

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05746

研究課題名(和文) 特異的的化学修飾を基軸とする内蔵性GABA(A)受容体のバイオセンサー化

研究課題名(英文) Construction of ligand assay system for GABA(A) receptors using ligand-directed chemistry

研究代表者

坂本 清志 (Sakamoto, Seiji)

京都大学・工学研究科・特定准教授

研究者番号：30335228

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)：GABA(A)受容体は、中枢神経系における速い抑制性神経伝達の大部分を行うことが知られており、その機能異常は多くの精神疾患に関与することから、様々な神経疾患治療や新規向精神薬開発の標的となっている。本研究では、GABA(A)受容体に作用する特異的リガンドやアロステリックモジュレーターを蛍光検出可能なアッセイ系の開発を目指して、ターンオン型蛍光イメージングプローブを用いたGABA(A)受容体のバイオセンサー化を行なった。また、生きたマウス脳内や神経細胞上における内蔵性GABA(A)受容体のバイオセンサー化を目指して、リガンド指向性化学を用いて受容体を特異的に蛍光標識する技術の開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GABA(A)受容体は神経機能制御に必須であり、その機能異常は不眠・不安・緊張・けいれん・てんかん等様々な病態を引き起こすことから、様々な神経疾患と精神疾患の治療標的にもなっている。従って、本研究で構築を試みる受容体型バイオセンサーは、脳高次機能に対する分子レベルでの基礎的知見を与えるのみならず、神経関連疾患に対する新規薬剤設計においても重要な指針を与えることが期待できる。さらに、生体分子間相互作用解析のために、高い認識能と感度を備えた機能分子センサーや新たな分析、計測手法の開発は必須であり、研究成果の技術的ニーズは高い。

研究成果の概要(英文)：gamma-Aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. The fast inhibitory actions of GABA are mainly mediated by GABA(A) receptors (GABA(A)Rs), which are widely recognized as clinically relevant drug targets. However, it remains difficult to create screening systems for drug candidates that act on GABA(A)Rs because of the existence of multiple ligand-binding sites and the delicate pentameric structures of GABA(A)Rs. In this study, we developed the first turn-on fluorescent imaging probe for GABAARs, which can be used to quantitatively evaluate ligand-receptor interactions under live cell conditions. In addition, with the aim of developing fluorescent biosensors using endogenous GABA(A)Rs in living mouse brains and neurons, we explored a new method based on ligand-directed chemistry that allow the chemical labeling of endogenous receptors without genetic manipulations.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：GABA(A)受容体 リガンド指向性化学 タンパク質ラベル化 バイオセンサー イメージングプローブ

1. 研究開始当初の背景

γ -アミノ酪酸 (γ -Aminobutyric acid : GABA) は主要神経伝達物質の一つであり、脳内における抑制性伝達を担っている。そのイオンチャネル型受容体である GABA(A) 受容体は、中枢神経系における速い抑制性神経伝達の大部分を行うことが知られている。これまでに、GABA(A) 受容体を構成するサブユニットとして、 $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , π , および $\rho 1-3$ の少なくとも 19 種類が同定されているが、脳内では様々な異なるサブユニットの組み合わせから成るヘテロ 5 量体として存在し、脳の各領域やニューロン内局在に依存して、サブタイプ特異的な機能を発現しているものと考えられている。GABA(A) 受容体は、神経伝達制御において必須であり、その異常は不安障害や睡眠障害、うつ病や統合失調症など多くの精神疾患に関与することから、様々な治療法や新規向精神薬開発の標的となっている。しかしながら、その複雑なサブユニット構成や構造情報の不足から理論的薬剤設計やハイスループットなスクリーニング系の構築は未だ困難な状況にある。従って、実際の脳組織や脳内における内存性 GABA(A) 受容体の発現分布や機能、薬剤応答性を詳細かつ系統的に分析可能なアッセイ系の開発は、様々な神経疾患治療や複雑な脳機能の分子レベルでの解明において多大な貢献を果たすことが期待される。イオンチャネル型受容体と化合物との相互作用様式を解析する上で、パッチクランプ法を用いた電気生理学的手法は、現在において強力なツールの一つである。しかしながら、パッチクランプ法は、特殊な技術を必要とし、多数の薬剤候補をスクリーニングする上でのハイスループット性に欠ける。また、膜タンパク質受容体に対するリガンド親和性評価には、放射線標識した化合物を用いた方法が利用されているが、主に細胞破碎後の膜画分を測定対象とするため、生きた細胞上や脳組織中における真の受容体機能を反映しているとは考え難い。また現在、可溶性タンパク質に関しては、NMR、SPR、QCM、ITC 等を用いた試験管内でのタンパク質-化合物相互作用に関する速度論的および熱力学的解析が可能となっているが、これらの手法は、生きた細胞や組織中での GABA(A) 型受容体等の巨大な膜タンパク質に対しては、未だ適用困難である。従って、GABA(A) イオンチャネル型受容体等の膜タンパク質受容体に対する多様な化合物の機能評価を網羅的かつ詳細に行うためには、既存法とは異なる新規ケミカルバイオロジー的方法論の開発が必須と考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本申請課題では、生細胞上に発現させた GABA(A) 受容体や生きた脳や神経細胞といった天然環境下における内存性 GABA(A) 型に受容体に結合したときのみ発光するターンオン型イメージングプローブや受容体に対する特異的的化学標識を基軸とするタンパク質型バイオセンサーを構築することを目的とする。具体的には、当研究室で独自に開発したリガンド指向性アシルイミダゾール (LDAI) 化学手法を用いて、生きたマウス脳内や脳組織上に存在する内存性 GABA(A) 受容体のリガンド結合部位近傍に蛍光色素や機能性原子団の位置特異的導入可能な技術の開発を目指した。リガンド指向性アシルイミダゾール (LDAI) 化学法においては、受容体特異的リガンド部位、アシルイミダゾール型反応性ユニットおよび蛍光プローブから構成される LDAI 標識試薬を標的タンパク質依存的に設計かつ合成する。生きたマウス脳内や組織にラベル化試薬を直接添加することによって、ターゲットタンパク質特異的に、リガンド結合部位近傍の求核性アミノ酸残基側鎖上へ共有結合を介して蛍光機能団の位置特異的な導入を試みる。本手法では、複合化する蛍光プローブや機能性分子が比較的小サイズであることに加えて、受容体タンパク質へのアミノ酸変異導入やタグ配列の挿入を必要としないため受容体機能を損なうことなく内存性タンパク質の化学修飾を実行することが可能となるものと考えた。

3. 研究の方法

研究第一段階では、当研究室で開発された LDAI 化学を基軸する内在性タンパク質ラベル化技術の開発を行なった。LDAI 試薬を構成するリガンド部位、反応性ユニットであるアシルイミダゾール基、蛍光性色素やそれらを連結するリンカーの種類や長さ等を系統的置換した LDAI ラベル化剤を種々合成し構造最適化を行なった。実際の実験では、培養細胞上に発現させた GABA(A) 受容体を用いて、設計した各化合物におけるセンシング機能やラベリング効率、選択性や応答速度を含めた受容体ラベル化能について詳細かつ系統的に評価した。さらに、設計した LDAI 試薬を用いて、マウスから単離したニューロンや急性脳組織スライスに加えて生きたマウス脳内に存在する内存性 GABA(A) へのラベル化を行い、効率的タンパク質化学ラベル化に必要な要素を見出すこととした。さらに、GABA(A) 受容体を特異的に認識したときのみ発光を発するターンオン型蛍光プローブと培養細胞上に発現した GABA(A) 受容体を用いたリガンドアッセイ系の構築と機能最適化を行った。

4. 研究成果

(1) リガンド指向性 LDAI 化学を用いた内在性 GABA(A)受容体ケミカルラベル化技術の開発

リガンド指向性 LDAI 化学ではリガンド認識駆動に基づき、標的タンパク質や膜タンパク質受容体のラベル化を可能とする。LDAI 化学を用いることで、初代培養神経細胞やマウス急性脳スライス上に存在する内在性 GABA(A)受容体を特異的にラベル化し、受容体リガンド結合サイト近傍に蛍光色素を導入することに成功した。また、生きたマウス脳内における内在性受容体ケミカルラベルには、ラベル化分子の拡散性、滞留性、器官内分布・反応特性（反応速度、官能基選択性）、リガンド親和性などが重要な要素となるが、受容体に対して異なる親和性をもつリガンド（数種類）、親水性や電荷の異なるプローブ部分などを組み合わせた反応性分子を合成し、脳内でのラベル化反応特性を検討した。ウエスタンブロッティング、in gel 蛍光解析、超解像共焦点レーザー顕微鏡イメージングや IP-MS/MS 解析など、様々な生化学的/生物学的手法を駆使し、それぞれのラベル化剤のマウス脳内での拡散性・滞留性、器官内分布だけでなく、GABA(A) 受容体に対する選択性や反応効率、ラベル化速度を評価した結果、実際に生きたマウス脳内で機能する LDAI ラベル化分子の開発に成功した。

(2) ターンオン型蛍光プローブを用いた新規 GABA(A)受容体アロステリックモジュレーターのスクリーニング

GABA(A)受容体に結合したときのみ蛍光を発するターオン型プローブを用いて生きた培養細胞上に発現した GABA(A)受容体のバイオセンサー化を行なった (S. Sakamoto *et al.*, *ACS Cent. Sci.*, **2019**, 5, 1541) (Figure)。この GABA(A)受容体型バイオセンサーは、プローブと競合的に結合するアゴニストやアンタゴニストに加えて、受容体のリガンド結合部位以外に相互作用して、受容体の GABA 親和性を変化させるアロステリックモジュレーターの検出も可能とする。これを用いて、生理活性物質候補に対する蛍光アッセイスクリーニングを行い、GABA(A)受容体に対してポジティブアロステリックモジュレーターとして機能する新規のリガンド候補を見出すことに成功した (A. Hugo *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **2022**, 13:5689)。電気生理学的評価や生きたマウス投与後の行動試験から、見出された化合物が生きたマウス脳内で GABA(A)受容体に対して機能している可能性が強く示唆されている。本成果は、受容体ベースのバイオセンサーが薬剤候補の迅速なスクリーニングに有効であることを強く示唆する。

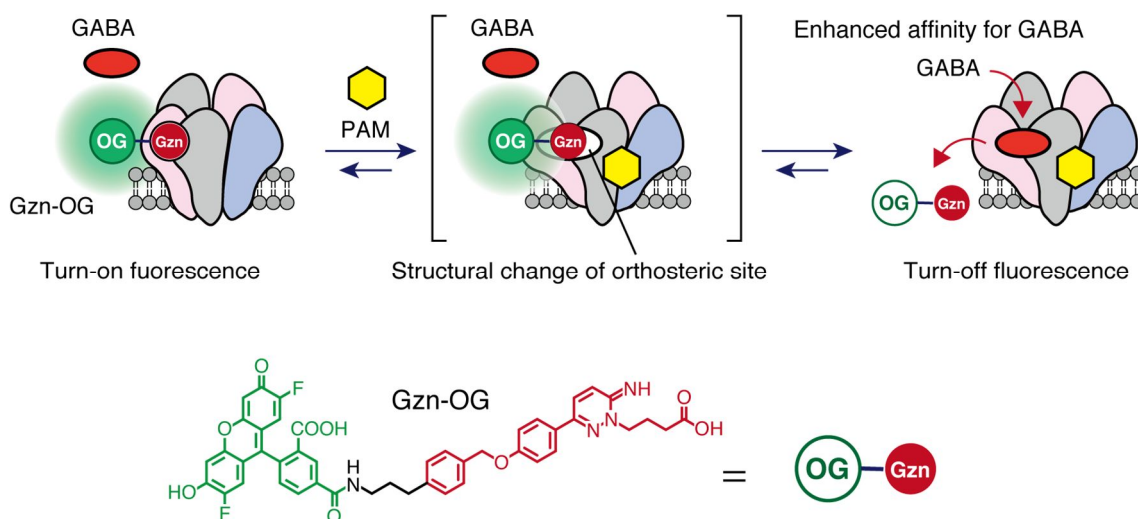


Figure. Schematic Illustration of GABA(A)R based ligand assay system.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seiji Sakamoto, Itaru Hamachi	4. 巻 2023
2. 論文標題 Ligand-directed chemistry for protein labeling for affinity-based protein analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Israel Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 e202200077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijch.202200077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hugo R. Arias, Allison L. Germann, Spencer R. Pierce, Seiji Sakamoto, Marcelo O. Ortells, Itaru Hamachi, Gustav Akk	4. 巻 179
2. 論文標題 Modulation of the mammalian GABAA receptor by type I and type II positive allosteric modulators of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 5323-5337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.15948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kiyoto Kamagata, Nanako Iwaki, Milan Kumar Hazra, Saori Kanbayashi, Trishit Banerjee, Rika Chiba, Seiji Sakamoto, Virginie Gaudon, Bertrand Castaing, Hiroto Takahashi, Michiko Kimura, Hiroyuki Oikawa, Satoshi Takahashi, and Yaakov Levy	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular principles of recruitment and dynamics of guest proteins in liquid droplets.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98955-0	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 Takeharu Mino, Seiji Sakamoto, and Itaru Hamachi	4. 巻 85
2. 論文標題 Recent applications of N-acyl imidazole chemistry in chemical biology.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem	6. 最初と最後の頁 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbaa026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 坂本清志・白岩和樹・清中茂樹・野中洋・浜地格
2. 発表標題 Ligand directed chemistry in live mouse brain (2):様々な神経伝達物質受容体への拡張と寿命解析
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野中洋・白岩和樹・坂本清志・清中茂樹・浜地格
2. 発表標題 Ligand directed chemistry in live mouse brain (3): 生後発達期の脳内AMPA受容体の動態解析
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武士 拓磨・白岩 和樹・石川 守・坂本 清志・野中 洋・浜地 格
2. 発表標題 リガンド指向性化学によるドパミン受容体の選択的ラベル化
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 清志、原田 文雄、清中 茂樹、野中 洋、浜地 格
2. 発表標題 内存性GABA(A) 受容体のマウス脳内固定化駆動ケミカルラベリング
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 美野 文晴、Luisa Kraus、坂本 清志、野中 洋、浜地 格
2. 発表標題 内在性mGlu1受容体のマウス脳内固定化駆動ケミカルラベリング
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 美野 文晴、天池 一真、野中 洋、坂本 清志、浜地 格
2. 発表標題 脳内における内在受容体の固定化駆動ラベリング
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020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

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