

キメラ化合物を分解する細胞内プロテアーゼの同定

(名工大院工¹・東大院薬²・東大院医³) ○田原 海¹・中村 彰伸¹・鈴木 祥央¹・市橋 祐樹²・浦野 泰照^{2,3}・小松 徹²・築地 真也¹

Identification of intracellular proteases that degrade chimeric compounds (¹*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*, ²*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo*, ³*Graduate School of Medicine, The University of Tokyo*) ○Kai Tahara,¹ Akinobu Nakamura,¹ Sachio Suzuki,¹ Yuki Ichihashi², Yasuteru Urano^{2,3}, Toru Komatsu², Shinya Tsukiji¹

In chemical biology, various chimeric compounds, such as chemical inducers of dimerization, PROTACs, and self-localizing ligands, have been generated by connecting two functional molecules (e.g. ligands) via a linker with amide bonds. Such chimeric compounds have been considered to be stable in cells. However, we recently found that mgcTMP, a chimeric molecule consisting of trimethoprim and the myristoyl-Gly-Cys motif, undergoes degradation of the amide bond C-terminal to the Cys residue in cells. In this work, we identified proteases responsible for the mgcTMP degradation. We also tested several other amide-containing chimeric compounds for possible cellular degradation, revealing that even a simple lipid-tethered small molecule without any amino acid is susceptible to proteolytic degradation.

Keywords: *chimeric compound; self-localizing ligand; intracellular degradation; protease*

小分子リガンドなどの機能性分子を複数連結したキメラ化合物は、生命現象の解明や制御のための強力なツールとして注目されている。例えば、「化学二量化剤」、「PROTACs」、「局在性リガンド」などがキメラ化合物の代表例として挙げられる。これらキメラ化合物の設計では、2つの機能性分子をスパーサーを介してアミド結合で連結する場合が多く、これらは細胞内で安定であるという前提で使用する。本発表では、アミド結合を持つキメラ化合物は必ずしも細胞内で安定ではなく、構造によっては細胞内で分解されうることが報告する。

当研究室では以前に、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) に対する小分子リガンドトリメトプリム (TMP) に、ミリスチン酸-グリシン-システインを連結した化合物「mgcTMP」を開発した¹⁾。mgcTMPは動物細胞内に発現させた eDHFR 融合タンパク質を細胞質から細胞膜内膜へ移行させることができる。しかし、想定外なことに、その局在移行は一過的であり、その原因は mgcTMP 中のアミド結合の細胞内分解に起因することを見出した²⁾。このようなキメラ化合物の細胞内分解はほとんど研究されておらず、どのような酵素が分解に関与し、どのような構造のキメラ化合物が分解を受けやすいのかといった知見はほとんどない。そこで本研究ではまず、mgcTMPの分解酵素を Diced Electrophoresis Gel (DEG) 法³⁾、阻害剤アッセイ、ノックアウト細胞を用いた実験により同定した。さらに、mgcTMP以外の化合物についても評価することで、アミド結合連結型キメラ化合物の細胞内分解の一般性について評価した。

1) M. Ishida et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 12684–12689. 2) A. Nakamura et al. *ACS Chem. Biol.*, **2020**, *15*, 837–843. 3) T. Komatsu et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 6002–6005.