

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 友重 秀介

## 研究背景

生体内においてタンパク質の存在量を制御する手法は、タンパク質の機能解析や生命現象解明、さらには疾患治療にも貢献する有用な手法である。現在、ノックアウトマウスの作製やゲノム編集技術、RNA 干渉など、逆遺伝学的手法が主流であり、生物学研究の現場において実際に利用されている。

近年、標的タンパク質の翻訳後に作用する、タンパク質存在量を化学的に制御する手法の開発が盛んに行われている。化学的手法では有機小分子を用いるため、操作や生体への導入が比較的容易であり、医薬応用への展開も期待されている。所属研究室では、このようなタンパク質存在量の化学的制御手法の一つとして、標的タンパク質特異的分解誘導手法「プロテインノックダウン法」を開発している [Itoh, Y. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820.]. これは、ユビキチンリガーゼ (E3) 活性を有するタンパク質 IAP のリガンドと標的タンパク質のリガンドを連結させた有機小分子 SNIPER により、標的タンパク質の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である (Fig. 1)。

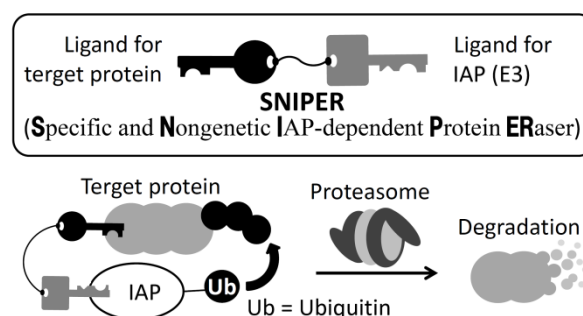


Fig. 1. Protein knockdown technology.

これまで、プロテインノックダウン法により種々のタンパク質の分解誘導が達成されてきたが、その一方で、SNIPER の部分構造に標的タンパク質のリガンドを必要とするため、リガンドの無いタンパク質には適用できないという制限があった。そこで著者は、プロテインノックダウン法の適用範囲を拡張すべく、以下の2つの研究課題を遂行した。

## 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

【背景・目的】ハンチントン病 (HD) は、神経変性疾患の一つであり、中枢神経系における神経細胞の脱落によって不随意運動や性格変化などの様々な症状を引き起こす疾患である。HD は常染

色体優性遺伝の遺伝性疾患としても知られている。現在、HD の治療法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。HD の発症原因として、Huntingtin (Htt) タンパク質の変異が挙げられる。変異 Htt (mHtt) は N 末端側のグルタミン繰り返し配列が野生型 Htt よりも異常に伸長した polyQ 部位を有している。

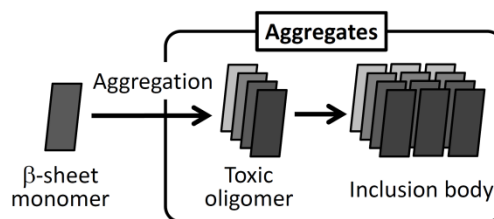


Fig. 2. Aggregation of misfolding proteins.

mHtt は polyQ 部位のために β シートに富んだ構造へと変換し、凝集性を示すようになる。生じた mHtt 凝集体がハンチントン病の発症に関与していると言われており、凝集体のなかでもオリゴマーの毒性が高いとされている (Fig. 2) [Ross, C. A.; Poirier, M. A. *Nat. Med.* **2004**, *10*, S10.]。

以上の背景から、本研究では、HD の根治を指向し、mHtt のプロテインノックダウンを目指すことにした。しかし現在、Htt に特異的に相互作用するリガンドは見出されておらず、従来の分子設計に基づいて mHtt を標的とする SNIPER を創製することはできない。そこで著者は、神経変性疾患の診断薬として創製された、凝集体に対するリガンド分子に着目した。凝集体リガンドの構造を有する SNIPER は、mHtt 凝集体とユビキチンリガーゼ IAP の双方と相互作用し、mHtt の分解誘導が可能になると考えた (Fig. 3)。この仮説に基づき著者は、凝集体を標的とする新規 SNIPER 「Agg SNIPER」の創製研究に着手した。

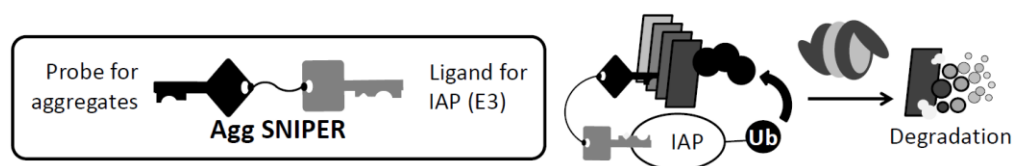


Fig. 3. Strategy for degradation of aggregates of mHtt using Agg SNIPER.

【分子設計】 現在、様々な凝集体リガンドが報告されているが、本研究では血液脳関門透過性や凝集体親和性が優れている BTA [Klunk, W. E. *et al. J. Neurosci.* **2003**, *23*, 2086., Mathis, C. A. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 295.] を選択し、Agg SNIPER として BTA および IAP リガンド BE04 からなる化合物 **1** を設計した (Fig. 4)。設計した **1** は 7 工程の有機化学反応を経て合成した。

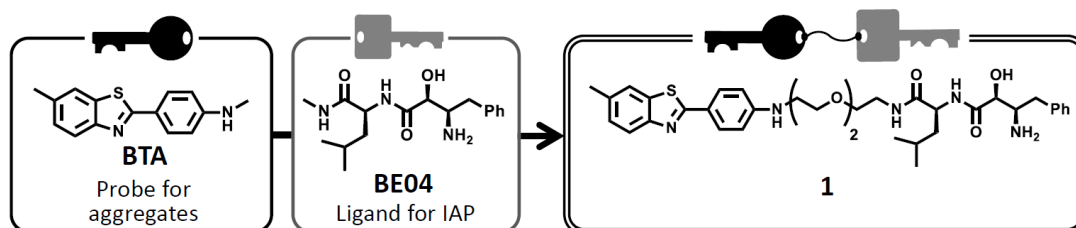
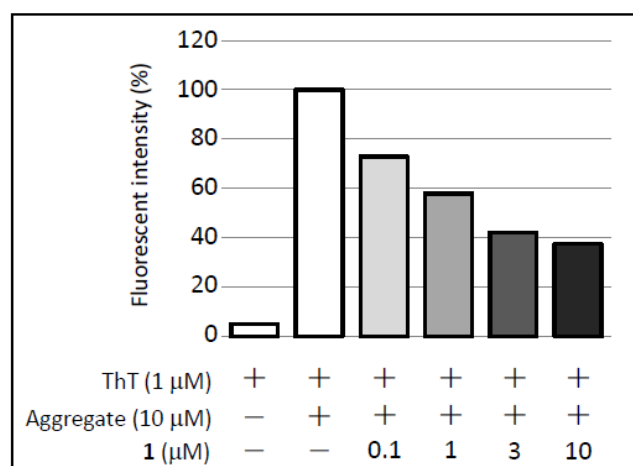


Fig. 4. Molecular design of Agg SNIPER.

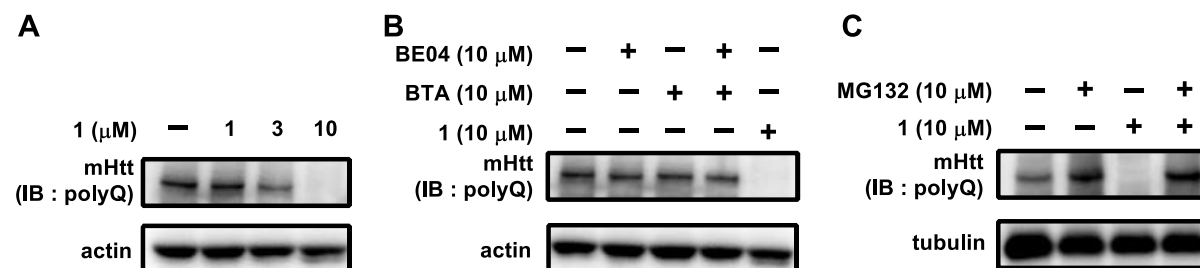
【結果】 化合物 **1** は BTA に対しより大きな構造を付加させていることから、**1** が凝集体との結合親和性を維持しているか確認することにした。結合試験では、蛍光色素 Thioflavin T (ThT) とグルタミンが 62 個連なったペプチドのモデル凝集体を用いた。ThT は凝集体との相互作用によって蛍光強度が増加する分子であり、蛍光強度によって ThT と凝集体の相互作用をモニターできる。したがって、**1** が凝集体親和性を有していれば、モデル凝集体と ThT を共存させた系に **1** を添加す

ると、ThT と凝集体の相互作用が競合阻害され、蛍光強度の減少が観測されるはずである。実験の結果、**1** の濃度依存的に蛍光強度が減少し、**1** が凝集体と相互作用することが示唆された(Fig. 5)。



**Fig. 5.** Binding assay. Inhibition of binding of ThT to Q<sub>62</sub> peptide aggregates by compound **1** was monitored by fluorescent intensity at 485 nm of ThT.

次に、HD 患者由来細胞を用いて **1** の mHtt 存在量減少活性を評価した。実験の結果、**1** は mHtt の存在量を濃度依存的に顕著に減少させた (Fig.6A)。また、**1** の部分構造である BTA および BE04 を単独あるいは併用処理したところ、これらの中では mHtt を減少させなかった (Fig. 6B)。さらに、プロテアソーム阻害剤と **1** の併用処理では mHtt 減少活性がキャンセルされ、mHtt の減少にはプロテアソームの関与が示唆された (Fig. 6C)。以上の結果から、リガンドが存在せず、かつ凝集性を示す神経変性疾患原因タンパク質のプロテインノックダウンを達成できたと考えている。



**Fig. 6.** Compound **1** reduced mHtt levels. (A)Western blot analysis of mHtt levels in HD fb. after 96 h treatment with compound **1**. (B)Western blot analysis of mHtt levels in HD fb. after 96 h treatment with BE04 and/or BTA, or compound **1**. (C)Western blot analysis of mHtt levels in HD fb. after 96 h treatment with compound **1**. Proteasome inhibitor MG132 was added to the culture 24 h prior to the lysis.

### リガンド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

**【背景・目的】** プロテインノックダウン法の適用範囲の拡張にあたり、筆者はアルキルクロライドと共有結合を形成する人工タグタンパク質 HaloTag [Loss, G. V. *et al.* *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 373.] に着目した。すなわち、HaloTag を SNIPER の共通の足場として利用した汎用システムを構築すれば、リガンドの有無に拘わらず、様々な標的タンパク質の分解を誘導できると考えた (Fig. 7)。以上の背景から、筆者は HaloTag を利用した汎用分解誘導システムの構築を目指し、本研究に着手した。

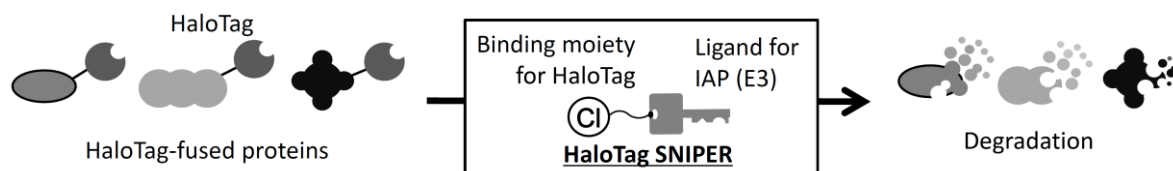


Fig. 7. Universal protein knockdown system using HaloTag-fused proteins and HaloTag SNIPER.

【分子設計】 HaloTag SNIPER として、HaloTag と結合するアルキルクロライド部分および IAP リガンド BE04 からなり、リンカー長の異なる化合物 **3a-d** ( $n=3-6$ ) を設計・合成した (Fig. 8)。

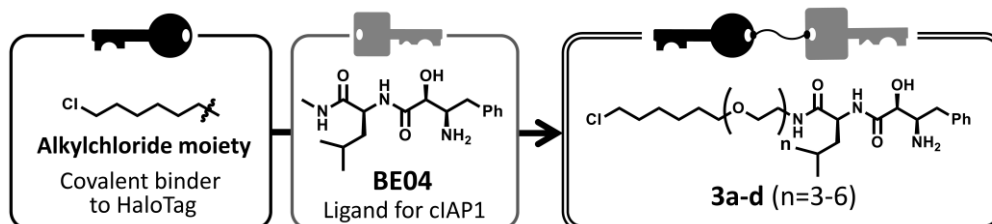


Fig. 8. Molecular design of HaloTag SNIPER.

【結果】 リガンドの無い標的タンパク質として CREB1、TNF $\alpha$ 、および c-jun を設定した。HaloTag を融合した上記タンパク質が発現する細胞株を用い、**3a-d** の活性評価を行った。実験の結果、各種 HaloTag 融合タンパク質のいずれかに対して化合物 **3a-d** のいずれかが存在量減少活性を示した (Fig. 9)。特に化合物 **3b** はいずれの HaloTag 融合タンパク質に対しても減少活性を示した。以上の結果から、作業仮説通りにリガンドの無いタンパク質の存在量減少を達成できた [Tomoshige, S. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9746.]。

なお、複数のグループが人工タンパク質を導入した動物を用いてタンパク質の機能解析を行っていることから [Neklesa, T. K. *et al. Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538., Dvorin, J. D. *et al. Science*, **2010**, 328, 910.], 本研究成果についても HaloTag 融合タンパク質を導入した動物を用いることで、標的タンパク質の機能解析が可能だと考えている。

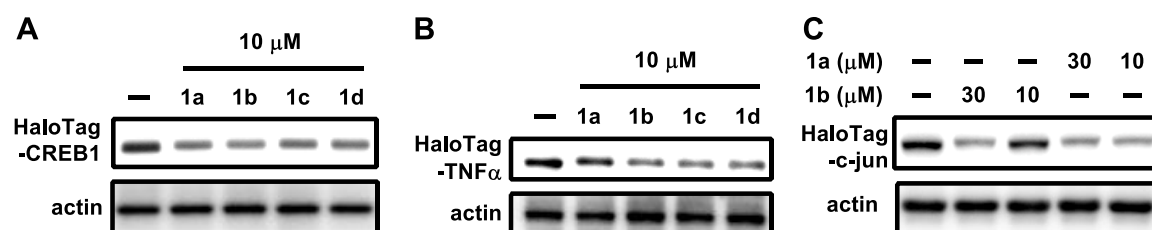


Fig. 9. Compounds **1a-d** reduced protein levels of HaloTag-fused proteins. (A) Western blot analysis of HaloTag-fused CREB1 levels in HEK293 cells stably expressing HaloTag-fused CREB1. (B) Western blot analysis of HaloTag-fused TNF $\alpha$  levels in HEK293 cells stably expressing HaloTag-fused TNF $\alpha$ . (C) Western blot analysis of HaloTag-fused c-jun levels in MCF-7 cells transiently expressing HaloTag-fused c-jun.

## 結論

以上の2つの研究成果を通し、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を確立することができた。