

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 友重 秀介

生体は、複雑に相互作用する様々な生命現象によって生を維持しており、その破たんは疾病の発症につながる。したがって、生命現象を理解することは単に知的欲求を満たすだけでなく、医学における新たな知見を提供し、疾病の予防や治療という形で我々の生の営みにも貢献する。生命現象を理解する主な手法として、タンパク質の存在量を制御する手法が開発されている。現在主流となっている手法は逆遺伝学的手法と呼ばれるものであるが、最近では、タンパク質の存在量を化学的に制御する手法の開発が隆盛しており、様々なグループがその発展に注力している。

友重秀介の所属研究室では、化学的手法の一つである、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。これは、ユビキチンリガーゼ (E3) 活性を有するタンパク質 cIAP1 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)。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分解誘導が達成されてきたが、その一方で、本手法は標的タンパク質のリガンドを必要とするため、適用範囲に限界があった。そこで友重は、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。

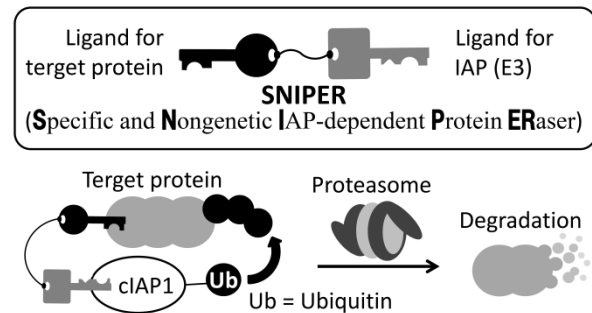


Fig. 1. Protein knockdown technology.

そこで友重は、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。

タンパク質の凝集を標的とする方法論の実証

ハンチントン病 (HD) は、中枢神経系の神経細胞が徐々に脱落することで様々な症状を引き起こす疾患である。HD の治療は対症療法のみであり、根治療法の開発が喫緊の課題である。HD では、原因タンパク質ハンチンチン (Htt) の変性が認められる。変性 Htt (mHtt) はβシート構造に富むため凝集性を示し、特に mHtt オリゴマー状態の毒性が高いとされている (Fig. 2)。これに対し友重は、プロテインノックダウン法によって mHtt を減少できれば、HD の根治につながると考えた。しかし、mHtt に対する特異的リガンドは現在見出されていない。そこで友重は、神経変性疾患の診断薬として創製された、変性タンパク質凝集体に相互作用する凝集体リガンドに着目した。すなわち、凝集体リガンドを部分構造に有する新規 SNIPER 「Agg SNIPER」は、mHtt そのものではなくその凝集体としての構造を標的とすることで mHtt の存在量を減少させ、結果、HD の根治につながる可能性がある (Fig. 3)。

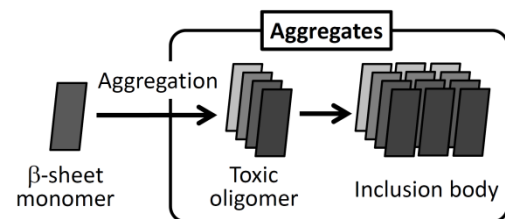


Fig. 2. Aggregation of misfolding proteins.

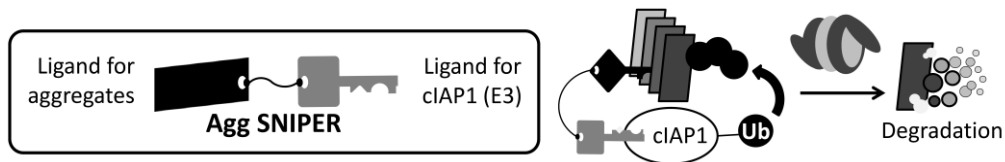


Fig. 3. Strategy for degradation of aggregates of misfolding proteins using Agg SNIPER.

この仮説に基づき、友重は mHtt のプロテインノックダウンを目指して Agg SNIPER の創製研究に着手した。友重は、凝集体リガンド BTA あるいは PDB と cIAP1 リガンド BE04 からなる化合物 **1** および **2** を設計・合成した (Fig. 4)。HD 患者由来細胞を用いた活性評価の結果、これらの化合物は内在する mHtt の存在量減少活性を有しており、Agg SNIPER の創製に成功した。この結果により、プロテインノックダウン法における凝集体を標的とする方法論の有効性が実証された。

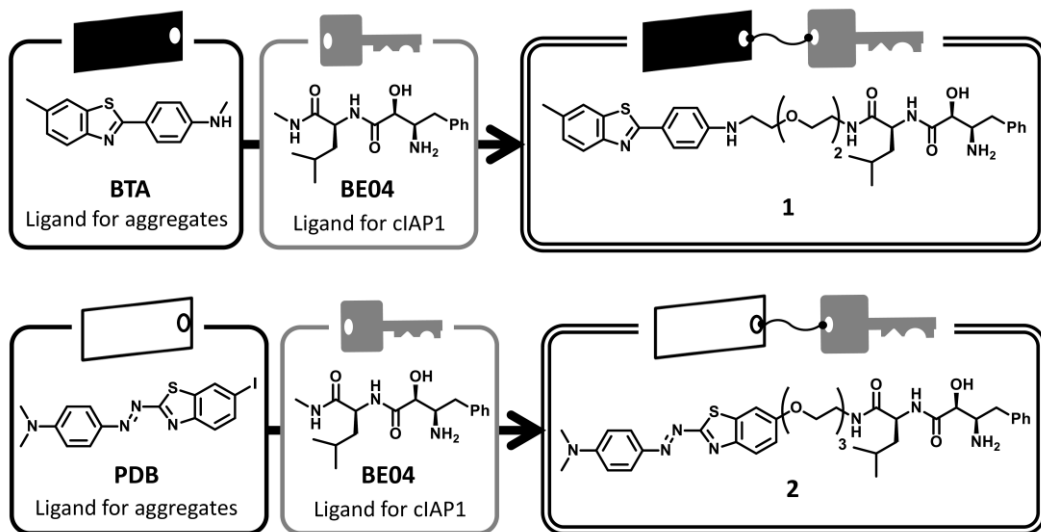


Fig. 4. Molecular design of Agg SNIPER.

リガンド結合部位を付与する方法論の実証

上述の研究により、プロテインノックダウン法におけるリガンドを用いない方法論の確立を実現できることがわかった。そこで友重は、リガンドを用いない新たな方法論の確立を目指すことにした。本研究課題において友重は、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 に着目し、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、リガンドの未知/既知に拘わらず、様々な標的タンパク質の分解を誘導できると考えた (Fig. 5)。この仮説を基に、友重は HaloTag を利用した汎用システムによるリガンド未知の標的タンパク質のプロテインノックダウンを目指し、本研究に着手した。

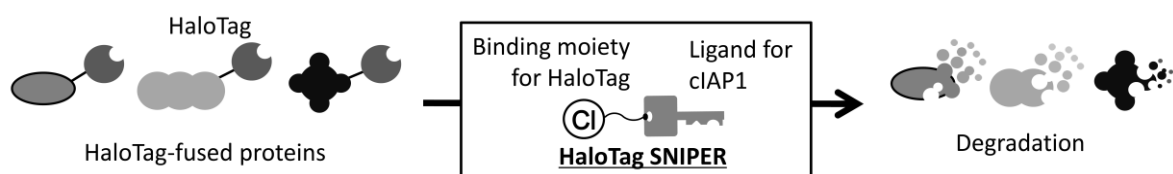


Fig. 5. Universal protein knockdown system using HaloTag-fused proteins and HaloTag SNIPER.

HaloTag を標的とする新規 SNIPER 「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 cIAP1 リガンド BE04 からなり、リンカー長の異なる化合物 **3a-d** ($n=3-6$) を設計した (Fig. 6)。

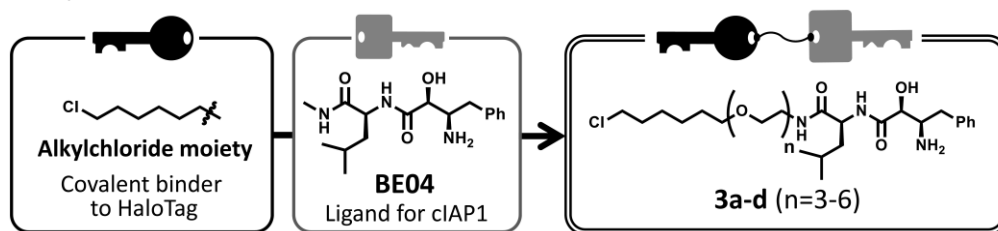


Fig. 6. Molecular design of HaloTag SNIPER.

各種 HaloTag 融合タンパク質を発現させた細胞株を用い、合成した化合物 **3a-d** の活性評価の結果、HaloTag 融合 CREB1、HaloTag 融合 TNF α 、HaloTag 融合 c-jun 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。特に化合物 **3b** はいずれの HaloTag 融合タンパク質に対しても活性を示した。この結果から、友重は HaloTag を利用したシステムによるリガンド未知の標的タンパク質のプロテインノックダウンを達成し、リガンドのないタンパク質に対してリガンド結合部位を付与方法論の実証に成功した。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、本研究成果についても標的タンパク質の機能解析に貢献することが充分期待できる。

以上、友重は二つの研究課題を通し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考案し、その有用性を実験的に実証した。本研究成果は、プロテインノックダウン法の適用範囲を拡張するものであり、現在注目されている「タンパク質存在量を化学的に制御する手法」の進展に寄与するものである。したがって、上記の成果は博士（薬科学）の学位授与に値するものであると判断した。