae, H. S.; Riddle, S. M.; Sim, T.; Marto, J. A.; Jänne, P. A.; Crews, C. M.; Gray, N. S. Pharmacological targeting of the pseudokinase Her3. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1006-1012.
- [40] Neklesa, T. K.; Tae, H. S.; Schneekloth, A. R.; Stulberg, M. J.; Corson, T. W.; Sundberg, T. B.; Raina, K.; Holley, S. A.; Crews, C. M. Small-molecule hydrophobic tagging-induced degradation of HaloTag fusion proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538-543.
- [41] McDonnell, D. P.; Wardell, S. E.; Norris, J. D. Oral selective estrogen receptor downregulators (SERDs), a breakthrough endocrine therapy for breast cancer. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*,

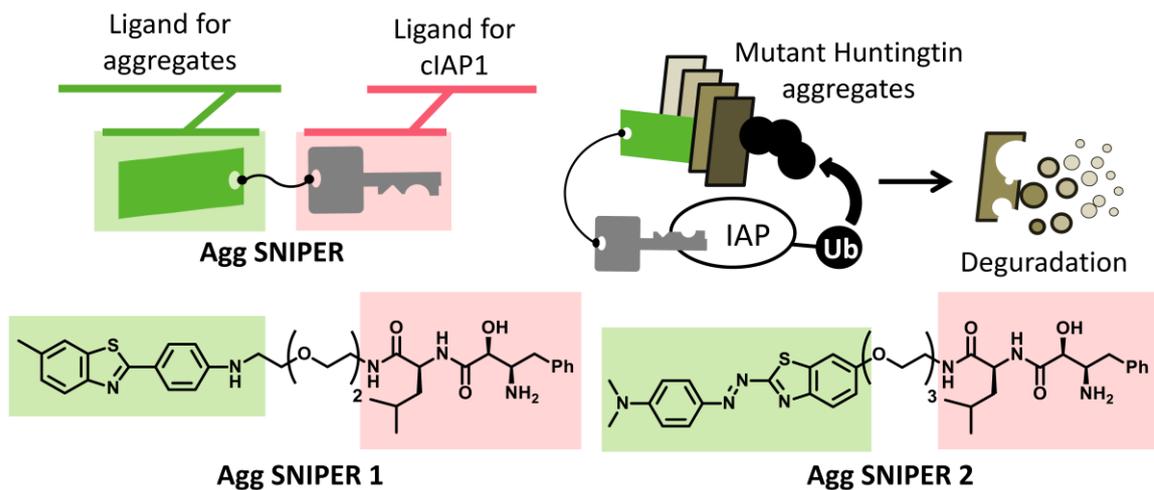
- 4883-4887.
- [42] H. S. Tae, T. B. Sundberg, T. K. Neklesa, D. J. Noblin, J. L. Gustafson, A. G. Roth, K. Raina and C. M. Crews “Identification of hydrophobic tags for the degradation of stabilized proteins” *ChemBioChem*. **2012**, *13*, 538-541.
- [43] R. Feltham, N. Khan and J. Silke “IAPS and ubiquitylation” *IUBMB Life* **2012**, *64*, 411-418.
- [44] G. Martinez-Ruiz, V. Maldonado, G. Ceballos-Cancino, J. P. R. Grajeda and J. Melendez-Zajgla “Role of Smac/DIABLO in cancer progression” *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2008**, *27*, doi:10.1186/1756-9966-27-48
- [45] Fulda, S.; Vucic, D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 109-123.
- [46] Wu, G.; Chai, J.; Suber, T. L.; Wu, J.; Du, C.; Wang, X.; Shi, Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **2000**, *408*, 1008-1012.
- [47] Flygare, J. A.; Beresini, M.; Budha, N.; Chan, H.; Chan, I. T.; Cheeti, S.; Cohen, F.; Deshayes, K.; Doerner, K.; Eckhardt, S. G.; Elliott, L. O.; Feng, B.; Franklin, M. C.; Reisner, S. F.; Gazzard, L.; Halladay, J.; Hymowitz, S. G.; La, H.; LoRusso, P.; Maurer, B.; Murray, L.; Plise, E.; Quan, C.; Stephan, J.; Young, S. G.; Tom, J.; Tsui, V.; Um, J.; Varfolomeev, E.; Vucic, D.; Wagner, A. J.; Wallweber, H. J. A.; Wang, L.; Ware, J.; Wen, Z.; Wong, H.; Wong, J. M.; Wong, M.; Wong, S.; Yu, R.; Zobel, K.; Fairbrother, W. J. Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152). *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4101-4113.
- [48] Sekine, K.; Takubo, K.; Kikuchi, R.; Nishimoto, M.; Kitagawa, M.; Abe, F.; Nishikawa, K.; Tsuruo, T.; Naito, M. Small molecules destabilize cIAP1 by activating auto-ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8961-8968.
- [49] Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Suda, H.; Hamada, M.; Takeuchi, T. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 97-99.
- [50] Sato, S.; Aoyama, H.; Miyachi, H.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Demonstration of direct binding of cIAP1 degradation-promoting bestatin analogs to BIR3 domain: Synthesis and application of fluorescent bestatin ester analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3354-3358.
- [51] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Sato, S.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3229-3241.
- [52] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820-5826.
- [53] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Sato, S.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6768-6778.
- [54] 伊藤 幸裕, プロテインノックダウン法の開発, 博士論文, 東京大学, 2011.

- [55] Varfolomeev, E.; Blankenship, J. W.; Wayson, S. M.; Fedorova, A. V.; Kayagaki, N.; Garg, P.; Zobel, K.; Dynek, J. N.; Elliott, L. O.; Wallweber, H. J. A.; Flygare, J. A.; Fairbrother, W. J.; Deshayes, K.; Dixit, V. M.; Vucic, D. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B activation, and TNF α -dependent apoptosis. *Cell* **2007**, *131*, 669-681.
- [56] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Okuhira, K.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule consisting of ATRA and IAPs antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4453-4457.
- [57] Okuhira, K.; Ohoka, N.; Sai, K.; Nishimaki-Mogami, T.; Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Hashimoto, Y.; Naito, M. Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 1147-1152.
- [58] Web サイト「BioGPS」の組織別 mRNA 発現パターンデータベースに収録されている VHL (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=7428>) および BIRC2 (cIAP1, <http://biogps.org/#goto=genereport&id=329>) の mRNA 発現パターンを参照 (Dataset: GeneAtlas U133A, gcrna).
- [59] Kaelin, Jr., W. G. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 680s-684s.
- [60] Kim, W. Y.; Kaelin, W. G. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 4991-5004.
- [61] Demizu, Y.; Okuhira, K.; Motoi, H.; Ohno, A.; Shoda, T.; Fukuhara, K.; Okuda, H.; Naito, M.; Kurihara, M. Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1793-1796.
- [62] Ohoka, N.; Nagai, K.; Hattori, T.; Okuhira, K.; Shibata, N.; Cho, N.; Naito, M. Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein via the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1513, doi:10.1038/cddis.2014.471

2

タンパク質の凝集を標的とする方法論：

Huntington 病原因タンパク質の プロテインノックダウン



要約： HD は神経変性疾患の一つであり、脳の萎縮に伴う不随意運動や性格変化など様々な症状が認められ、罹患後 10 から 20 年で死に至る。治療法としては対症療法のみであり、根治療法の開発が喫緊の課題となっている。疾患原因は Htt タンパク質の凝集性変異体であり、変異 Htt 凝集体の細胞毒性によって HD が発症すると考えられている。なお、Htt の詳細な機能については不明な点が多く、Htt リガンドも未発見である。

筆者は、変異 Htt のプロテインノックダウンを達成すべく、凝集体リガンドを部分構造に有し、凝集体を標的とする新規 SNIPER「Agg SNIPER」の創製に着手した。設計・合成した Agg SNIPER1 および 2 は、HD 患者由来細胞において内在する変異 Htt の存在量を減少させた。メカニズム解析の結果、Agg SNIPER は変異 Htt 凝集体と cIAP1 の双方に相互作用し、プロテアソーム依存的に mHtt を減少させることが示唆された。

2.1 背景：神経変性疾患と Huntington 病

本研究課題では、標的タンパク質のリガンドを用いずにプロテインノックダウンを達成すべく、標的タンパク質そのものではなく、標的タンパク質の凝集を標的とすることで、標的タンパク質の存在量を減少させる方法論の確立を試みた。標的タンパク質として神経変性疾患 HD の原因タンパク質を設定し、そのプロテインノックダウンを目指した。本節では、研究背景として神経変性疾患、HD、および HD の治療研究について述べる。

2.1.1 神経変性疾患と変性タンパク質の凝集

神経変性疾患は、中枢神経が徐々に脱落し、様々な症状が引き起こされる脳神経疾患の総称である。アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症など数種類の疾患が知られている。中でもアルツハイマー病とパーキンソン病は有病率と世間的な認知度が高く、様々な製薬会社が治療薬の創製研究を行っている。神経変性疾患の理解度は 2000 年頃になってようやく原因遺伝子や発症メカニズムが解明され始めた程度であり、根治療法は存在しない。レボドパによるドパミン補充（パーキンソン病）や、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬によるアセチルコリンの増加（アルツハイマー病）などの対症療法が存在するのみである。

一部の神経変性疾患では共通して、 β シート構造に富む変性タンパク質の凝集体とそれに起因する細胞死が認められ、これが疾患原因の一つであるとされている。凝集は段階的に進行し、高毒性な可溶性オリゴマーを経て、最終的に封入体として組織に沈着する (Fig. 1) ¹。

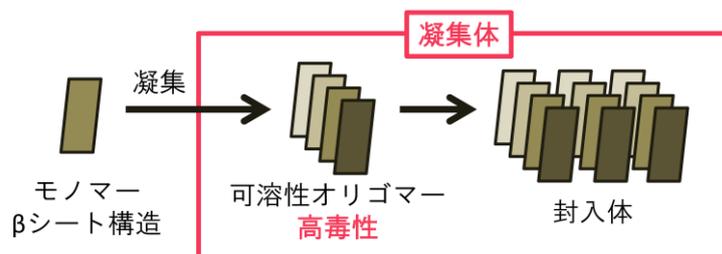


Figure 1. 変性タンパク質の凝集過程.

現在、凝集性を示す変性タンパク質として、アルツハイマー病におけるアミロイド β や tau、パーキンソン病における α -シヌクレイン、そしてポリグルタミン (polyQ) 病と総称される一連の神経変性疾患における polyQ タンパク質などが知られている ²。

2.1.2 ポリグルタミン病とハンチントン病 ^{3,4}

polyQ 病は、ある種のタンパク質が有するグルタミンの繰り返し配列がなんらかの遺伝的要因によって異常に伸長し、凝集性を示すようになった polyQ タンパク質によって発症する疾患の総称である。PolyQ 病として HD (原因 polyQ タンパク質:Htt)、球脊髄性筋萎縮症 (androgen receptor)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (atrophin-1)、そして 6 種の脊髄小脳変性症 (ataxin-1,

2, 3, 7, CACNA1A, TATA-binding protein) が報告されている。

HD は常染色体優性遺伝を示す遺伝性の神経変性疾患である。症状として脳の萎縮に伴う不随意運動、認知障害の他、性格の変化といった精神症状や、運動障害なども見られる。これらの症状は10から20年かけて徐々に進行し、最終的には嚥下障害による窒息などで死に至る。黄色人種100万人に1-7人、白人でその10倍程度が発症する希少疾病である。HD患者では脳内におけるドパミンの産生亢進を原因として不随意運動が認められたため⁵、不随意運動に対する対症療法として、ドパミン量を減少させるVMAT2阻害剤テトラベナジンが処方される⁶。しかし、他の神経変性疾患と同様に根治療法は確立されていない。

原因タンパク質Httは*HTT*遺伝子によってコードされる約350kDaのタンパク質で、全身に発現している。正常Httの詳細な機能は明らかになっていないが、最近になってHttがオートファジーに参与している可能性が示唆され、HttおよびHDとオートファジーとの関連性に関心が高まっている^{7,8}。

*HTT*遺伝子はそのexon1にグルタミンをコードするCAGのリピート領域が存在しており、平均的な*HTT*遺伝子では17程度のリピートを有するが、HD患者では35を超えて異常に伸長したCAGリピートが認められる(36-40のCAGリピートはグレーゾーンであり、生涯発症しない場合もある)。また、CAGの長さは症状の重さや発症年齢と関与しており、長いほど症状が重くなり、発症年齢も早くなる。正常なCAGリピートの*HTT*から翻訳される正常Httではグルタミンリピート部分は α ヘリックス構造をとるが⁹、異常な*HTT*から翻訳された変異Htt(mHtt)は β シート構造をとっており、それに起因して凝集性を示す(Fig. 2)¹⁰。

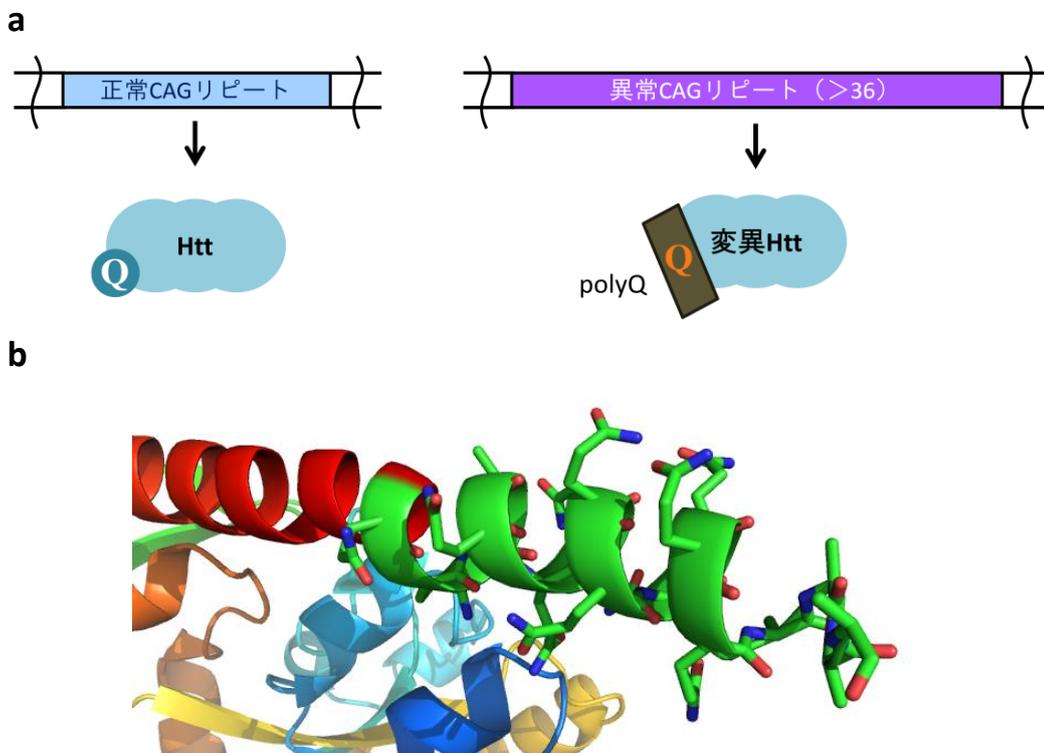


Figure 2. (a) CAG リピートと Htt の変異の関係. (b) 正常 Htt(17Q)の exon1 部分の結晶構造(PDB ID: 3IOW, molecule b). 緑色のヘリックスがグルタミン繰り返し部分.

mHtt が凝集し、蓄積することで HD が発症すると上述したが、通常、mHtt のような変性タンパク質は品質管理機構によって分解されるため、凝集対の蓄積は起こらないはずである。現在、これを説明する仮説として、HD などの変性タンパク質が関与する神経変性疾患では疾患原因となる変性タンパク質が UPS やオートファジーに対して耐性・阻害活性を有しているという説が唱えられている¹¹。例えば DiFiglia らと Davies らはそれぞれ、死後の HD 患者の脳組織やマウスモデルの脳組織において封入体が Ub 抗体陽性であることを報告している^{12, 13}。これは、mHtt 凝集体が Ub 化修飾されるものの、プロテアソームによって分解されないことを示唆している。また、Bence らは不安定化させた GFP を発現する細胞において mHtt を強制発現させると、不安定化 GFP 由来の蛍光強度が増加することを報告し、mHtt 凝集体が UPS を阻害していると考えられる¹⁴。さらに、Zucchelli らは E3 の一種である TRAF6 が mHtt に対し Lys6、Lys27、Lys29 結合性の特殊な Ub 化を行うことで mHtt の凝集を促進すると報告しており、mHtt には UPS とは異なる Ub 修飾が行われている可能性も示唆されている¹⁵。

しかしその一方で、Jana らは E3 活性を有するシャペロン補助タンパク質 CHIP の過剰発現によって mHtt 凝集体がプロテアソーム依存的に減少すると報告しており¹⁶、Jana ら以外にも複数のグループが細胞/*in vivo* を問わずシャペロンタンパク質の過剰発現によって mHtt に対し UPS を誘導できると報告している¹⁷。また、Bhat らは HD モデルマウスを用いた実験により、①mHtt は UPS シグナルである Lys48 結合性 Ub 化だけでなく凝集を促進する Lys63 結合性 Ub 化を受ける、②加齢とともに Lys48 結合性 Ub 化を担う E3 である Ube3a の発現量が減少する、③HD モデルマウスに Ube3a を過剰発現させると脳内 mHtt が減少すると報告している¹⁸。このように、HD における変性タンパク質の品質管理については様々な実験結果が得られており、未だ議論の余地がある状況である。

2.1.3 HD 治療に対する研究

上述したように、HD に対する根治療法が見出されていないため、その開発が喫緊の課題となっている。

医薬化学の分野では特に mHtt の凝集抑制に焦点が当てられており、凝集を抑制する有機分子の創製が盛んに行われている¹⁹。また、変性タンパク質の可溶性オリゴマーが発症原因であり、封入体は発症に関与していないとする説^{20, 21}が報告されてからは、凝集を促進させる有機分子の創製も行われるようになった(次項 Fig. 3)^{22, 23}。しかし、凝集制御剤では結局 mHtt が細胞内に残ったままである点については懸念が残る。そのような懸念のためか、最近では mHtt の存在量を減少させようとする試みが増えている。特に、近年の遺伝子サイレンシング技術の向上もあり、複数の研究グループが RNAi やゲノム編集による mHtt の発現抑制を報告している²⁴。また、理化学研究所の貫名らのグループは、シャペロン結合モチーフと mHtt 凝集体結合モチーフを融合したポリペプチドを発現させることで、mHtt 選択的にシャペロン介在型オートファジーの誘導と mHtt の存在量減少を達成している²⁵。しかしこうした生物学的手法では、実際に医薬応用を検討する際に生物製剤をどのように中枢へ到達させるかが問題となることを留意する必要がある²⁶。

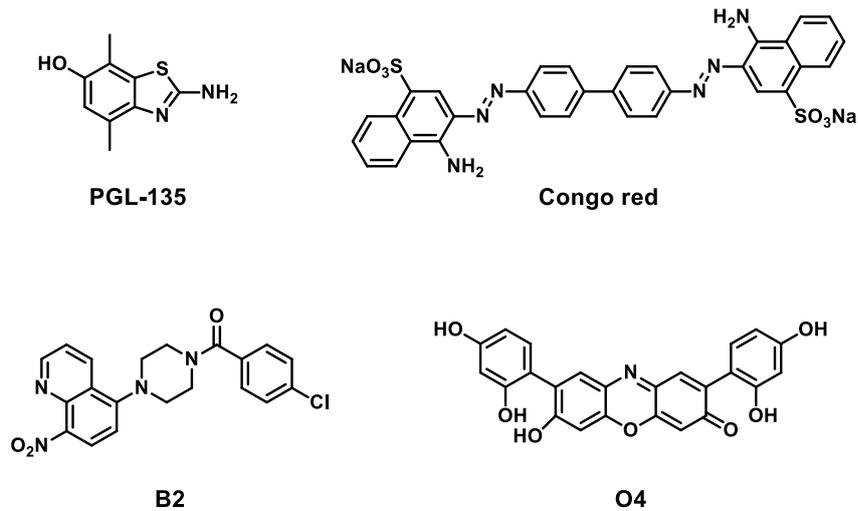


Figure 3. 凝集阻害剤（上段）および凝集促進剤（下段）の構造.

2.2 目的・作業仮説

以上の背景を踏まえ、本節では本研究課題の目的およびこれを達成するための作業仮説について述べる。

2.2.1 目的

HD の根治療法開発は喫緊の課題であり、有機小分子による mHtt の凝集制御や、生物学的手法による mHtt の存在量減少など様々なアプローチによる HD 治療研究が行われている。しかし、いずれも問題点があることは前節で述べた通りである。

これに対し筆者は、プロテインノックダウン法であれば mHtt の存在量を減少させ、かつ、有機小分子 SNIPER の脳移行も期待でき、上述の問題点を解決できると考えた。この考えのもと筆者は、HD 原因タンパク質 mHtt のプロテインノックダウンを目的に設定し、本研究に着手した。

2.2.2 作業仮説

プロテインノックダウン法の原理および SNIPER の分子設計に基づく、mHtt のプロテインノックダウンを達成するには mHtt 特異的リガンドが必要である。しかし、現在 mHtt 特異的リガンドは見出されていない。そこで筆者は、神経変性疾患診断薬に着目した。

神経変性疾患診断薬は、変性タンパク質凝集体に特異的に相互作用するように創製された有機小分子、すなわち凝集体に対する特異的リガンドである。神経変性疾患の診断において、HD のような遺伝子に変異がある疾患であれば遺伝子診断が可能であるが、アルツハイマー病など遺伝子に変異のない疾患の方が患者数は圧倒的に多い。そのような遺伝子診断が適用できない場合は、神経変性疾患診断薬として放射性同位体元素を含む凝集体リガンドを用い、PET/SPECT 法による脳内の変性タンパク質凝集体の可視化および神経変性疾患の診断が行

われる²⁷。こうした背景から、凝集体リガンドは主にアルツハイマー病の原因タンパク質の検出を指向して創製されているが、同じく凝集体を形成する mHtt についても凝集体リガンドによって認識されると考えられる。ここから着想を得て筆者は、凝集体リガンドを用いた、凝集体を標的とする新規 SNIPER「Agg SNIPER」を創製することで、mHtt リガンドを用いずに mHtt のプロテインノックダウンを行うことが可能なのではないかと考えた (Fig. 4)。

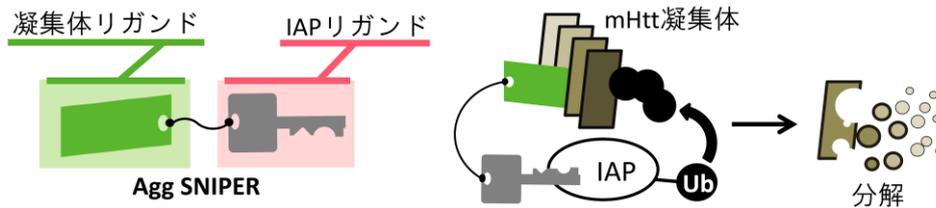


Figure 4. Agg SNIPER による mHtt のプロテインノックダウン。

2.3 分子設計・合成

本節では、前節で述べた作業仮説に基づいて Agg SNIPER の分子設計および合成について述べる。

2.3.1 分子設計

現在、凝集体リガンドとして様々な有機小分子が報告されており、そのうちいくつかがアメリカ食品医薬品局 (FDA) に臨床での使用が認可されている (Fig. 5)^{27, 28}。

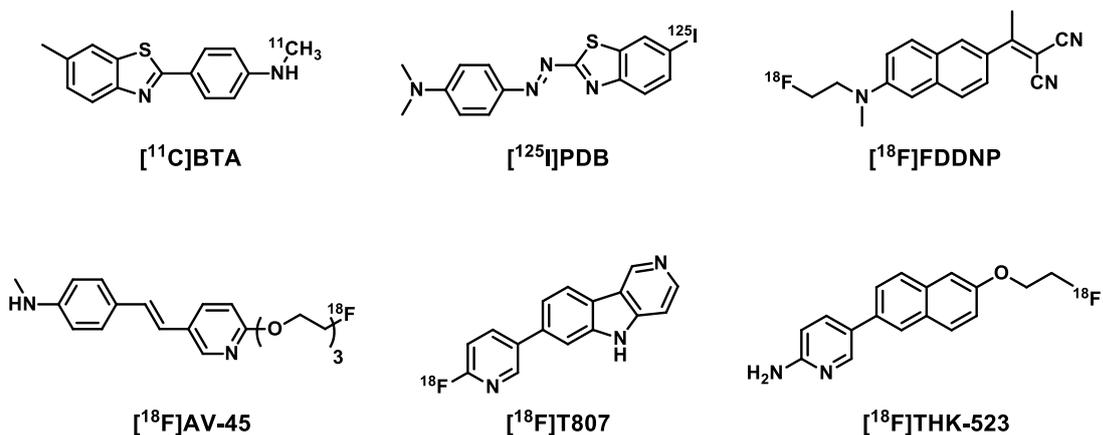


Figure 5. 代表的な神経変性疾患診断薬の構造。[¹⁸F]AV-45 は FDA に認可されており、Amyvid の名で使用されている。

本研究課題ではこれらのうち、BTA および PDB を SNIPER に用いることにした。

BTA を選択した理由は、2001 年に見出されて以降、BTA の神経変性疾患診断薬としての性質が詳細に調べられ、BTA は凝集体親和性や脂溶性 (Fig. 6)、脳移行性 (Table 1) が良好であることが分かっているためである²⁹⁻³¹。また、BTA は凝集体との結合様式が分子動力学シミュレーションによって検討されている³²。現在、凝集体リガンドと凝集体との結合様式は関心を集めているものの、変性タンパク質凝集体の結晶構造が未だ解明されていないこともあり、BTA のように結合様式が検討されている凝集体リガンドは決して多くない。

PDB は、比較的最近見出された凝集体リガンドである。PDB を選択した理由は、凝集体親和性 (Fig. 6) が良好であるのに加え、BTA よりも脳内滞留時間が長く (Table 2)³³、また、PDB のベンゾチアゾール環からエチレングリコールを導入した誘導体 FPPDB においても凝集体親和性が維持されており (Fig. 6)³⁴、SNIPER の分子設計指針が立てやすいためである。

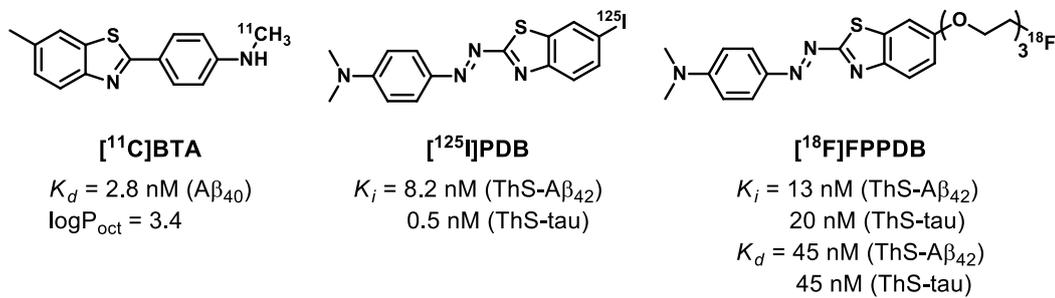


Figure 6. BTA の logP 値および各化合物の凝集体親和性.

Table 1. [¹¹C]BTA を静脈投与したマウスの各部位における放射能. 文献 29 より作製.

	Time post injection (%ID/g)		
	2 min	30 min	60 min
Blood	4.20 ± 0.55	0.90 ± 0.1	0.71 ± 0.11
Whole brain	7.61 ± 0.27	2.76 ± 0.13	1.29 ± 0.21
Cerebellum	8.70 ± 1.02	2.82 ± 0.60	1.32 ± 0.21

Table 2. [¹²⁵I]PDB を静脈投与したマウスの各部位における放射能. 文献 33 より作製.

	Time post injection (%ID/g)		
	2 min	30 min	60 min
Blood	7.12 ± 1.11	2.24 ± 1.88	1.55 ± 1.88
Whole brain	0.94 ± 0.18	2.54 ± 0.40	2.89 ± 0.42

2. タンパク質の凝集を標的とする方法論：

なお、BTA および PDB は、健常者の脳組織は染色せずに神経変性疾患の患者の脳組織を特異的に染色する。BTA および PDB による染色部位は疾患原因タンパク質の抗体による染色部位とよく一致しており^{29,33}、これらの凝集体リガンドは神経変性疾患原因タンパク質の凝集体に特異的に結合できると考えられる。

以上の情報を踏まえ、凝集体リガンド BTA および PDB それぞれに対しユビキチンリガーゼ cIAP1 のリガンド BE04 を連結させた **1** および **2** を Agg SNIPER として設計した (Fig. 7)。

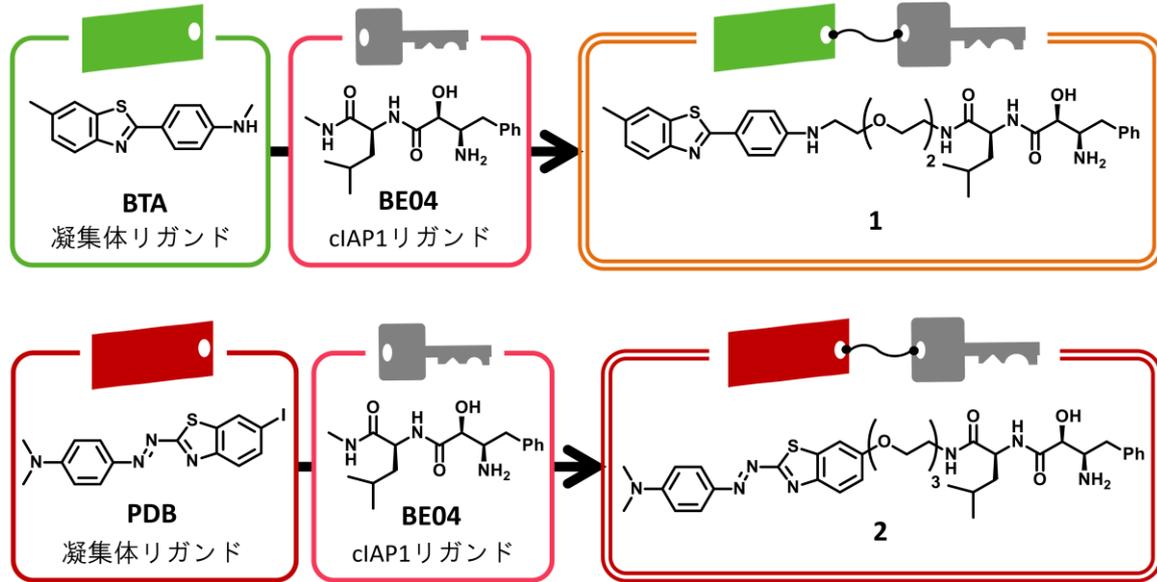
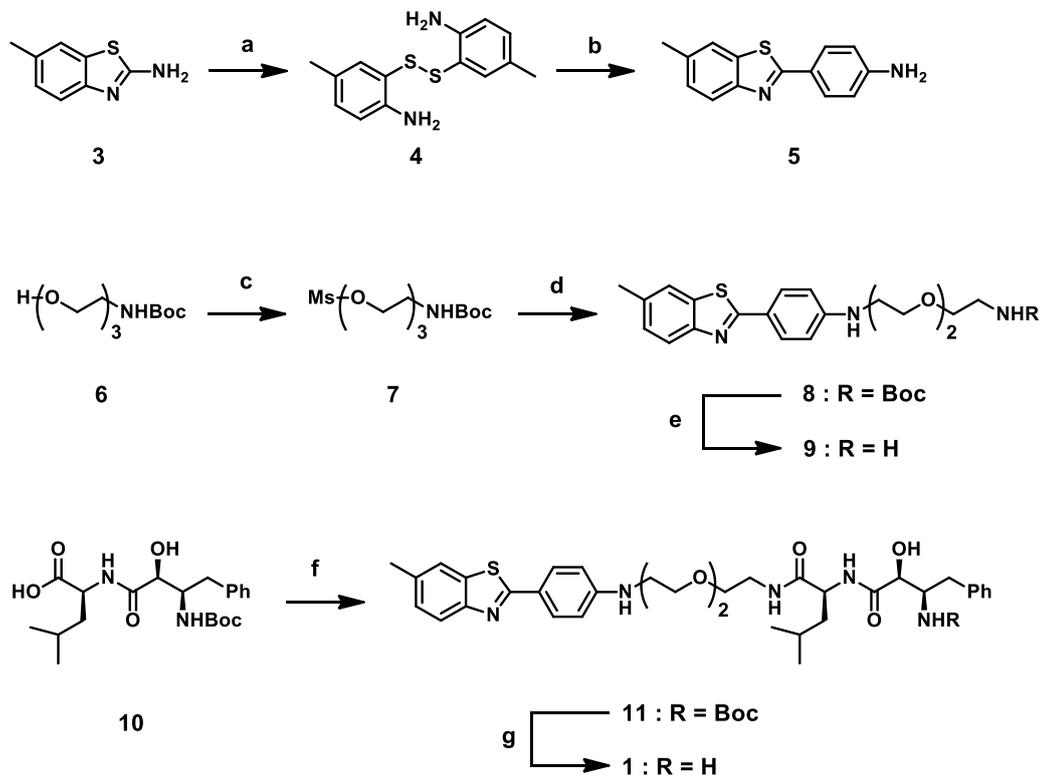


Figure 7. Agg SNIPER 1 および 2 の分子設計.

2.3.2 合成

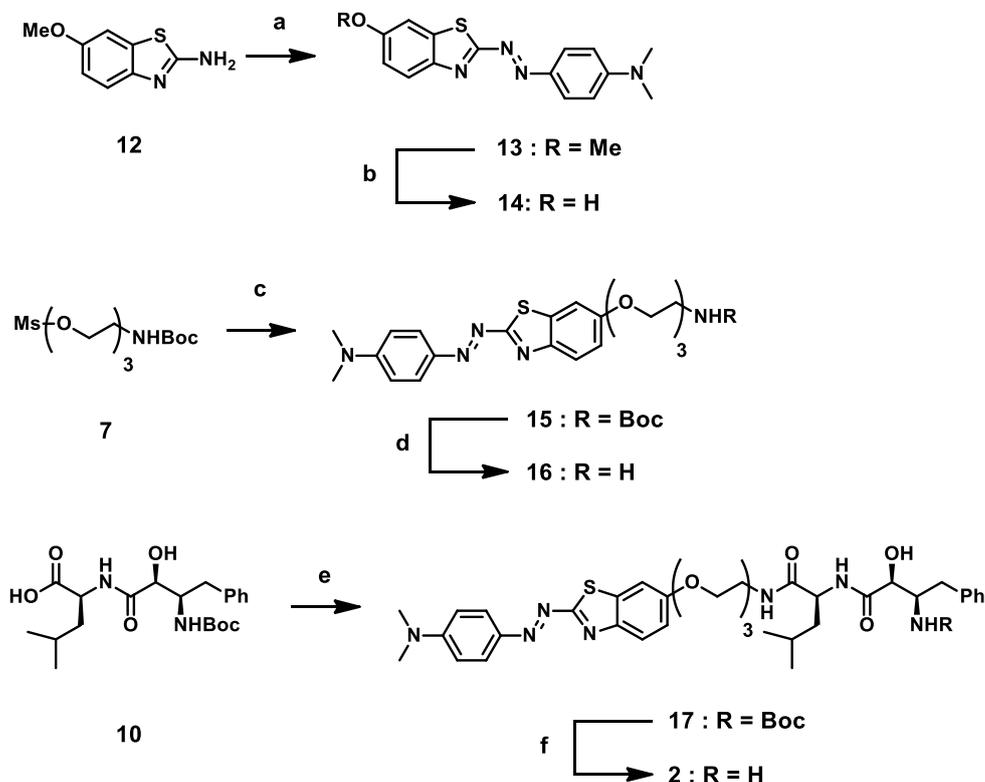
Agg SNIPER **1** を Scheme 1 に示すとおりに合成した。**5** の生成では、**3** の加水分解反応において **4** の還元体であるアミノチオフェノールはジスルフィド結合を形成しやすく、アミノチオフェノールとして得ることはできなかつたため、 PPh_3 によって系中で **4** を還元し³⁵、アミノ安息香酸と縮合することで **5** を得た。アミン **9** の生成では、アニリン **5** と **6**³⁶ を酸化して得られるアルデヒド体との還元的アミノ化を試みたが、**6** の酸化によってアルデヒドを得ることが困難であった。そのため、アルコール **6** を Ms 化して **7** を生成し、**5** との $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応と Boc の脱保護によりアミン **9** を得た。最後に、カルボン酸 **10**³⁷ とアミン **9** を縮合し、Boc を脱保護することで Agg SNIPER **1** を得た。



Scheme 1. Agg SNIPER **1** の合成. (a) 10 M NaOH aq., reflux, 18.5 h, 77%; (b) PPh_3 , 4-aminobenzoic acid, polyphosphoric acid, 220 °C, 4 h, 41%; (c) MsCl, NEt_3 , DCM, r.t., 45 min, 87%; (d) **5**, K_2CO_3 , KI, DMF, 90 °C, 3.5 h, 30%; (e) 4 M HCl/1,4-dioxane, DCM, 0°C, 3 h; (f) **9**, EDC, HOBT, DIEA, DMF, r.t., 24 h, 33% (2 steps); (g) 4 M HCl/1,4-dioxane, DCM, r.t., 3 h, 80%

2. タンパク質の凝集を標的とする方法論：

続いて Agg SNIPER **2** を Scheme 2 の通りに合成した。**14** の合成では、文献情報³⁸ を基にアミン **12** とジメチルアニリンのカップリングによりアゾ化合物 **13** を生成し、 BBr_3 を用いた脱保護によりフェノール **14** を得た。さらに中間体 **7** との $\text{S}_\text{N}2$ 反応および Boc の脱保護によりアミン **16** を得た。最後に、Agg SNIPER **1** の合成と同様にカルボン酸 **10** との縮合および Boc の脱保護により Agg SNIPER **2** を得た。



Scheme 2. Agg SNIPER **2** の合成. (a) NaNO_2 , N,N -dimethylaniline, H_2SO_4 , AcOH , 0°C , 15 min; (b) BBr_3 , DCM , r.t., overnight; (c) **14**, K_2CO_3 , DMF , 100°C , 7 h, 7% (3 steps); (d) 4 M HCl /1,4-dioxane, DCM , r.t., overnight; (e) **16**, EDC , HOBt , DIEA , DMF , r.t., 24 h, 54% (2 steps); (g) 4 M HCl /1,4-dioxane, DCM , r.t., 6 h, 80%.

2.4 活性評価

本節では、設計・合成した Agg SNIPER における、凝集体に対する結合活性と細胞系での mHtt 減少活性について述べる。

2.4.1 凝集体に対する結合活性

設計・合成した Agg SNIPER **1** および **2** は、いずれも凝集体リガンドに対しより大きな構造が付加されており、凝集体親和性を失っている可能性が考えられた。そこで、まずは **1** および **2** が凝集体親和性を維持しているか検証することにした。

凝集体との結合試験では、蛍光色素 ThT (Fig. 8) とグルタミンが 62 個連なったペプチド (Q₆₂ ペプチド)³⁹ の凝集体を用いた実験を行った。ThT は、タンパク質凝集体と相互作用することで $\lambda_{ex}=440$ nm、 $\lambda_{em}=485$ nm の蛍光強度が増加するという特徴的な蛍光特性を有する蛍光性有機小分子である (Fig. 9)。

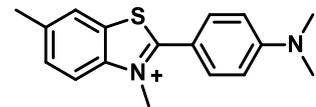


Figure 8. ThT の構造.

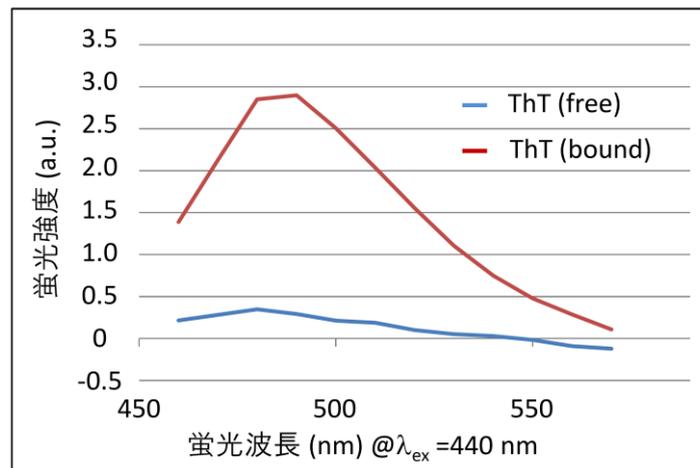


Figure 9. ThT の蛍光強度変化.

したがって、Q₆₂ ペプチド凝集体と ThT を共存させた系に対して Agg SNIPER を添加した際に、もし Agg SNIPER が凝集体と相互作用するならば、ThT と Q₆₂ ペプチドの相互作用を競合阻害し、ThT の蛍光強度の低下が予想される (Fig. 10)。この実験手法は、化合物の凝集体に対する結合試験として一般的に行われている。

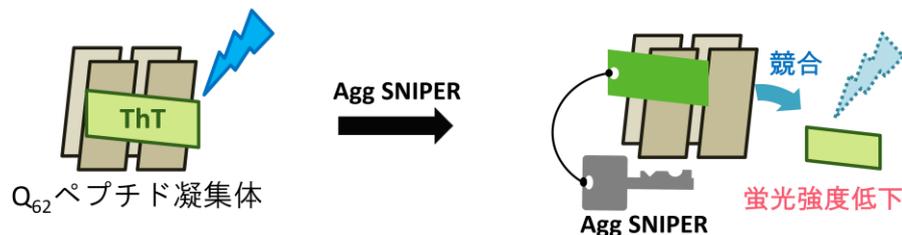


Figure 10. 結合試験の模式図.

また、Q₆₂ ペプチドの精製は GST を融合させて可溶化した状態で行った⁴⁰。GST-Q₆₂ ペプチドは、GenScript 社にて委託合成された Q₆₂ ペプチド遺伝子を pGEX ベクターに導入し、大腸菌に形質転換することで発現させた。これをグルタチオンビーズによって精製した後、thrombin によって GST を Q₆₂ ペプチドから切断することで凝集させ、結合試験を行った。

結合試験の結果、**1** および **2** は濃度依存的に ThT の蛍光強度を低下させた (Fig. 11)。

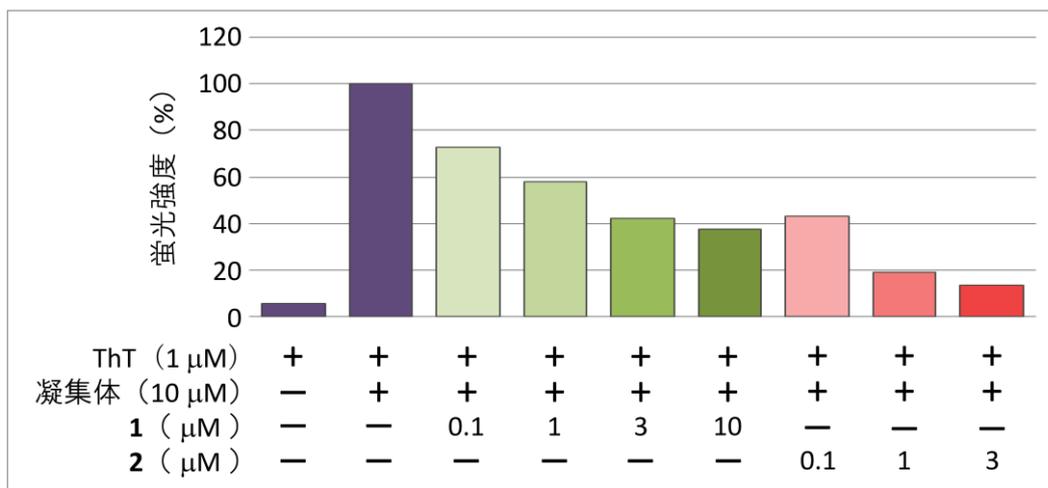


Figure 11. 結合試験.

なお、Agg SNIPER **2** は赤色を呈する化合物であるが、3 μM において 485 nm の波長の光に対する吸光は認められなかった (Fig. 12)。

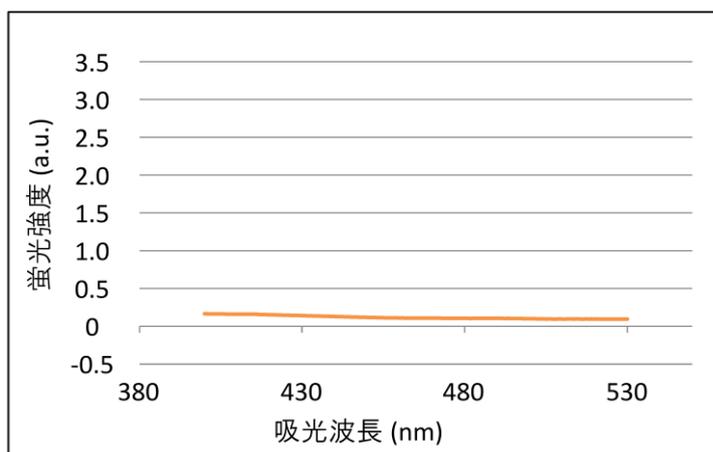


Figure 12. Agg SNIPER **2** の吸光スペクトル.

以上の結果から、Agg SNIPER **1** および **2** は凝集体に対する親和性を維持していることが示唆された。

2.4.2 HD 患者由来細胞における mHtt 存在量減少活性

続いて、Agg SNIPER の mHtt 存在量減少活性を評価した。この実験では、HD 患者由来 fibroblast 細胞 (HD fb) に内在する mHtt を、polyQ 抗体を用いて western blotting により検出し、その存在量の変化を評価した。HD fb に対し Agg SNIPER **1** および **2** を 96 h 処理したところ、mHtt の存在量が減少した (Fig. 13)。

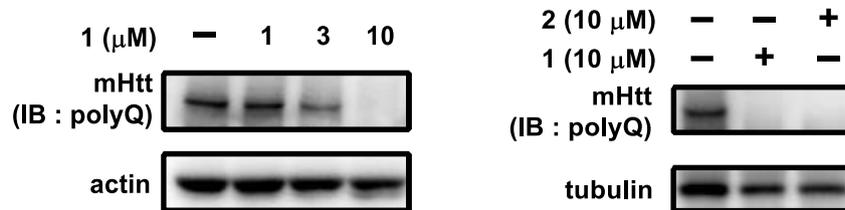


Figure 13. Agg SNIPER の mHtt 存在量減少活性の評価.

以上より、mHtt の存在量を減少させる化合物として **1** および **2** を見出すことができた。

2.5 メカニズム解析

本節では、Agg SNIPER **1** を用いた mHtt 存在量減少活性のメカニズム解析について述べる。

2.5.1 mHtt の減少における SNIPER の連結構造の重要性の検証

1 の mHtt 減少活性が、**1** が含む各リガンド構造に由来する可能性がある。そこでこの実験では、BTA および BE04 の各リガンドを単独あるいは併用処理し、mHtt の減少活性において **1** の連結構造が重要か検証した。

実験の結果、BTA および BE04 には mHtt 減少活性は認められなかった (Fig. 14)。

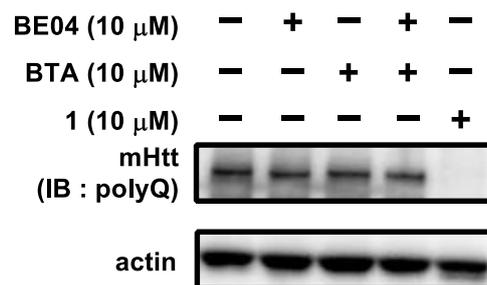


Figure 14. Agg SNIPER **1** と各リガンドの mHtt 存在量減少活性.

この結果から、Agg SNIPER による mHtt 減少活性は Agg SNIPER の部分構造に由来するものではなく、また、活性の発現には連結構造が必要であることが示された。

2.5.2 mHtt の減少におけるプロテアソーム依存性の検証

プロテインノックダウン法では標的タンパク質に対し UPS を誘導する。したがって、Agg SNIPER が作業仮説通りに作用しているならば、mHtt の存在量減少においてプロテアソームが関与しているはずである。そこでこの実験では、プロテアソーム阻害剤によって Agg SNIPER の mHtt 減少活性がキャンセルされるかを検証した。

ただし、プロテアソーム阻害剤を Agg SNIPER と同じく 96 h 処理するのは細胞への大きな負担が危惧される。そのため、この検証ではまず Agg SNIPER 1 の mHtt 減少活性のタイムコースを確認し、活性が表れる直前にプロテアソーム阻害剤を添加することで、その処理時間を最小限に抑えることにした。

タイムコースを確認したところ、Agg SNIPER 1 の処理後 72 h までは mHtt の明らかな残存が確認された (Fig. 15a)。そこでプロテアソーム阻害実験では、Agg SNIPER 1 の処理後 72 h の時点でプロテアソーム阻害剤 MG132 を処理し、そこから 24 h 後 (Agg SNIPER 1 の処理から計 96 h 後) に western blotting を行うことにした。

実験の結果、Agg SNIPER 1 の mHtt 減少活性は MG132 を併用することでキャンセルされた (Fig. 15b)。この結果から、Agg SNIPER 1 による mHtt 存在量の減少には、プロテアソームが関与していることが示唆された。

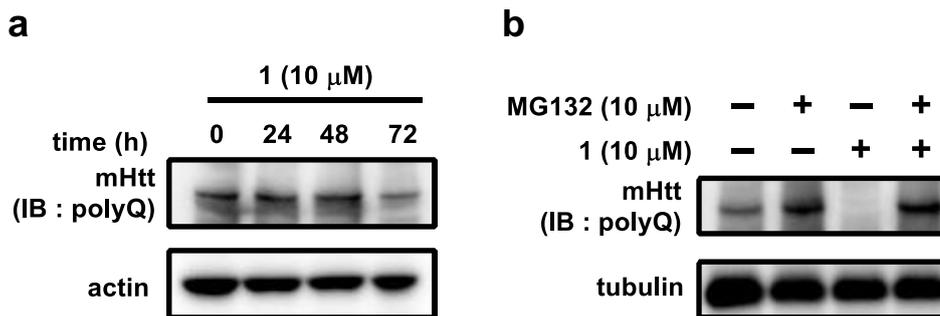


Figure 15. (a) Agg SNIPER 1 の活性のタイムコース確認. (b) プロテアソーム阻害実験.

2.5.3 mHtt の減少における cIAP1 依存性の検証

続いて、mHtt の減少においてユビキチンリガーゼ cIAP1 が関与するか検証した。

Agg SNIPER が作業仮説通りに mHtt 凝集体と cIAP1 の双方に相互作用することで活性を示しているのであれば、cIAP1 と相互作用しない Agg SNIPER 誘導体では mHtt の存在量減少活性が認められないはずである (Fig. 16)。

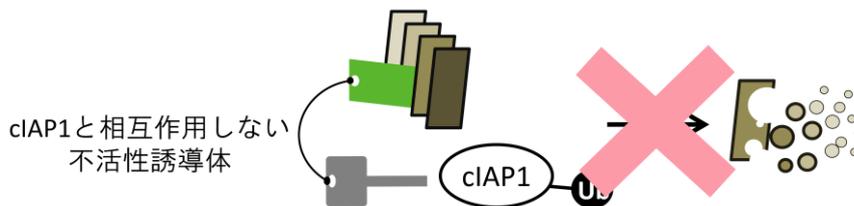


Figure 16. SNIPER は cIAP1 と相互作用しないと標的タンパク質の Ub 化を誘導できない.

そこでこの検証実験では、cIAP1 と相互作用しない誘導体を新たに合成し、その mHtt 減少活性を評価することにした。なお、過去の研究において BE04 と cIAP1 の相互作用には BE04 のヒドロキシ基とアミノ基が重要であることが分かっている⁴¹。実際、これらを水素に置換した誘導体 **18** は cIAP1 と相互作用せず、また、BE04 部分にヒドロキシ基とアミノ基を持たない SNIPER 誘導体 **19** は標的タンパク質分解誘導活性が消失する⁴² (Fig. 17)。

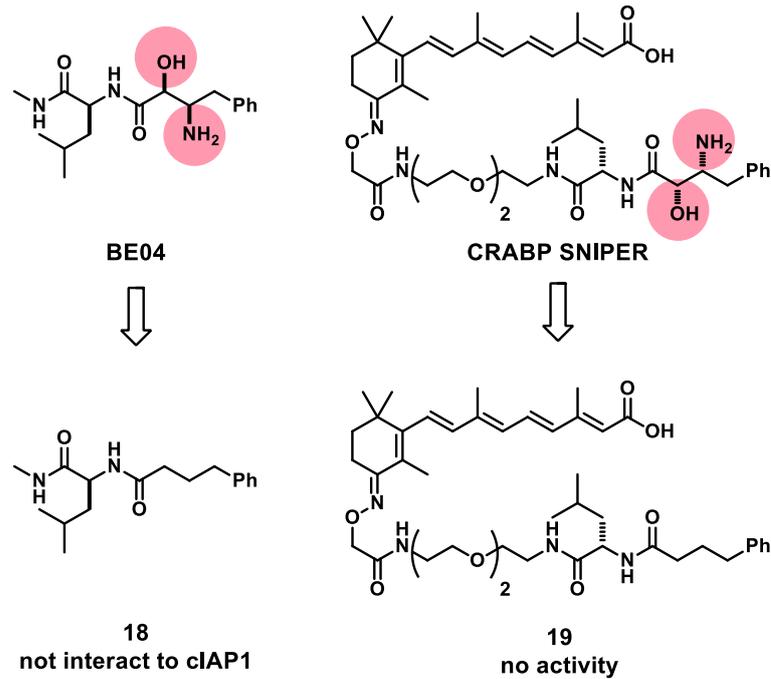
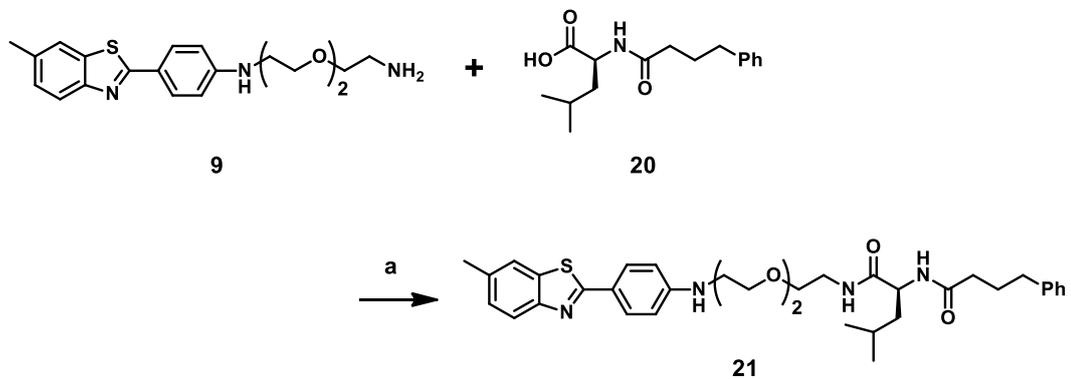


Figure 17. BE04 のヒドロキシ基とアミノ基の重要性.

以上の知見を踏まえ、cIAP1 と相互作用しない Agg SNIPER **1** 誘導体として **21** を設計し、**9** と **20** の縮合により合成した (Scheme 3)。



Scheme 3. **21** の合成. (a) EDC, HOBt, DIEA, DMF, r.t., 24 h, 54%.

HD fb に対し **21** を 96 h 処理したところ、**21** は mHtt の存在量を減少させなかった (Fig. 18)。

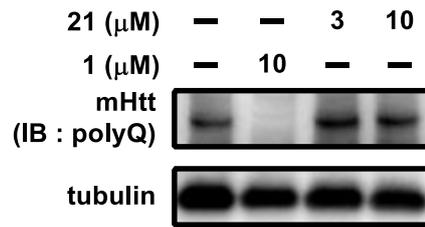


Figure 18. cIAP1 依存性の検証.

この結果から、Agg SNIPER による mHtt の存在量減少には cIAP1 が関与していることが示唆された。

2.6 考察

本研究課題では、mHtt そのものではなく、その凝集体を標的とすることで mHtt のプロテインノックダウンを試み、mHtt の存在量を減少させることに成功した。しかし、Agg SNIPER の作用機序について、作業仮説通りに作用しているか更なる詳細な検討が望まれる。Agg SNIPER では mHtt の凝集体のみが分解誘導され、mHtt のモノマーが残ると予想したが、実際には mHtt の存在量が western blotting でほぼ確認できない量まで減少した。これについては、Hd fb に発現する mHtt の凝集状態を確認する必要がある。また、オフターゲットの分解誘導による mHtt の発現抑制の可能性も考えられることから、mHtt の mRNA 量を定量することも考えている。

2.7 まとめと今後の展望

本研究課題では、HD 原因タンパク質である mHtt のプロテインノックダウンを目指した。特異的リガンドが見出されていない mHtt のプロテインノックダウンに際し、筆者は mHtt そのものではなく、凝集体を標的とする新規 SNIPER「Agg SNIPER」によって mHtt を減少させる作業仮説を考案した。作業仮説に基づいて設計・合成した Agg SNIPER **1** および **2** は、polyQ 凝集体との親和性を示し、HD fb において内在する mHtt の存在量を減少させた。また、**1** を用いたメカニズム解析により、mHtt 減少活性が **1** の各リガンドである BTA および BE04 に由来するものではないことが示され、さらに、Agg SNIPER がプロテアソームおよび cIAP1 依存的に mHtt を減少させていることが示唆された。

以上の結果から、筆者は本研究課題の目的である mHtt の存在量をプロテアソーム依存的に減少させる有機小分子 **1** および **2** を世界で初めて創製することに成功した。同時に、本研究成果によってプロテインノックダウン法における「標的タンパク質そのものではなく、タンパク質の凝集を標的とする方法論」を実証することができた。本研究成果は、未だ対症療法のみである HD の治療において、根治療法の提案につながる発見であると考えている。

現在、cIAP1 のノックダウン実験や、免疫沈降法による[mHtt・Agg SNIPER・cIAP1]三者複合体の形成確認など、Agg SNIPER の更なるメカニズム解析を進めている。加えて、Agg SNIPER **1** および **2** が 10 μ M、96 h 処理において、統計的に有意差はないものの HD fb に対して若干の毒性を示すことから (Fig. 19)、より低濃度で活性を示す強力な Agg SNIPER の創製も目下進行中である。

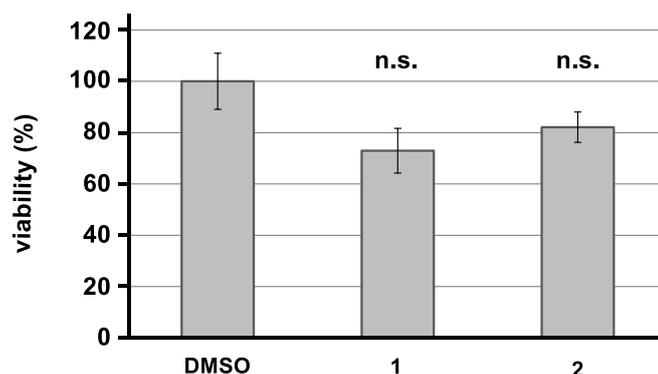


Figure 19. Agg SNIPER **1** および **2** の細胞毒性 (WST-1 assay) .

2.8 参考文献

- [1] Kitamura, A.; Nagata, K.; Kinjo, M. Conformational analysis of misfolded protein aggregation by FRET and live-cell imaging techniques. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 6076-6092.
- [2] Ross, C. A.; Poirier, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **2004**, *10*, S10-S17.
- [3] C. J.; Cortes, La Spada, A. R. Autophagy in polyglutamine disease: imposing order on disorder or contributing to the chaos? *Mol. Cell. Neurosci.* **2015**, *66*, 53-61.
- [4] Bates, G. P.; Dorsey, R.; Gusella, J. F.; Hayden, M. R.; Kay, C.; Leavitt, B. R.; Nance, M.; Ross, C. A.; Scahill, R. I.; Wetzel, R.; Wild, E. J.; Tabrizi, S. J. Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2015**, *1*, article number: 15052, doi:10.1038/nrdp.2015.52
- [5] Chen, J. Y.; Wang, E. A.; Cepeda, C.; Levine, M. S. Dopamine imbalance in Huntington's disease: a mechanism for the lack of behavioral flexibility. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, article 114, <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2013.00114>
- [6] Paleacu, D. Tetrabenazine in the treatment of Huntington's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2007**, *3*, 545-551
- [7] Ochaba, J.; Lukacsovich, T.; Csikos, G.; Zheng, S.; Margulis, J.; Salazar, L.; Mao, K.; Lau, A. L.; Yeung, S. Y.; Humbert, S.; Saudou, F.; Klionsky, D. J.; Finkbeiner, S.; Zeitlin, S. O.; Marsh, J. L.; Housman, D. E.; Thompson, L. M.; Steffan, J. S. Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 16889-16894.
- [8] Martin, D. D. O.; Ladha, S.; Ehrnhoefer, D. E.; Hayden, M. R. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends in Neurosci.* **2015**, *38*, 26-35.
- [9] Kim, M. W.; Chelliah, Y.; Kim, S. W.; Otwinowski, Z.; Bezprozvanny, I. Secondary structure of huntingtin amino-terminal region. *Structure* **2009**, *17*, 1205-1212.
- [10] Nagai, Y.; Inui, T.; Popiel, H. A.; Fujikake, N.; Hasegawa, K.; Urade, Y.; Goto, Y.; Naiki, H.; Toda, T. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 332-340.
- [11] Ciechanover, A.; Kwon, Y. T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* **2015**, *47*, e147, doi:10.1038/emm.2014.117
- [12] DiFiglia, M.; Sapp, E.; Chase, K. O.; Davies, S. W.; Bates, G. P.; Vonsattel, J. P.; Aronin, N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **1997**, *277*, 1990-1993.
- [13] Davies, S. W.; Turmaine, M.; Cozens, B. A.; DiFiglia, M.; Sharp, A. H.; Ross, C. A.; Scherzinger, E.; Wanker, E. E.; Mangiarini, L.; Bates, G. P. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **1997**, *90*, 537-548.

- [14] Bence, N. F.; Sampat, R. M.; Kopito, R. R. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* **2001**, *292*, 1552-1555.
- [15] Zucchelli, S.; Marcuzzi, F.; Codrich, M.; Agostoni, E.; Vilotti, S.; Biagioli, M.; Pinto, M.; Carnemolla, A.; Santoro, C.; Gustincich, S.; Persichetti, F. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) associates with huntingtin protein and promotes its atypical ubiquitination to enhance aggregate formation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 25108-25117.
- [16] Jana, N. R.; Dikshit, P.; Goswami, A.; Kotliarova, S.; Murata, S.; Tanaka, K.; Nukina, N. Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11635-11640.
- [17] Pratt, W. B.; Gestwicki, J. E.; Osawa, Y.; Lieberman, A. P. Targeting Hsp90/Hsp70-based protein quality control for treatment of adult onset neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2015**, *55*, 353-371.
- [18] Bhat, K. P.; Yan, S.; Wang, C.; Li, S.; Li, X. Differential ubiquitination and degradation of huntingtin fragments modulated by ubiquitin-protein ligase E3A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 5706-5711.
- [19] Liu, T.; Bitan, G. Modulating self-assembly of amyloidogenic proteins as a therapeutic approach for neurodegenerative diseases: strategies and mechanisms. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 359-374.
- [20] Takahashi, T.; Kikuchi, S.; Katad, S.; Nagai, Y.; Nishizawa, M.; Onodera, O. Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 345-356.
- [21] Arrasate, M.; Mitra, S.; Schweitzer, E. S.; Segal, M. R.; Finkbeiner, S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* **2004**, *431*, 805-810.
- [22] Bodner, R. A.; Outeiro, T. F.; Altmann, S.; Maxwell, M. M.; Cho, S. H.; Hyman, B. T.; McLean, P. J.; Young, A. B.; Housman, D. E.; Kazantsev, A. G. Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 4246-4251.
- [23] Bieschke, J.; Herbst, M.; Wiggenda, T.; Friedrich, R. P.; Boeddrich, A.; Schiele, F.; Kleckers, D.; del Amo, J. M. L.; Grüning, B. A.; Wang, Q.; Schmidt, M. R.; Lurz, R.; Anwyll, R.; Schnoegl, S.; Fändrich, M.; Frank, R. F.; Reif, B.; Günther, S.; Walsh, D. M.; Wanker, E. E. Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 93-101.
- [24] Aronin, N.; DiFiglia, M. Huntingtin-lowering strategies in Huntington's disease: antisense oligonucleotides, small RNAs, and gene editing. *Mov. Disord.* **2014**, *29*, 1455-1461.
- [25] Bauer, P. O.; Goswami, A.; Wong, H. K.; Okuno, M.; Kurosawa, M.; Yamada, M.; Miyazaki, H.; Matsumoto, G.; Kino, Y.; Nagai, Y.; Nukina, N. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat. Biotech.* **2010**, *28*, 256-263.
- [26] Godinho, B. M. D. C.; Malhotra, M.; O'Driscoll, C. M.; Cryan, J. F. Delivering a

- disease-modifying treatment for Huntington's disease. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 50-64.
- [27] Zhu, L.; Ploessl, K.; Kung, H. F. PET/SPECT imaging agents for neurodegenerative diseases. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6683-6691.
- [28] Okamura, N.; Harada, R.; Furumoto, S.; Arai, H.; Yanai, K.; Kudo, Y. Tau PET Imaging in Alzheimer's Disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2014**, *14*, 500. doi: 10.1007/s11910-014-0500-6
- [29] Klunka, W. E.; Wang, Y.; Huang, G.; Debnath, M. L.; Holt, D. P.; Mathis, C. A. Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain. *Life Sci.* **2001**, *69*, 1471-1484.
- [30] Mathis, C. A.; Bacskai, B. J.; Kajdasz, S. T.; McLellan, M. E.; Frosch, M. P.; Hyman, B. T.; Holt, D. P.; Wang, Y.; Huang, G.; Debnath, M. L.; Klunk, W. E. A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 295-298.
- [31] Klunk, W. E.; Wang, Y.; Huang, G.; Debnath, M. L.; Holt, D. P.; Shao, L.; Hamilton, R. L.; Ikonovic, M. D.; DeKosky, S. T.; Mathis, C. A. The binding of 2-(4'-Methylaminophenyl)benzothiazole to postmortem brain homogenates is dominated by the amyloid component. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 2086-2092.
- [32] Wu, C.; Wang, Z.; Lei, H.; Duan, Y.; Bowers, M. T.; Shea, J. The binding of thioflavin T and its neutral analog BTA-1 to protofibrils of the Alzheimer's disease A β 16-22 peptide probed by molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 718-729.
- [33] Matsumura, K.; Ono, M.; Hayashi, S.; Kimura, H.; Okamoto, Y.; Ihara, M.; Takahashi, R.; Mori, H.; Saji, H. Phenyl diazenyl benzothiazole derivatives as probes for in vivo imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Med. Chem. Commun.* **2011**, *2*, 596-600.
- [34] Matsumura, K.; Ono, M.; Kimura, H.; Ueda, M.; Nakamoto, Y.; Togashi, K.; Okamoto, Y.; Ihara, M.; Takahashi, R.; Saji, H. ¹⁸F-labeled phenyl diazenyl benzothiazole for in vivo imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 58-62.
- [35] Endo, T.; Ikenaga, S.; Mukaiyama, T. A convenient method for the preparation of thioesters. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1970**, *43*, 2632-2633.
- [36] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820-5826.
- [37] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Sato, S.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6768-6778.
- [38] Zadrožna, I.; Kaczorowska, E. Relationship between structure and nonlinear optical properties of new bisazo chromophores. Theoretical and experimental study. *Struct. Chem.* **2008**, *19*, 131-135.
- [39] Onodera, O.; Rosea, A. D.; Tsuji, S.; Vancea, J. M.; Strittmatter, W. J.; Burke, J. R. "Toxicity

- of expanded polyglutamine-domain proteins in *Escherichia coli*" *FEBS Lett.* **1996**, *399*, 135-139.
- [40] Scherzinger, E.; Sittler, A.; Schweiger, K.; Heiser, V.; Lurz, R.; Hasenbank, R.; Bates, G. P.; Lehrach, H.; Wanker, E. E. Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 4604-4609.
- [41] Sekine, K.; Takubo, K.; Kikuchi, R.; Nishimoto, M.; Kitagawa, M.; Abe, F.; Nishikawa, K.; Tsuruo, T.; Naito, M. Small molecules destabilize cIAP1 by activating auto-ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8961-8968.
- [42] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Sato, S.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3229-3241.

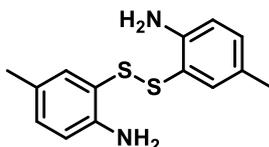
2.9 実験項

2.9.1 Organic synthesis

General.

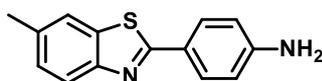
^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-ECA500 (500 MHz) spectrometer in the indicated solvent. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million relative to the internal standard tetramethylsilane (^1H NMR) or the centerline of the triplet at 77.0 ppm of CDCl_3 (^{13}C NMR). ESI and FAB mass spectra were recorded on a BRUKER micrOTOF II mass spectrometer and JEOL JMA-HX110 mass spectrometer, respectively. Chemical reagents and solvents were purchased from Aldrich Inc., Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd., Wako Pure Chemical Industries,Ltd., and Kanto chemical co.,inc. and used without purification. Routine TLC was performed on silica gel 60 F254 plates (Merck, Germany). Flash column chromatography was performed on Silica gel 60 (spherical, particle size 40–100 μm ; Kanto Chemical, Japan)

Bis(4-methylaminophenyl)disulfane (4).



A mixture of 2-amino-6-methylbenzothiazole (**3**, 5.00 g, 30.5 mmol) in 10 N NaOH (40 mL) was stirred under reflux for 18.5 h. The reaction mixture was poured into ice-water, acidified with concentrated HCl to pH 1, neutralized with 2 N NaOH, and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, and dried over MgSO_4 . Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification by flash column chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 1:2) gave 3.23 g (77%) of **4** as a yellow solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.97 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.95 (s, 2H), 6.64 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 2.13 (s, 6H). MS (FAB) m/z 277 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

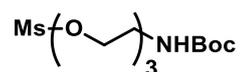
2-(4-Aminophenyl)-6-methylbenzothiazole (5).



A mixture of **4** (2.007 g, 7.261 mmol), PPh_3 (1.92 g, 7.34 mmol), and 4-aminobenzoic acid (1.99 g, 14.5 mmol) in polyphosphoric acid (14.5 mL) was stirred at 220 $^\circ\text{C}$ for 4 h. After cooling, the reaction mixture was poured into 10% aqueous Na_2CO_3 , stirred at 0 $^\circ\text{C}$ until gas evolution ceased, and

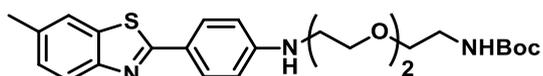
extracted with AcOEt. The organic layer was washed with brine, and dried over MgSO_4 . Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification by flash column chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 2:1) gave 1.45 g (41%) of **5** as a yellow solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.25 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 2.48 (s, 3H). MS (FAB) m/z 241 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

2-(2-(2-*tert*-Butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy)ethyl methansulfonate (**7**).

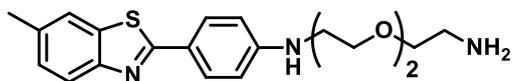


To a mixture of **6** (51.0 mg, 0.205 mmol) and NEt_3 (51.6 mg, 0.510 mmol) in DCM (5 mL) was added methanesulfonyl chloride (50.0 mg, 0.440 mmol) at 0 °C and stirred at room temperature for 45 min. The reaction mixture was washed with H_2O and the organic layer was dried over MgSO_4 and filtrated. Evaporation of the solvent *in vacuo* and purification by flash column chromatography (AcOEt) gave 50.4 mg (87%) of **7** as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4.39 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H), 3.77 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H), 3.62 (m, 4H), 3.53 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.32 (br, 2H), 3.08 (s, 3H), 1.45 (s, 9H). MS (FAB) m/z 328 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

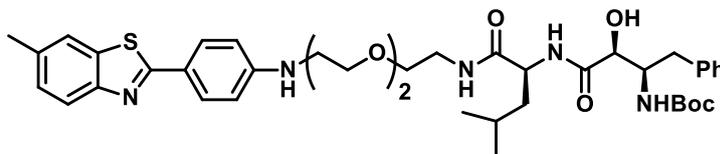
2-(4-(2-(2-(2-*tert*-Butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy)ethyl)aminophenyl)-6-methylbenzothiazole (**8**).



A mixture of **7** (34.5 mg, 0.105 mmol), **5** (20.4 mg, 84.9 μmol), K_2CO_3 (7.4 mg, 53.0 μmol), and KI (27.4 mg, 0.165 mmol) in DMF (0.2 mL) was stirred at 90 °C for 3.5 h. The reaction mixture was poured into aqueous NaCl (brine/ H_2O = 1:1), extracted with CHCl_3 , and dried over MgSO_4 . Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification by flash column chromatography (*n*-hexane/AcOEt = 2:1 to 1:1) gave 11.9 mg (30%) of **8** as colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.24 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.65 (m, 4H), 3.56 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.39 (br, 2H), 3.34 (br, 2H), 2.47 (s, 3H), 1.45 (s, 9H). MS (FAB) m/z 472 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

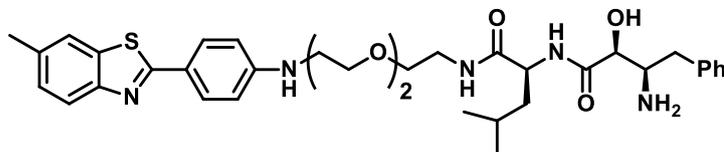
2-(4-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)aminophenyl)-6-methylbenzothiazole (9).

To a solution of **8** (11.9 mg, 25.2 μmol) in DCM (0.8 mL) was added 4 M HCl/1,4-dioxane (0.8 mL) at 0 °C and stirred for 3 h. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* to give crude **9** (dihydrochloride salt, 12.1 mg) as a yellow solid. The product was used in next step without further purification. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.24 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.67 – 3.65 (m, 4H), 3.53 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.38 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.89 (br, 2H), 2.47 (s, 3H). MS (FAB) m/z 372 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

2-(4-(2-(2-(2-((S)-2-((2S,3R)-3-tert-Butoxycarbonylamino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-4-methylpentanamide)ethoxy)ethoxy)ethyl)aminophenyl)-6-methylbenzothiazole (11).

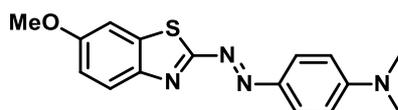
To a mixture of **9** (12.1 mg), **10** (10.4 mg, 25.5 μmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (8.1 mg, 60 μmol) and DIEA (20 μL) in DMF (0.5 mL) was added EDC (19.8 mg, 103 μmol) at 0 °C and stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was treated with saturated aqueous NaHCO_3 , extracted with CHCl_3 , and dried over MgSO_4 . Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification by flash column chromatography (CHCl_3 to $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 20:1$) gave 6.3 mg (33%, 2 steps) of **11** as a yellow amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.76 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.25 – 7.18 (m, 1H), 6.68 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.42 (dd, $J = 9.8, 5.5$ Hz, 1H), 4.11 (dd, $J = 7.9, 4.0$ Hz, 1H), 3.65 – 3.48 (m, 8H), 3.32 (br, 2H), 3.27 (br, 2H), 2.80 (dd, $J = 13.1, 7.6$ Hz, 1H), 2.42 (s, 3H), 1.56 – 1.53 (m, 3H), 1.28 (s, 9H), 1.14 (s, 2H), 0.87 (dd, $J = 17.1, 6.1$ Hz, 6H). MS (FAB) m/z 762 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

2-(4-(2-(2-(2-((S)-2-((2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-4-methylpentanamide)ethoxy)ethoxy)ethyl)aminophenyl)-6-methylbenzothiazole (1).



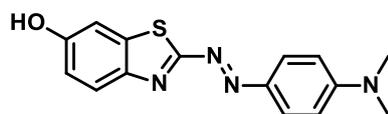
4 M HCl/1,4-Dioxane (0.8 mL) was added to a solution of **11** (6.3 mg, 8.3 μmol) in DCM (0.2 mL) at 0 °C and stirred at room temperature for 3 h. Evaporation of the solvent *in vacuo* and purification by preparative thin-layer chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ aq. = 10:1:0.1) gave 5.4 mg (80%) of **1** as a yellow amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.81 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.76 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.27 – 7.20 (m, 6H), 6.73 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 4.42 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.94 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 3.68 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.63 – 3.61 (m, 4H), 3.53 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.36 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 3.31 (br, 2H), 2.90 (dd, J = 13.4, 6.7 Hz, 1H), 2.67 (dd, J = 13.4, 7.9 Hz, 1H), 2.47 (s, 3H), 1.67 – 1.61 (m, 3H), 1.18 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 0.93 (dd, J = 9.2, 5.5 Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 173.89, 173.14, 168.75, 151.62, 151.53, 138.39, 134.53, 133.91, 128.86, 128.37, 128.11, 127.31, 126.02, 120.99, 120.83, 120.63, 111.88, 72.07, 69.96, 69.79, 69.13, 68.99, 55.08, 51.59, 42.43, 40.57, 39.10, 38.89, 24.51, 21.83, 20.64, 19.90. MS (FAB) m/z 662 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}^+$, 662.3371; found 662.3374.

2-((4-Dimethylaminophenyl)diazenyl)-6-methoxybenzothiazole (13).



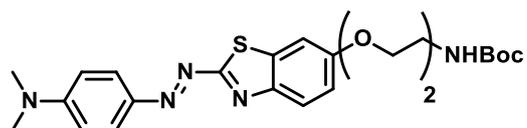
To a mixture of **12** (502 mg, 2.79 mmol), AcOH (9.5 mL), and conc. H_2SO_4 aq. (5.5 mL) was added NaNO_2 aq. (240.5 mg, 3.49 mmol in 1.5 mL of H_2O) dropwise for 15 min at 0 °C and stirred for 10 min at 0 °C. Then, to the reaction mixture was added a mixture of *N,N*-dimethylaniline (351 μL , 2.77 mmol) and 1.4 *N* HCl aq. (2.5 mL) dropwise for 15 min at 0 °C and stirred for 15 min at 0 °C. The reaction mixture was neutralized and the precipitate was filtrated and washed with hexane. The product was used in next step without further purification. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.97 (t, J = 9.0 Hz, 3H), 7.29 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.06 (dd, J = 3.0 and 8.5 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.15 (s, 6H). MS (FAB) m/z 313 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

2-((4-Dimethylaminophenyl)diazenyl)-6-hydroxybenzothiazole (14).



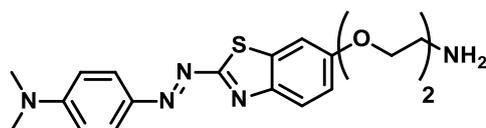
To a solution of **13** (391 mg, 1.25 mmol) in DCM (12.0 mL) was added 1 M BBr₃ in DCM (3.8 mL) and stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was poured into saturated aqueous NaHCO₃ and the precipitate was filtrated and washed with CHCl₃. The product was used in next step without further purification. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.99 (br, 1H), 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.95 (dd, *J* = 2.5 and 8.5 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.13 (s, 6H). MS (FAB) *m/z* 299 (M+H)⁺.

2-((4-Dimethylaminophenyl)diazenyl)-6-(2-(2-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzothiazole (15).



A mixture of **14** (101.2 mg, 339.2 μmol), **7** (112.3 mg, 343.0 μmol), and K₂CO₃ (46.7 mg, 337.9 μmol) in DMF (10 mL) was stirred at 100 °C for 7 h. The reaction mixture was poured into NaCl aq. (brine/H₂O = 1:1), extracted with CHCl₃, and dried over MgSO₄. Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification by flash column chromatography (CHCl₃) gave 53.4 mg (7%, 3 steps) of **14** as a red amorphous solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 2.5 and 9.5 Hz, 1H), 4.23 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.73 (dd, *J* = 2.5 and 5.0 Hz, 2H), 3.66 (dd, *J* = 2.5 and 5.0 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.33 (br, 2H), 3.15 (s, 6H), 1.45 (s, 9H). MS (FAB) *m/z* 530 (M+H)⁺.

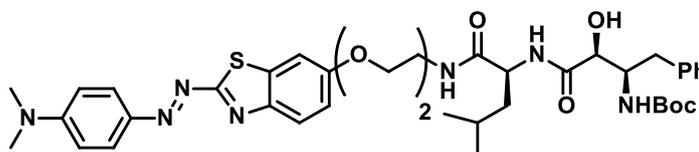
2-((4-Dimethylaminophenyl)diazenyl)-6-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzothiazole (16).



To a solution of **15** (21.4 mg, 40.4 μmol) in DCM (2.0 mL) was added 4 M HCl/1,4-Dioxane (2.0 mL) and stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was poured into saturated aqueous

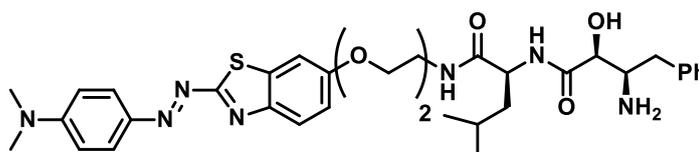
NaHCO₃, extracted with CHCl₃, and dried over MgSO₄. Filtration and evaporation of the solvent *in vacuo* gave a red amorphous solid that was used in next step without further purification. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 2.6 and 8.9 Hz, 1H), 4.23 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.75 (dd, *J* = 4.0 and 5.7 Hz, 2H), 3.67 (dd, *J* = 4.0 and 5.7 Hz, 2H), 3.53 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.15 (s, 6H), 2.88 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H). MS (FAB) *m/z* 430 (M+H)⁺.

2-((4-Dimethylaminophenyl)diazenyl)-6-(2-(2-(2-((*S*)-2-((2*S*,3*R*)-3-*tert*-butoxycarbonylamino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-4-methylpentanamide)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzothiazole (17).



To a mixture of **16** (12.7 mg, 29.6 μmol), **10** (12.1 mg, 29.6 μmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (9.0 mg, 65.0 μmol) and DIEA (15.5 μL, 88.7 μmol) in DMF (1.0 mL) was added EDC (23.6 mg, 123 μmol) at 0 °C and stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was poured into NaCl aq. (brine/H₂O = 1:1), extracted with CHCl₃, and dried over MgSO₄. Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification by flash column chromatography (CHCl₃ to CHCl₃/MeOH = 100:1) gave 16.7 mg (54%, 2steps) of **17** as a red amorphous solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.30 – 7.18 (m, 11H), 7.09 (dd, *J* = 2.3 and 9.2 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.46 – 4.43 (m, 1H), 4.23 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 4.15 (dd, *J* = 2.3 and 6.9 Hz, 1H), 4.02 (s, 1H), 3.89 – 3.88 (m, 2H), 3.70 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.62 (dd, *J* = 2.9 and 5.7 Hz, 2H), 3.54 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.17 – 3.12 (m, 7H), 3.10 – 3.00 (m, 1H), 1.57 – 1.54 (m, 3H), 1.37 (s, 9H), 0.88 (dd, *J* = 6.6 and 10.0 Hz, 6H). MS (FAB) *m/z* 820 (M+H)⁺.

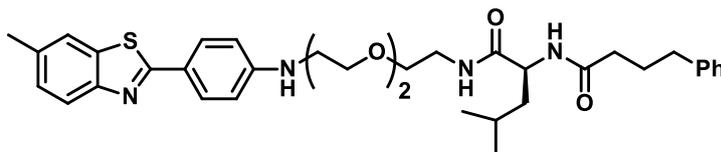
2-((4-Dimethylaminophenyl)diazenyl)-6-(2-(2-(2-((*S*)-2-((2*S*,3*R*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-4-methylpentanamide)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzothiazole (2).



To a solution of **17** (16.3 mg, 19.9 μmol) in DCM (1.0 mL) was added 4 M HCl/1,4-Dioxane (1.0 mL)

and stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was evaporated *in vacuo* and purification of the residue by PTLC (CHCl₃/MeOH/NH₃ aq = 40:1:0.1) gave 11.4 mg (80%) of **2** as a red amorphous solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.32 - 7.30 (m, 5H), 7.09 (dd, *J* = 2.6 and 8.9 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 9.7 Hz, 2H), 4.44 - 4.43 (m, 1H), 4.22 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.97 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 3.88 (td, *J* = 2.1 and 4.7 Hz, 2H), 3.71 (td, *J* = 1.9 and 3.9 Hz, 2H), 3.62 (dd, *J* = 3.4 and 5.7 Hz, 2H), 3.55 (t, *J* = 5.2 Hz, 3H), 3.47 - 3.43 (m, 2H), 3.16 (s, 6H), 2.97 (dd, *J* = 5.2 and 13.2 Hz, 6H), 2.55 (dd, *J* = 9.5 and 13.5 Hz, 1H), 1.62 - 1.57 (m, 2H), 1.26 (s, 1H), 0.91 (dd, *J* = 6.3 and 10.3 Hz, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 177.50, 175.47, 174.66, 159.48, 156.13, 147.96, 144.03, 140.01, 136.63, 130.39, 129.64, 127.53, 124.89, 117.50, 113.02, 106.81, 79.48, 73.65, 71.82, 71.31, 70.79, 70.53, 69.27, 56.62, 53.03, 42.09, 40.72, 40.46, 40.44, 40.42, 26.02, 23.38, 22.13. MS (FAB) *m/z* 720 (M+H)⁺. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₃₇H₅₀N₇O₆S⁺, 720.3538; found 720.3530.

2-(4-(2-(2-(2-((S)-2-(4-phenylbutanamido)-4-methylpentanamide)ethoxy)ethoxy)ethyl)aminophenyl)-6-methylbenzothiazole (21).



To a mixture of **9** (12.4 mg, 33.4 μmol), **20** (9.5 mg, 34.3 μmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (7.9 mg, 58.5 μmol) and DIEA (18.0 μL, 99.8 μmol) in DMF (0.5 mL) was added EDC (10.6 mg, 55.3 μmol) at 0 °C and stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was diluted with AcOEt, extracted with brine/H₂O (1:1), and dried over MgSO₄. Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification by flash column chromatography (hexane/AcOEt = 1:3 to 1:6) gave 12.2 mg (58%) of **21** as a yellow amorphous solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.29 - 7.15 (m, 6H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.45 (dd, *J* = 14.0 and 8.3 Hz, 1H), 3.72 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.64 - 3.62 (m, 4H), 3.56 - 3.54 (m, 2H), 3.47 - 3.43 (m, 2H), 3.38 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.62 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.19 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.98 - 1.92 (m, 2H), 1.64 - 1.57 (m, 2H), 1.50 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 0.92 (d, *J* = 4.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172.91, 172.28, 167.86, 152.53, 150.63, 141.47, 134.79, 134.47, 129.08, 128.61, 128.56, 127.67, 126.16, 122.95, 121.97, 121.35, 112.73, 77.37, 70.44, 69.80, 69.59, 51.66, 43.19, 41.49, 41.46, 39.40, 35.89, 35.28, 27.24, 24.93, 22.97, 22.34, 21.63. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₃₆H₄₆N₄NaO₄S⁺, 653.3131; found 653.3150.

2.8.2 Biology

Cell culture condition.

Fibroblast cells from Huntington's disease patients (GM04281-17/68 CAG), obtained from Coriell Cell Repositories, were cultured in D-MEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS and the antibiotics penicillin/streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in the air.

Construction, Expression, and purification of GST-Q₆₂.

GST-Q₆₂ cDNA was obtained by cloning the synthesized DNA sequence coding for 62 Qs (GenScript Japan Inc.) into the *Bam*HI and *Eco*RI sites of pGEX 4T-1 plasmid vector (GE Healthcare). GST-Q₆₂ was expressed in transformed RosettaTM (DE3) competent cells derived from *Escherichia coli* BL21 grown in LB medium by induction with 0.1 mM of IPTG at 37 °C for 4 h. Cell suspensions were centrifuged at 3000×g for 5 min and bacterial pellets were resuspended in sonication buffer (25 mM Tris, 300 mM NaCl, 10% v/v glycerol, and 1 mM PMSF). Cell suspensions were sonicated and centrifuged at 14000×g for 10 min. Supernatants were batch purified on glutathione-Sepharose 4B resin (GE Healthcare) and eluted GST-Q₆₂ using elution buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM Glutathione (reduced form, Aldrich), pH 8.0). Amount of SGT-Q₆₂ was quantified using Bradford protein assay and SDS-PAGE with OrioleTM Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad).

Q₆₂ peptide binding assay.

10 μM of GST-Q₆₂ was cleaved by thrombin (1 unit / 100 μg of GST-Q₆₂, GE Healthcare) at room temperature overnight and aggregation was monitored by measuring the turbidity at 600 nm on ARVOTM SX microplate reader. Aggregate of Q₆₂ was incubated in the presence of 1 μM of ThT at room temperature for 15 min. To the mixture was added BTA-1 or SNIPER_EG3 and incubated at room temperature for 15 min. After incubation, fluorescence intensity of ThT in the mixture was measured on fluorescence spectrometer (Jasco FP-6500) with excitation set at 440 nm and emission set at 485 nm.

Western blotting.

Cells were washed with PBS, lysed in SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA and 50 mM Tris, pH 8.1) and boiled for 5 min. Protein concentrations were determined using BCA protein assay and normalized by total protein concentration in each lysate. After boiling for 5 min with Laemmli buffer (2% SDS, 50 mM Tris pH 6.8, 0.1 M DTT, 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue), each lysate was resolved by SDS-PAGE with SuperSepTM Ace 5-12% (Wako Pure Chemical Industries) and transferred onto PVDF membrane. After blocking with TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) containing 5% skim milk, the transblotted membrane was probed with anti-polyQ mouse monoclonal antibody 3B5H10 (SIGMA, 1:1000), anti-β-tubulin antibody (Boehringer Mannheim, 1:200), anti-β-actin antibody I-19 HRP conjugates (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:1000), and anti-mouse IgG antibody 12-349 HRP conjugates (Millipore, 1:1000) in Can-Get-Signal

2. タンパク質の凝集を標的とする方法論：

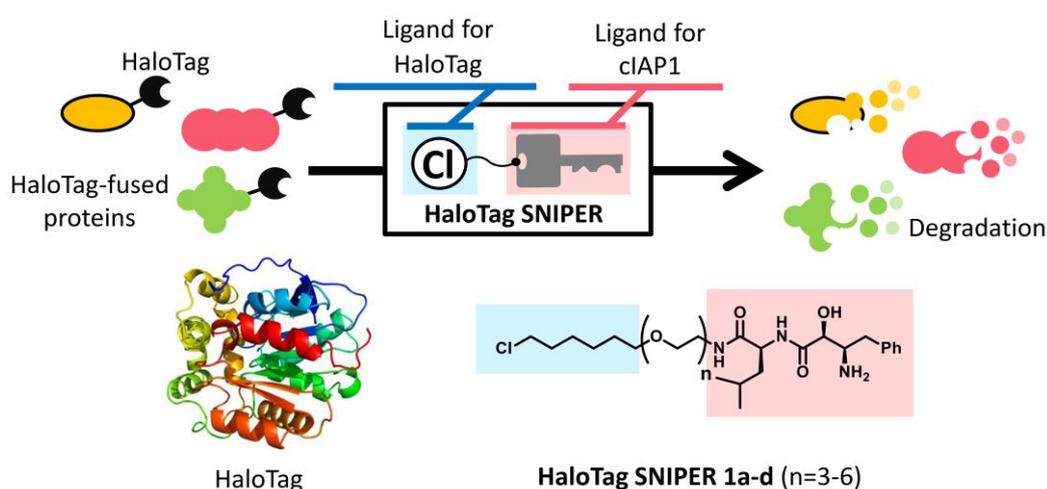
solution (Toyobo). After probing, the membrane was washed twice more with TBS-T. The immunoblots were visualized by enhanced chemiluminescence with ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

3

リガンドと結合部位を付与する方法論：

HaloTag を利用した

汎用分解誘導システムの構築



要約：プロテインノックダウン法におけるリガンドを必要としない方法論の更なる確立に加え、本手法の汎用性向上および本手法が適用できるタンパク質の局在についての調査を目指した。そこで筆者は、塩化アルキルと共有結合を形成する人工タンパク質 HaloTag を標的タンパク質に融合させ、SNIPER のための共通のリガンドと結合部位を付与するシステムを考えた。このシステムを構築すれば、ユビキチンリガーゼ cIAP1 リガンド BE04 と塩化アルキルを連結させた HaloTag を標的とする新規 SNIPER「HaloTag SNIPER」によってリガンドのないタンパク質のプロテインノックダウンが可能になるだけでなく、種々のタンパク質に対し汎用できると期待した。また本研究では上記システムの構築だけでなく、これを利用することで核に局在するタンパク質にプロテインノックダウン法を適用できるか調査することにした。

設計・合成した HaloTag SNIPER は、HaloTag 融合 CREB1、c-jun および TNF α の存在量を減少させ、構築したシステムがリガンドの無いタンパク質に対し汎用できる可能性が示唆された。また、HaloTag 融合 CREB1 および c-jun の核局在および核内での存在量減少が確認でき、プロテインノックダウン法が核局在タンパク質に適用できることが示唆された。

3.1 背景：プロテインノックダウン法のその他の問題点

第2章で述べた研究課題の成功を踏まえ、筆者は標的タンパク質のリガンドを必要としない方法論の更なる確立を試みることにした。また、本研究課題ではこれに加えて以下の2つの問題点についても解決したいと考えた。

1つ目の問題点は、標的タンパク質ごとに新規 SNIPER を創製する必要がある点である。プロテインノックダウン法では、標的タンパク質を変更する際に、その都度新たな SNIPER を分子設計し、合成しなければならない。リンカー長やリンカー導入位置については試行錯誤が必要な場合もあり、また合成工程数も短くないため、化学分野における知識と技術を要する。この点は、生物学者が本手法を利用する上でひとつの障壁となると考えられる。

2つ目の問題点は、プロテインノックダウン法が適用可能なタンパク質局在が調べられていない点である。現在までにプロテインノックダウン法によって分解誘導を達成したタンパク質は、いずれも基本的には細胞質に局在するものであり、完全に核内に局在しているタンパク質や細胞膜に局在しているタンパク質への一般性を確認していない^{1,2}。プロテインノックダウン法で利用しているユビキチンリガーゼ cIAP1 が主に細胞質に局在している点³や、細胞膜に局在するタンパク質の分解がUPSとは異なる経路で分解されている点⁴を考慮すると、完全に核内や細胞膜に局在しているタンパク質に対して本手法が適用できるかは不明である。

3.2 作業仮説・目的

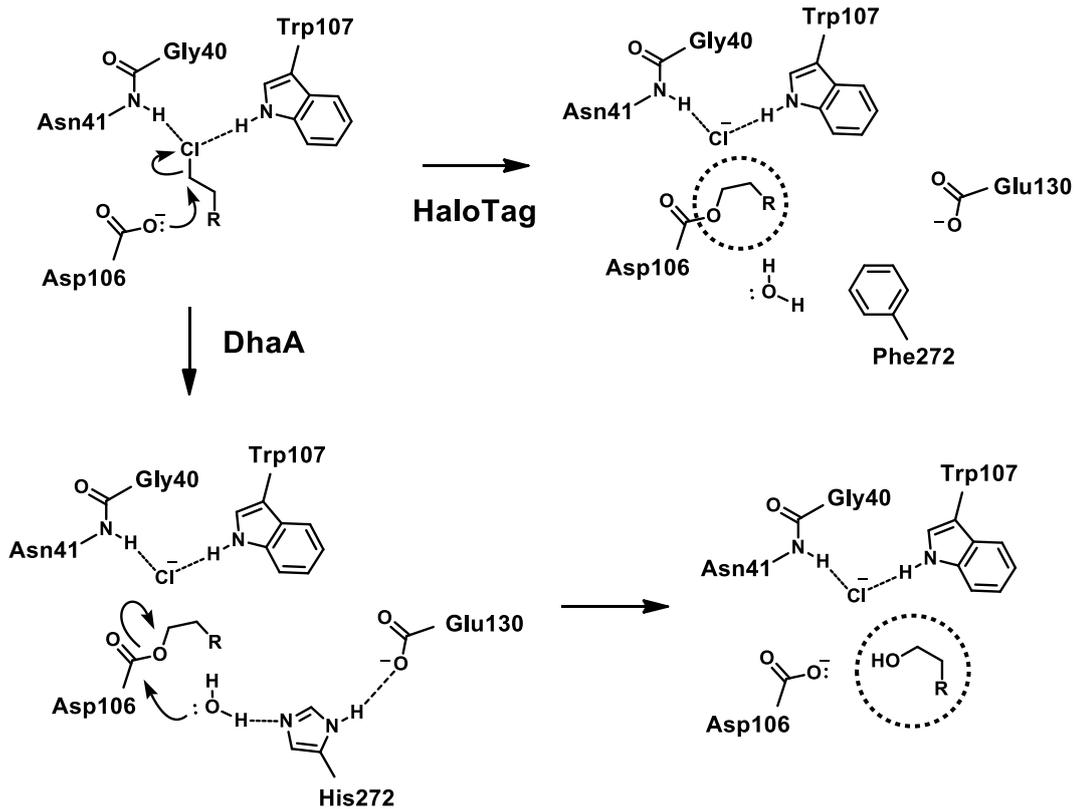
以上の背景から、本研究課題ではプロテインノックダウン法におけるリガンドを必要としない方法論の更なる確立だけでなく、上記の2つの問題点も解決したいと考えた。本節では、問題解決のための作業仮説と本研究課題の目的について述べる。

3.2.1 作業仮説：HaloTag を利用した汎用分解誘導システム^{5,6}

リガンドを必要としない方法論の確立と上記問題点の解決の両方を達成するには、特定の SNIPER をリガンドの有無に拘わらず様々なタンパク質に汎用できるシステムを構築し、これを用いて核あるいは細胞膜の局在を示すタンパク質のプロテインノックダウンを試みる必要がある。そこで筆者は、標的タンパク質にタグタンパク質を融合し、タグタンパク質リガンドと IAP リガンドからなる SNIPER によってタグ融合標的タンパク質の存在量を減少させるシステムを考えた。このシステムでは標的タンパク質にリガンドとその結合部位を付与するため、リガンドのない標的タンパク質のプロテインノックダウンも可能である。さらに、各々の標的タンパク質に対して共通のタグタンパク質を融合すれば、汎用性の高いシステムとして期待できる。筆者は、このシステムに利用するタグタンパク質として HaloTag に着目した。

HaloTag はアルキルハライドと共有結合する 33 kDa のタンパク質であり、バクテリアの一種 *Rhodococcus rhodochrous* が有するハロアルカン脱ハロゲン化酵素 DhaA の活性中心に存在す

る His272 残基を Phe272 に改変した人工酵素である。野生型の DhaA では、活性中心の Asp106 がアルキルハライドに対して S_N2 機構で反応し、アルキルハライドの脱ハロゲン化と Asp106 とアルキル基のエステル結合形成が起こる。続いて活性中心付近の His272 によって Asp106 上のエステル結合の加水分解が触媒され、アルキルハライドは最終的にアルコールへと変換される。一方、DhaA の His272→Phe272 変異体である HaloTag では、Asp106 上で生成したエステル結合の加水分解が起こらないため、HaloTag はアルキル化されたままになる (Scheme 1)。



Scheme 1. DhaA および HaloTag の反応機構.

HaloTag とアルキルハライドの共有結合形成反応は細菌由来の反応であるため生体直交性があり、細胞系や *in vivo* においても所望の化学修飾を特異的に行うことができる。

現在、ビオチンや蛍光色素といった機能部位と HaloTag 結合部位であるアルキルクロライドからなる HaloTag 試薬が市販されており、HaloTag 融合タンパク質のイメージングや精製などに応用されている (Fig. 1)。

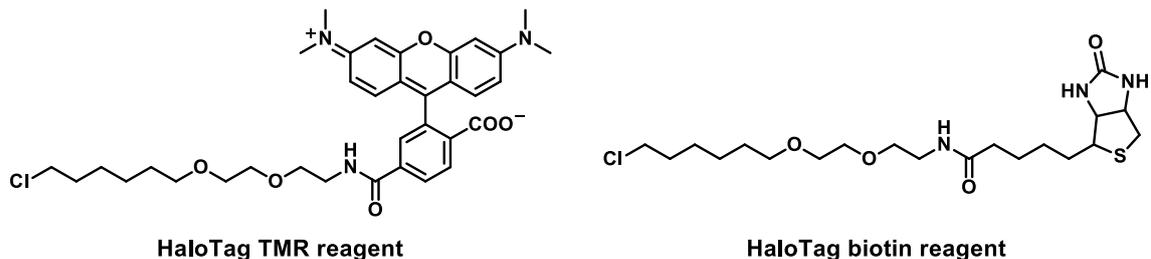


Figure 1. 代表的な HaloTag 試薬の構造.

また、2015年12月現在、10853種類のHaloTag融合タンパク質のプラスミドベクターが、かかず DNA 研究所から販売されており、HaloTag 研究を簡便に行える点も特徴である。

以上を踏まえ、筆者はHaloTagを標的とするHaloTag SNIPERによってHaloTagを融合した標的タンパク質の存在量を幅広く減少させる汎用分解誘導システムを考案した。

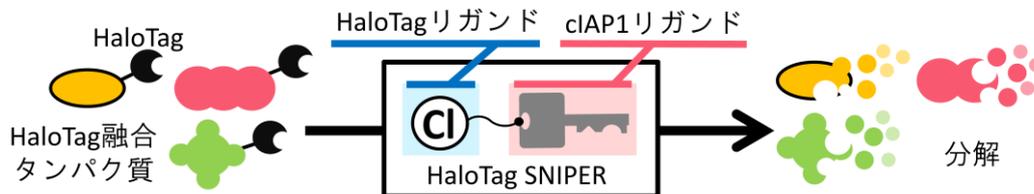


Figure 2. HaloTag を利用した汎用分解誘導システム.

3.2.2 考案した汎用分解誘導システムの意義

上述のHaloTagを利用した汎用分解誘導システムでは、強制発現させたHaloTag融合タンパク質の存在量をHaloTag SNIPERによって減少させるため、いわゆる“自作自演”的なシステムである。実際に、強制発現させたタンパク質の存在量を制御する手法によってタンパク質の機能解析を行った例がいくつか報告されている。

例えばWandlessらのグループは、タンパク質を不安定化させるタンパク質タグDD (FKBPのL106P変異体) およびDDを安定化させる有機小分子Shield-1によって標的タンパク質の存在量を制御する手法を開発している⁷。この手法は*in vivo*においても利用可能であり^{8,9}、彼らはこの手法によってカルシウム依存キナーゼの一種CDPK5がマラリア原虫の増殖においてどのように関与しているか詳細に解析している¹⁰。

また、Crewsらのグループは疎水性タグ法をHaloTag融合タンパク質に用い、既知の事実ではあるが、マウスにおいてHrasのG12V変異体が腫瘍形成に関与することを確認している¹¹。

こうした前例は、考案した汎用分解誘導システムの意義を支持するものであり、このシステムがタンパク質の機能解析や生命現象解明に貢献できると考えている。

3.2.3 目的

上述の作業仮説に基づき、本研究課題ではHaloTagを利用した汎用分解誘導システムの構築ならびに、このシステムを用いてプロテインノックダウン法が適用可能なタンパク質局在を調査することを目的として設定した。

3.3 分子設計・合成

本節では、前節で述べた作業仮説に基づいて HaloTag を標的とする新規 SNIPER 「HaloTag SNIPER」の分子設計および合成について述べる。

3.3.1 分子設計

既存の HaloTag 試薬を参考に、HaloTag リガンドである塩化アルキルとユビキチンリガーゼ cIAP1 のリガンドである BE04¹² を連結させた有機小分子を設計した。なお、各リガンドを連結させているリンカーの長さについては、HaloTag と HaloTag TMR 試薬の結合様式を参考にした。HaloTag と HaloTag TMR 試薬の結合では、塩化アルキルと TMR を連結するリンカーがジエチレングリコールの場合に TMR が HaloTag 表面にあらわれている (Fig. 3)。

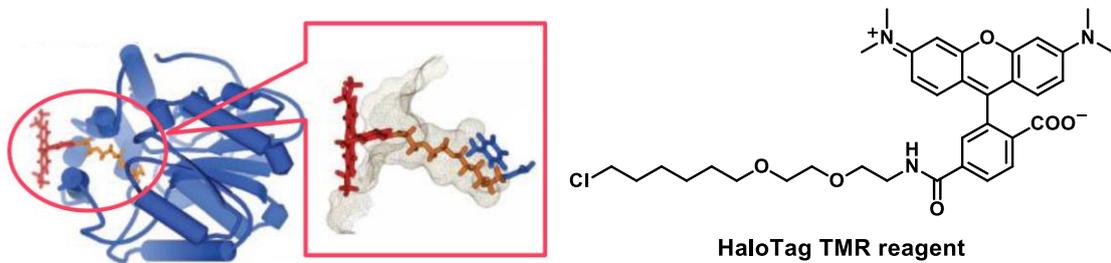


Figure 3. HaloTag と HaloTag TMR 試薬の結合様式 (モデル) . Promega 社パンフレットより改変.

そこで HaloTag SNIPER では、BE04 が cIAP1 と相互作用する必要があることを考慮し、トリエチレングリコールからヘキサエチレングリコールまでの 4 種類の長さのリンカーを有する HaloTag SNIPER **1a-d** を設計した (Fig. 4)。

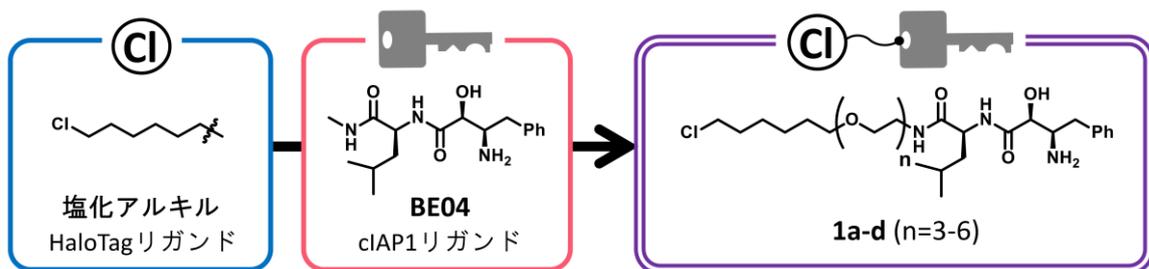
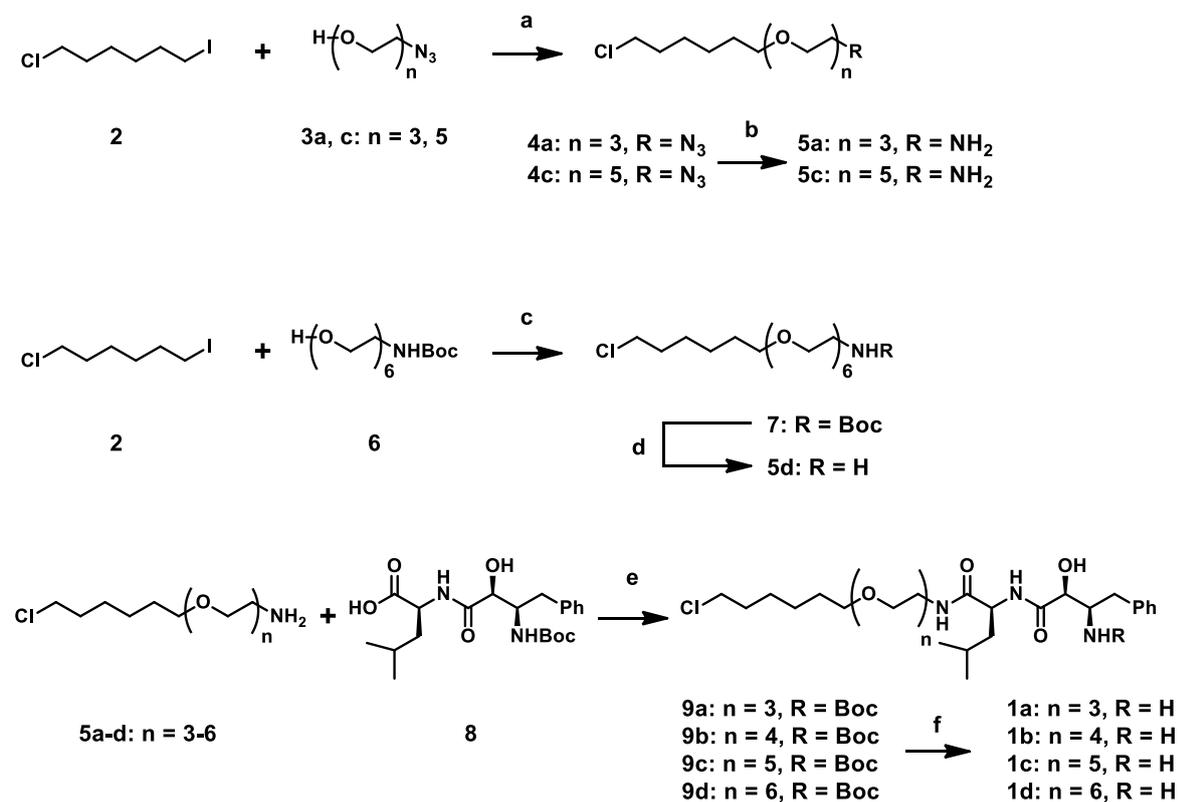


Figure 4. HaloTag SNIPER の分子設計.

3.3.2 合成

HaloTag SNIPER **1a-d** の合成ルートを Scheme 2 に示す。文献情報¹³に基づいてヘキサン誘導体 **2** とアルコール **3a, c** および **6**¹ の S_N2 反応を行い、得られた中間体 **4a, c** および **7** を staudinger 反応または酸性条件にてアミン **5a, c, d** へと変換した。アミン **5a, c, d** および Promega 社から購入したアミン **5b** をそれぞれカルボン酸 **8**² と縮合し、得られた前駆体 **9a-d** の Boc を脱保護することによって HaloTag SNIPER **1a-d** を得た。



Scheme 2. HaloTag SNIPER **1a-d** の合成. (a) NaH, DMF, 0°C, 7.5 h, 41-60%; (b) PPh₃, H₂O, THF, r.t., overnight; (c) NaH, DMF, 0°C, 7 h, 63%; (d) 4 M HCl/1,4-dioxane, DMF, r.t., 2 h. (e) EDC, HOBt, DIEA, DMF, r.t., 24 h, 75-81% (2steps); (f) 4 M HCl/1,4-dioxane, DMF, r.t., 24 h, 54-100%.

3.4 活性評価

3.4.2 HaloTag-CREB1 に対する存在量減少活性

HaloTag 融合 CREB1 (HaloTag-CREB1) を安定発現する HEK293 細胞株を用い、各 HaloTag SNIPER**1a-d** の活性を評価した。実験の結果、いずれも HaloTag-CREB1 の存在量を減少させ、構築したシステムが機能することが示された (Fig. 5)。

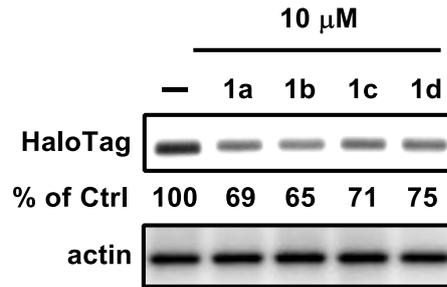


Figure 5. HaloTag SNIPER **1a-d** の HaloTag-CREB1 減少活性評価. 各化合物 6 h 処理.

また、最も活性の強かった **1b** を用いて濃度依存性を確認したところ、HaloTag-CREB1 減少活性は濃度依存であり、10 μM でプラトーに達することが分かった (Fig. 6a)。さらに、**1b** の活性タイムコースを確認したところ、**1b** は処理後 1 h 以内に活性を発現し、24 h 以上活性が持続することが分かった (Fig. 6b)。

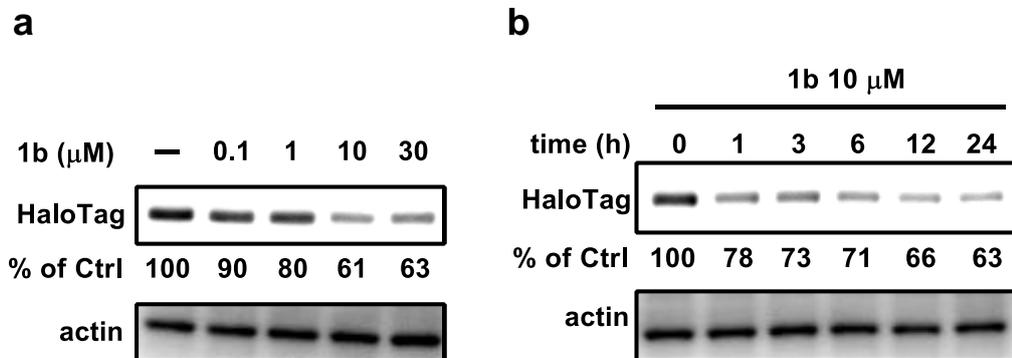


Figure 6. (a) HaloTag SNIPER **1b** による HaloTag-CREB1 減少活性の濃度依存性.

(b) HaloTag SNIPER **1b** による HaloTag-CREB1 減少活性のタイムコース.

続いて、HaloTag-CREB1 の減少においてプロテアソームが関与している検証した。なお、この実験では **1b** を添加する 6 h 前にプロテアソーム阻害剤 epoxomicin を添加した。実験の結果、**1b** の HaloTag-CREB1 減少活性は epoxomicin によってキャンセルされた (Fig. 7)。この結果から、HaloTag-CREB1 の減少にプロテアソームが関与していることが示唆された。

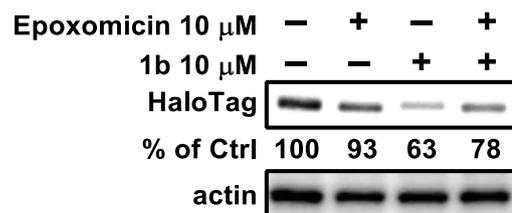


Figure 7. プロテアソーム阻害実験.

また、**1b** の細胞毒性を確認したところ、6 h 処理において有意な毒性は認められず、24 h 処理においても若干の毒性が認められる程度であった (Fig. 8)。

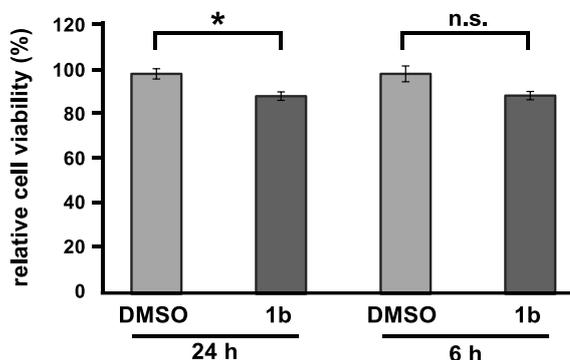


Figure 8. (a) HaloTag-c-jun 減少活性評価. 各化合物 18 h 処理. (b) HaloTag-TNFα

3.4.2 構築したシステムの汎用性の検証

構築したシステムが他の HaloTag 融合タンパク質に対しても機能するか検証した。

HaloTag-c-jun を一過性発現する MCF-7 細胞株を用い、HaloTag SNIPER **1a** および **1b** の活性を評価した。実験の結果、どちらも HaloTag-c-jun の存在量を減少させた (Fig. 9a)。さらに、HaloTag-TNFα を安定発現する HEK293 細胞株を用いて HaloTag SNIPER **1b** の活性評価を行ったところ、濃度依存的に HaloTag-TNFα の存在量が減少した (Fig. 9b)。

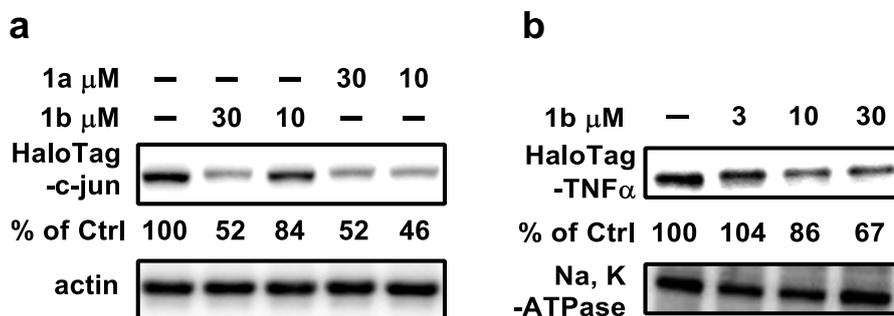


Figure 9. (a) HaloTag-c-jun 減少活性評価 (18 h 処理). (b) HaloTag-TNFα 減少活性評価 (24 h 処理).

この結果から、構築したシステムが種々の標的タンパク質に対し幅広く利用できることが示唆された。

3.4.3 プロテインノックダウン法を適用できるタンパク質局在の調査

最後に、構築したシステムを用いてプロテインノックダウン法を適用できるタンパク質局在を調査した。

これまでの活性評価で用いた CREB1 および c-jun は、本来は完全に核に局在するタンパク質である。今回、HaloTag を融合した CREB1 および c-jun の存在量を減少させることができたため、HaloTag-CREB1 および HaloTag-c-jun についても核に局在しているか確認した。HaloTag に特異的に結合する蛍光色素 HaloTag Oregon Green を用い、HaloTag-CREB1 および HaloTag-c-jun の局在を蛍光顕微鏡によって確認したところ、いずれも核に局在した (Fig. 10)。

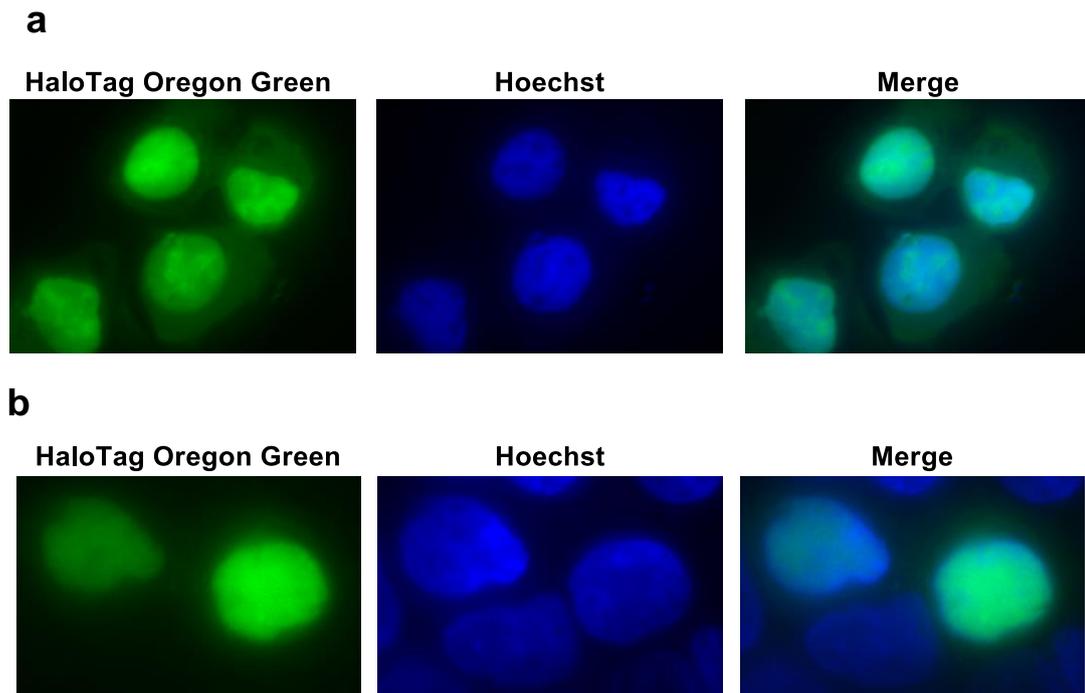


Figure 10. HaloTag-CREB1 (a) および HaloTag-c-jun (b) の局在. HaloTag Oregon Green: HaloTag 融合タンパク質; Hoechst: 核.

さらに、HaloTag-CREB1 安定発現株 (HEK293) の核分画実験を行ったところ、**1b** は核において HaloTag-CREB1 の存在量を減少させていることが示唆された (Fig. 11)。

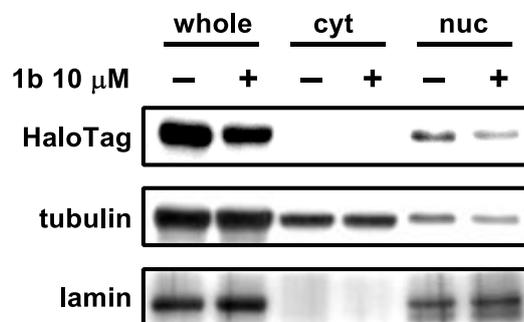


Figure 11. HaloTag-CREB1 の核分画実験.

以上の結果から、構築したシステムによってプロテインノックダウン法が核局在タンパク質に適用できることを確認することができた。

3.5 考察

本研究課題では、標的タンパク質に HaloTag を融合させることで SNIPER のための共通のリガンドと結合部位を付与し、HaloTag SNIPER によってリガンドの有無に拘わらず幅広い標的タンパク質の存在量を減少させるシステムの構築を試みた。

活性評価において、HaloTag SNIPER は HaloTag 融合タンパク質の存在量を完全に消失させる前にその活性がプラトーに達することが明らかになった。これについては、HaloTag 融合タンパク質を強制発現させているため、その存在量が内因性タンパク質よりも多く、cIAP1 による Ub 化が発現速度より遅いのではないかと考えている。その場合、ユビキチンリガーゼリガンドを IAP アンタゴニストである MV1 に変え、cIAP1 以外の IAP の E3 活性も利用できるようにすることで改善できるかもしれない^{14,15}。もう一つの可能性として、HaloTag 融合タンパク質の半数以上が翻訳されて間もないフォールディング途中であり、HaloTag リガンドと共有結合を形成できないことが考えられる。しかし、HaloTag-c-jun および HaloTag-TNF α に対する活性評価において、HaloTag SNIPER を処理した条件では HaloTag-c-jun および HaloTag-TNF α のバンドが高分子量側に若干シフトしており (Fig. 9)、HaloTag SNIPER と HaloTag の共有結合自体は形成できているのではないかと考えている。

また、標的タンパク質ごとに減少活性が認められる処理条件が異なったことから、存在量減少活性の強弱は標的タンパク質の安定性などに依存する可能性がある。この結果に関連して、HaloTag SNIPER によって誘導される Ub 化は、HaloTag ではなく標的タンパク質の Lys である可能性も考えられる。

3.6 まとめと今後の展望

本研究課題では、標的タンパク質に HaloTag を融合し、HaloTag を標的とする新規 SNIPER 「HaloTag SNIPER」によってリガンドの有無に拘わらず幅広い標的タンパク質の存在量を減少させるシステムの構築を目指した。創製した HaloTag SNIPER はリガンドの無い3種類のタンパク質の存在量を減少させることができ、考案したシステムの構築に成功した。また、このシステムによって、プロテインノックダウン法が核局在タンパク質に適用できることを明らかにすることができた。これらの研究成果により、①リガンドの無い標的タンパク質に対し、SNIPER のための共通のリガンドと結合部位を付与する方法論の確立、②構築したシステムにおいて種々のタンパク質に汎用できる SNIPER の創製、③プロテインノックダウン法の適用可能なタンパク質局在の調査、の3つを達成することができた。

今後は、膜タンパク質に対しプロテインノックダウン法を適用できるか調査を進める予定である。また、今回構築したシステムでは標的タンパク質の存在量を 50%程度しか減少できなかったため、HaloTag SNIPER の活性向上を目指す。具体的な活性向上策としては、HaloTag SNIPER のユビキチンリガーゼリガンドを BE04 から MV1 に変更することを考えている。

3.7 参考文献

- [1] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820-5826.
- [2] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Sato, S.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6768-6778.
- [3] Vischioni, B.; Giaccone, G.; Span, S. W.; Kruyt, F. A. E.; Rodriguez, J. A. Nuclear shuttling and TRAF2-mediated retention in the cytoplasm regulate the subcellular localization of cIAP1 and cIAP2. *Exp. Cell Res.* **2004**, *298*, 535-548.
- [4] M. Babst "Quality control at the plasma membrane: one mechanism does not fit all" *J. Cell Biol* **2014**, *205*, 11-20.
- [5] England, C. G.; Luo, H.; Cai, W. HaloTag technology: a versatile platform for biomedical applications. *Bioconj. Chem.* **2015**, *26*, 975-986.
- [6] Los, G. V.; Encell, L. P.; McDougall, M. G.; Hartzell, D. D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M. G.; Learish, R.; Ohana, R. F.; Urh, M.; Simpson, D.; Mendez, J.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Vidugiris, G.; Zhu, J.; Darzins, A.; Klaubert, D. H.; Bulleit, R. F.; Wood, K. V. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373-382.
- [7] Banaszynski, L. A.; Chen, L.; Maynard-Smith, L. A.; Ooi, A. G. L.; Wandless, T. J. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell* **2006**, *126*, 995-1004.
- [8] Herm-Götz, A.; Agop-Nersesian, C.; Münter, S.; Grimley, J. S.; Wandless, T. J.; Frischknecht, F.; Meissner, M. Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 1003-1005.
- [9] Banaszynski, L. A.; Sellmyer, M. A.; Contag, C. H.; Wandless, T. J.; Thorne, S. H. Chemical control of protein stability and function in living mice. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1123-1127.
- [10] Dvorin, J. D.; Martyn, D. C.; Patel, S. D.; Grimley, J. S.; Collins, C. R.; Hopp, C. S.; Bright, A. T.; Westenberger, S.; Winzeler, E.; Blackman, M. J.; Baker, D. A.; Wandless, T. J.; Duraisingh, M. T. A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science* **2010**, *328*, 910-912.
- [11] Neklesa, T. K.; Tae, H. S.; Schneekloth, A. R.; Stulberg, M. J.; Corson, T. W.; Sundberg, T. B.; Raina, K.; Holley, S. A.; Crews, C. M. Small-molecule hydrophobic tagging-induced degradation of HaloTag fusion proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538-543.
- [12] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Sato, S.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Development of target protein-selective degradation inducer for protein knockdown. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*,

3229-3241.

- [13] Benink, H. A.; McDougall, M. G.; Klaubert, D. H.; Los, G. V. Direct pH measurements by using subcellular targeting of 5(and 6-) carboxysemaphthorhodafluor in mammalian cells. *BioTechniques* **2009**, *47*, 769-774.
- [14] Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Okuhira, K.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule consisting of ATRA and IAPs antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4453-4457.
- [15] Varfolomeev, E.; Blankenship, J. W.; Wayson, S. M.; Fedorova, A. V.; Kayagaki, N.; Garg, P.; Zobel, K.; Dynek, J. N.; Elliott, L. O.; Wallweber, H. J. A.; Flygare, J. A.; Fairbrother, W. J.; Deshayes, K.; Dixit, V. M.; Vucic, D. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B activation, and TNF α -dependent apoptosis. *Cell* **2007**, *131*, 669-681.

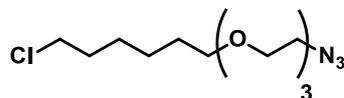
3.8 実験項

3.8.1 Organic synthesis

General.

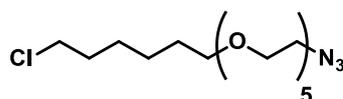
^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-ECA500 (500 MHz) spectrometer in the indicated solvent. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million relative to the internal standard tetramethylsilane (^1H NMR) or the centerline of the triplet at 77.0 ppm of CDCl_3 (^{13}C NMR). ESI and FAB mass spectra were recorded on a BRUKER micrOTOF II mass spectrometer and JEOL JMA-HX110 mass spectrometer, respectively. Chemical reagents and solvents were purchased from Aldrich Inc., Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd., Wako Pure Chemical Industries,Ltd., and Kanto chemical co.,inc. and used without purification. Routine TLC was performed on silica gel 60 F254 plates (Merck, Germany). Flash column chromatography was performed on Silica gel 60 (spherical, particle size 40–100 μm ; Kanto Chemical, Japan)

2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethyl azide (**4a**)



To a mixture of **3a** (42.3 mg, 241 μmol) and NaH (22.3 mg, 93 μmol) in DMF (1 mL) was added **2** (52.0 μL , 342 μmol) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 7.5 h, diluted with AcOEt, washed with brine/water (1:1), and dried over MgSO_4 . Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification of the residue by flash column chromatography (hexane/AcOEt = 3:1) gave 26.1 mg (33%) of compound **4a** as a colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.69 – 3.65 (m, 8H), 3.59 (dd, $J = 6.0$ and 3.7 Hz, 2H), 3.53 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.46 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.39 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.81 – 1.75 (m, 2H), 1.63 – 1.57 (m, 2H), 1.49 – 1.35 (m, 4H). MS (ESI) m/z 316 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

2-(2-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl azide (**4c**)



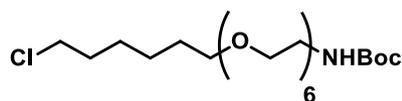
The title compound was prepared from **3c** (52.1 mg, 198 μmol) according to the procedure described for **4a**. Yield: 45.3 mg (60%). Colorless oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.69 – 3.57 (m, 18H), 3.53

3. リガンドと結合部位を付与する方法論 :

68 | HaloTag を利用した汎用分解誘導システムの構築

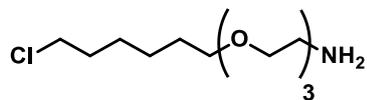
(t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.46 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.39 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.81 – 1.75 (m, 2H), 1.63 – 1.57 (m, 2H), 1.48 – 1.42 (m, 2H), 1.40 – 1.35 (m, 2H). MS (FAB) m/z 382 ($M + H$)⁺.

2-(2-(2-(2-*tert*-Butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)hexyl chloride (7)



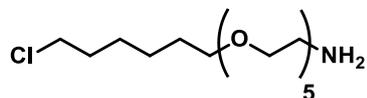
The title compound was prepared from **6** (20.7 mg, 54.3 μ mol) according to the procedure described for **4a**. Yield: 17.1 mg (63%). Colorless oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.14 (br s, 1H), 3.66 – 3.52 (m, 24H), 3.46 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.32 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 1.80 – 1.75 (m, 2H), 1.63 – 1.57 (m, 2H), 1.44 – 1.35 (m, 13H). MS (FAB) m/z 522 ($M + Na$)⁺.

2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethylamine (5a)



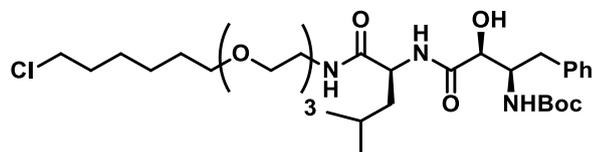
A mixture of **4a** (1 equiv.), PPh₃ (1.2 equiv.), and water (20 μ L) in THF was stirred at room temperature for 24 h. Evaporation of the solvent *in vacuo* gave the crude **5a**, which was used immediately in the next step without further purification. MS (ESI) m/z 268 ($M + H$)⁺.

2-(2-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethylamine (5c)



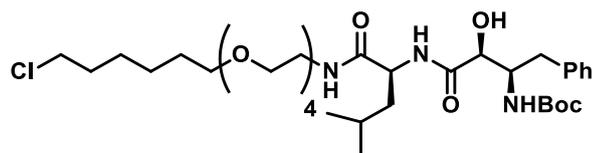
The title compound was prepared from **4c** (12.7 mg, 33.3 μ mol) according to the procedure described for **5a**. The crude product was used immediately in next step without further purification. MS (ESI) m/z 356 ($M + H$)⁺.

(S)-2-((2S,3R)-3-tert-Butoxycarbonylamino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-N-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-methylpentanamide (9a).

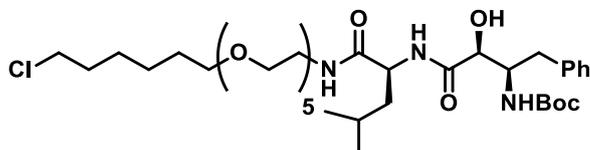


To a mixture of **5a** (25.1 mg, 93.6 μmol), **8** (38.2 mg, 93.6 μmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (20.3 mg, 150 μmol) and DIEA (50 μL , 281 μmol) in DMF (0.5 mL) was added EDC (27.4 mg, 143 μmol) at 0 $^{\circ}\text{C}$. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, diluted with AcOEt, washed with brine/water (1:1), and dried over MgSO_4 . Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification of the residue by flash column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ = 100:1 to 30:1) gave 48.7 mg (79%, 2 steps) of compound **9a** as a colorless amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.32 – 7.19 (m, 5H), 6.79 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.48 (br s, 1H), 4.13 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 3.64 – 3.44 (m, 16H), 3.02 (d, J = 28.6 Hz, 2H), 1.80 – 1.74 (m, 2H), 1.70 – 1.59 (m, 5H), 1.48 – 1.23 (m, 13H), 0.92 (dd, J = 14.6, 6.0 Hz, 6H). MS (ESI) m/z 680 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

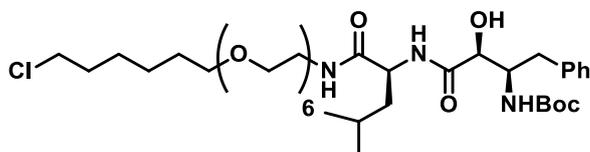
(S)-2-((2S,3R)-3-tert-Butoxycarbonylamino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-N-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-methylpentanamide (9b).



The title compound was prepared from **5b** (21.9 mg, 70.2 μmol) according to the procedure described for **9a**. Yield: 39.7 mg (81%). Colorless amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.31 – 7.20 (m, 5H), 6.89 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 5.12 (br s, 1H), 4.49 (br s, 1H), 4.13 (br s, 1H), 3.65 – 3.44 (m, 20H), 3.00 (br s, 2H), 1.79 – 1.74 (m, 2H), 1.70 – 1.56 (m, 5H), 1.47 – 1.26 (m, 13H), 0.92 (dd, J = 14.9, 6.3 Hz, 6H). MS (ESI) m/z 724 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$.

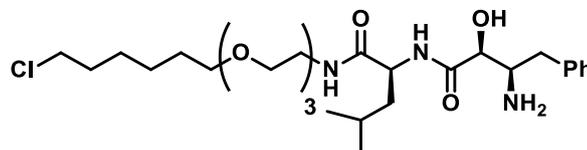
(S)-2-((2S,3R)-3-tert-Butoxycarbonylamino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-N-(2-(2-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-methylpentanamide (9c).

The title compound was prepared from **5c** (11.8 mg, 33.3 μmol) according to the procedure described for **9a**. Yield: 18.7 mg (75%, 2 steps). Colorless amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.27 – 7.17 (m, 5H), 4.47 (dd, $J = 9.5, 5.4$ Hz, 1H), 4.15 (dd, $J = 7.7, 5.4$ Hz, 1H), 3.97 (s, 1H), 3.65 – 3.51 (m, 20H), 3.47 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.37 – 3.34 (m, 2H), 2.88 – 2.84 (m, 2H), 1.79 – 1.73 (m, 2H), 1.67 – 1.55 (m, 5H), 1.45 – 1.37 (m, 13H), 0.93 (dd, $J = 20.0, 6.3$ Hz, 6H). MS (FAB) m/z : 747 ($M + H$) $^+$.

(S)-2-((2S,3R)-3-tert-Butoxycarbonylamino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-N-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-methylpentanamide (9d).

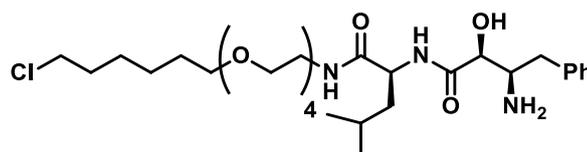
4 M HCl/1,4-dioxane (0.5 mL) was added to a solution of **7** (17.1 mg, 34.2 μmol) in DCM (0.5 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, the solvent of the reaction mixture was evaporated *in vacuo*. To a mixture of the residue, **8** (14.4 mg, 35.3 μmol), 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (11.6 mg, 85.8 μmol) and DIEA (17.6 μL , 103 μmol) in DMF (0.7 mL) was added EDC (26.5 mg, 138 μmol) at 0 $^\circ\text{C}$. The mixture was stirred at room temperature for 19 h, diluted with AcOEt, washed with brine/water (1:1), and dried over MgSO_4 . Filtration, evaporation of the solvent *in vacuo*, and purification of the residue by flash column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100:1$ to 30:1) gave 20.9 mg (77%) of compound **9d** as a colorless amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.28 – 7.20 (m, 5H), 5.56 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.46 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.13 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.02 (s, 1H), 3.67 – 3.53 (m, 24H), 3.48 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.39 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.94 – 2.84 (m, 2H), 1.81 – 1.75 (m, 2H), 1.64 – 1.59 (m, 5H), 1.50 – 1.44 (m, 2H), 1.41 – 1.35 (m, 11H), 0.94 (dd, $J = 17.8$ and 6.3 Hz, 6H). MS (ESI) m/z : 812 ($M + \text{Na}$) $^+$.

(S)-2-((2S,3R)-3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-N-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-methylpentanamide (1a).



4 M HCl/1,4-dioxane (1.0 mL) was added to a solution of **9a** (48.7 mg, 74.0 μmol) in DCM (1.0 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. Evaporation of the solvent *in vacuo* and purification of the residue by flash column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100:1$ to $30:1$) gave 41.0 mg (99%) of compound **1a** as a colorless amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.32 – 7.20 (m, 5H), 4.43 (dd, $J = 8.9, 5.4$ Hz, 1H), 3.93 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 3.60 – 3.46 (m, 14H), 3.39 – 3.31 (m, 2H), 2.78 (dq, $J = 118.4, 7.0$ Hz, 2H), 1.79 – 1.73 (m, 2H), 1.68 – 1.56 (m, 5H), 1.48 – 1.37 (m, 4H), 0.95 (dd, $J = 10.6$ and 6.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, a mixture of $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 173.37, 172.60, 137.97, 129.06, 128.43, 126.41, 77.58, 72.05, 71.07, 70.23, 69.83, 69.69, 69.29, 54.66, 51.27, 44.76, 40.84, 39.02, 32.26, 29.09, 26.41, 25.09, 24.60, 22.60, 21.39. HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{ClN}_3\text{O}_6^+$, 558.3304; found 558.3321.

(S)-2-((2S,3R)-3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-N-(2-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-methylpentanamide (1b).

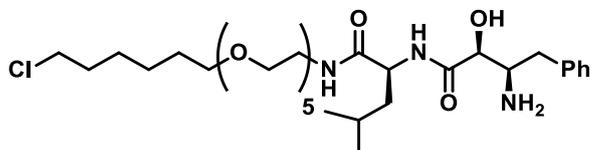


The title compound was prepared from **9b** (39.7 mg, 56.5 μmol) according to the procedure described for **1a**. Yield: 35.2 mg (100%). Colorless amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, a mixture of $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 7.33 – 7.24 (m, 5H), 4.44 (s, 1H), 3.98 (s, 1H), 3.661 – 3.36 (m, 21H), 2.81 (dq, $J = 134.6, 6.9$ Hz, 2H), 1.78 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.63 – 1.59 (m, 5H), 1.49 – 1.43 (m, 2H), 1.41 – 1.35 (m, 2H), 0.95 (dd, $J = 10.0, 4.9$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, a mixture of $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 173.44, 172.62, 138.10, 128.99, 128.35, 126.29, 72.21, 70.99, 70.19, 70.16, 70.12, 69.77, 69.68, 69.24, 54.61, 51.17, 44.68, 40.81, 39.10, 38.98, 32.22, 29.04, 26.35, 25.05, 24.55, 22.53, 21.30. HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{ClN}_3\text{O}_7^+$, 602.3567; found 602.3554.

3. リガンドと結合部位を付与する方法論：

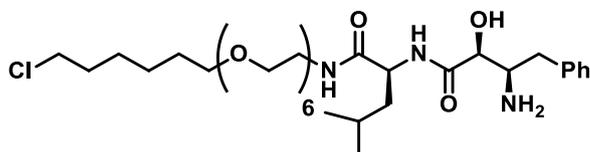
72 | HaloTag を利用した汎用分解誘導システムの構築

(S)-2-((2S,3R)-3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-N-(2-(2-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-methylpentanamide (1c).



The title compound was prepared from **9c** (7.8 mg, 10.5 μmol) according to the procedure described for **1a**. Yield: 3.7 mg (54%). Colorless amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, a mixture of $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 7.34 – 7.22 (m, 5H), 4.46 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.97 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 3.68 – 3.54 (m, 20H), 3.50 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.42 – 3.36 (m, 3H), 2.81 (dq, $J = 121.6, 6.9$ Hz, 2H), 1.82 – 1.76 (m, 2H), 1.69 – 1.59 (m, 5H), 1.52 – 1.46 (m, 2H), 1.44 – 1.339 (m, 2H), 0.98 (dd, $J = 10.6$ and 6.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 174.88, 172.62, 139.10, 130.45, 129.80, 127.86, 72.17, 71.58, 71.55, 71.53, 71.24, 71.18, 70.46, 56.55, 53.15, 45.71, 42.11, 40.46, 40.41, 39.53, 33.77, 30.55, 27.73, 26.51, 26.03, 23.37, 22.22. HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{57}\text{ClN}_3\text{O}_8^+$, 646.3829; found 646.3850.

(S)-2-((2S,3R)-3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbutanamido)-N-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(6-chlorohexyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-methylpentanamide (1d).



The title compound was prepared from **9d** (9.4 mg, 11.9 μmol) according to the procedure described for **1a**. Yield: 5.3 mg (65%). Colorless amorphous solid. ^1H NMR (500 MHz, a mixture of $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 7.33 – 7.21 (m, 5H), 4.45 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.97 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 3.71 – 3.53 (m, 24H), 3.49 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.40 – 3.36 (m, 3H), 2.80 (dq, $J = 125.9, 6.9$ Hz, 2H), 1.81 – 1.75 (m, 2H), 1.65 – 1.58 (m, 5H), 1.49 – 1.44 (m, 2H), 1.42 – 1.37 (m, 2H), 0.96 (dd, $J = 10.9$ and 6.3 Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 175.18, 174.64, 139.62, 130.44, 129.72, 127.70, 73.11, 72.16, 71.56, 71.54, 71.25, 71.19, 70.48, 56.60, 53.07, 45.71, 42.14, 40.45, 40.42, 40.18, 33.77, 30.56, 27.74, 26.51, 26.04, 23.39, 22.20. HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{61}\text{ClN}_3\text{O}_9^+$, 690.4091; found 690.4090.

1.2. Biological assay

Cell culture condition and transfection.

Human embryonic kidney HEK293 cells were cultured in D-MEM containing 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and penicillin and streptomycin mixture at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Breast cancer cell line MCF-7 cells were cultured in D-MEM containing 10% heat-inactivated FBS, and penicillin and streptomycin mixture at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

HEK293 cells stably expressing HaloTag-CREB1 were established by co-transfection with HaloTag 7-CREB1 cDNA (Kazusa DNA Res. Inst.) and mRFP cDNA (OriGene Technologies, Inc.: for selection) using Lipofectamine LTX reagent and PLUS reagent (Invitrogen), and G418 (Nacal tesque) selection. MCF-7 cells were transiently transfected with HaloTag 7-c-jun cDNA (Kazusa DNA Res. Inst.) using Lipofectamine LTX reagent and PLUS reagent according to the manufacturer's instructions. Four hours after transfection, indicated compounds were treated for 21 h.

Western blotting.

Cells were washed with PBS, lysed in SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA and 50 mM Tris, pH 8.1) and boiled for 5 min. Protein concentrations were determined using bicinchoninic acid (BCA) protein assay and normalized by total protein concentration in each lysate. After boiling for 5 min with Laemmli buffer, each lysate was resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with SuperSepTM Ace 10-20% (Wako Pure Chemical Industries) and transferred onto PVDF membrane. After blocking with TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5) containing 5% skim milk, the transblotted membrane was probed with anti-HaloTag rabbit polyclonal antibody (Promega, 1:1000), anti- alpha 1 sodium potassium ATPase antibody ab7671 (Abcam, 1:1000), anti-lamin antibody H-110 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:500), anti-β-tubulin antibody (Boeringer Mannheim, 1:200), anti-β-actin antibody HRP conjugates I-19 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:1000), anti-mouse IgG antibody HRP conjugates 12-349 (Millipore, 1:1000), and anti-rabbit IgG-HRP conjugates (Amerham, 1:2000) in Can-Get-Signal solution (Toyobo). After probing, the membrane was washed twice more with TBS-T. The immunoblots were visualized by enhanced chemiluminescence with ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

Nuclear and cytoplasmic protein extraction

HEK293 cells were harvested with trypsin-EDTA and the cytoplasmic and nuclear fractions were extracted using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Fluorescence microscopic analysis

HaloTag-fused proteins expressed in HEK293 cells or MCF-7 cells on glass-base dishes were labeled

3. リガンドと結合部位を付与する方法論：

with HaloTag Oregon Green (Promega) according to the manufacturer's instructions, fixed with 10% formalin-PBS containing 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 (ICN Biomedicals) at room temperature for 30 min, and washed with PBS containing 0.05% Tween 20. Images were acquired using an IX70 inverted fluorescence microscope (Olympus).

WST-1 cell viability assay

Toxicity of compound **1b** was measured using Cell Counting Kit (Dojindo) according to the manufacturer's instructions.

4

結論

所属研究室で開発された化学的タンパク質存在量制御手法「プロテインノックダウン法」は、これまでに種々の標的タンパク質の存在量減少を達成している。その一方でプロテインノックダウン法では標的タンパク質に特異的に相互作用するリガンドが必要であり、リガンドの無い標的タンパク質に適用できないという問題があった。この問題を解決すべく、筆者はプロテインノックダウン法におけるリガンドを必要としない方法論の確立を目指し、以下の2つの研究課題を遂行した。

一つ目の研究課題では、HD 原因タンパク質 mHtt のプロテインノックダウンを試みた。mHtt は特異的に相互作用するリガンドが見出されていないため、筆者は mHtt そのものではなく、mHtt の凝集体を標的とした新規 SNIPER 「Agg SNIPER」によって mHtt 凝集体のプロテインノックダウンを行った。

設計・合成した2つの Agg SNIPER はいずれも mHtt の存在量を減少させることができた。また、メカニズム解析により、Agg SNIPER が mHtt 凝集体と cIAP1 の双方と相互作用し、プロテアソーム依存的に mHtt の存在量を減少させることが明らかとなった。

この研究成果により、筆者は標的タンパク質そのものではなく、その凝集を標的とする方法論を実証することができた。さらに、本研究成果は未だ対症療法しかない HD の根治療法の提案につながるものであると考えている。

二つ目の研究課題では、HaloTag を利用した汎用分解誘導システムの構築を試みた。HaloTag を融合した標的タンパク質を、HaloTag を標的とする新規 SNIPER 「HaloTag SNIPER」によって減少させるシステムを構築した。構築したシステムを用いて HaloTag 融合 CREB1、c-jun、TNF α の三種類のリガンドの無いタンパク質の存在量を減少させることができ、また、HaloTag-CREB1 を核内で減少させていることを確認した。本研究成果により、プロテインノックダウン法におけるリガンドを必要としない方法論として、標的タンパク質に対し共通のリガンドと結合部位を付与する方法論を実証することができた。また、構築したシステムを用いることで SNIPER を汎用することも可能になり、さらに、プロテインノックダウン法が核に局在するタンパク質にも適用できることが明らかとなった。

以上の2つの研究課題を通し、筆者は博士課程においてプロテインノックダウン法におけるリガンドを必要としない方法論を2つ実証し、限定的ではあるがプロテインノックダウン法をリガンドの無い標的タンパク質に対しても利用できるようになったと考えている。

今回報告した2つの研究課題について、更なる発展の余地が残っている。現在、それぞれの研究課題を更に展開させているところである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京大学分子細胞生物学研究所教授 橋本 祐一 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行および博士論文の執筆にあたり、終始暖かい御指導ならびに数々の御助言を賜りました東京大学分子細胞生物学研究所准教授 石川 稔 先生に深く感謝いたします。博士課程の3年間のうち半分は結果が出ず、辛く苦しい思いをしましたが、本研究を諦めずに遂行し、博士論文にまとめることができたのは石川先生のおかげであります。

本研究を遂行するにあたり、bestatin をご提供くださいました日本化薬株式会社、特に関根啓子博士に深く感謝いたします。

本論文の審査にあたり、有益な御指導並びに御助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科教授 井上 将行 先生、船津 高志 先生、富田 泰輔 先生、同准教授 花岡 健二郎 先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、様々な御助言をくださり、また、日々の研究生活において親しくしていただいた東京大学分子細胞生物学研究所 生体有機化学研究分野のスタッフや OB、同期、後輩の皆様には深く感謝いたします。

本研究の遂行ならびに進路等について、様々な御助言をくださいました国立医薬品食品衛生研究所研究員 三澤 隆史 博士、理化学研究所研究員 大金 賢司 博士、北里大学薬学部助教 唐木 文霞 博士に深く感謝いたします。

本研究の一部は日本科学協会 笹川科学研究助成の支援を受けて遂行いたしました。経済的な支援を賜りました日本科学協会に感謝いたします。

最後に、本学博士課程で研究する機会を与えてくださり、筆者を経済的、精神的に支え、暖かく見守ってくださった両親、そして、5年間の大学院生活に理解を示し、支えとなってくださった妻 菜奈に心より感謝いたします。

2016年 春
友重 秀介