

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32623

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460092

研究課題名(和文) GPCRのアロステリックリガンド：細胞応答測定による親和性解析法とリガンド探索

研究課題名(英文) Study of the affinities of allosteric ligands for G protein-coupled receptors by the measurement of cellular signaling

研究代表者

須賀 比奈子 (Suga, Hinako)

昭和女子大学・生活科学部・准教授

研究者番号：50261186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品の約半数はGタンパク質共役受容体(GPCR)を標的としている。GPCRのアロステリックリガンドは、内在性の神経伝達物質やホルモンなどの生理的作用を促進する、オルソステリック薬(これまでの治療薬)の特異性を高める等、副作用が少ない治療法として期待されている。しかし、アロステリックリガンドの検出は難しい。本研究では、細胞応答の種類やオルソステリック薬の種類に影響されない、細胞応答測定のみでできる(リガンド結合実験が不要な)アロステリックリガンドの親和性解析法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：I explored a novel method to analyze affinities of allosteric ligands by measuring a response downstream in the signaling pathway, without using radioligands. I measured carbamylcholine (agonist)-induced signaling responses of cells expressing wild type M2 muscarinic receptor or a constitutively active mutant of M2 muscarinic receptor after partial receptor inactivation by atropine (antagonist) using TGF β shedding assay. I'm analyzing the data and getting estimates of the isomerization constant of the unoccupied receptor, the sensitivity constant of the signaling pathway, and the more empirical parameters of the receptor population including the observed affinities and efficacies of allosteric and orthosteric ligands, including inverse agonists, and the efficacy of the unoccupied receptor (i.e., constitutive activity). My method will provide a more meaningful analysis of structure-activity relationships, and an absolute measure of agonist bias.

研究分野：受容体薬理学

キーワード：GPCR Gタンパク質共役受容体 ムスカリン受容体 アセチルコリン リガンドバイアス アロステリックリガンド 細胞応答 リガンド

1. 研究開始当初の背景

医薬品の約半数はGタンパク質共役受容体(GPCR)を標的としている。ムスカリン性アセチルコリン受容体は、GPCRの一種であり、アルツハイマー病やパーキンソン病等精神神経疾患や癌等多くの病因と関係している。ムスカリン受容体には5つのサブタイプ(M1-M5)が存在し、各々異なる病因と関係している。一方、ムスカリン受容体に作用する治療薬は、サブタイプ特異性が低く、副作用が強い為、あまり用いられていない。例えば、パーキンソン病治療に用いられるムスカリン受容体拮抗薬は、病因に関与するM1受容体だけでなく、M2受容体やM3受容体も阻害し、それぞれ頻脈や口渇等を引き起こす。

GPCRには、オルソステリックなりリガンド結合部位とは異なる場所に、アロステリックなりリガンド結合部位が存在する。ムスカリン受容体の場合、アセチルコリンや現在の治療薬は、オルソステリックリガンドである。アロステリックリガンドは、オルソステリックリガンドの作用を促進又は抑制する。オルソステリック部位はサブタイプ間で高く保存されており、類似している為、オルソステリックリガンドはサブタイプ特異性が低い。一方、アロステリック部位は保存性が低い為、アロステリックリガンドはサブタイプ特異性が高い。これらのことから、アロステリック薬は、生理的条件下で局所的に分泌された内在性リガンドの作用を促進又は抑制する、オルソステリック薬の特異性を高め、有効濃度を下げる等、副作用が少ない治療法として期待されている。

ところで、脱感作は、オルソステリック薬により活性化した受容体が細胞内に取り込まれることによって起こり、薬物耐性やパーキンソン病治療薬(ドパミン前駆体)長期使用症候群等の一因と考えられている。一方、アロステリック薬は、受容体の活性化状態を変え、細胞内取り込み及び脱感作を抑制する可能性があり、薬物耐性を軽減させることが期待されている。

GPCRのアロステリックリガンドは、創薬の可能性から、主に医薬品メーカーによって、この数年急に注目されているが、基礎的な解析はほとんど行われていない。アロステリックリガンドの検出は難しい。検出にはリガンド結合実験と細胞応答測定が用いられるが、リガンド結合実験は、比活性の高い標識リガンドが無い場合、行うことはできない。また、細胞応答は、測定する細胞応答の種類や、使用するオルソステリックリガンドの種類によって、用量効果と最大応答が複雑に大きくばらつく。アロステリックリガンドの親和性や有効性を、リガンド結合ではなく、細胞応答測定によって解析する方法は、まだ報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞応答測定によるアロステリックリガンドの解析法を開発することである。GPCRのモデルとして、ムスカリン受容体を用いる。また、本研究の目的は、パーキンソン病等治療のリードとしてムスカリンM1受容体のアロステリックリガンドを探索することである。これらの研究により、アロステリック薬の臨床応用への展開を図る研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 細胞応答測定によるアロステリックリガンドの解析法の開発

本研究では、GPCRへのアロステリックリガンド結合に関する全ての媒介変数を推定する理論と条件を確立する。まず、GPCRの発現が減少している、或は、一部が不活性化している、そしてアロステリックリガンドが結合している状態で、細胞応答を解析することにより、不活性化型GPCRの異性化定数 K_{q-obs} と、細胞応答の感受性定数 K_{E-obs} が推定できることを示す(図1)。これらの推定値と、濃度応答曲線の解析から、活性型と不活性化型GPCRの親和定数(オルソステリックリガンドの場合それぞれ K_b と K_a 、アロステリックリガンドの場合それぞれ K_f と K_e ; 図2)が推定できること、更に、オルソステリックな作動薬と逆作動薬の有効性、アロステリックリガンドの有効性、リガンドが結合していない(恒常的)活性など、受容体全体により経験的な媒介変数が推定できることを示す。さらに、培養細胞に発現させたムスカリンM2受容体を、拮抗薬を添加することにより一部を不活性化させ、各種作動薬で刺激して、細胞応答を測定する。細胞応答測定は、TGF α 切断アッセイにより行う。得られたデータを用いて上述の解析法を実証する。

(2) パーキンソン病等治療のリードとなる候補化合物の探索

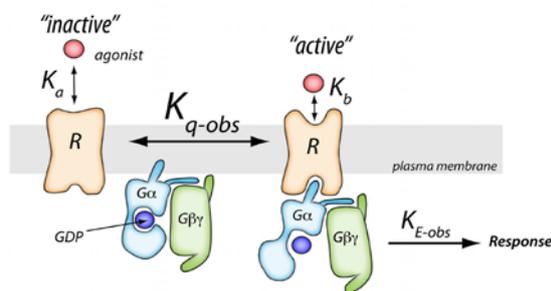


図1 不活性化型 GPCR と活性化型 GPCR に関する定数

不活性化型 GPCR に対する作動薬の親和定数 K_a 、活性化型 GPCR に対する作動薬の親和定数 K_b 、不活性化型 GPCR と活性化型 GPCR の間の異性化定数 K_{q-obs} 、細胞応答の感受性定数 K_{E-obs} を示した。

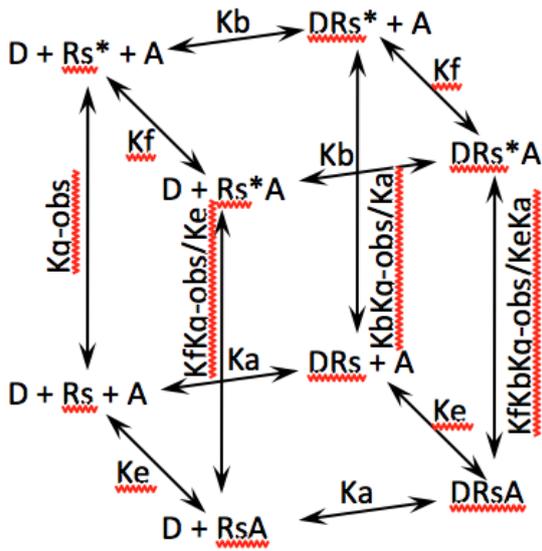


図2 GPCRの活性化状態とリガンドとの相互作用を立方体で表した図
 不活性型 GPCR (Rs)を下に、活性型 GPCR (Rs*)を上を示した。GPCRの異なる場所にオルソステリックリガンド(D)とアロステリックリガンド(A)は結合する。

本研究では、遺伝性若年性パーキンソン病原因遺伝子産物 PINK1 の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニングを行い、複数のヒット化合物を獲得する。スクリーニング法として、PINK1 促進剤および阻害剤を同時に検出できる方法を開発する。化合物ライブラリーは、384 穴プレートに分注した状態で、東京大学創薬機構から提供を受けて使用する。化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、PINK1/Parkin 共発現細胞の増殖を阻害または促進 (PINK1 活性を促進または阻害) した化合物の濃度応答曲線を作成し、活性と特異性が高いもの (ヒット化合物) を探す。

4. 研究成果

(1) 細胞応答測定によるアロステリックリガンドの解析法の開発

野生型ムスカリン M2 受容体、または、恒常的に活性化させた変異型ムスカリン M2 受容体を培養細胞に発現させて、作動薬で刺激し、細胞応答を測定した。また、この解析法が、様々な細胞内シグナル系に対する作動薬の選択性 (リガンドバイアス) の定量に適用可能か調べるため、リガンドバイアスの定量に適した細胞応答測定法として TGF α 切断アッセイを最適化した。図3に、培養細胞に発現させた野生型および変異型ムスカリン M2 受容体を、様々な濃度の拮抗薬アトロピン存在下で、作動薬カルバミルコリンで刺激し、TGF α 切断アッセイを用いて細胞応答を測定した結果を示した。この方法を用いることにより、リガンド結合に関する全ての媒介変数を推定する理論と親和性解析に必要なデータを収集した。現在、不活性型受容体の

活性型受容体への異性化定数と、細胞応答の感受性定数の解析を行っている。また、これらの推定値と濃度応答曲線の解析から、活性型と不活性型受容体の親和定数、作動薬と逆作動薬の有効性、恒常的活性など、受容体全体により経験的な媒介変数の解析を行っている。

この解析法が開発されると、標識リガンドや比活性の高い標識リガンドが無い

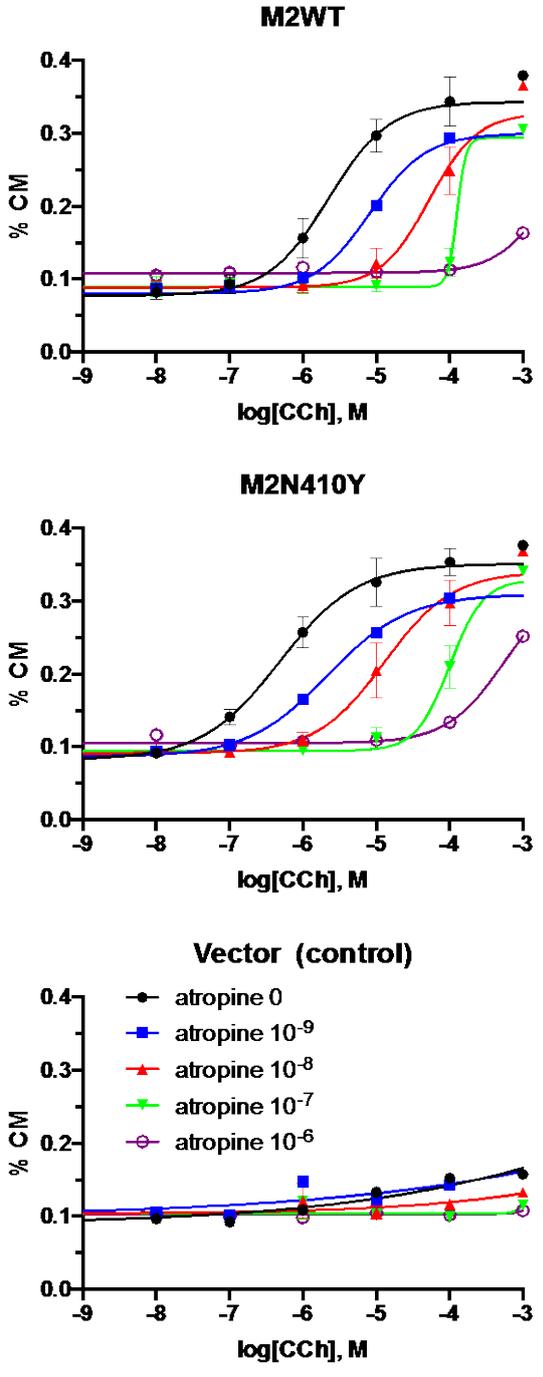


図3 野生型および変異型ムスカリン M2 受容体に対する作動薬の効果
 野生型および変異型 M2 受容体を培養細胞に発現させて、様々な濃度の拮抗薬存在下で、様々な濃度の作動薬で刺激し、TGF α 切断アッセイを行い、濃度応答曲線を作成した。

などの理由で、リガンド結合実験ができない場合でも、細胞応答測定のみで、アロステリックリガンドの親和性解析が可能になる。また、リガンドバイアスの定量が可能になる。

(2) パーキンソン病等治療のリードとなる候補化合物の探索

私は、パーキンソン病治療のリードとして、ムスカリン M1 受容体のアロステリックリガンド探索を試みていたが、メガファーマなどが同様の研究を行っていることを知った。そこで、パーキンソン病の新たな治療標的を探した。

PINK1 は、パーキンソン病の発症を抑制している。そこで、私は、PINK1 活性を促進する化合物は、パーキンソン病の予防および治療に役立つのではないかと考えた。しかし、PINK1 促進剤や阻害剤として使える化合物はまだ報告されていない。そこで、まず、PINK1 促進剤および阻害剤を同時にスクリーニングする方法を確立した。この方法では、PINK1 とパーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin を共発現させた細胞の増殖を指標として、化合物のスクリーニングを行った。東京大学創薬機構の化合物ライブラリのスクリーニングを行い、増殖促進 (PINK1 の機能阻害) または増殖阻害 (PINK1 の機能促進) が Parkin 単独発現細胞より大きかった化合物について、濃度応答曲線を作製した。その結果、Compound B は、増殖阻害活性があり、 EC_{50} は 1 μ M 程度と低く、PINK1/Parkin 共発現細胞と Parkin 単独発現細胞の $\log EC_{50}$ の差が 0.7 程度だった。このことから、Compound B は、増殖阻害剤 (PINK1 促進剤) のリード化合物として、構造最適化に使える可能性があると考えた。

現在、Compound B や他のヒット化合物が PINK1 に作用しているか、PINK1 のキナーゼ活性に影響しているかなど、ヒット化合物の作用機構を調べている。PINK1 に作用するヒット化合物が見つかり、それが最適化に使える構造をしている場合、リード化合物として構造最適化を行い、PINK1 の機能促進剤および阻害剤を開発する予定である。将来は、開発した PINK1 の機能促進剤および阻害剤を用いて、PINK1 の機能や、PINK1/Parkin による増殖阻害やオートファジーのメカニズムを解明することを考えている。

本研究で開発される PINK1 促進剤および阻害剤を用いれば、PINK1 によるオートファジーおよびパーキンソン病発症の分子メカニズムが解明され、PINK1 促進剤によるパーキンソン病の予防および治療法の開発に役立つと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 6 件)

① 須賀 比奈子、細胞応答測定による G タンパク質共役受容体の親和性の解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会

(ConBio2017)、2017 年

② 須賀 比奈子、パーキンソン病原因遺伝子産物 PINK1 の促進剤及び阻害剤の探索と作用機構の解析、平成 28 年度「ミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワークの解明」合同研究報告会、2016 年

③ 須賀 比奈子、オレキシン受容体のアミノ酸残基 2.65 及び 3.33 はオレキシンの認識に関与している、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年

④ 須賀 比奈子、パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin/PINK1 の促進剤及び阻害剤のスクリーニング、平成 27 年度「ミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワークの解明」合同研究報告会、2015 年

⑤ 須賀 比奈子、オレキシン受容体 OX2R のリガンド結合ポケット及びその周辺への変異導入解析、日本薬学会第 135 年会、2015 年

⑥ 須賀 比奈子、オレキシン受容体によるオレキシン A と B の識別機構の解析、第 87 回日本生化学会大会、2014 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

昭和女子大学 教員紹介・研究業績
<http://gyouseki.swu.ac.jp/swuhp/KgApp?kyoinId=yomisgbgegy>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須賀 比奈子 (Suga, Hinako)
昭和女子大学・生活科学部・准教授
研究者番号： 50261186

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
エラート フレデリック (Ehlert,
FJ.)
カリフォルニア大学アーバイン校・医学
部・教授