

TSUBAME 共同利用 令和7年度 学術利用 成果報告書

利用課題名 構造類似 GPCR を識別する高選択的人工バインダーの計算設計

英文: Computational Design of Highly Selective Artificial Binders for Discriminating Structurally Similar GPCRs

利用課題責任者: 加藤 英明

First name Surname: Hideaki Kato

所属: 東京大学 先端科学技術研究センター

Affiliation: Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo

URL: https://park.its.u-tokyo.ac.jp/hekato_lab/ja/

邦文抄録(300 字程度)

G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、7 本の膜貫通ヘリックスから成る膜タンパク質であり、ヒトの多様な生理現象に関与する重要な創薬標的である。実際、承認済み医薬品の約 3 割以上が GPCR を標的とすることが報告されている。GPCR を高選択的に認識する抗体・バインダーは、組織染色や発現解析などの基礎研究ツールとして有用であるだけでなく、受容体機能の制御や創薬応用にも展開可能である。しかし、類縁 GPCR 間では配列および立体構造が類似している場合が多く、高選択的に標的を識別する分子の開発は容易ではない。本研究では、構造的・配列的に類似する GPCR_A と GPCR_B を対象に、BindCraft を用いて GPCR_A 結合バインダーの初期構造を設計し、独自に構築した選択性最適化パイプラインにより、GPCR_A には高親和性で結合し、GPCR_B には結合しにくい候補を探索した。その結果、on-target ipTM が 0.7 以上、off-target ipTM が 0.3 未満となる 14 候補を得た。今後はプルダウンアッセイおよび BLI 測定により、結合親和性と選択性を実験的に検証する。

英文抄録(100 words 程度)

G protein-coupled receptors (GPCRs) are seven-transmembrane membrane proteins involved in diverse human physiological processes and represent major drug targets. Antibodies and binders that selectively recognize specific GPCRs are useful not only as basic research tools for tissue staining and expression analysis, but also for modulating receptor function and potential therapeutic applications. However, selective recognition is challenging because closely related GPCRs often share similar sequences and structures. In this study, we targeted the structurally and sequentially similar GPCR_A and GPCR_B. Initial GPCR_A-binding scaffolds were generated using BindCraft, followed by an in-house selectivity optimization pipeline. We obtained 14 candidates with on-target ipTM scores above 0.7 and off-target scores below 0.3. Their affinity and selectivity will be experimentally validated by pulldown assays and BLI measurements.

Keywords: 5つ程度

GPCR, protein design, De novo protein, BindCraft, off-target binding, molecular recognition

背景と目的

G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞外のシグナルを細胞内へ伝達する膜タンパク質群であり、多様な生理現象に関与する重要な創薬標的である。一方で、GPCR ファミリー内には配列および立体構造が互いに類似した受容体が多数存在するため、特定の GPCR のみを高選択的に認識する抗体やバインダーの開発は難しい。

実際、Dahl らは、Human Protein Atlas 由来の 400 種類以上の抗 GPCR 抗体を、215 種類の可溶性 GPCR ライブラリに対して多重スクリーニングし、抗 GPCR 抗体の選択性を体系的に評価している。その結果、約 61%の抗体は意図した標的に選択的であった一

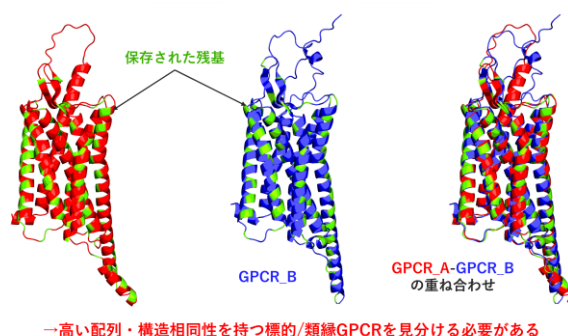


図1: GPCR_A と GPCR_B は構造的、配列的に類似している

方、約 11%は off-target 結合を示し、約 28%は十分な GPCR 結合を示さなかったと報告されている。(Dahl et al., *Science Advances*, 2023)

このように、GPCR を標的とする抗体は、標的以外の類縁 GPCR への非特異的結合が依然として課題である。非特異的結合は、組織染色や細胞イメージングにおける誤検出の原因となるだけでなく、生体内で機能する分子として利用する場合には、標的外シグナルの阻害や予期しない生理作用につながる可能性がある。したがって、類似した GPCR を精密に識別できる高選択的バインダーの開発は、基礎研究および応用研究の両面で重要な課題である。

本研究では、構造および配列が類似した GPCR_A と GPCR_B を対象とし(図1)、GPCR_A に対して高い結合親和性を持ちながら、GPCR_B への off-target 結合を抑制した人工バインダーを設計することを目的とした。

概要

本研究では、まず BindCraft を用いて GPCR_A に結合するバインダー候補の初期構造を設計した。BindCraft により得られたバインダーの主鎖骨格構造を大きく変更せず、主として側鎖配列を最適化することで、標的 GPCR への結合性と類縁 GPCR への非特異的結合抑制を両立する設計を行った(図2)。

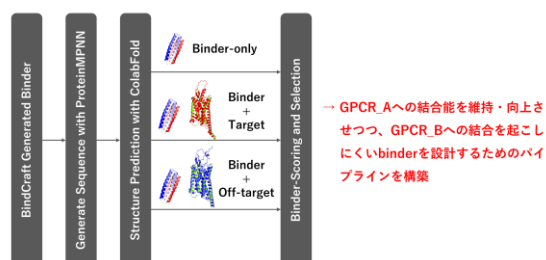


図 2: 本研究で設計した側鎖最適化パイプライン

独自に構築した設計パイプラインでは、バインダー単体およびバインダー-GPCR_A 複合体の構造予測に加え、バインダー-GPCR_B 複合体についても構造予測を実施した。その上で、複合体予測の信頼性指標である ipTM に着目し、GPCR_A に対する ipTM を高く、GPCR_B に対する ipTM を低くするように側鎖配列を探索した。すなわち、on-target ipTM - off-target ipTM を最大化することにより、GPCR_A と GPCR_B を識別可能な候補配列の取得を目指した。

このような on-target と off-target を同時に評価する

設計戦略により、単に標的に強く結合すると予測される分子ではなく、類縁受容体への結合が抑制された高選択的バインダー候補の探索を行った。

結果および考察

本研究で構築した設計パイプラインを用いた結果、GPCR_A に対する結合親和性が高く、GPCR_B に対する結合親和性が低いと予測されるバインダー候補を 14 種類取得した。これらの候補はいずれも GPCR_A との複合体予測において ipTM が 0.7 以上であり、標的 GPCR に対して良好な結合様式を形成する可能性が示唆された。一方、GPCR_B との複合体予測における ipTM はいずれも 0.3 未満であり、類縁受容体への安定な結合は形成しにくいと予測された(図 3)。

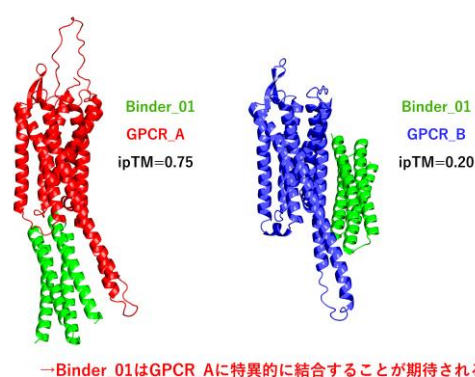


図 3: 設計に成功した Binder 候補。GPCR_A に特異的に結合することが期待される。

この結果は、GPCR_A と GPCR_B のように構造および配列が類似した標的に対しても、on-target と off-target を同時に考慮した計算設計により、選択性を持つバインダー候補を抽出できる可能性を示している。従来の抗 GPCR 抗体では、標的外 GPCR への交差反応や十分な結合性を示さない抗体が一定数存在することが報告されており、GPCR を対象とした分子認識の難しさが指摘されている。本研究のアプローチは、このような GPCR 認識分子の課題に対し、計算機上で off-target 結合を事前に評価・排除する点に特徴がある。

得られた 14 候補については、すでに遺伝子合成の段階に進んでいる。今後、実験的検証により、計算予測で得られた高い選択性が実際の分子間相互作用として再現されるかを確認する必要がある。特に、ipTM は構造予測上の指標であり、実際の結合親和性や結

合速度・解離速度を直接示すものではないため、wet 実験による定量評価が不可欠である。

まとめ、今後の課題

本研究では、構造および配列が類似した GPCR_A と GPCR_B を識別する高選択的バインダーの開発を目的として、BindCraftと独自の off-target 評価パイプラインを組み合わせた計算設計を実施した。その結果、GPCR_A に対する on-target ipTM が 0.7 以上、GPCR_B に対する off-target ipTM が 0.3 未満となる 14 種類のバインダー候補を得た。これらの候補は、GPCR_A を選択的に認識する人工バインダーとして機能する可能性がある。

今後は、まずプルダウンアッセイにより、各候補が GPCR_A に結合するかを確認する。その後、Gator を用いた bio-layer interferometry (BLI) 測定により、結合速度、解離速度、および結合親和性を定量的に評価する。さらに、GPCR_B およびその他の類縁 GPCR に対しても同様の測定を行い、off-target 結合が十分に抑制されているかを検証する。これにより、本研究で構築した計算設計パイプラインの妥当性を評価し、GPCR を対象とした高選択的バインダー設計手法としての有効性を明らかにする。