

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19338

研究課題名（和文）トランスポーター創薬を飛躍的に加速するハイスループットスクリーニング技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of high-throughput screening technology to accelerate transporter-targeted drug discovery

研究代表者

宮地 孝明（Miyaji, Takaaki）

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・研究教授

研究者番号：40550314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：これまでトランスポーターの普遍的なハイスループットスクリーニング技術がなかったため、トランスポーターの過半数の機能は不明なままである。本研究では、幅広い輸送基質候補の中から任意のトランスポーターの輸送機能を同定し、さらにはその創薬候補化合物をハイスループットで探索できる夢のような基盤技術の開発に挑戦した。その結果、オルガネラレベルのプロテオーム解析によって候補トランスポーターを選抜し、そのトランスポーターの大量発現・精製系を確立した。次に、輸送基質の候補を結合実験のスクリーニングによって選抜し、このトランスポーターの輸送機能を同定した。さらに、このトランスポーター阻害剤を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスポーター標的型の医薬品は全体の約7%しかこれまでに上市されていないため、トランスポーター創薬は未開拓な研究領域の一つである。本研究技術によって、トランスポーターの機能同定から創薬研究までの方法を確立することができた。本研究技術は全てのタイプのトランスポーターを高感度に定量評価できるため、トランスポーター創薬研究のパラダイムシフトが期待される。

研究成果の概要（英文）：Because there was no optimal method to evaluate the transport activity, the function of majority of transporters remained unknown. In this study, we aimed to establish universal evaluation system of eukaryotic transporters to be suitable for identifying unknown functions and drug screening. We selected candidate proteins by organellar proteomics, and established over-expression and purification system of the transporters. Furthermore, we selected the candidates of transport substrate by bidding screening, and identified transport function of transporters and the inhibitors by reconstituted proteoliposomes containing purified transporter. Thus, we have constructed a platform for function analysis and drug discovery of eukaryotic transporters using the over-expression and purification system.

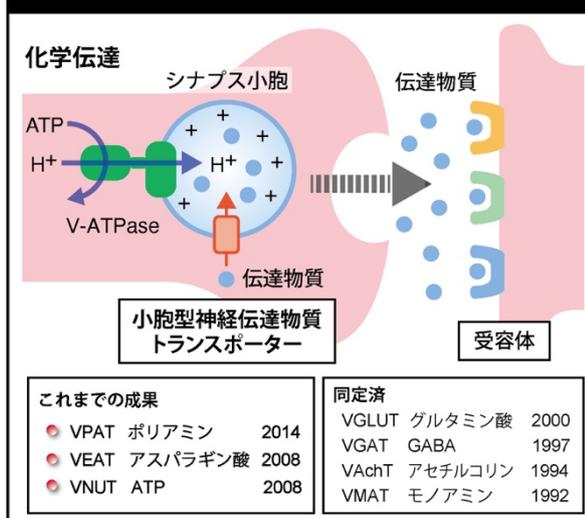
研究分野：膜輸送分子生物学

キーワード：トランスポーター 創薬 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

神経は分泌小胞に充填した伝達物質を開口放出し、後シナプス側に情報を伝達する。これが高次神経機能を支える神経伝達の素反応である。このうち小胞型神経伝達物質トランスポーターは伝達物質の小胞内充填と放出を司り、神経伝達に必須の構成因子である(図1)。これまでに独自のトランスポーターの輸送活性評価技術により、小胞型神経伝達物質トランスポーターファミリーの機能未知遺伝子の中から、ATP やアスパラギン酸、ポリアミンの小胞型神経伝達物質トランスポーターを同定し、特異的阻害剤は既存治療薬よりも副作用なく、様々な疾患を有効に治療できることを見出した。しかしながら、これらトランスポーターのハイスループットスクリーニング技術がなかったため、小胞型神経伝達物質トランスポーターの多くは未だ不明なままであった。

図1 小胞型神経伝達物質トランスポーターの役割



2. 研究の目的

本研究では、幅広い輸送基質候補の中からトランスポーター候補の輸送機能を同定し、さらにはその創薬候補化合物をハイスループットで探索できる夢のような基盤技術の開発に挑戦した。また、この技術を利用して、神経伝達の種類と開始点を決定する小胞型神経伝達物質トランスポーターの全貌を明らかにし、脳・創薬研究分野で革新的な分子プローブを提供することを目指した。

3. 研究の方法

(1) シナプス小胞のプロテオーム解析

マウス脳からシナプス小胞画分を調製し、密度勾配遠心法によってシナプス小胞を単離した。これを質量分析装置でLC-MSMSし、シナプス小胞に局在する膜タンパク質を網羅的に探索した。

(2) 候補トランスポーターの大量発現と精製

His タグを連結した候補遺伝子を含むプラスミドあるいはバキュロウイルスを作製した。これを大腸菌あるいは昆虫細胞に導入・感染させることで、タンパク質を大量発現させた。この膜画分を界面活性剤で可溶化し、アフィニティー精製した。

(3) サーマルシフトアッセイによる輸送基質スクリーニング

熱安定性はタンパク質を特徴付ける情報の一つであり、段階的熱変性試験で評価できる。タンパク質が基質と結合すると、コンホメーション変化を介して熱安定性が変化し、親和性の強さと相関する。タンパク質変性を検知する蛍光プローブを用いて、トランスポータータンパク質と基質の結合、その親和性を評価した。

(4) トランスポーターの輸送活性評価

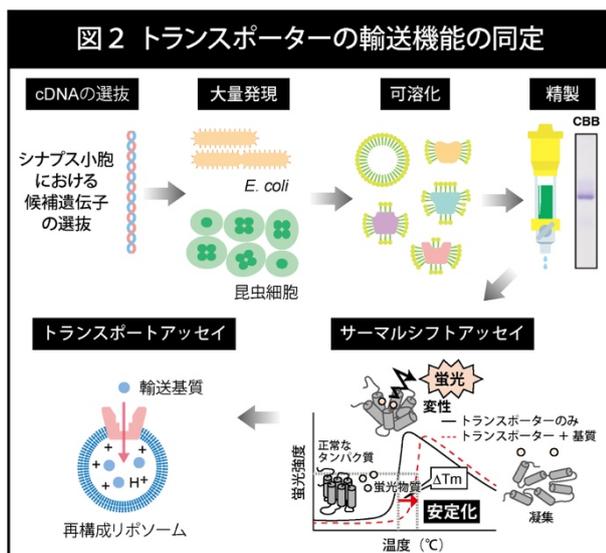
精製タンパク質を人工膜小胞(リポソーム)に凍結融解希釈法にて再構成した。再構成リポソームの内外のイオン組成を任意に設定し、RI 標識された神経伝達物質を加えて、輸送反応を開始した。その後、Sephadex G50 fine カラムにサンプルをアプライし、700 x g、2分、4°Cで遠心した。液体シンチレーションカウンターで再構成リポソーム内に取り込まれた RI 標識の神経伝達物質(溶出液)を定量した。

4. 研究成果

マウス脳から調製したシナプス小胞画分を密度勾配遠心して、分画したサンプルを電子顕微鏡法とウェスタンブロット法で確認した。その結果、高純度なシナプス小胞画分を得ることができており、細胞膜やミトコンドリア等の混入もほとんどないことを確認した。これを質量分析して、シナプス小胞に含まれる様々なタンパク質のリストを得た。リストの上位には既知のシナプス小胞タンパク質が多数含まれており、この中には既知の小胞型神経伝達物質トランスポータ

一も含まれていた。このリストから新しい小胞型神経伝達物質トランスポーターの候補遺伝子を選抜した。

候補タンパク質を大量発現・可溶化・精製して、ウエスタンブロット法とクマシーブリリアントブルー染色法にて候補トランスポーターを精製できていることを確認した。ハイスループット化のために96穴プレートを用いた。96穴プレートでのサーマルシフトアッセイにより、候補トランスポーターと結合する候補化合物を選抜した。次に、リポソームに再構成して輸送活性評価した。その結果、サーマルシフトアッセイでは偽陽性の化合物も含まれていたが、選抜した候補化合物の中から、輸送基質を特定し、その輸送特性を明らかにすることができた。また、阻害剤スクリーニングすることで、低濃度で候補トランスポーターを阻害する化合物を同定することができた。トランスポートアッセイは全ての候補トランスポーターの機能を評価することができたが、サーマルシフトアッセイではトランスポーターの種類によっては評価しにくいものが含まれていたため、サーマルシフトアッセイの汎用化は今後の課題の一つである。



以上より、候補トランスポーターの選抜からその輸送機能を同定し、阻害剤を探索する基盤技術を確認することができた (図2)。また、サーマルシフトアッセイとトランスポートアッセイを組み合わせることで、これまでよりもハイスループットに評価できるようになった。これまで小胞型神経伝達物質トランスポーターの多くは不明なまま残されていたが、この方法を利用することで、新しい小胞型神経伝達物質トランスポーターの輸送機能を同定し、その阻害剤を見出すことができた。これによって、神経伝達の新しい作動機構が明らかとなり、トランスポーター遺伝子やその阻害剤は脳・創薬研究分野で革新的な研究ツールになると期待される。トランスポーター標的型の医薬品は全体の約7%しかこれまでに上市されておらず、トランスポーター創薬は未開拓な研究領域の一つであるため、引き続き本基盤技術の高度化や一般化に取り組み、トランスポーター創薬を推進していきたい。

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mitani-Ueno Namiki, Yamaji Naoki, Huang Sheng, Yoshioka Yuma, Miyaji Takaaki, Ma Jian Feng	4. 巻 14
2. 論文標題 A silicon transporter gene required for healthy growth of rice on land	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-42180-y	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 Miyashita Tomoyuki, Murakami Kanako, Kikuchi Emi, Ofusa Kyouko, Mikami Kyohei, Endo Kentaro, Miyaji Takaaki, Moriyama Sawako, Konno Kotaro, Muratani Hinako, Moriyama Yoshinori, Watanabe Masahiko, Horiuchi Junjiro, Saitoe Minoru	4. 巻 382
2. 論文標題 Glia transmit negative valence information during aversive learning in Drosophila	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eadf7429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.adf7429	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 Kato Yuri, Ohsugi Kengo, Fukuno Yuto, Iwatsuki Ken, Harada Yuika, Miyaji Takaaki	4. 巻 119
2. 論文標題 Vesicular nucleotide transporter is a molecular target of eicosapentaenoic acid for neuropathic and inflammatory pain treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2122158119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2122158119	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 宮地 孝明	4. 巻 59
2. 論文標題 エイコサペンタエン酸の新しい分子標的の発見	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 29～33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.59.1_29	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14件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takaaki Miyaji
2. 発表標題 The universal evaluation system of plant mineral transporters by purification and reconstitution into liposomes
3. 学会等名 International workshop on plant mineral transport (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 吉岡 佑真、宮地 孝明
2. 発表標題 亜鉛トランスポーター 1 の輸送メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 加藤 百合、高木 さくら、大杉 健剛、岩槻 健、原田 結加、宮地 孝明
2. 発表標題 神経障害性疼痛治療薬・プレガバリンの新しい分子標的の同定
3. 学会等名 痛み研究会2023
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮地 孝明
2. 発表標題 プリン作動性化学伝達を司る小胞型ヌクレオチドトランスポーターの新たな脂質制御機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮地 孝明
2. 発表標題 小胞型神経伝達物質トランスポーターを切り口とした革新的創薬
3. 学会等名 Brainstorming2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮地 孝明
2. 発表標題 プリン作動性化学伝達を制御する機能性脂質代謝物の同定と薬学的応用
3. 学会等名 第264回 遺伝子機能解析部門セミナー (第388回 細胞工学会研究会講演会) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 百合、大杉 健剛、福野 雄斗、岩槻 健、原田 結加、宮地 孝明
2. 発表標題 小胞型ヌクレオチドトランスポーターは神経障害性や炎症性疼痛治療のためのEPAの分子標的である
3. 学会等名 痛み研究会2022
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮地 孝明
2. 発表標題 神経障害性疼痛の予防や治療を目指したプリン作動性化学伝達を制御する機能性脂質代謝物の同定
3. 学会等名 Pain Live Symposium for Diabetes (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 百合、大杉 健剛、福野 雄斗、岩槻 健、原田 結加、宮地 孝明
2. 発表標題 プリン作動性化学伝達を制御する機能性脂質代謝物の同定
3. 学会等名 第63回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福野 雄斗、加藤 百合、大杉 健剛、岩槻 健、原田 結加、宮地 孝明
2. 発表標題 エイコサペンタエン酸が神経障害性疼痛を抑制する分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第61回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村 愛美、原田 結加、宮地 孝明
2. 発表標題 エイコサペンタエン酸の代謝物によるプリン作動性化学伝達の制御
3. 学会等名 第61回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樹下 成信、菊池 洋輔、加藤 百合、角野 歩、宮地 孝明
2. 発表標題 小胞型グルタミン酸トランスポーターの脂質制御機構
3. 学会等名 第61回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮地孝明
2. 発表標題 プリン作動性化学伝達を制御する機能性脂質代謝物の同定
3. 学会等名 第8回JFAS (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國島勇太、原田結加、樹下成信、宮地孝明
2. 発表標題 うつ病の新規発症機序解明を目指した機能未知トランスポーターの発現・局在解析
3. 学会等名 第62回日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021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