

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：82502
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K14362
研究課題名（和文）蛍光バイオセンサーを駆使した神経受容体標的のアロステリック薬の合理的探索手法の開発

研究課題名（英文）A rational method for selecting allosteric modulators using fluorescent biosensors

研究代表者
山浦 圭（Yamaura, Kei）
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・博士研究員（任常）

研究者番号：10805675
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アロステリック薬は既存の薬剤と比較して標的特異性が高く、生体内局所においてのみ作用を示す。そのため副作用が少なく、新薬開発において強く望まれている。しかしながら、創薬ターゲットとして重要な膜タンパク質に作用するアロステリック薬の探索が困難なため、その薬剤開発は停滞している。今回、神経伝達物質受容体の蛍光バイオセンサーを駆使することで、これまで困難であったアロステリック薬の合理的な探索手法の開発に成功した。さらに、化合物ライブラリーを用いて薬剤スクリーニングを行った結果、複数ヒット化合物が得られ、そのいくつかは実際にアロステリック作動薬として機能することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質に作用するアロステリック薬を検出する方法として、アフィニティーレシオアッセイが報告されている。この手法はバックグラウンドを示す余剰の放射性同位体標識したアンタゴニスト除去及び膜画分の濃縮のため濾過及び洗浄過程を要し、親和性の低いアロステリック薬や神経伝達物質受容体アゴニストは洗い流されてしまうため、偽陰性が多く神経伝達物質受容体に対する評価は困難である。一方、本手法ではバックグラウンドとなるものがないため洗浄が不要であり、細胞を破砕せずに、生細胞において簡便に評価できるため、スループット性が高い。すなわち、膜タンパク質に作用するアロステリック薬探索の新手法として位置付けられる。

研究成果の概要（英文）：Allosteric modulators have drawn intense attention because of their higher specificity and less toxicity relative to traditional compounds which are bound to the orthosteric site of a target protein. However, it is hard to discover such allosteric modulators acting on membrane-proteins, an important drug target, resulting in being stagnated development of these modulators recently. Here, we developed a new method termed BFQRAP (Bimolecular Fluorescence Quenching and Recovery with Assistance of Positive allosteric modulator) using GABAAR-based semisynthetic fluorescent biosensors constructed by ligand-directed chemistry, which enables to efficiently select positive allosteric modulators that is bound to various allosteric sites of GABAAR.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 化学系薬学 創薬化学 薬理学 神経伝達物質受容体 アロステリック作動薬
蛍光バイオセンサー 薬剤スクリーニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

創薬開発は、10~15年という長い年月、そして平均で12億円という巨額の開発費を投じられ実施されるが、安全性の問題等で開発が中止されることが多く、その成功率が年々低下し続けていることが問題となっている。その中でも特に、脳を標的とした向精神薬の開発効率が著しく低下している。このような状況を打破するものとして、アロステリック薬が注目されている。アロステリック薬はそれ単体では活性はなく、生体内においてアゴニストが放出された限られた空間のみで活性を示すため副作用が出にくいと期待されている。しかしながら、現在、向精神薬の重要な標的である神経伝達物質受容体に作用するアロステリック薬の合理的な探索法は無く、その開発は急務であった。

2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では様々なアロステリック薬結合部位に作用するアロステリック薬を合理的に探索可能な方法の開発を目的とした。具体的には、正のアロステリック薬はアゴニストの親和性を向上させるが、アンタゴニストの親和性はほとんど変化させないという性質に着目し、研究代表者らが過去に開発した GABA_A 受容体の GABA (アゴニスト) 結合部位の蛍光バイオセンサー(Yamaura, K. *et al.*, *Nature Chem. Biol.*, 2016)と低濃度の GABA (アゴニスト) を組み合わせることで開発できると考えた(図1)。

クエンチャー・アンタゴニストコンジュゲート

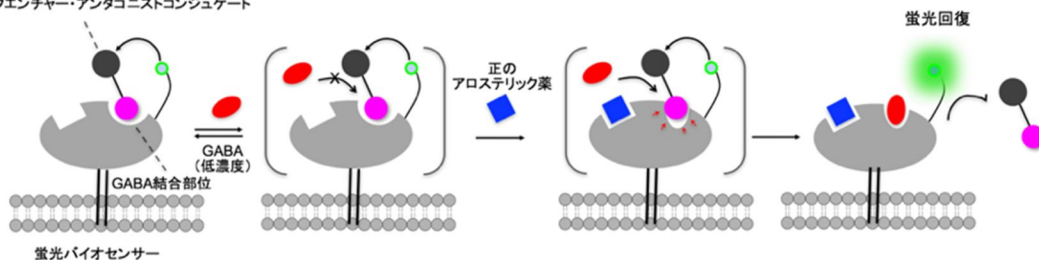


図1 蛍光バイオセンサーを用いたアロステリック薬検出の流れ
模式図であり、GABA_A 受容体の構造とは異なる

3. 研究の方法

蛍光バイオセンサーの構築には、細胞膜上に GABA_A 受容体を強制発現させた生細胞を用い、化学的修飾法としてリガンド指向性化学を用いた。これにより、GABA_A 受容体の機能を失活することなくアゴニスト・アンタゴニスト結合部位近傍に蛍光色素が修飾される。続いて対応するクエンチャー・コンジュゲートによって蛍光バイオセンサーを構築した。その蛍光バイオセンサーを用いたアロステリック薬の検出は共焦点レーザー顕微鏡を使って評価した。また、化合物ライブラリーは市販品を使用した。

4. 研究成果

(1) 正のアロステリック作動薬の検出

既報の方法に倣い、GABA 結合部位を蛍光バイオセンサー化し、GABA_A 受容体の正のアロステリック作動薬である etomidate 共存及び非共存下において GABA の濃度依存性を調べた結果、etomidate 共存下では大きく GABA 濃度応答曲線が低濃度側にシフトした。このことから、図1のように正のアロステリック作動薬が検出できることが期待され、実際、低濃度の GABA として 0.5 mM GABA を用いることで、蛍光回復に基づき etomidate を検出することに成功した。

(2) 正のアロステリック作動薬の選別

図1の方法では蛍光回復に基づいて薬剤を検出するため GABA 結合部位に競合する薬剤も検出してしまふ。従って、それら競合的な薬剤と正のアロステリック薬とを区別するために簡便なネガティブセレクション法も考案した(図2)。具体的には、低濃度の GABA の有無(図1及び2)における検出結果の比較により判断可能である。低濃度の GABA が存在しているときに蛍光回復を示し、存在していないときに蛍光回復を示さないものがアロステリック薬と判断できる。

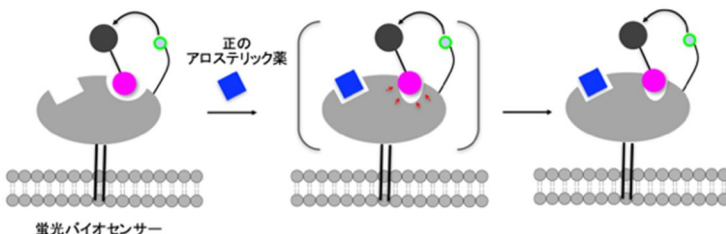


図2 蛍光バイオセンサーを用いたアロステリック薬ネガティブセレクションの流れ

実際に、このネガティブセレクションを組み合わせることによって GABA_A 受容体に作用する様々な異なる薬剤結合部位に結合する正のアロステリック作動薬のほか、オープンチャネルブロッカー、競合阻害剤などから選択的に正のアロステリック作動薬のみを選別することに成功した。

(3) 薬剤スクリーニングへの応用

この方法論を市販品の化合物ライブラリーを用いて薬剤スクリーニングを行った。その結果、複数ヒット化合物が得られた。電気生理学的にヒット化合物がアロステリック作動薬が検証した。その結果、clemizole、CGP-13501、paliperidone はそれぞれ GABA 作動性電流を可逆的に増加させたことより、それらの化合物が GABA_A 受容体のアロステリック作動薬として機能することが世界で初めて明らかとなった。また、paliperidone はさらなる評価実験により既存の結合部位とは異なる結合部位に結合部位が示唆された。つまり、この手法は GABA の親和性の向上を引き金として正のアロステリック作動薬を検出するものであり、未知の結合部位を含む様々なアロステリック結合部位に結合する作動薬を網羅的に検出可能な方法であると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seiji Sakamoto, Kei Yamaura, Tomohiro Numata, Fumio Harada, Kazuma Amaike, Ryuji Inoue, Shigeki Kiyonaka, and Itaru Hamachi	4. 巻 5
2. 論文標題 Construction of a Fluorescent Screening System of Allosteric Modulators for the GABAA Receptor Using a Turn-On Probe	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 1541-1553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00539	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kei Yamaura, Tomohiro Numata, Shigeki Kiyonaka and Itaru Hamachi
2. 発表標題 Rational selection method for allosteric modulators of GABAA receptors using ligand-directed chemistry
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----