

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06945

研究課題名(和文) 受容体チャネルの分子動態遷移を識別するアロステリック創薬に関する研究

研究課題名(英文) Allosteric modulators that recognize the transition-states of receptor channels

研究代表者

久保 泰 (Kubo, Tai)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：10178030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性ペプチド分子骨格を鋳型とするランダムペプチドライブラリから、神経系 nAChR α 7 の様々な分子状態・コンフォメーションに対するペプチド性バインダーを試験管内分子進化技術により探索し候補ペプチドを取得した。次に、一分子動態計測および電気生理学計測により、これらのバインダーが nAChR のどの分子状態・コンフォメーションを認識し、受容体の機能制御に関わるかなどの特性解析を行った。本研究は、受容体やイオンチャネルなどを標的とする創薬で直面する副作用問題を回避する新たな創薬「アロステリック創薬」のプラットフォームを確立するための基盤となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在進められている創薬研究の多くは、標的となるタンパク質の活性中心やリガンドポケットを狙う、所謂「オルソステリック創薬」が中心となっている。一方この方法では、リガンド結合領域を含む機能領域の配列や構造が類似するファミリータンパク質において広く作用することが多く、これに起因する副作用問題が重大な課題となっている。本研究では、タンパク質が生体機能を発揮する過程で分子がダイナミックに分子内運動をすることに着目し、その遷移状態を特異的に認識するペプチドを創製することにより、従来の問題を回避する新たな創薬「アロステリック創薬」のプラットフォームを確立するための基盤となる。

研究成果の概要(英文)：To establish the new drug development platform for the allosteric modulators, in vitro evolution (IVE) technology and a single molecular dynamic study were applied to the neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) α 7. The nAChR α 7 molecules undergo molecular dynamic motions with/without ligands. In our previous study, both the agonistic and antagonistic receptor ligands were successfully identified by IVE technology from the three-finger (3-F) scaffold-based library. Thus, the α 7 binder peptides that recognize the various dynamic states were screened from the library. The candidate peptides were under investigation to characterize the positive/negative allostericity of the nAChR α 7. Diffracted X-ray Tracking method was applied to study the transition states of α 7 receptor, and ivermectine, one of the Positive Allosteric Modulators (PAMs), showed to induce molecular motions to the receptor distinct from the ligand acetylcholine.

研究分野：神経分子生物学

キーワード：アロステリック アセチルコリン受容体 進化学 分子動態 遷移状態

1. 研究開始当初の背景

従来、標的分子の機能部位やリガンドポケットに結合しその機能調節(抑制/促進)を狙った創薬が主流であった。所謂「オルソステリック創薬」である。しかし、それでは構造が類似するファミリータンパク質にも作用することが多く、副作用問題が払拭できないでいた。これに対し、標的タンパク質が機能発現時に分子がダイナミックに動く「分子動態」、または複数の安定・準安定状態間を遷移する「遷移過程」に作用するアロステリック創薬の考えが生まれ、創薬戦略の主流となってきている。一方、これらの分子動態を認識する分子としては、天然物から偶然見出されたものがほとんどであり、如何に効率よく探索するかが焦点となっていた。我々は、神経毒等の天然の生理活性ペプチドの分子骨格を鋳型とするペプチドライブラリから、任意の標的を識別して結合するペプチドを選択する「試験管内進化」技術を確立した。これは、生物進化過程で保存されてきたある種の生理活性ペプチドの分子骨格(scaffold)がランダムな配列を空間提示するのに都合がよいことを見出し、それを鋳型とするランダムペプチドライブラリ(Scaffold-based library)から任意の標的分子を特異的に認識するバインダーを探索する試験管内分子進化技術である(*Nucleic Acid Res.*, 2009; *Molecular Brain*, 2011; *Anal. Biochem.*, 2011; *Toxicol.*, 2012; *ACS Combinatorial Science*, 2016 他)。その際に、阻害剤・アンタゴニストに留まらず促進作用・アゴニスト活性のあるものも取れてきたことから、「分子動態」・「遷移過程」を認識するペプチドを創製しアロステリック創薬の基盤とするという本研究提案の想起に至った。

Allosteric 創薬においては標的となるタンパク質の機能時の分子動態・構造遷移をリアルタイム・リアルスペースで把握することが必要である。この新たな研究潮流に沿った最近の報告では、 $\beta 2$ アドレナリン受容体の機能時に協奏的に引き起こされる構造変化の遷移過程を特異的に認識しポジティブあるいはネガティブに制御する Nanobody を使い、その遷移状態を NMR により解析した研究がある(*Nature* 535:448, 2016)。しかし Nanobody (分子量 15kDa) は抗体より小型化したとはいえ分子ツールとしては大きく、その産生や抗体特性は免疫動物に大きく依存する。本研究では、Nanobody よりさらに分子量が $1/3 \sim 1/5$ と小さい生理活性ペプチドを母体とし、また極めて diversity の高いライブラリから、試験管内進化法(*in vitro evolution*)により効率よく標的認識分子を単離・同定するという点で革新的な試みであると認識している。

さらに、機能タンパク質の分子動態をリアルタイムで計測することのできる DXT 法(Diffracted X-ray Tracking Method)により、ニコチン性アセチルコリン受容体などのリガンド有無での高速一分子ダイナミクスを詳細に解析することに成功している(*Scientific Reports*, 2018)。Allosteric 創薬をはじめ生化学反応の遷移状態の解析と遷移状態制御のためには、遷移状態識別の汎用分子プローブの開発が鍵である。タンパク質の機能発現場での分子内部動態情報を 1 分子レベルでかつナノ~マイクロ秒レベルの遷移過程の運動計測、即ち作用場実計測「1 分子オペランド計測」が必須となる。これらの背景を基に、機能タンパク質の分子遷移状態に焦点を絞った創薬技術の開発研究にチャレンジする発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質が生体機能を発揮する過程で分子がダイナミックに分子内運動をすることに着目し、その遷移過程・遷移状態を特異的に認識するペプチドを創製する。そのためには、独自に開発した Scaffold-based library からの試験管内進化技術を駆使し、また高速一分子ダイナミクス解析との組み合わせにより、従来の「オルソステリック創薬」が抱える問題を回避する新たな創薬技術としての「アロステリック創薬」のプラットフォームを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

3-1 アロステリック遷移状態を認識するペプチドを創製する技術の確立

申請者が既に構築しその有効性を実証した 3-finger (3-F) peptide (約 60aa, 右図 A) および Inhibitor Cystine Knot (約 30aa, 右図 B) を鋳型とする peptide library から種々の遷移状態を取り得る nAChR alpha 7 ($\alpha 7$) を標的として、それらと親和性の高い peptide を試験管内進化技術(*in vitro evolution*, 下図)によりスクリーニングする。各 library の分子骨格は、長い生物進化のプロセスで選択淘汰された合理的な構造である。即ち標的認識やチャージリレーなどに関与する領域(右図破線部分)とそれらを空間提示するための枠構造保持部分である。これらの library は、合計 15 ~ 20 aa がランダム化され、 $10^{11} \sim 10^{12}$ という膨大な diversity (化学的にも生理・生化学的にも)を実現している。この library には遷移状態(分子構造の揺らぎの瞬間)を捕捉する分子種の存在が期待できる。

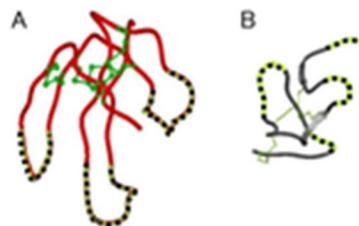
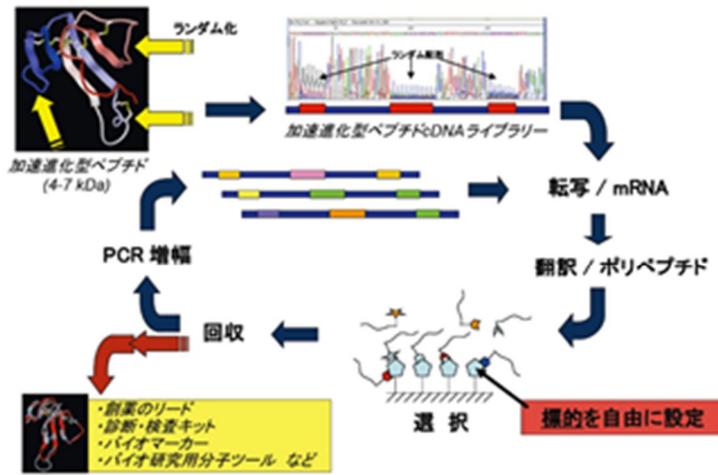


図 天然の生理活性ペプチドを鋳型としたペプチドライブラリ Three-finger 型ペプチド(ヘビ毒由来)骨格(A)、Inhibitor Cystine Knot型ペプチド(クモ毒由来)骨格(B)、破線: ランダム配列挿入部分



試験管内分子進化: cDNA display法

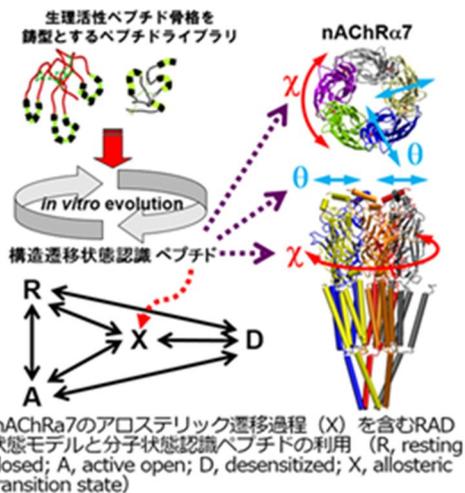
- ①3-finger protein cDNA library
- ②mRNA合成、③Linker ligation
- ④タンパク質の翻訳: 3-F libraryの作製
- ⑤mRNAの逆転写によるcDNA合成
- ⑥3-F cDNA-RNA-Linker-protein library
- ⑦標的分子結合ビーズによる選択
- ⑧3-F cDNA-RNA-Linker-proteinのcDNA部分を鋳型にしたPCR → ①へ続く

以上のサイクルを繰り返すことで、10¹¹種類以上の3-finger proteinの中から標的分子に親和性の高いアミノ酸配列を持つものへ進化・収束

加速進化型ペプチドを鋳型とした指向的分子進化の流れ

3-2 nAChR α7 のアロステリック遷移過程を標的として設定

反応の遷移状態を解析するモデルシステムとして、本提案では神経系ニコチン性アセチルコリン受容体 nAChR alpha 7 (α7) を標的分子として設定する。α7 はリガンド acetylcholine (ACh) が結合すると channel pore が開いてカチオン (主に Ca²⁺) が細胞内に流入する。このリガンドとα7 の反応過程は複雑で、生化学的・電気生理学的研究から、少なくとも自由エネルギー的に安定な3つの分子状態 [active open (A), resting closed (R), desensitized (D)] が存在しその間を遷移する (図, RAD 遷移モデル)。リガンド ACh はチャネル開口(A)を惹起するが、迅速に desensitized state (D)に陥ってチャネルは不活性化し神経伝達が遮断される。これら3つの状態に加えて、リガンドの種類により allosteric transition state (X)の存在が知られており、遷移過程のポテンシャル調節に関わっていると考えられる。



α7 の遷移過程で状態 X の存在確率が高いリガンド

(carbachol, nicotine, epibatidine など) の存在 (+) および非存在 (-) 下のα7 を標的として、前項 3-1 の試験管内進化を実施する。それぞれ選択した library の差分 library を作製してそれを2次 library とする。この差分で得た2次 library [ligand (+) – ligand (-)]は、遷移状態あるいは遷移中間体を認識する分子種が濃縮されていることが期待できるため、次にはその library から ligand (+) のα7 を標的としてさらに試験管内分子進化を進める。

4 . 研究成果

4-1 nAChR α7 および AChBP の調製

ラット nAChR α7 cDNA は、new born rat brain cDNA library を鋳型とした PCR により protein coding 領域全長および His タグ配列を有するクローンを取得した。SP6 RNA polymerase promoter を含むベクター pSD64TR にサブクローニングし、シークエンシングにより塩基配列を確認した。この plasmid を基に cap 修飾 cRNA を合成し (Ambion, MegaScript Kit) アフリカツメガエル卵母細胞に microinjection して2-3日培養後、膜画分を調製、2% Triton X-100 で可溶化して Ni-NTA 磁気ビーズにより精製標品を調製した。なお、アフリカツメガエル卵母細胞に microinjection する際には、正常な refolding および ER から細胞膜への translocation を促進するために、ric-3 および NACHO も同時に microinjection した。Two-electrode voltage clamp 法により nAChR α7 を発現した卵母細胞がアセチルコリン (100 μM) 依存的に内向き電流が流れ、機能的な受容体が発現していることを確認した。

nAChR α7 の細胞外ドメインとアミノ酸配列相同性が高い acetylcholine binding protein (AChBP) は、Aplysia kurodai 中枢神経系の cDNA ライブラリより cDNA を単離し保有している。この AChBP cDNA に His タグおよび Strep-tag II を付加したクローンを大腸菌で発現し、refolding 操作をした後 TALON 樹脂カラムにて精製した。BIACORE を用いて精製 Ak-AChBP と α-bungarotoxin との結合親和性を確認したところ、Kd = 30 nM と高い結合活性を確認した。

4-2 3-F ペプチドライブラリからの候補ペプチドの探索

His タグ付き nAChR α7 を Ni-NTA 磁気ビーズに固定化したものをターゲットとして、Three-

finger (3-F) peptide library より作製した cDNA-linker-3-F peptide のライブラリを混合し、binder の selection を実施した。この際、反応液に ACh 非存在下 nAChR $\alpha 7$ 固定化ビーズでの unbound fraction を ACh (+) nAChR $\alpha 7$ 固定化ビーズと混合し結合するものを選択した。

その結果、この方法での cDNA 回収率が著しく少なくなり、試験管内進化法での selection cycle を回すことが困難との見通しが立った。

そのため、標的の受容体をフルの様態で使用する代わりに、受容体の細胞外ドメインに相当する領域を持ち、かつ受容体と同じく 5 量体を形成して同等のリガンド結合能を発揮する AChBP を固定化して、これを先ずターゲットに設定して同様の selection を行う方針に転換した。これにより、selection cycle 毎の収率減少は受容体の場合より改善された。

6 ラウンドの selection cycle を回して回収された cDNA の配列を確認するため、PCR にて 3-F ペプチドの本体部分を増幅した DNA を plasmid vector に挿入し、大腸菌に transformation して形成されるコロニーをランダムにピックアップして plasmid DNA の配列からペプチドのアミノ酸配列を決定した。これらの配列を解析した結果、大きく 6 種類のグループに大別された。

続いて、それぞれのグループの代表配列を、大腸菌発現もしくは化学合成により調製し、選択されたペプチドの特性解析に進めた。

4-3 選択 3-F ペプチドの特性解析

前項で選択されたペプチドの特性解析方法の一つとして、nAChR $\alpha 7$ を基板に固定化し、また金ナノ結晶でラベルしたものに高輝度 X 線を照射して、それによって生ずる輝点（ラウエ斑点）の動きを観測する DXT (Diffracted X-ray Tracking) 法による分子動態解析の手法を試みた。実際のペプチドでの試験は継続中である。DXT を分子動態解析・遷移状態解析に応用するため、nAChR $\alpha 7$ の Positive Allosteric Modulator (PAM) の Ivermectin (IVM) を用いて確認実験を行った。その結果、5 量体を形成する nAChR $\alpha 7$ 受容体本体の回転軸に対し、ACh と IVM はいずれも単独で回転方向（twisting）および垂直方向（tilting）の動きを誘発するが、その方向が ACh と IVM では反対方向に動く様子が観測された（投稿準備中）。この結果は、取得したペプチドの nAChR $\alpha 7$ に対する分子動態・遷移状態のどのプロセスに関与するか評価することができる可能性を示唆するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mio Kazuhiro, Ishihara Masaki, Fujimura Shoko, Sasaki Daisuke, Nozawa Shunsuke, Ichianagi Kohei, Fukaya Ryo, Adachi Shin-ichi, Kuramochi Masahiro, Sekiguchi Hiroshi, Kubo Tai, Sasaki Yuji C.	4. 巻 529
2. 論文標題 X-ray-based living-cell motion analysis of individual serotonin receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 306 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujimura Shoko, Mio Kazuhiro, Kuramochi Masahiro, Sekiguchi Hiroshi, Ikezaki Keigo, Mio Muneyo, Hengphasatporn Kowit, Shigeta Yasuteru, Kubo Tai, Sasaki Yuji C.	4. 巻 124
2. 論文標題 Agonist and Antagonist-Diverted Twisting Motions of a Single TRPV1 Channel	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 11617 ~ 11624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c08250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kubo, T., & Naimuddin, M.	4. 巻 2070
2. 論文標題 cDNA Display of Disulfide-containing Peptide Library and in vitro Evolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 57-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9853-1_4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mio, K., Fujimura, A., Kuramochi, M., Ishihara, M., Honda, M., Kubo, T., Sekiguchi, H., Sasaki, Y.C.	4. 巻 44
2. 論文標題 Toward understanding of internal motion measurement with quantum probe and cryo-EM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JOURNAL OF PESTICIDE SCIENCE	6. 最初と最後の頁 210-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.W19-40	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekiguchi, H., Kuramochi, M., Ikesaki, K., Okamura, Y., Yoshimura, K., Matsubara, K., Chang, J. W., Ohta, N., Kubo, T., Mio, K., Suzuki, Y., Chavas, L. M., & Sasaki, Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Diffracted X-ray blinking tracks single protein motions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35468-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kubo, T., & Naimuddin, M	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 cDNA Display of Disulfide-containing Peptide Library and in vitro Evolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shoko Fujimura, Kazuhiro Mio, Masahiro Kuramochi, Hiroshi Sekiguchi, Muneyo Mio, Tai Kubo, Yuji C. Sasaki
2. 発表標題 ANTAGONIST-INDUCED CLOCKWISE ROTATION IN THE TRPV1
3. 学会等名 63rd annual meeting Biophysical Society (BPS19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三尾 和弘、藤村 章子、倉持 昌弘、関口 博史、三尾 宗代、久保 泰、佐々木 裕次
2. 発表標題 TRPV1 チャネルの 1 分子内回転動態の決定 Rotational Motions of Single TRPV1 Channel upon Gating
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保 泰、伊藤 弘幸、大橋 澄子、齋藤 光義
2. 発表標題 Screening and characterization of allosteric modulators for nAChR 7 from structurally constrained peptide libraries
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三尾 和弘、倉持 昌弘、松原賢、池崎 圭吾、関口 博史、三尾 宗代、久保 泰、佐々木 裕次
2. 発表標題 Rotational Brownian Motion of TRPV1 Channel observed by Synchrotron Diffracted X-ray Tracking and Laboratory X-ray blinking analysis
3. 学会等名 62th Annual Meeting Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤村 章子、三尾 和弘、倉持 昌弘、関口博史、池崎 圭吾、三尾 宗代、久保 泰、佐々木 裕次
2. 発表標題 X線1分子追跡法によるTRPV1チャネルの3次元運動
3. 学会等名 第27回 日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤村 章子、三尾 和弘、倉持 昌弘、関口博史、池崎 圭吾、三尾 宗代、久保 泰、佐々木 裕次
2. 発表標題 3D motion of TRPV1 cation channel depicted by diffracted X-ray tracking method
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 生理活性を持つ中分子の薬物動態を改善する方法、薬物動態の改善を利用した中分子ライブラリの製造法	発明者 竹内恒、夏目徹、久保泰	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/003815	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 核酸リンカー	発明者 久保泰、M. ナイム ディン	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2014-266738	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------