



Title	Design, Synthesis, and Biological Evaluation of PROTACs Targeting G9a/GLP Methyltransferase
Author(s)	Mukherjee, Anirban
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101926
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

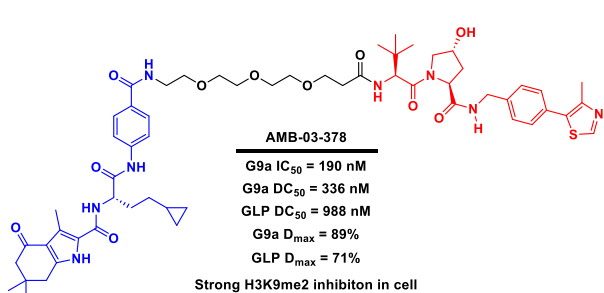
Name (Anirban Mukherjee)	
Title	Design, Synthesis, and Biological Evaluation of PROTACs Targeting G9a/GLP Methyltransferase (G9a/GLP メチルトランスフェラーゼを標的とする PROTAC の設計、合成および生物学的評価)

Abstract of Thesis:

Histone methylation plays an important role in chromatin structure and epigenetic gene expression. G9a and G9a like protein (GLP) are histone methyltransferases that facilitate the mono- and di-methylation of histone H3 at lysine 9 (H3K9). Aberrant expression of G9a/GLP has been associated with numerous pathological conditions, including cancer, neurodegenerative diseases, and other disorders. Therefore, G9a/GLP inhibition is expected as an effective therapeutic strategy. However, conventional G9a/GLP inhibitors that inhibit only the catalytic function of G9a/GLP do not achieve the complete eradication of cancer. In this context, novel G9a modulators that are distinct from the conventional G9a inhibitors are expected to be applied as alternative therapeutic strategies.

In recent years, targeted protein degradation by proteolysis targeting chimeras (PROTACs) has emerged as a promising therapeutic approach in medicinal chemistry. PROTACs consist of two components: a ligand for the protein of interest (POI) and a ligand for ubiquitin ligase (E3). Because PROTACs induce ubiquitination and the subsequent proteasomal degradation of the POI, they effectively inhibit all functions of the POI. Focusing on the features of PROTACs, in this study, I attempted to identify G9a/GLP PROTACs. In other words, it is expected that the G9a/GLP PROTACs should exhibit the desired therapeutic effects because they should not only inhibit the catalytic activity but also disrupt interactions of G9a/GLP with other proteins.

Two distinct classes of PROTAC candidates were designed and synthesized using UNC0638 or RK-701 as G9a/GLP-binding ligand. Biological evaluation revealed that UNC0638-based class I PROTAC candidates were unable to induce the degradation of G9a. However, some candidates of this class exhibited antiproliferative effects against MCF-7 cells, suggesting potential off-target interactions that may contribute to their anticancer activity independent of G9a degradation. To overcome this challenge, several class II PROTACs were designed using a highly selective norleucine-based inhibitor RK-701. Among these, AMB-03-378 was identified as the most potent PROTAC degrader, demonstrating a dose- and time-dependent degradation of G9a and GLP via the ubiquitin-proteasome system (UPS). As a result of G9a/GLP degradation, AMB-03-378 strongly decreased the levels of di-methylated H3K9 (H3K9me2) in MCF-7 cells. Additionally, AMB-03-378 demonstrated the ability to downregulate the expression of HP1 γ , shedding light on the scaffolding role of G9a/GLP. Notably, it promoted neurite outgrowth in the mouse neural crest-derived cell line N2a, highlighting its potential in neural development and repair. Although AMB-03-378 inhibited the migration of MCF-7 breast cancer cells, it had no significant impact on their proliferation, suggesting a need to reevaluate the role of G9a/GLP in breast cancer development. In this context, AMB-03-378 may serve as an important pharmacological probe.



AMB-03-378

G9a IC₅₀ = 190 nM
G9a DC₅₀ = 336 nM
GLP DC₅₀ = 988 nM
G9a D_{max} = 89%
GLP D_{max} = 71%

Strong H3K9me2 inhibition in cell
Inhibit the Cell Migration in MCF-7 cells
Neurite outgrowth promoting activity
Lack of antiproliferative effect in MCF-7 cells

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Anirban Mukherjee)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	鈴木 孝禎
	副 査	教授	中谷 和彦
	副 査	教授	西村 多喜
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>PROteolysis-Targeting Chimera (PROTAC) は、標的タンパク質 (POI) のリガンドとユビキチンリガーゼ (E3) のリガンドを、リンカーを介して連結させたキメラ分子であり、ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) 依存的に POI を分解する。PROTAC は、POI そのものを細胞から除去できるため、POI のすべての機能を抑制できるという利点がある。例えば、触媒機能だけでなく、他のタンパク質と相互作用する足場機能を持つ酵素を標的とする場合、従来の酵素阻害剤では、触媒機能しか阻害できないのに対して、PROTAC はその両機能を阻害することができる。すなわち、POI の機能を包括的に研究するには、PROTAC の利用が有用である。そこで学位申請者は、がんやアルツハイマー病などの創薬標的として興味深いヒストンメチルトランスフェラーゼ G9a および G9a-like protein (GLP) に着目し、新規 G9a/GLP PROTAC の創製を行った。</p> <p>G9a および GLP は、ヒストンのメチル化反応を触媒することで、クロマチン構造と遺伝子発現を制御している。G9a/GLP の過剰発現は、がんの増殖、進行、転移およびアルツハイマー病の進行に関与している。したがって、G9a/GLP の機能抑制は有効な治療戦略として期待されている。しかし、G9a/GLP の触媒機能のみを阻害する従来の G9a/GLP 阻害剤は、がんなどに対し十分な効果を示さない。そこで学位申請者は、G9a/GLP のすべての機能を抑制することが、G9a/GLP の制御に重要であると仮説を立て、G9a/GLP PROTAC の創製に着手した。既知の G9a/GLP 阻害剤である UNC0638 や RK-701 を基に、種々の PROTAC 候補化合物を合成した。合成した化合物をヒト乳癌 MCF-7 細胞に処理し、G9a/GLP 分解活性を評価した結果、UNC0638 を基にした化合物は分解活性を示さなかったが、RK-701 を基にした化合物は分解活性を示した。RK-701 を基にした化合物の中でも PEG リンカーを有する AMB-03-378 は高い分解活性を示し、AMB-03-378 による G9a/GLP 分解は UPS 依存的であることが確認された。また、AMB-03-378 は MCF-7 細胞においてヒストンのメチル化量を減少させ、細胞内で G9a/GLP の機能を効果的に抑制することも確認された。さらに、AMB-03-378 は、MCF-7 細胞の遊走阻害活性とマウス神経芽腫 N2a 細胞に対する神経突起伸長作用を示し、その効果は従来の G9a/GLP 阻害剤 RK-701 よりも優れていることがわかった。これらの結果は、AMB-03-378 が G9a/GLP に対する有用な PROTAC であることに加え、G9a/GLP の生物学を理解するためのツールとして応用できることを示している。</p> <p>本研究は膨大な実験量に基づく新規かつ高活性な G9a/GLP PROTAC の創製研究であり、本専攻の博士論文研究に相応しい業績である。</p> <p>よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>			