

奨励金No.1601

# PROTAC 製剤のオフターゲットユビキチン化評価系の確立

渡部 昌

北海道大学 講師



## Establishment of an evaluation system for off-target ubiquitination of PROTACs

Masashi Watanabe

Hokkaido University, Lecturer

本研究は、PROTAC 製剤のオフターゲット評価系確立を目指した。ユビキチンリガーゼプローブを安定発現する細胞株を樹立し、質量分析とウエスタンブロット法を用いてオフターゲット基質を同定・評価した。プロテアソームによる分解の有無に応じた解析条件を最適化し、オフターゲット基質群の層別化プロトコルを確立した。この評価系は安全性薬理試験に活用でき、毒性予測や作用メカニズム解明に貢献する。また、開発段階の PROTAC 製剤の迅速評価や、より選択的な製剤開発の基盤となることが期待される。

This study aimed to establish an off-target evaluation system for PROTAC compounds. Cell lines stably expressing ubiquitin ligase probes were established, and off-target substrates were identified and evaluated using mass spectrometry and Western blot analysis. Analysis conditions were optimized based on the presence or absence of proteasomal degradation, and a protocol for stratifying off-target substrate groups was established. This evaluation system can be utilized in safety pharmacology tests, contributing to toxicity prediction and elucidation of action mechanisms. It is also expected to serve as a foundation for rapid evaluation of PROTAC compounds in development and for the development of more selective formulations.

### 1. 研究内容

#### 1.1 背景

近年、難治性疾患に対する革新的な治療法として、PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimeras) が注目を集めている。これらの技術は、従来の低分子医薬や抗体医薬では標的とできなかった約 80% のタンパク質に対してアプローチできる可能性がある。PROTAC の構造は、標的タンパク質と結合するリガンド、ユビキチンリガーゼと結合するリガンド、そして両リガンドを連結するクロスリンカーから成り立っている。この構造により、PROTAC は標的タンパク質とユビキチンリガーゼを同時に結合させ、標的タンパク質のポリユビキチン化とプロテアソームによる分解を誘導する。

PROTAC は新しい薬剤モダリティとして大きな期待を集めているが、その新規性ゆえに安全性評価が重要な課題となっている。特に、意図しないタンパク質（オフターゲット基質）の分解による毒性の可能性について、詳細な調査が必要となる。しかし、PROTAC のオフターゲット評価手法はまだ確立されていない。本研究では、新たに開発されたユビキチン化基質同定法を応用し、PROTAC 製剤のオフターゲット評価系の確立を目指した。この研究は、PROTAC の安全性評価を向上させ、より効果的で副作用の少ない治療法の開発に貢献することが期待される。

## 1.2 方法と結果

### (1) オフターゲット評価プローブを安定に発現する細胞株の樹立

PROTACに頻繁に使用されるユビキチンリガーゼ遺伝子5種類を入手し、各遺伝子に対して2種類のプローブを設計し、合計10種類の基質捕捉用のユビキチンリガーゼプローブをレトロウイルス発現ベクターに組み込んだ。さらに、PROTAC依存性結合分子評価プローブの作製も行った。その後、作製したプローブベクターを用いてレトロウイルスを生成し、このウイルスを利用してプローブを安定に発現する細胞株を確立した。

### (2) PROTAC 標的タンパク質の同定

前項で作製した細胞を用いて、既知の基質に対する抗体を用いたウエスタンブロット解析を基に、PROTAC処理濃度、処理時間、プロテアソーム阻害剤使用の有無などの条件検討を実施した。この結果を元に質量分析実行までのプロトコルを確立した。その過程で、プロテアソームによって分解を受ける基質と、分解を受けない基質について、それぞれ異なる条件で評価することの重要性が明らかとなった。さらに、PROTAC依存性結合分子評価用プローブを導入した細胞溶解液を用いて、ユビキチンリガーゼに予め結合しているタンパク質、およびPROTAC処理によって結合量が増加するタンパク質を同定するための条件検討を行った。この結果、可溶化条件や薬剤処理条件などの最適化に成功した。確定した各条件に基づき、樹立した細胞株に薬剤処理を施し、2段階の精製プロセスを経てユビキチン化ペプチドを単離した。得られたペプチドは脱塩および濃縮処理を行い、質量分析に適した状態に調製した。加えて、PROTAC依存性結合分子評価用プローブを導入した細胞溶解液を用いて、ユビキチンリガーゼに予め結合しているタンパク質およびPROTAC処理によって結合量が増加するタンパク質の精製を行った。精製したタンパク質はタンパク質分解酵素によってペ

プチドに消化した後、脱塩および濃縮処理を実施し、質量分析に適した形態へと調製した。精製したオフターゲット評価サンプルおよびPROTAC依存性結合分子評価サンプルを、液体クロマトグラフィと連結したタンデム質量分析計を用いて網羅的に測定した。得られたオフターゲット基質同定用の測定データは、配列データベース検索ソフトウェアを使用してユビキチン化ペプチドと帰属するタンパク質を同定した。偽陽性を排除するため、別種のユビキチンリガーゼプローブで行った解析データと比較し、頻繁に誤同定されるユビキチン化ペプチドを除外した。さらに、PROTAC処理時と非処理時、またはPROTACかつプロテアソーム阻害剤併用処理時とプロテアソーム阻害剤単独処理時を比較することで、PROTACオフターゲット基質候補をリスト化した。PROTAC依存性結合分子評価用の測定データについても同様に、配列データベース検索ソフトウェアによってペプチドと帰属するタンパク質を同定した。偽陽性排除のため、別種のユビキチンリガーゼプローブで行った解析データと比較し、頻繁に誤同定されるペプチドを除外した上で、PROTAC処理時と非処理時を比較し、PROTAC依存的に結合する分子をリスト化した。

### (3) 同定タンパク質の妥当性評価

PROTAC処理群、非処理群、プロテアソーム阻害剤単独処理群、PROTAC／プロテアソーム阻害剤併用処理群のウエスタンブロット解析を実施し、PROTACによる分解量の評価を行った。加えて、PROTAC依存性結合分子評価用プローブを導入した細胞溶解液を用い、PROTAC処理群と非処理群に分けて抗体による免疫沈降を行った。これにより、予めユビキチンリガーゼに結合しているタンパク質およびPROTAC処理によって結合量が増加するタンパク質について、ウエスタンブロット解析を通じて検証を行った。次に野生型細胞株を用いて各条件で回収後、ユビキチン化タン

パク質の免疫沈降を実施した。基質候補抗体を使用して、標的タンパク質候補分子のユビキチン化がPROTAC処理によって増加するかどうかを検証した。一連の解析の結果、実際に複数のPROTACについてオフターゲット基質の同定に成功した。以上により、オフターゲット基質の同定と、その層別化プロトコルを確立した。

### 1.3 考察と展望

本研究では、PROTAC製剤が結合またはユビキチン化する標的外のタンパク質を網羅的かつ迅速に予測する評価系を確立した。研究開発において、PROTAC製剤で頻用されるユビキチンリガーゼに対応した基質同定プローブを作製し、このプローブを安定に発現する細胞株を樹立した。この成果は安全性薬理試験で利用可能なリソースとなり、意図しない毒性を未然に排除するための情報を取得する有力なツールとなる。具体的には、細胞の生存に必須なタンパク質やドライバーがん抑制遺伝子産物がオフターゲット基質に含まれているかどうかの検討が可能となる。また、毒性試験や臨床試験で有害事象が認められた場合、作用メカニズムを検討する際の重要な基礎データとなる。さらに、開発途上のPROTAC製剤をこの細胞株に投与することで、迅速にオフターゲット基質の評価を行うことができ、基礎研究のスクリーニング段階での活用も期待できる。構造情報と組み合わせることで、オフターゲット基質を回避し、標的とする基質のみに作用するPROTAC製剤へと改良するための基盤となる。

## 2. 発表（研究成果の発表）

本研究の成果は現在、投稿準備を進めております。貴財団の研究に対するご理解とご支援に心より感謝申し上げます。