

## 双頭のキメラ化合物でタンパク質の分解を制御する： 標的タンパク質分解誘導薬開発の経緯、現状と課題

叶 直 樹

星薬科大学 医薬品化学研究所 生体分子有機化学研究室

### Degradation of target proteins by using heterobifunctional chimeric molecules: History and current status of targeted protein degraders

Naoki KANOHI

*Laboratory of Organic and Biomolecular Chemistry, Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University*

#### はじめに

タンパク質は、医薬品の最も重要な分子標的である。ヒトプロテオームには数万から 10 万種類のタンパク質が存在すると言われ、酵素をはじめとする多くのタンパク質が生体の恒常性を保つために重要な働きを担っている。また、疾患の様々なステージにおいて、特有な働きを持つタンパク質の存在が次々と明らかにされている。

これまでに開発されてきた多くの低分子医薬の標的がタンパク質に帰結したことから、特定の疾患関連タンパク質を標的とした薬、すなわち分子標的治療薬を開発する機運が前世紀末から今世紀初頭にかけて高まった。このような状況下、開発されたイマチニブ (グリベック®) は、タンパク質を狙い撃つ分子標的治療薬の成功例である。

一方、疾病治療薬の開発と共に、生物学を研究するためのツールとして有機小分子を利用しようとする機運も高まり、化学生物学 (chemical biology)、化学遺伝学 (chemical genetics)<sup>1)</sup>、ケミカルゲノミクス (chemical genomics)<sup>2)</sup> という学問領域がこの頃に誕生した。この中で、「化学遺伝学」は、ある表現型を生ずる有機小分子の標的タンパク質を同定し、その遺伝子を解明する「順化学遺伝学 (forward chemical genetics)」と、特定の遺伝子産物 (タンパク質) に対して特異的に作用する制御分子 (リガンド) を用いて、そのタンパク質の機能解析を行う「逆化学遺伝学 (reverse chemical genetics)」に分類できるが、逆化学遺伝学の発展には順化学遺伝学で研究された特異的阻害剤やリガンド分子の存在が必須であった。米国ハーバード大学の S. L. Schreiber らによるラパマイシンの標的分子 TOR (target of rapamycin) の発見<sup>3,5)</sup> や、東京大学の吉田稔らによるレプトマイシン B の標的分子 CRM1 の発見<sup>6,7)</sup> は、順化学遺伝学の成

功例であるが、これらの発見が、それぞれ、細胞の成長調節機構の理解や、細胞の核内輸送機構という、生命の基本的な仕組みの理解に繋がったのは、タンパク質特異的リガンドの発見が基礎科学の理解と発展に如何に重要であるかを物語っている。

これらの成功例を受けて、「原理的には全てのタンパク質に対する低分子リガンド (または制御分子) の取得が可能である」という作業仮説に基づき、ゲノム規模で網羅的かつ系統的にタンパク質機能制御分子を見だし、生命現象を理解するためのツールとして利用するという「ケミカルゲノミクス」の理念が唱われた。著者は、日本の化学遺伝学やケミカルゲノミクスの拠点であった理化学研究所に 2001 年から 2006 年にかけて在籍し、タンパク質リガンド探索技術<sup>8,9)</sup> や、生物活性分子の標的タンパク質探索技術<sup>10,11)</sup> の開発に携わり、幾つかの有用な技術の確立に貢献した。その内容に関しては参考文献を参考にして頂きたい。

さて、鳴り物入りで華々しく登場したケミカルゲノミクスであったが、十数年の歳月を経て再検証すると、特異的な低分子リガンドや制御分子が見いだされたタンパク質の数は限られており、「全てのタンパク質に対する低分子リガンドの取得」が困難であったことは明白である。その理由として、低分子有機化合物が特定のタンパク質の機能に影響を及ぼすためには、(1) ある程度の深さを持つ (酵素) 活性部位や、アロステリック部位に結合する (もしくは、はまり込む) 必要があり、そのような部位を持つタンパク質は酵素や特定のレセプターなどに限られること、また、(2) そのタンパク質の大部分 (例えば 90% 以上<sup>12)</sup>) に結合しなければならず、結果的に化合物を高濃度で添加する必要があるため、目的外のタンパク質に対して影響する「オフターゲット効果」が誘起されやすいこと、などが挙げられる。そこで、この

ような古典的低分子リガンドの標的となりうるタンパク質 (druggable target) は、全タンパク質の約 20% に過ぎないと言われている<sup>13)</sup>。

このような状況下、上記に挙げた古典的な低分子薬剤の欠点を克服できる標的タンパク質分解誘導薬と呼ばれる新しい中分子薬が近年注目を集めている<sup>14-19)</sup>。本稿では、これまでに報告されている標的タンパク質分解誘導薬の開発の経緯と現状、および課題に関して概説する。

ところで、標的タンパク質分解誘導薬は、英語では induced protein degrader または targeted protein degrader と呼ばれ、これらを用いたタンパク質分解技術は chemical protein knockdown technology (化合物を用いたプロテインノックダウン技術) と呼ばれる。標的タンパク質分解誘導薬は、本稿タイトルの「双頭のキメラ型化合物 (heterobifunctional molecules)」と「分子接着剤様化合物 (molecular glues)」に大別されるが (共に後述)、本稿では主に双頭のキメラ型化合物に焦点を絞って紹介することをご承知頂きたい。更に、それぞれの標的タンパク質分解誘導薬やリガンド類の性能を理解するために、時には解離定数 ( $K_D$ ) や試薬の濃度、反応時間など、詳細な記述を残すこととした。必要のない場合には読み飛ばして頂ければ幸いである。

### 1. タンパク質の分解を誘導する古典的低分子薬剤

標的タンパク質分解誘導薬は、その名前の通り、目的とするタンパク質の分解を誘導する薬剤を指すが、これは必ずしも新しい概念ではない。タンパク質の発現量を低下させる薬剤の古典的な例としては、微生物由来の二次代謝産物であるゲルダナマイシンが有名である。

ゲルダナマイシンは、分子シャペロンタンパク質 HSP90 (heat shock protein 90) の ATP 結合部位に結合することで、HSP90 のシャペロン活性を失わせる<sup>20)</sup>。すなわち、HSP90 は、クライアントと呼ばれる様々なタンパク質に結合し、それらが正しい機能を持つ立体構造に折りたたまれるのを助ける活性 (シャペロン活性) を持つが、HSP90 が機能不全に陥ると、クライアントタンパク質群が正しく折りたたまれなくなり、後述のユビキチン・プロテアソーム系での分解を受ける。よって、ゲルダナマイシンは、間接的に HSP90 のクライアントタンパク質の分解を誘導する。HSP90 のクライアントタンパク質は多岐にわたり、例えばヒトのリン酸化酵素では半数以上を占めるといふ報告がある<sup>21)</sup>。そのため、ゲルダナマイシンは、限られた種類のタンパク質を選択的に分解する薬剤と言うにはほど遠い。ゲルダナマイシンの類縁体は抗がん剤として臨床試験も実施されたが、上記のクライアント多様性により、その薬効がどんなタンパク質の分解に起因しているのか突き止めるのが難しいと言われており、薬として認可されたものは未だ無い。

### 2. ユビキチン依存性タンパク質分解系と標的タンパク質分解誘導薬

一方、最近注目を集めている標的タンパク質分解誘導薬は、生体内に備わっているユビキチン依存性タンパク質分解系 (ユビキチン・プロテアソーム系) を乗っ取って、特定のタンパク質の分解を誘導する薬剤である。標的タンパク質分解誘導薬について紹介する前に、まずはユビキチン依存性のタンパク質分解機構を概説する。

ユビキチン依存性タンパク質分解機構は、オートファジーと並ぶ、主たる生体内のタンパク質分解機構の一つである<sup>22)</sup>。ここでは、76 残基のアミノ酸からなるタンパク質ユビキチン (Ubiquitin: Ub) と、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3 ユビキチンリガーゼまたは E3 リガーゼ) と呼ばれる 3 種類のユビキチン化酵素、およびプロテアソームと呼ばれるタンパク質巨大複合体が鍵となる。このシステムは、手当たり次第にタンパク質を分解する訳ではなく、分解すべきタンパク質 (基質タンパク質) の選別と認識は、複数のタンパク質の複合体である E3 リガーゼにより厳密に行われる<sup>23)</sup>。

ユビキチン依存性のタンパク質分解機構の概要は以下の通りである (Fig. 1A)。まず、ATP 依存的にユビキチン活性化酵素 (E1) に導入されたユビキチン (Ub) がユビキチン結合酵素 (E2) に受け渡され、ユビキチン - E2 複合体が形成される (Step 1)。次に、ユビキチン - E2 複合体は、E3 リガーゼ、および基質タンパク質と複合体を形成し (Step 2)、形成された高次複合体は E2 から基質タンパク質へのユビキチンの転移を触媒する (Step 3)。E2 からのユビキチン転移は繰り返され、基質タンパク質にポリユビキチン鎖が導入される (Step 4)。ポリユビキチン化された基質タンパク質は、プロテアソームにより認識され、分解される (Step 5)。

ヒトでは 600 種を超える E3 リガーゼの存在が示唆さ

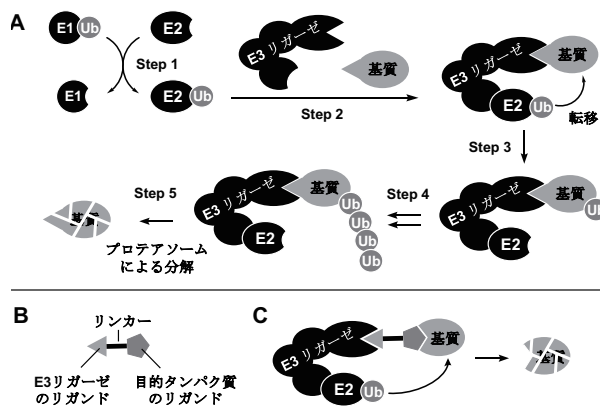


Fig. 1 ユビキチン依存性タンパク質分解系と標的タンパク質分解誘導薬の概要

れており<sup>24)</sup>、それぞれ固有の基質選択性を有している。生体内で様々なタンパク質の量が厳密に制御されているのは、このシステムのお陰である。

近年、研究が進められている標的タンパク質分解誘導薬は、このシステムを巧みに利用することで考案された。上述の通り、分解されるべき基質タンパク質は、固有のE3 リガーゼで制御されているため、このままでは目的とする別のタンパク質を分解できない。そこで、以下の方法が考えられた。E3 リガーゼに選択的に結合するリガンドと、目的タンパク質に選択的に結合するリガンドを準備し、リンカーとなる鎖状分子でこれらを連結したキメラ型分子を作成する (Fig. 1B)。このキメラ分子が細胞内に入れば、ユビキチン・E2・E3 リガーゼ複合体と目的タンパク質を連結して、ユビキチン・E2 複合体と目的タンパク質の近接化を引き起こすであろう (Fig. 1C)。すると、目的タンパク質のユビキチン化と続くプロテアソームによる分解が期待できる。この場合、キメラ分子は目的タンパク質の活性部位以外に結合しても良く、かつ触媒的に働き得るため、前述した古典的低分子薬の持つ欠点が回避できる。以上が標的タンパク質分解誘導薬の概念である。

後述するが、この概念のもとで開発され、改良された標的タンパク質分解誘導薬は、現在では *in vivo* 実験においても目的タンパク質の分解誘導活性を發揮することが示されており、多方面で大きな注目を集めている。

ところで、意外ではあるが、標的タンパク質分解誘導薬の概念が注目を集め、発展するようになった要因のひとつに、過去に大きな薬害を引き起こしたサリドマイドの標的分子と作用機作の解明があった。次節ではその経緯を紹介したい。

### 3. サリドマイド系免疫調節薬の標的分子は E3 リガーゼであった

サリドマイドは1950～60年代に40ヶ国以上で販売され、世界規模の薬害を生んだ鎮静剤である (Fig. 2)。つわりの軽減のために妊婦に処方されたが、妊娠後3～8週に服用した妊婦から生まれた胎児に四肢等の奇形が発生したため、販売が中止された。いわゆる「サリドマイド事件」である。一方、最近になって、サリドマイドやその類縁体であるポマリドミドやレナリドミド (Fig. 2) が多発性骨髄腫や骨髄異形成症候群などの疾病に有効であることが確認され、これらを総称したサリドマイド系免疫調節薬 (Immunomodulatory drugs: IMiDs, i はイミド化合物の imide を表す) が再度脚光を浴びることになった<sup>25)</sup>。しかしながら、それらの潜在的な催奇形性により、処方には厳密な制限がかけられている。2010年、東京工業大学の半田・伊藤ら (現東京医科大学) は、主作用と副作用との作用分離ができれば、より広い適用

拡大が可能となると考えた。そこでまず、サリドマイドの催奇形性の原因となっている分子標的と作用機作の解明を目指した研究を行った。

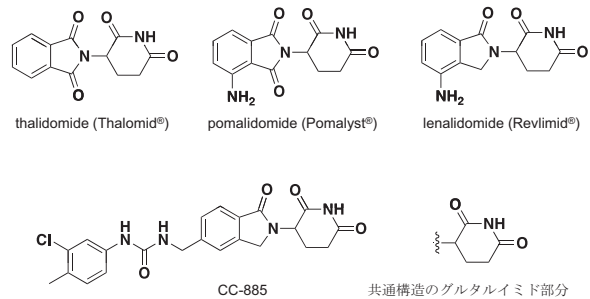


Fig. 2 代表的なサリドマイド系免疫調節薬 (IMiDs) とその共通部分構造

彼らは、独自に開発したアフィニティー樹脂技術<sup>26, 27)</sup>を用いて、サリドマイドの細胞内結合タンパク質探索を実施した。すなわち、サリドマイド誘導体を固定化したアフィニティー樹脂を用いて、細胞抽出液からこの樹脂に特異的に結合するタンパク質を探索した。その結果、セレブロン (cereblon; CRBN) と呼ばれる E3 リガーゼ複合体の構成タンパク質を同定した<sup>28)</sup>。更なる解析の結果、彼らは、サリドマイドが CRBN に直接結合し、内在性の基質タンパク質に対する CRBN の E3 リガーゼ活性を阻害すること、また、この機能阻害が催奇形性の直接の原因となることを明らかとした<sup>28)</sup>。

続く構造生物学的<sup>29)</sup> および分子生物学的<sup>30, 31)</sup> 研究により、以下のことが明らかとされた (Fig. 3)。通常、CRBN を含む E3 リガーゼ複合体は、内在性の基質タンパク質 (天然基質) を認識してユビキチン化し、分解に導く (Path A)。一方、サリドマイドを含む IMiDs は、その共通構造であるグルタリイミド部分 (Fig. 2) を介して、CRBN の基質認識部位、すなわち E3 リガーゼ複合体の基質認識に関わる部分と結合する (Fig. 3, Path B)。CRBN と IMiDs の解離定数 ( $K_D$  値) は 157～250 nM

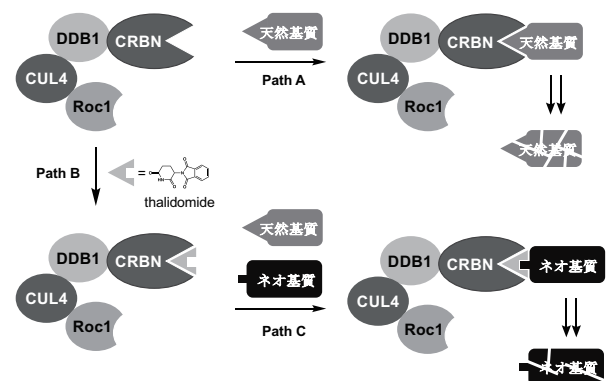


Fig. 3 サリドマイド系免疫抑制剤 (IMiDs) の作用機作

と見積もられている<sup>29)</sup>。その結果、CRBN・IMiD 複合体の表面に新しい基質認識部位が生じて、CRBN が認識する基質が変化する。そこで、別のタンパク質が新しい基質（ネオ基質 (neo-substrate) と呼ばれる）となり、ユビキチン化され、分解に導かれる (Path C)。

さて、CRBN の内在性基質の一つに MEIS2<sup>32)</sup> という転写因子があることが分かった<sup>29)</sup>。サリドマイドが CRBN に結合することにより、MEIS2 は CRBN に結合できなくなり、ユビキチン・プロテアソーム系での分解が抑制される。MEIS2 はヒトの発生過程への関与が指摘されている転写因子であり、そのタンパク量の制御異常と催奇形性との関連が示唆されている。これがサリドマイドの負の作用機作、いわゆる催奇形性発現のメカニズムの有力候補とされている。他にもグルタミン合成酵素<sup>33)</sup>、また、ごく最近では、手足や耳の発達を担う p63 タンパク質も有力候補となっている<sup>34)</sup>。

一方、IMiDs の薬効はどのように説明されるだろうか。レナリドミドを用いた解析の結果、レナリドミドが CRBN に結合すると、MEIS2 の代わりに骨髄腫細胞の増殖に重要な IKZF1 (別名 Ikaros) や IKZF3 (別名 Aiolos) と呼ばれる転写因子が CRBN・レナリドミド複合体表面に結合できるネオ基質になることが分かった<sup>30, 31)</sup>。これらのネオ基質が分解されることで、骨髄腫細胞などの増殖が阻害された<sup>30, 31)</sup>。これが IMiDs の薬効の作用機作であると考えられている。

これらの研究で解明された、IMiDs が生体のタンパク質分解機構を巧みに乗っ取る仕組みを創薬に生かすため、共通グルタルイミド構造を持つ IMiD ライブラリーから新規薬剤を開発する試みが行われている。米国 Celgene 社の研究者および上述の半田・伊藤らは、2016 年、様々ながん細胞株に対して増殖抑制作用を持つ化合物を IMiD ライブラリーからスクリーニングし、CC-885 (Fig. 2) を見いだした<sup>35)</sup>。CC-885 はサブ nM レベルで急性骨髄性白血病細胞の増殖を抑制するが、その作用機作は、CC-885・CRBN 複合体を含む E3 リガーゼ複合体に対して GSPT1 というタンパク質がネオ基質となって結合し、選択的に分解されるためであることが証明された<sup>35)</sup>。

上記の研究は、医薬品や基礎研究用ツール化合物の開発に大変有用であり、今後も有用な化合物の発見が期待できる。実際、エーザイと兵庫医療大学のグループは、スルホンアミド系抗がん剤が E3 リガーゼとネオ基質を繋ぐ「分子接着剤」となり、ネオ基質の分解誘導活性を持つことを報告している<sup>36)</sup>。しかしながら、「そのような薬剤を科学者がデザインする」という観点から見るとどうであろうか。レナリドミドや CC-885 が CRBN の基質認識部位に結合して、その複合体表面が IKZF1 や IKZF3、GSPT1 を認識するようになったのは、恐らく偶然

である。目的タンパク質と結合するように CRBN の表面を「改変」する化合物を、科学者が正確にデザインするのは、コンピューターの性能が上がり、様々なドッキングプログラムが開発された現在でも困難な課題であろう。

#### 4. 標的タンパク質分解誘導薬開発の歴史と現状

現時点において、この問題に対するより現実的な解が「双頭のキメラ型化合物」である。すなわち、CRBN などの E3 リガーゼの基質認識部位に結合するリガンド (E3 リガーゼリガンド、または E3 リガンド) と、分解したい目的タンパク質に対するリガンド (標的タンパク質リガンド) を別々に用意し、リンカー分子で結合させたヘテロ二機能性リガンドの利用である (Fig. 1B)。この方法論では、E3 リガーゼの基質認識部位で起こる偶然に期待するのではなく、E3 リガーゼおよび標的タンパク質それぞれの受容体に対するリガンドの設計を独立して行えば良いため、少なくとも設計の難易度は格段に低い。

現在開発されている標的タンパク質分解誘導薬はこのような概念のもとで設計されているため、既存の古典的な小分子薬とは異なり、タイトルにもある「双頭のキメラ化合物」、すなわち、2つのリガンドがリンカー状分子で繋がれたヘテロ二機能性分子という「顔」を持つ。

さて、上記の通り、標的タンパク質および E3 リガーゼに対するリガンド、およびそれらを繋ぐ鎖状分子は、目的に応じて個別に設計される。標的タンパク質は目的によって異なることから、そのデザインの詳細は本稿の範囲を超えるため、詳細には述べない。一方、利用される E3 リガーゼの種類は現在のところ限られており、いくつかの主要な E3 リガンドのデザインは、そのプロトタイプとなる分子 (ペプチド) に基づいて、非常に合理的に行われてきた歴史がある。事実、これまでの標的タンパク質分解誘導薬開発の歴史は、E3 リガンドの開発の歴史といえる。

そこでまず、主に E3 リガンド設計に関する開発の経緯を中心に、標的タンパク質分解誘導薬開発の歴史を紐解いてみたい。その後、最近の標的タンパク質分解誘導薬で利用されている標的タンパク質リガンドやリンカーの例を見た上で、現在の標的タンパク質分解誘導薬がどの位進歩しているかについて概説したい。

#### 5. E3 リガーゼの基質ペプチドを原型とした E3 リガンド開発

E3 リガンドが標的タンパク質分解誘導薬の開発に有用であることを認識し<sup>37)</sup>、最初の論文を 2001 年に報告したのは、実は IMiD 関連研究を行った研究者ではなく、Yale 大学の C. M. Crews らのグループである<sup>38)</sup>。E3 リガー

ぜには3つのクラス、すなわちRING (really interesting new gene) ファミリー、HECT (homology to F6AP C-terminus) ファミリー、RBR (RING between RING) ファミリーが知られているが<sup>23)</sup>、彼らはまず、RING ファミリーに属するSCF (Skp1-Cullin-F box) 複合体の利用を考えた (Fig. 4A)。F-box タンパク質として知られる $\beta$ -TRCPは、SCF E3 リガーゼ複合体 ( $SCF^{\beta-TRCP}$  複合体) の一部となり、I $\kappa$ B $\alpha$  と呼ばれる因子をリクルートしてユビキチン化し、分解する (Fig. 4A)。 $\beta$ -TRCPは、I $\kappa$ B $\alpha$  中のリン酸化されたデカペプチド DRHDS\*GLDS\*M (I $\kappa$ B $\alpha$  ホスホペプチド: S\*はリン酸化されたセリン残基) を認識するため、これがE3 リガンドになると考えた。そこで彼らは、このI $\kappa$ B $\alpha$  ホスホペプチドを、微生物の二次代謝産物オバリシンと炭化水素鎖を介して連結し、最初の標的タンパク質分解誘導薬であるI $\kappa$ B $\alpha$ -OVAを創製した (Fig. 4B)<sup>38)</sup>。オバリシンは、細胞内でメチオニンアミノペプチダーゼ (MetAP-2) という酵素と共有結合を形成する化合物である。

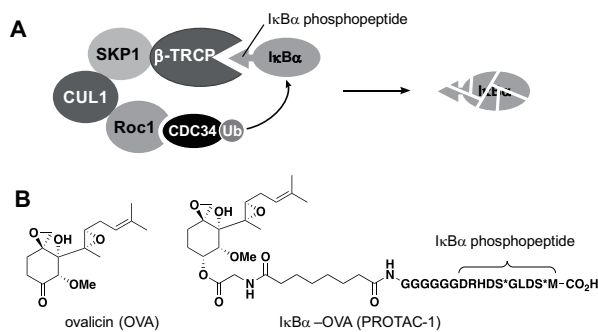


Fig. 4  $SCF^{\beta-TRCP}$  複合体によるI $\kappa$ B $\alpha$  分解機構の概要と、微生物二次代謝産物オバリシンを利用した最初の標的タンパク質分解誘導薬

I $\kappa$ B $\alpha$ -OVA が MetAP-2 の分解を誘起するかを確認するために、アフリカツメガエル卵抽出物に含まれる  $SCF^{\beta-TRCP}$  複合体を用いた *in vitro* 実験が行われた<sup>38)</sup>。MetAP-2 (9  $\mu$ M) を I $\kappa$ B $\alpha$ -OVA (50  $\mu$ M) で前処理し、MetAP-2 と I $\kappa$ B $\alpha$ -OVA の共有結合体を形成させた後、アフリカツメガエル卵抽出物と混合したところ、この共有結合体は、 $SCF^{\beta-TRCP}$  複合体の天然基質ではないにも関わらずユビキチン化され、混合後 30 分でほぼ分解された。このことから、I $\kappa$ B $\alpha$ -OVA が、アフリカツメガエル卵抽出物に内在する  $SCF^{\beta-TRCP}$  複合体を用いても、標的タンパク質分解誘導薬として働くことが確認された。Crews らはこのタイプの標的タンパク質分解誘導薬を PROTAC (proteolysis-targeting chimeric molecule、後に proteolysis-targeting chimera) と名付け、現在でもその呼称を使用している。彼らは更に、目的タンパク質として、エストロゲン受容体 (ER) やアンドロゲン受容体 (AR) を利用し、これらのリガンドであるエストラジオール

(E2) やジヒドロテストステロンを前述の I $\kappa$ B $\alpha$  ホスホペプチドとそれぞれ連結した PROTAC (PROTAC-2 と PROTAC-3) を創製し、これらが試験管内で、または細胞内にマイクロインジェクションした際に、目的タンパク質の分解を引き起こすことを示した<sup>39)</sup>。試験管内の実験 (30、60 分) では、PROTAC-2 (I $\kappa$ B $\alpha$ -E2) は 0.1-1  $\mu$ M の濃度から ER のユビキチン化を引き起こし、最大有効濃度は 5-10  $\mu$ M であった。興味深いことに、より高濃度 (500  $\mu$ M) の PROTAC-2 添加では ER のユビキチン化は逆に抑制された。

さて、これらの PROTAC は、試験管内、細胞抽出液中、および細胞内で目的とするタンパク質の分解を誘起したものの、E3 リガンドとしてリン酸化ペプチドを用いているため、細胞膜の透過能に問題があった。そこで Crews らは、細胞膜透過性 PROTAC の創製を目的として、E3 リガンドとしてヘプタペプチド ALAPYIP の利用を考えた<sup>40)</sup> (Fig. 5)。このペプチドは、転写因子 HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ 、低酸素誘導因子 1 $\alpha$ ) の E3 リガンドとなる最小構造として知られており、通常の酸素濃度下では、中央に存在するプロリンの 4 位が細胞内のプロリン水酸化酵素により水酸化された後に、VBC-Cul2 E3 リガーゼ複合体の基質認識ユニットである VHL (von Hippel-Lindau 癌抑制タンパク質) に認識されてユビキチン化され、分解される (Fig. 5A)。

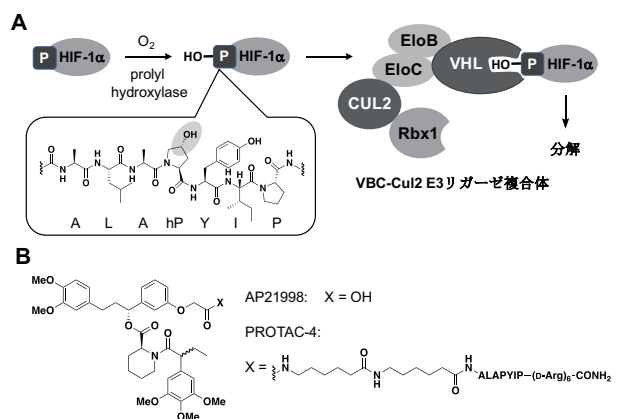


Fig. 5 VBC-Cul2 E3 リガーゼ複合体による HIF-1 $\alpha$  分解機構の概略と、ヘプタペプチドを利用した標的タンパク質分解誘導薬

多くの E3 リガーゼがリン酸化ペプチドを認識するのに対し、VHL は、リン酸化ペプチドよりも化学的に安定と考えられる、ヒドロキシプロリンを含むペプチドを認識するため、ヘプタペプチド ALAhPYIP (hP: 4-ヒドロキシプロリン) は、より安定な PROTAC の創製に有利と考えられた。更に、薬剤の細胞膜透過性を担保するために、ポリ D-アルギニンタグ (D-Arg)<sub>6</sub> を前述の 7 アミノ酸ペプチドの C-末端に導入した新規 E3 リガンドを

設計した (Fig. 5B)。Crews らは、これを FKBP12 (微生物二次代謝産物の FK-506 に特異的に結合する 12 kDa のタンパク質) の F36V 変異体に対する選択的リガンドである AP21998 に連結した PROTAC-4 を創製した (Fig. 5B)<sup>40)</sup>。PROTAC-4 を、FKBP12 (F36V) を過剰発現させたヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に 25  $\mu$ M の濃度で添加したところ、2.5 時間後に FKBP12 (F36V) の大幅な減少が見られた。一方、前述のジヒドロテストステロンを今回の E3 リガンドに連結させて合成した PROTAC-5 を、アンドロゲン受容体と GFP の融合タンパク質 (GFP-AR) を過剰発現させたヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に添加したところ、同様に 25  $\mu$ M の濃度で GFP-AR の減少が確認された<sup>40)</sup>。

ペプチドを基盤とした E3 リガンドは、他の PROTAC にも利用されている<sup>41, 42)</sup>。

### 6. ペプチドから小分子に：E3 リガンドの小分子化

これらのペプチドを基盤とした E3 リガンドは、有用ではあったが、合成・精製の手間や、ペプチドゆえの不安定性などが、更なる適用範囲の拡大の障害になると考えられた。そこで次に、E3 リガンドをペプチド以外の有機小分子に置き換えることが検討された。そこで候補とされたのが、2004 年に開発された、癌抑制タンパク質 p53 とその制御タンパク質 MDM2 間のタンパク質タンパク質相互作用阻害剤であるニュートリン類<sup>43)</sup> である。

MDM2 は E3 リガーゼの一種で、基質として p53 を認識してユビキチン化し、分解に導く (Fig. 6A)。p53 の発現量の上昇は、細胞周期の停止と細胞死を誘導するため、ヒトの癌において p53 の不活性化は頻度高く見られる。そこで「p53 と MDM2 の相互作用<sup>44)</sup> を阻害する化合物は p53 の分解を抑制し、癌細胞の細胞死を誘導する」との作業仮説から、p53-MDM2 相互作用阻害剤のスク

リーニングが実施された。

通常、タンパク質間相互作用は低分子化合物で阻害するのが難しいと考えられている。しかしながら、MDM2 と p53 部分ペプチド複合体の X 線結晶解析により、MDM2 が比較的深く疎水性の高いポケットを持つことが分かっていたこと<sup>45)</sup> が p53-MDM2 相互作用阻害剤探索のモチベーションになっていたようである。

このような経緯から p53-MDM2 相互作用阻害剤 (または MDM2 リガンド) として開発されたのが *cis*-イミダゾリンアナログ化合物の一種、ニュートリン類である<sup>43)</sup> (Fig. 6B)。ニュートリン類は当初、ラセミ体として合成され評価されていたが、見いだされた 3 種のニュートリン類のうち、最も活性の高い化合物であるニュートリン-3 の一方の鏡像体は、p53-MDM2 相互作用を IC<sub>50</sub> 値 0.09  $\mu$ M の濃度で阻害し、他方の鏡像体の IC<sub>50</sub> 値は 13.6  $\mu$ M であった。ヒト MDM2 とニュートリン-2 複合体の X 線結晶解析から、ニュートリンが p53 ペプチドを模倣していることが示された。

まず、ニュートリン類の細胞レベルでの効果が評価された。ニュートリン-1 をヒト結腸癌由来 HCT116 細胞に 1 ~ 8  $\mu$ M の濃度で 8 時間処理したところ、p53 と MDM2、p21<sup>Waf1/Cip1</sup> の細胞内発現レベルの上昇が確認された。p21<sup>Waf1/Cip1</sup> は、p53 により転写が促進されるタンパク質である。p53 の発現レベルの上昇は、正のフィードバックにより MDM2 レベルの上昇も引き起こすことが知られている。更に、ニュートリン-1 の投与によるこれらのタンパク質の発現レベル上昇は、p53 が変異または欠失した細胞株では見られなかったことから、これらの現象は細胞内でニュートリンが MDM2-p53 相互作用を実際に阻害した結果であることが強く示唆された。最も活性の高いニュートリン-3 活性型鏡像体を、ヒトおよびマウスの癌および正常細胞株に投与すると、その増殖が阻害された。興味深いことに、癌細胞株 (ヒト骨肉腫由来 SJSA-1 細胞) では細胞増殖および生存に対する IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 1.5  $\mu$ M、3  $\mu$ M であったのに対し、正常細胞株 (ヒトの皮膚由来 1043SK およびマウス胎児皮膚由来 NIH/3T3 細胞株) では、1.3 ~ 2.2  $\mu$ M の IC<sub>50</sub> 値で増殖は阻害したものの、10  $\mu$ M の濃度で 1 週間処理しても細胞は増殖能を保っていた。ニュートリン-3 は、ヌードマウスのヒト癌移植モデルにおいても治癒効果を示した<sup>43)</sup>。

この結果を受けて、Crews らは、E3 リガンドとしてニュートリン-3 光学活性体、タンパク質リガンドとしてアンドロゲン受容体モジュレーター SARM (selective androgen receptor modulator) を連結した完全低分子化 PROTAC を設計し (Fig. 6C)、これを合成した<sup>46)</sup>。SARM は、アンドロゲン受容体と基質アンドロゲンの結合を阻害定数  $K_i$  = 4 nM で阻害する化合物である<sup>47)</sup>。

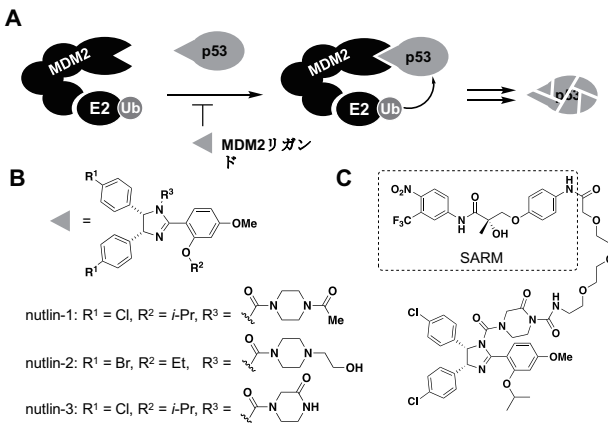


Fig. 6 MDM2 による p53 の分解機構と p53-MDM2 相互作用を阻害するニュートリン類の構造、およびこれらを利用した PROTAC

合成した低分子化 PROTAC を、アンドロゲン受容体を一過的に過剰発現させた HeLa 細胞に 10  $\mu\text{M}$  の濃度で 7 時間処理したところ、アンドロゲン受容体発現量の低下が確認された。この発現量の低下は、プロテアソーム阻害剤の前処理で阻害されたため、プロテアソーム依存的であることが確認された。本結果は、細胞膜透過性を備えた完全低分子化 PROTAC 創製に関する初の報告である<sup>46)</sup>。また、最近になって、異なるニュートリン系化合物が MDM2 リガンドとして活用されている<sup>48)</sup>。

一方、アンドロゲン受容体は MDM2 の基質であり<sup>49)</sup>、ニュートリンの処理のみでアンドロゲン受容体の発現量が低下することから<sup>50)</sup>、この PROTAC が本当に PROTAC として機能しているかの検証が必要との指摘もある<sup>14, 17, 18)</sup>。

### 7. ペプチド性 E3 リガンドの構造改変による合理的な小分子 E3 リガンドのデザイン

ニュートリン類の発見後、幾つかの小分子 E3 リガンドが発見され、報告されたが、リン酸化ペプチドを小分子化する合理的な分子デザインも報告されている。2012 年、Crews らは、前述した HIF-1 中の VHL 基質ペプチド ALAhPYIP の小分子化を検討した<sup>51)</sup>。HIF-1 $\alpha$  では、564 番目のプロリンが酸化されたヒドロキシプロリンが VHL との相互作用の鍵となることが分かっているため、まずこの残基を分子デザインの開始点とした (Fig. 7)。HIF-1 $\alpha$  ペプチドと VHL の共結晶の構造情報<sup>52)</sup> から重要と考えられた相互作用を模倣するように、コンピュータプログラムを用いてイソオキサゾールとベンジル基を有する VHL リガンド 1 をデザインした。リガンド 1 は、蛍光標識した HIF-1 $\alpha$  ペプチドと VHL との結合を阻害し ( $\text{IC}_{50} = 117 \mu\text{M}$ )、かつ NMR 実験により VHL との特異的な相互作用が観察されたことから、最小のファーマコフォアであると確認された。そこで、固相合成を用いて、置換ベンジル基を有する多数の類縁化合物を合成し、評価した結果、蛍光ペプチドと VHL の結合をより低い

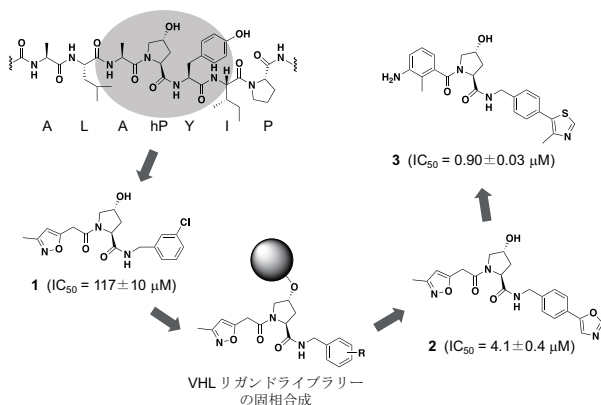


Fig. 7 VHL 基質ペプチドの小分子化 (各化合物の  $\text{IC}_{50}$  値は本文参照)

濃度 ( $\text{IC}_{50} = 4.1 \mu\text{M}$ ) で阻害する VHL リガンド 2 の取得に成功した<sup>51)</sup>。Crews らは、VHL リガンド 2 の系統的な部分構造改変と評価を繰り返して、詳細な構造活性相関情報<sup>53, 54)</sup> を得ることで、2 を更に改良した VHL リガンド 3 ( $\text{IC}_{50} = 0.90 \mu\text{M}$ ) の創製にも成功した。

### 8. E3 リガンドのレパートリー

上述のニュートリンや VHL リガンド類の他にも E3 リガンドは多数報告されており、その例を Fig. 8 に挙げる。

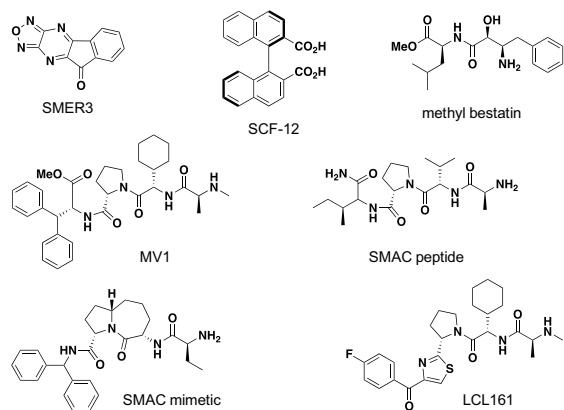


Fig. 8 小分子 E3 リガンド

SMER3 (small-molecule-enhancer of rapamycin 3) は、その名前の通り、免疫抑制剤ラパマイシンの作用を増強させる薬剤のスクリーニングから発見された化合物である。作用機作解析の結果、Met30 というサブユニットを基質認識部位として持つ E3 リガーゼ複合体  $\text{SCF}^{\text{Met30}}$  のユビキチンリガーゼ活性を阻害する化合物として見いだされた<sup>55)</sup>。更なる解析の結果、SMER3 は Met30 に直接結合するという結果が得られた一方、SMER3 は  $\text{SCF}^{\text{Met30}}$  複合体自身を解離させる (もしくは複合体形成を阻害する) という結果も得られているため<sup>55)</sup>、SMER3 は  $\text{SCF}^{\text{Met30}}$  の基質認識部位以外に結合するのかもしれない。

SCF-12 は、 $\text{SCF}^{\text{Cdc4}}$  E3 リガーゼによる基質タンパク質認識を阻害する化合物のスクリーニングにより得られた、軸不斉を有する化合物である<sup>56)</sup>。本化合物は、ラセミ体として実験に用いられていたが、 $\text{SCF}^{\text{Cdc4}}$  の基質認識タンパク質である Cdc4 との共結晶解析により、R 体のエナンチオマーのみが Cdc4 に認識されていたことから、R 体が活性本体であると思われる。

ジペプチドであるベスタチンのメチルエステル体であるメチルベスタチンも E3 リガンドの一種である。東京大学の内藤 (現国立医薬品食品衛生研究所) らは、メチルベスタチンが E3 リガーゼ活性を持つタンパク質 cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1) に結合すること、また、メチルベスタチンが cIAP1 に結合すると、cIAP1 の自己ユビキチン化を活性化して、プロテ

アソームによる分解を促進することを見いだした<sup>57)</sup>。

IAP ファミリータンパク質に結合するペプチド化合物としては、他にも MV1<sup>58)</sup> や SMAC ペプチド<sup>59)</sup> が知られている。IAP タンパク質はがん治療の標的分子として以前から注目されているため、他にも多数のリガンド (IAP アンタゴニスト) が知られているが、細胞内での安定性や細胞膜透過性の構造を狙って小分子化されたものも多く、例えば SMAC ペプチドを小分子化した SMAC mimetic<sup>60)</sup> や Novartis 社が開発した LCL161 がその例である。

当然ではあるが、本項の最初に述べた、標的タンパク質分解誘導薬研究の活性化にも繋がった IMiDs (Fig. 2) も小分子 E3 リガンドの範疇に含まれる。

### 9. 改良された E3 リガンド：標的タンパク質分解誘導薬への応用

このように発見された E3 リガンドを、標的タンパク質分解誘導薬に応用するため、構造最適化およびリンカー分子導入位置の最適化が実施されている。例えば Crews らは、前述の VHL リガンド 3 (Fig. 7) を PROTAC 創製のための E3 リガンドとして最適化し、リガンド 4 や 5 などを創製している (Fig. 9)<sup>61)</sup>。図中、黒丸で示した部分は、リンカーを導入する部分を意味しているが、興味深いのは、リガンド 4 ではその部分が分子の左末端 (ペプチドで言うならば N 末端部分) にあるのに対し、5 では分子右側の芳香環上に位置していることである。これは、単に E3 リガンドと言っても、分解すべき標的タンパク質のリガンドと単に結合させれば良いのではなく、標的タンパク質およびそのリガンドに依存して構造最適化が必要であることを意味している。実際、E3 リガンドの配向とタンパク質リガンドを繋ぐリンカーの長さが標的タンパク質分解の効率に大きく関わることが報告されている<sup>61)</sup>。X 線結晶解析を元に構築された、E2 と E3 リガーゼ (SCF<sup>Skp2</sup> 複合体) のモデルでは、E2 のユビキチン転移部分であるシステイン残基と F-box タン

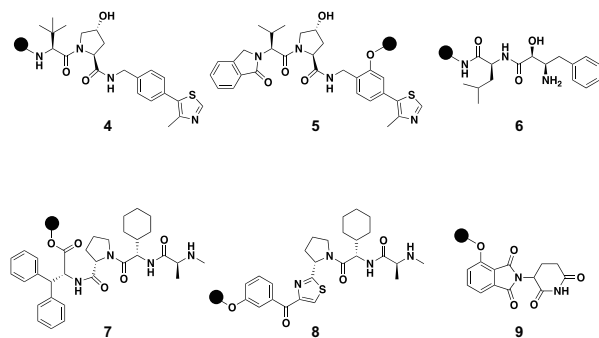


Fig. 9 標的タンパク質分解誘導薬に改良または最適化された E3 リガンド類 (黒丸はリンカーを導入して標的タンパク質リガンドを結合させる位置を表す)

パク質の基質認識部位の距離は約 50 オングストロームと見積もられている<sup>62)</sup>。

Crews らによって開発された、VHL リガンドを利用した PROTAC は、膜透過性に優れ、培養細胞系では nM 以下の投与濃度で目的タンパク質の分解を誘導する活性を持っている<sup>63, 64)</sup>。

メチルベスタチン (Fig. 8) も標的タンパク質分解誘導薬のための E3 リガンドとして開発されている。メチルベスタチンの構造中、メチルエステルのメチル基を他の構造に変換しても、その cIAP1 分解活性は維持されるが<sup>65)</sup>、興味深いことに、ここにリンカーを導入して他のタンパク質のリガンドを連結すると、cIAP のみならず、リガンドを介して連結したタンパク質も cIAP の E3 リガーゼ活性によりユビキチン化され、プロテアソームによる分解を受ける。

国立医薬品食品衛生研究所の内藤および東京大学の橋本らは、このシステムを用いた標的タンパク質分解誘導薬を SNIPER (specific and nongenetic inhibitor of apoptosis protein (IAP)-dependent protein eraser) と名付けて開発を続けている。その過程で、メチルベスタチン由来のリガンド 6 を用いた SNIPER が、培養細胞系で標的タンパク質を分解するのに高濃度 (10 μM) の薬剤添加が必要であったことから<sup>66, 67)</sup>、彼らはより高活性な E3 リガンドを追求し、前述 (Fig. 8) の MV1 由来のリガンド 7、LCL161 由来のリガンド 8 などの利用を試みた。その結果、リガンド 8 を用いた SNIPER を用いると、培養細胞系では nM レベルの添加で目的タンパク質の分解を誘導させることに成功している<sup>68)</sup>。一方、東京大学の橋本や東北大学の石川らにより、メチルベスタチン由来のリガンド 6 を E3 リガンドに用いた標的タンパク質分解誘導薬が、ハンチントン病の原因となる変異ハンチントンタンパク質の分解を促進するという興味深い結果も報告されている<sup>69, 70)</sup>。

IMiDs 誘導体のリガンド 9 を用いた標的タンパク質分解誘導薬は、Novartis 社の J. E. Bradner らにより degronimid と名付けられ、精力的に開発研究が進められている。こちらでも培養細胞系で、nM レベルの化合物の添加で標的タンパク質の分解を誘起する degronimid の開発に成功している。現在、臨床応用も含めて開発が進められているのは、E3 リガンドとして VHL、CRBN、および IAP のリガンドを用いた標的タンパク質分解誘導薬である<sup>71)</sup>。その代表例は総説にまとめられているので参照されたい<sup>19)</sup>。

ところで、CRBN を E3 リガーゼとして用いる標的タンパク質分解誘導薬は、リンカーを介して双頭のキメラ化合物になっているにも関わらず、GSPT1 などの IMiDs のネオ基質の分解を誘導するという事例が報告されている<sup>72)</sup>。これは E3 リガーゼによる E3 リガンド認識の厳



密性に関係すると考えられているが、サリドマイド誘導体で催奇形性のない IMiDs は2019年10月現在で未だに見つかっていないことから、現時点では臨床薬としての開発には注意が必要である。

## 10. E3 リガンドと標的タンパク質リガンドを繋ぐリンカー構造

E3 リガンドとしてペプチドが使われていた初期の標的タンパク質分解誘導薬 (PROTAC-1, Fig. 4) ではポリグリシン構造なども使われていたが、報告されている多くの標的タンパク質分解誘導薬では、直鎖の炭化水素鎖またはオリゴエチレングリコール鎖、もしくは水溶性と脂溶性のバランスを考えてそのハイブリッド構造<sup>73)</sup>が利用されている。リガンドとリンカーを繋ぐ場合や、複数のリンカーユニットを繋ぐ場合は、エステラーゼによる分解を考慮してアミド結合が用いられていることが多い。最近ではクリック反応などを用いた連結も報告されている<sup>74,75)</sup>。前述した通り、リンカー長は効率的な標的タンパク質のユビキチン化に大きく影響を与えるが、その最適な長さは標的タンパク質の大きさ、各リガンドの結合部位と配向、および E3 リガナーの種類に応じて変わるため、現状ではトライアンドエラーで最適化するしか無いと思われる。ただ、E3 リガナーと標的タンパク質分解誘導薬、および標的タンパク質からなる三者複合体の構造情報が X 線結晶解析などから得られれば<sup>76)</sup>、これはリンカーの長さをデザインする際の有力な情報となる。実際、そのような例も報告されている<sup>77)</sup>。

## 11. 標的タンパク質リガンドの例

概念実証実験で用いられているのは、基礎研究で頻繁に使われる既存のリガンドである。例えば、PROTAC-1 で用いられたオバリシンは、標的となる MetAP-2 に共有結合するリガンドであったが、これは、MetAP-2 と比較して、PROTAC-1 と共有結合した MetAP-2 のみが分解誘導されることを示す上で極めて良い実験系となった<sup>38)</sup>。その後用いられた、エストラジオールやジヒドロテストステロンなどのステロイドは、それぞれのステロイド受容体に対する選択的リガンドである。例えば、17 $\beta$ -エストラジオールとエストロゲン受容体の  $K_D$  値は 0.05-15 nM と見積もられており<sup>78)</sup>、ジヒドロテストステロンとアンドロゲン受容体の解離定数もサブ nM レベル

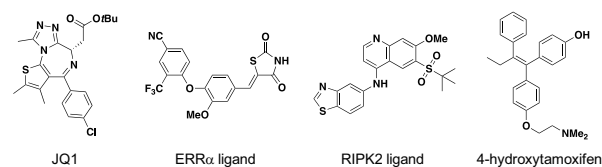


Fig. 10 臨床応用も視野に入れて開発されている標的タンパク質リガンド

である<sup>79)</sup>。このように、強力に標的タンパク質に結合するリガンドは、概念実証実験では有用である。

臨床応用も視野に入れて開発されている標的タンパク質リガンドは、それ自身で既に臨床開発が進められていたなど、薬としての顔を持つものが多い (Fig. 10)。例えば、転写共役因子 BRD4 の BET ドメインに結合する JQ1<sup>80)</sup>、ERR $\alpha$  (estrogen-related receptor  $\alpha$ ) に選択的に結合し、ERR $\alpha$  と ERR $\alpha$  結合ペプチドとの相互作用をサブ $\mu$ M レベル ( $IC_{50} < 150$  nM) で阻害するがそれ自身は ERR $\alpha$  の発現量に影響を及ぼさない ERR $\alpha$  リガンド<sup>81)</sup>、更には、自然免疫シグナルの重要なメディエーターである RIPK2 のリガンド<sup>63)</sup> などである。他にも ER $\alpha$  リガンドである 4-hydroxytamoxifen など利用されている<sup>68,82)</sup>。これら標的タンパク質リガンドは、それぞれ適切な鎖長を持つリンカーを介して E3 リガンドに接続されることで、高効率の標的タンパク質分解誘導薬 (Fig. 11) が創製されている。これらはいずれも、細胞レベルでは nM レベルで目的タンパク質を分解する活性を示し、PROTAC\_RIPK2 を除く 3 種はマウスを用いた *in vivo* 実験でも薬効を示すことが報告されている。

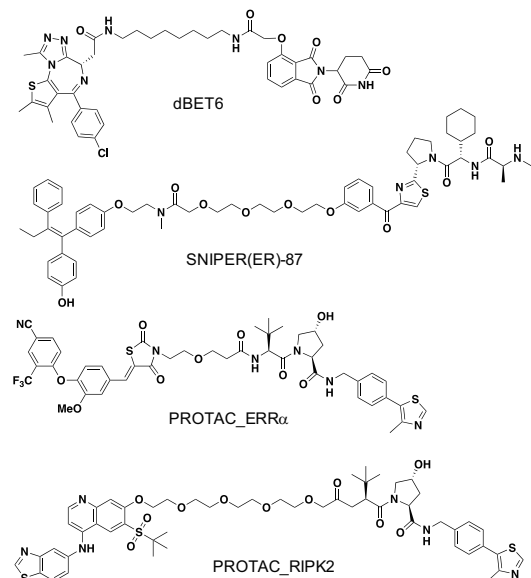


Fig. 11 低濃度 (nM レベル) で目的タンパク質の分解活性を有する標的タンパク質分解誘導薬

## 12. 最適化された標的タンパク質分解誘導薬の性能

様々な技術を駆使して開発された標的タンパク質分解誘導薬の性能はどのようなものであろうか。Crews らにより報告された PROTAC\_RIPK2 を例に見てみたい<sup>63)</sup>。

PROTAC\_RIPK2 をヒト単球細胞 THF-1 に投与すると、10 nM の濃度で 95% 以上の RIPK2 を分解する。50% の RIPK2 を分解する濃度 ( $DC_{50}$  値) は 1.4 nM である。一方、3  $\mu$ M 以上の濃度で投与するとノックダウン活性は

減弱し、30  $\mu\text{M}$  では細胞内 RIPK2 量はもとのレベルに回復する。この二相性の反応は、RIPK2、PROTAC、E3 リガーゼ間の三者複合体形成に特有の現象である<sup>83)</sup>。また、3  $\mu\text{M}$  の投与でも VHL が本来持つ HIF-1 $\alpha$  分解活性を阻害しなかったことから、主作用 (RIPK2 分解誘導) と副作用 (内在性基質タンパク質に対する VHL 活性の阻害) 発現の濃度域は 1000 倍以上であることが示された。更に、PROTAC\_RIPK2 の効果が発現する時間は投与後 1 時間からであり、4 時間で最大に達した。これは、平均的なタンパク質の半減期が約 60 時間<sup>84)</sup> であることを考えると、大変早い応答である。一方、培地から PROTAC\_RIPK2 を除くと 24 時間以内に RIPK2 は元の量に回復した。このような可逆的効果は、siRNA などの核酸を元にした技術では達成不可能である。また、どの濃度域においても細胞毒性は見られなかった。

標的タンパク質分解誘導薬は、触媒的に働くことも利点とされている。実際、PROTAC\_RIPK2 を用いた定量的解析では、少なく見積もっても PROTAC\_RIPK2 の 1 分子当たり、2 ~ 3.4 回、RIPK2 をユビキチン化していることが示された。

### 13. 標的タンパク質分解誘導薬を取り巻く現状と今後の展望、および課題

標的タンパク質分解誘導薬のコンセプトは、世界中の製薬業界の注目を集めている。2016 年頃を境に、標的タンパク質分解誘導薬の開発と実用化を目指して、Crews らが設立した Arvinas 社や、米国 Scripps Research Institute の著名な化学生物学者 Benjamin F. Cravatt と 2 人の合成化学者 Phil S. Baran と Jin-Quan Yu が設立した Vividion Therapeutics 社、その他、Kymera Therapeutics 社、Cullgen 社など、多額の資金を受領したバイオベンチャーの創立が続いている。臨床薬開発では、目的とする疾患は、癌、炎症、神経変性疾患、心血管疾患など、多種多様である。最近では、農業への適用を目的として、雑草や害虫の防除を目的とした研究も開始されたようである<sup>85)</sup>。植物ホルモンであるジャスモン酸やオーキシンなどが、分子接着剤として E3 ユビキチンリガーゼと標的タンパク質を繋ぎ、標的タンパク質の分解を誘導することは、前述の IMiDs の作用機作解明や標的タンパク質分解誘導薬開発と時を同じくして明らかにされてきたことであるため<sup>86-88)</sup>、農業への適用拡張は当然の流れなのかもしれない。

ユビキチン・プロテアソーム以外のタンパク質分解系を用いた標的タンパク質分解誘導薬開発も行われている。東北大学の有本らは、自身が開発したオートファジー誘起分子を用いて、オートファジーによってタンパク質を分解する AUTAC (autophagy-targeting chimera) と名付けた方法および化合物を開発している<sup>89)</sup>。AUTAC では

オートファジーを利用しているため、タンパク質凝集体やオルガネラも分解のターゲットにできることが特徴である。一方、オートファジーを誘起する分子接着剤様化合物も報告されている。中国の復旦大学の Ding, Fei, Lu らは、ごく最近、ハンチントン病の原因となる変異ハンチントンタンパク質と、オートファゴソームの構成タンパク質を繋ぐ分子接着剤様化合物を発見した<sup>90)</sup>。この化合物は、モデル動物内でハンチントン病様の症状を改善するため、臨床薬としての開発も期待される。

さて、このように開発が活発化している標的タンパク質分解誘導薬であるが、最後に、今後この概念が広く用いられるために解決すべき課題および展望を挙げてみたい。

一つ目は標的タンパク質および E3 リガーゼに対するリガンド分子を如何にして見つけるかである。前述の通り、黎明期に発表された標的タンパク質分解誘導薬は、その殆どが概念実証実験のため、既知のリガンドが用いられている。E3 リガンドに関しては標的タンパク質分解誘導薬の基盤技術となるため、本項でも詳しく述べたように体系的な研究が行われてきており、そのバリエーションを更に拡充しようとする試みも行われている<sup>91-92)</sup>。一方、繰り返しになるが、標的タンパク質リガンドは個々の研究および臨床薬開発でそれぞれ異なるため、系統的というよりも全て各論となり、標的ごとに研究することになる。

この目的には、我々が以前開発した、化合物アレイが適している。化合物アレイとは、DNA マイクロアレイの技術を応用して、数千から数万種類の低分子有機化合物を固相担体に固定化したチップである<sup>8, 9, 93)</sup>。例えば、蛍光標識したタンパク質の溶液でチップを処理すると、そのタンパク質が結合した領域だけ蛍光が観察される。位置マーカーとなる蛍光色素も同時にチップ上に固定化しておくと、蛍光が観察された場所から、どのような化合物がタンパク質に結合したかが分かる。一方、タンパク質を蛍光標識すること無しに、表面プラズモン共鳴<sup>94)</sup> や斜入射反射率の測定<sup>90)</sup> などにより、チップ上化合物とタンパク質の結合を解析する方法もある。化合物アレイを用いた方法ではタンパク質に単に結合するだけの化合物が見つかることもあり、以前はそのような化合物は無用の長物であったが、標的タンパク質分解誘導薬のためのタンパク質リガンドとしては有用であると考えられる。現在、我々は、標的タンパク質リガンド候補として得られたヒット化合物の評価を検討している。

二つ目の課題は、目的タンパク質リガンドと E3 リガンドを繋ぐ際のデザインである。リンカー分子の長さが変わると目的タンパク質の分解効率が変えることは前述したが、最近の報告から、E3 リガンドに依存して目的タンパク質の分解プロファイルが劇的に変化することも

明らかになった<sup>73)</sup>。そこで、現時点では一つの標的タンパク質に対する標的タンパク質分解誘導薬の構造を一つに決めてかからず、複数の構造を同時に構築できるような合成化学的方法論、もしくは入手が容易なビルディングブロックの開発が必要であろう。合成化学者としてはつまらないかもしれないが、キット化されたリンカーやE3リガンドのセット<sup>95)</sup>は標的タンパク質分解誘導薬の予備最適化を迅速化するのに役立つに違いない。既にそのような試みも報告されているが<sup>73, 96)</sup>、誰もが、自身が研究しているタンパク質の分解誘導薬を容易かつ迅速に入手できるようにするため、このような基盤技術の更なる発展を必須である。

第三の課題は、これまで述べてきたことに対して逆説的になるかもしれないが、標的タンパク質分解誘導薬のタンパク質分解誘導活性は、標的タンパク質およびE3リガーゼそれぞれに対する結合活性と単純に比例しない場合があることである。例えば、E3リガーゼとしてVHLやCRBNを利用し、標的タンパク質としてリン酸化酵素を用いた解析例では、標的タンパク質に対する分解誘導薬の $K_D$ 値が26 nMであっても標的を分解できない場合や、逆に標的タンパク質に対する $K_D$ 値が11  $\mu$ Mの分解誘導薬でも標的を効率的に分解する例が報告されている<sup>72)</sup>。詳細な解析の結果から、標的タンパク質を効果的に分解するには、標的タンパク質とE3リガーゼ間のタンパク質-タンパク質相互作用が重要であると結論されているが<sup>72)</sup>、今後、更に多くの結果の解析を注意深く進めて、タンパク質分解誘導活性にどのような因子が関わっているかを明らかにすることが重要であろう。

おわりに

以上、近年注目を集めている標的タンパク質分解誘導

薬に関して、これまでの開発の経緯と現状、および課題に関して概説した。標的タンパク質分解誘導薬の進歩はまさに日進月歩であり、関連する論文も加速度的に増えている。本稿の改訂中でも新しい文献が飛び込んできて、最新の報告では、本稿で紹介したE3リガンドに代わる分解シグナルとして、単一のアミノ酸だけを用いるというものもある<sup>97)</sup>。このような状況のため、筆者が重要な論文を見逃している可能性は大いにあり、本稿がこれまでの標的タンパク質分解誘導薬に関する情報を全て網羅しているものではないことを付け加えておく(2019年11月現在)。また、できるだけ注意深く論文に当たるようにはしたが、勘違いや間違いがあれば深くお詫び申し上げます。そのような場合は是非ご一報頂ければ幸いです。

謝辞

本稿の執筆の機会を与えて頂きました星薬科大学薬学科医療薬剤学研究室教授の大西 啓先生に感謝申し上げます。本稿の初稿を注意深く確認して頂きました、東北大学大学院生命科学研究所教授の有本博一先生と石川 稔先生、および星薬科大学医薬品化学研究所生体分子有機化学研究室講師の高橋万紀先生と助教の横江弘雅先生に感謝いたします。特に、日本のこの分野のトップランナーである有本博一先生と石川 稔先生には重要なお指摘を頂きました。心より御礼申し上げます。

【利益相反】

開示すべき利益相反はない。

#### 参考文献と注釈

- Schreiber, S. L. The small molecule approach to biology in *Chem. Eng. News* **81**, 1-61 (2003).
- MacBeath, G. Chemical genomics: what will it take and who gets to play? *Genome Biol.* **2**, COMMENT2005.2001-COMMENT2005.2006 (2001).
- Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E. & Schreiber, S. L. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341**, 758-760 (1989).
- Heitman, J., Movva, N. R. & Hall, M. N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-909 (1991).
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P. & Snyder, S. H. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**, 35-43 (1994).
- Nishi, K. et al. Leptomycin B targets a regulatory cascade of CRM1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 6320-6324 (1994).
- Kudo, N. et al. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9112-9117 (1999).
- Kanoh, N. et al. Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein-small-molecule interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 5584-5587 (2003).
- Kanoh, N. et al. Photo-cross-linked small-molecule microarrays as chemical genomic tools for dissecting protein-ligand interactions. *Chem. Asian J.* **1**, 789-797 (2006).
- Kanoh, N., Honda, K., Simizu, S., Muroi, M. & Osada, H. Photo-cross-linked small-molecule affinity matrix for facilitating forward and reverse chemical genetics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 3559-3562 (2005).

- 11) Kanoh, N. Photo-cross-linked small-molecule affinity matrix as a tool for target identification of bioactive small molecules. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 709-718 (2016).
- 12) Adjei, A. A. What is the right dose? The elusive optimal biologic dose in phase I clinical trials. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4054-4055 (2006).
- 13) Russ, A. P. & Lampel, S. The druggable genome: an update. *Drug Discov. Today* **10**, 1607-1610 (2005).
- 14) Thinworth, C. P., Lithgow, H. & Churcher, I. Small molecule-mediated protein knockdown as a new approach to drug discovery. *Med. Chem. Commun.* **7**, 2206-2216 (2016).
- 15) Bondeson, D. P. & Crews, C. M. Targeted protein degradation by small molecules. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **57**, 107-123 (2017).
- 16) Lai, A. C. & Crews, C. M. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 101-114 (2017).
- 17) Collins, I., Wang, H., Caldwell, J. J. & Chopra, R. Chemical approaches to targeted protein degradation through modulation of the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. J.* **474**, 1127-1147 (2017).
- 18) Itoh, Y. Chemical protein degradation approach and its application to epigenetic targets. *Chem. Rec.* **18**, 1681-1700 (2018).
- 19) Ohoka, N. Development of protein knockdown technology as emerging drug discovery strategy. *Yakugaku Zasshi* **138**, 1135-1143 (2018).
- 20) Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E. & Neckers, L. M. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8324-8328 (1994).
- 21) Taipale, M., Jarosz, D. F. & Lindquist, S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 515-528 (2010).
- 22) Pohl, C. & Dikic, I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science* **366**, 818-822 (2019).
- 23) Berndsen, C. E. & Wolberger, C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 301-307 (2014).
- 24) Li, W. *et al.* Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3**, e1487 (2008).
- 25) Quach, H. *et al.* Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia* **24**, 22-32 (2010).
- 26) Sakamoto, S., Hatakeyama, M., Ito, T. & Handa, H. Tools and methodologies capable of isolating and identifying a target molecule for a bioactive compound. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1990-2001 (2012).
- 27) Shimizu, N. *et al.* High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat. Biotechnol.* **18**, 877-881 (2000).
- 28) Ito, T. *et al.* Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* **327**, 1345-1350 (2010).
- 29) Fischer, E. S. *et al.* Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *Nature* **512**, 49-53 (2014).
- 30) Lu, G. *et al.* The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science* **343**, 305-309 (2014).
- 31) Kronke, J. *et al.* Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* **343**, 301-305 (2014).
- 32) Abruzzese, M. P. *et al.* The homeobox transcription factor MEIS2 is a regulator of cancer cell survival and IMiDs activity in Multiple Myeloma: modulation by Bromodomain and Extra-Terminal (BET) protein inhibitors. *Cell Death Dis.* **10**, 324 (2019).
- 33) Nguyen, T. V. *et al.* Glutamine triggers acetylation-dependent Degradation of glutamine synthetase via the thalidomide receptor cereblon. *Mol. Cell* **61**, 809-820 (2016).
- 34) Asatsuma-Okumura, T. *et al.* p63 is a cereblon substrate involved in thalidomide teratogenicity. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 1077-1084 (2019).
- 35) Matyskiela, M. E. *et al.* A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase. *Nature* **535**, 252-257 (2016).
- 36) Uehara, T. *et al.* Selective degradation of splicing factor CAPER $\alpha$  by anticancer sulfonamides. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 675-680 (2017).
- 37) 実は、この概念は1999年に米国のバイオ企業 Proteonix 社の J. H. Kenten らにより特許 (US6306663B1) として出願されていたが、現在は権利が放棄されている。
- 38) Sakamoto, K. M. *et al.* Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 8554-8559 (2001).
- 39) Sakamoto, K. M. *et al.* Development of PROTACs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 1350-1358 (2003).
- 40) Schneekloth, J. S., Jr. *et al.* Chemical genetic control of protein levels: selective *in vivo* targeted degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3748-3754 (2004).
- 41) Hines, J., Gough, J. D., Corson, T. W. & Crews, C. M. Posttranslational protein knockdown coupled to receptor tyrosine kinase activation with phospho PROTACs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 8942-8947 (2013).
- 42) Cyrus, K., Wehenkel, M., Choi, E. Y., Swanson, H. & Kim, K. B. Two-headed PROTAC: an effective new tool for targeted protein degradation. *Chembiochem* **11**, 1531-1534 (2010).
- 43) Vassilev, L. T. *et al.* *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844-848 (2004).
- 44) Moll, U. M. & Petrenko, O. The MDM2-p53 interaction. *Mol. Cancer Res.* **1**, 1001-1008 (2003).
- 45) Kussie, P. H. *et al.* Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**, 948-953 (1996).

- 46) Schneekloth, A. R., Pucheault, M., Tae, H. S. & Crews, C. M. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 5904-5908 (2008).
- 47) Marhefka, C. A. *et al.* Design, synthesis, and biological characterization of metabolically stable selective androgen receptor modulators. *J. Med. Chem.* **47**, 993-998 (2004).
- 48) Hines, J., Lartigue, S., Dong, H., Qian, Y. & Crews, C. M. MDM2-recruiting PROTAC offers superior, synergistic antiproliferative activity via simultaneous degradation of BRD4 and stabilization of p53. *Cancer Res.* **79**, 251-262 (2019).
- 49) Lin, H. K., Wang, L., Hu, Y. C., Altuwajri, S. & Chang, C. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J.* **21**, 4037-4048 (2002).
- 50) Logan, I. R. *et al.* Analysis of the MDM2 antagonist nutlin-3 in human prostate cancer cells. *Prostate* **67**, 900-906 (2007).
- 51) Buckley, D. L. *et al.* Targeting the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1 interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4465-4468 (2012).
- 52) Hon, W. C. *et al.* Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 by pVHL. *Nature* **417**, 975-978 (2002).
- 53) Van Molle, I. *et al.* Dissecting fragment-based lead discovery at the von Hippel-Lindau protein: hypoxia inducible factor  $\alpha$  protein-protein interface. *Chem. Biol.* **19**, 1300-1312 (2012).
- 54) Buckley, D. L. *et al.* Small-molecule inhibitors of the interaction between the E3 ligase VHL and HIF1. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 11463-11467 (2012).
- 55) Aghajan, M. *et al.* Chemical genetics screen for enhancers of rapamycin identifies a specific inhibitor of an SCF family E3 ubiquitin ligase. *Nat. Biotechnol.* **28**, 738-742 (2010).
- 56) Orlicky, S. *et al.* An allosteric inhibitor of substrate recognition by the SCF(Cdc4) ubiquitin ligase. *Nat. Biotechnol.* **28**, 733-737 (2010).
- 57) Sekine, K. *et al.* Small molecules destabilize cIAP1 by activating auto-ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **283**, 8961-8968 (2008).
- 58) Varfolomeev, E. *et al.* IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B activation, and TNF  $\alpha$ -dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669-681 (2007).
- 59) Fulda, S., Wick, W., Weller, M. & Debatin, K. M. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma *in vivo*. *Nat. Med.* **8**, 808-815 (2002).
- 60) Sun, H. *et al.* Structure-based design of potent, conformationally constrained Smac mimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 16686-16687 (2004).
- 61) Buckley, D. L. *et al.* HaloPROTACS: Use of small molecule PROTACs to induce degradation of Halo tag fusion proteins. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1831-1837 (2015).
- 62) Zheng, N. *et al.* Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**, 703-709 (2002).
- 63) Bondeson, D. P. *et al.* Catalytic *in vivo* protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 611-617 (2015).
- 64) Raina, K. *et al.* PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 7124-7129 (2016).
- 65) 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.* **18**, 3354-3358 (2008).
- 66) Okuhira, K. *et al.* Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein. *FEBS Lett.* **585**, 1147-1152 (2011).
- 67) 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.* **132**, 5820-5826 (2010).
- 68) Ohoka, N. *et al.* *In vivo* knockdown of pathogenic proteins via specific and nongenetic inhibitor of apoptosis protein (IAP)-dependent protein erasers (SNIPERs). *J. Biol. Chem.* **292**, 4556-4570 (2017).
- 69) Tomoshige, S., Nomura, S., Ohgane, K., Hashimoto, Y. & Ishikawa, M. Degradation of huntingtin mediated by a hybrid molecule composed of IAP antagonist linked to phenyldiazanyl benzothiazole derivative. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**, 707-710 (2018).
- 70) Tomoshige, S., Nomura, S., Ohgane, K., Hashimoto, Y. & Ishikawa, M. Discovery of small molecules that induce the degradation of huntingtin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 11530-11533 (2017).
- 71) Winter, G. E. *et al.* BET bromodomain proteins function as master transcription elongation factors independent of CDK9 recruitment. *Mol. Cell* **67**, 5-18 e19 (2017).
- 72) Bondeson, D. P. *et al.* Lessons in PROTAC design from selective degradation with a promiscuous warhead. *Cell Chem. Biol.* **25**, 78-87 e75 (2018).
- 73) Lai, A. C. *et al.* Modular PROTAC design for the degradation of oncogenic BCR-ABL. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 807-810 (2016).
- 74) Wurz, R. P. *et al.* A "click chemistry platform" for the rapid synthesis of bispecific molecules for inducing protein degradation. *J. Med. Chem.* **61**, 453-461 (2018).
- 75) Lebraud, H., Wright, D. J., Johnson, C. N. & Heightman, T. D. Protein degradation by in-cell self-assembly of proteolysis targeting chimeras. *ACS Cent. Sci.* **2**, 927-934 (2016).
- 76) Gadd, M. S. *et al.* Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 514-521 (2017).
- 77) Zengerle, M., Chan, K. H. & Ciulli, A. Selective small molecule Induced degradation of the BET bromodomain protein BRD4. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1770-1777 (2015).

- 78) Rich, R. L. *et al.* Kinetic analysis of estrogen receptor/ligand interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8562-8567 (2002).
- 79) Kempainen, J. A. *et al.* Distinguishing androgen receptor agonists and antagonists: distinct mechanisms of activation by medroxyprogesterone acetate and dihydrotestosterone. *Mol. Endocrinol.* **13**, 440-454 (1999).
- 80) Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**, 1067-1073 (2010).
- 81) Patch, R. J. *et al.* Identification of diaryl ether-based ligands for estrogen-related receptor  $\alpha$  as potential antidiabetic agents. *J. Med. Chem.* **54**, 788-808 (2011).
- 82) Ohoka, N. *et al.* Derivatization of inhibitor of apoptosis protein (IAP) ligands yields improved inducers of estrogen receptor  $\alpha$  degradation. *J. Biol. Chem.* **293**, 6776-6790 (2018).
- 83) Douglass, E. F., Jr., Miller, C. J., Sparer, G., Shapiro, H. & Spiegel, D. A. A comprehensive mathematical model for three-body binding equilibria. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 6092-6099 (2013).
- 84) Schwanhauser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337-342 (2011).
- 85) Protein degraders, from clinic to crops. *Nat. Biotechnol.* **37**, 701 (2019).
- 86) Thines, B. *et al.* JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665 (2007).
- 87) Tan, X. *et al.* Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 640-645 (2007).
- 88) Chini, A. *et al.* The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-671 (2007).
- 89) Takahashi, D. *et al.* AUTACs: Cargo-specific degraders using selective autophagy. *Mol. Cell.* *in press* (doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.009) (2019).
- 90) Li, Z. *et al.* Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds. *Nature* **575**, 203-209 (2019).
- 91) Ottis, P. *et al.* Assessing different E3 ligases for small molecule induced protein ubiquitination and degradation. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2570-2578 (2017).
- 92) Ward, C. C. *et al.* Covalent ligand screening uncovers a RNF4 E3 ligase recruiter for targeted protein degradation applications. *ACS Chem. Biol.* **14**, 2430-2440 (2019).
- 93) Kondoh, Y., Honda, K. & Osada, H. Construction and application of a photo-cross-linked chemical array. *Methods Mol. Biol.* **1263**, 29-41 (2015).
- 94) Kanoh, N. *et al.* SPR imaging of photo-cross-linked small-molecule arrays on gold. *Anal. Chem.* **78**, 2226-2230 (2006).
- 95) 2019年現在では、Sigma-Aldrich社 (Merck) より、標的タンパク質分解のためのクロスリンカーライブラリが市販されている (<https://www.sigmaaldrich.com/japan/chemistry/chemical-synthesis/technology-spotlights/partial-protacs.html>)
- 96) Qiu, X. *et al.* Chemoselective synthesis of lenalidomide-based PROTAC library using alkylation reaction. *Org. Lett.* **21**, 3838-3841 (2019).
- 97) Shanmugasundaram, K. *et al.* A modular PROTAC design for target destruction using a degradation signal based on a single amino acid. *J. Biol. Chem.* *in press* (doi: 10.1074/jbc.AC1119.010790) (2019).

Degradation of target proteins by using heterobifunctional chimeric molecules: History and current status of targeted protein degraders

Naoki KANO

*Laboratory of Organic and Biomolecular Chemistry, Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University*

Conventional small-molecule drugs have been developed to inhibit or modulate enzymes and receptors. However, recent estimation suggests that they can access only about 20% of the proteome; thus, new modalities are needed to break the deadlock in the current situation. Recently, unique heterobifunctional chimeric molecules, also known as induced protein degrader or targeted protein degrader, have been developed to degrade any proteins of interest by hijacking the ubiquitin-proteasome machinery inside the cells. In this review, the history, present status, and outlook of this technology will be highlighted.