

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 横田 格 殿

## 助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 : 800 千円	
研究代表者 : 田端 俊英	所属 : 学術研究部工学系	職位 : 教授
研究題目 : GPCR スーパーコンプレックスを薬理操作できるDNAアプタマー: 富山の製薬産業を活性化 化する核酸技術		

## 研究概要

あらゆる細胞の表面に発現している G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は重要な細胞間・内シグナリングを制御している。近年、異種の GPCR が巨大複合体 (スーパーコンプレックス) を形成することが明らかになり、医薬品の新たな作用ターゲット分子として国内外の注目を集めている。我々は遺伝物質である DNA の配列を操作することで立体的な構造を取らせ、特定の GPCR コンプレックスに結合・作用する DNA アプタマーの開発を目指した。モデルとして代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) とアデノシン 1 型受容体 (A1R) のスーパーコンプレックスを用いた。最近、抗体医薬など高分子医薬の付加価値が高まる一方、伝統的な低分子医薬は低廉化が進んでおり、低分子医薬中心の富山県の製薬産業は業績低迷に苦しんでいる。DNA アプタマーの製造は低分子医薬用の製造プラントの転用も比較的容易であるため、上記の DNA アプタマーが成功すれば、まったく新しい創薬のアプローチを世界に発信するだけでなく、富山の製薬産業の復活、世界規模での差別化につながることを期待される。

## 成果要約

産業技術総合研究所の池本の指導の下、A1R-mGluR1 スーパーコンプレックスに結合能を持った DNA アプタマーを改良型 Cell SELEX 法により数十種類作出した。さらにその中からとくに結合能が高い 4 種類のアプタマー (Apt-1AM, Apt-2AM, Apt-3AM, Apt-4AM) を選び、PCR 法により大量合成した。その際、アプタマーの 5' 末側に蛍光色素を付加した。一方、順天堂大学医学部上窪らと共同で mGluR1 と A1R のスーパーコンプレックスを安定発現する HEK-293 細胞を作出した。この細胞では tet-Op プロモーターの下流に当該 GPCR 遺伝子群を挿入することにより、doxycycline を培地に添加した場合のみ当該 GPCR 群が発現するしくみになっている。Tet-Op プロモーターなしで GPCR 遺伝子だけが複数コピー導入された HEK-293 細胞では、持続的かつ過剰に発現した GPCR の強い細胞内シグナルによって細胞が死滅してしまう。tet-Op プロモーターを使用した場合、doxycycline を実験の直前 24~2 時間前に導入することで、細胞死が起こる前に実験が可能になる。このような方法によって、我々は GPCR スーパーコンプレックスの機能を効率的に検討することにはじめて成功した。Doxycycline を 2~24 時間作用させ A1R-mGluR1 スーパーコンプレックスを発現させた HEK-293 細胞に蛍光色素を付加したアプタマー群を投与し、レーザー共焦点顕微鏡で観察したところ、細胞膜に薄い蛍光標識が広がっている他、細胞膜直下の細胞質に斑点状の強い蛍光標識が見つかった。また、これは狙い通りに Apt-1~4AM が GPCR スーパーコンプレックスに結合し、さらに GPCR 群を活性化させて細胞内へのスーパーコンプレックスの引き込み (endocytosis) を誘導したことを示唆している。蛍光標識は Apt-3AM が最も強く、A1R-mGluR1 スーパーコンプレックスに結合・作用するために最適な立体構造を有している可能性がある。In-silico (コンピューターシミュレーション) で、Apt-3AM の立体構造を解析したところ、他のアプタマーにはない“枝豆”状の構造が見つかった。また Apt-3AM の A1R-mGluR1 スーパーコンプレックスに対する作用をカルシウム・イメージングで確認した。本研究では、創薬ターゲット分子として有望な GPCR スーパーコンプレックスに結合・作用する DNA アプタマーを世界に先駆けて作成することに成功した。Apt-3AM を基にさらに結合能の高い DNA アプタマーを作出し、また微細な構造の改良で GPCR スーパーコンプレックスに対する作用を制御することで、DNA アプタマーによる創薬に道を拓き、低分子薬を得意とする富山県の製薬産業の発展に大きく寄与することができるものと考えられる。

<p>研究成果 発表状況</p>	<p>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】</p> <p>雑誌論文</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. A test potential booster for fast-scan cyclic voltammetry with electrophysiological amplifier. H. Nagai, T. Yokoi, M. Kano, <u>T. Tabata</u>. Analytical Biochemistry 610 (2020) 113934.</li> <li>2. Carbon powder-filled microelectrode: an easy-to-fabricate probe for cellular electrochemistry A. Tsujimura, Y. Kamae, H. Kawasaki, H. Ngai, M. Kano, <u>T. Tabata</u>. Analytical Biochemistry, under revision.</li> </ol> <p>学会発表（いずれもオンライン開催）</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. A simple method to fabricate a robust single-carbon fiber electrode for fast-scan cyclic voltammetry. 永井春来, 横井太一, <u>田端俊英</u>. 日本神経科学大会 2020年7月</li> <li>2. 1 型代謝型グルタミン酸受容体と GABAB 受容体は異種 GPCR 間複合体を形成し、互いの細胞内シグナルを双方向に制御する. 坂入伯駿, 上窪裕二, <u>田端俊英</u>, 櫻井隆. 薬理学会関東部会 2020年10月</li> <li>3. Carbon powder-filled microelectrode: an easy-to-fabricate probe for single-cell electrochemistry. 構佑飛, 川崎暉留, 辻村明日風, 永井春来, <u>田端俊英</u>. 日本生理学会大会 2021年3月</li> <li>4. A new type of microelectrode for cellular electrochemistry employing carbon power as a conductor. 辻村明日風, 構佑飛, 川崎暉留, 辻村明日風, 永井春来, <u>田端俊英</u>. 日本神経科学大会 2021年7月（予定）</li> </ol>																											
<p>経費の 執行状況</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="336 1162 826 1211">区 分</th> <th data-bbox="831 1162 1129 1211">執行額（円）</th> <th data-bbox="1134 1162 1458 1211">備 考</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="336 1218 826 1256">【物品費】</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="336 1263 826 1301">ソレノイドバルブ</td> <td data-bbox="831 1263 1129 1301">89,320</td> <td data-bbox="1134 1263 1458 1352" rowspan="3">試薬投与装置、単価 22,330円×4個</td> </tr> <tr> <td data-bbox="336 1308 826 1346">試薬</td> <td data-bbox="831 1308 1129 1346">332,980</td> </tr> <tr> <td data-bbox="336 1352 826 1391">消耗品</td> <td data-bbox="831 1352 1129 1391">377,700</td> </tr> <tr> <td data-bbox="336 1397 826 1435">【旅費】</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="336 1442 826 1480">【謝金】</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="336 1487 826 1525">【その他】</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td data-bbox="336 2024 826 2069">合計</td> <td data-bbox="831 2024 1129 2069">800,000円</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	区 分	執行額（円）	備 考	【物品費】			ソレノイドバルブ	89,320	試薬投与装置、単価 22,330円×4個	試薬	332,980	消耗品	377,700	【旅費】			【謝金】			【その他】			合計	800,000円			
区 分	執行額（円）	備 考																										
【物品費】																												
ソレノイドバルブ	89,320	試薬投与装置、単価 22,330円×4個																										
試薬	332,980																											
消耗品	377,700																											
【旅費】																												
【謝金】																												
【その他】																												
合計	800,000円																											