

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：タンパク質工学と創薬化学の融合による次世代型 GPCR 標的医薬品の創出

Development of Next-Generation GPCR-Targeted Drugs by Integration Protein Engineering and Medicinal Chemistry

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 15 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：椎村 祐樹

Yuki Shiimura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

学校法人久留米大学 分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門 講師

Institute of Life Science, Kurume University, Department of Molecular genetics, Lecture

II 研究開発の概要

本研究開発では、G タンパク質共役型受容体（GPCR）のひとつであるグレリン受容体を対象として、DNA エンコード化合物（DEL）を活用した新規低分子創薬デザイン技術基盤の構築を実施した。DEL スクリーニングにより、複数のグレリン受容体結合化合物を抽出し、その中から特定シグナルに対して選択的な活性を示す化合物を見出した。さらに、オルソステリックリガンドの薬理作用を増強する化合物を同定した。これらは、それぞれバイアスアゴニスト、アロステリックモデュレーター（PAM）と呼ばれる化合物であり、いずれも GPCR シグナルを質的に制御する次世代型 GPCR 標的分子として注目されている。一方で、これらの化合物群が承認医薬品に占める割合はわずか 2%にとどまり、その創出技術の開発は創薬上の重要な課題となっている。

本研究開発は、近年のタンパク質工学の発展によって実現可能となった GPCR 精製技術と DEL スクリーニングの統合を図ったものである。これにより、従来創出が困難であったバイアスアゴニストおよび PAM を同定し、次世代型 GPCR 標的医薬品の創製に向けた新たな創薬デザイン技術の有効性が示された。

【1. 研究背景と目的】

GPCR は医薬品標的として重要な分子であり、これまでに多くの低分子医薬品が開発され、臨床応用されている。従来の GPCR 創薬は、オルソステリック作動薬や拮抗薬による受容体活性の量的制御を中心として展開されてきたが、近年では、副作用低減や作用最適化の観点からシグナル伝達の質的制御の重要性が認識されている。このような背景のもと、バイアスドリガンドや PAM といった新たな創薬概念が提案されている。

バイアスドリガンドは、特定シグナル経路を選択的に活性化することで副作用の低減や作用の最適化を可能とする化合物である。一方、PAM は、オルソステリックリガンドの作用を調節することで、内因性リガンドの時間的・空間的制御を保持したまま受容体機能を増強する点に特徴がある。しかし、既存のハイスループットスクリーニング（HTS）は、特定の機能出力を評価指標とするため、条件依存的な作用様式を示す化合物の探索には限

界があった。加えて PAM 創製では、アロステリック部位の多様性や予測困難性が創薬上のボトルネックとなっていた。

そこで本研究開発では、これらの課題に対し、DEL スクリーニングと薬理学的評価、さらに構造生物学的解析を統合することにより、GPCR に対する新規シグナル制御化合物の創製に関する技術開発とその有効性の実証を試みた。

【2. 研究開発の成果】

2.1 DEL スクリーニング

高純度に精製したグレリン受容体-G_q タンパク質複合体を用いた DEL スクリーニングにより、受容体に特異的に結合する複数の化合物候補を抽出した。本研究開発では、タンパク質工学により機能的な状態を維持した GPCR 複合体を調製し、これをスクリーニング材料として活用した点に特徴がある。このアプローチにより、従来の機能依存型スクリーニングでは取得が困難であった条件依存的な作用様式を有する結合分子候補を効率的に取得することに成功した。また抽出された化合物候補の薬理学評価に基づき、有望な 4 化合物を開発候補として選抜した。

2.2 バイアスドリガンドの同定

選抜した 4 化合物についてより詳細な薬理学評価を行い、1 化合物 (化合物 X) についてグレリン受容体に対するアゴニスト活性を確認した。結合様式を明らかにするために、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) 解析を行い、化合物 X 結合型グレリン受容体-G_q タンパク質複合体の立体構造を 3.2Å 分解能で決定した。その結果、化合物 X は既存の承認作動薬であるアナモレリンとは異なる結合様式で、グレリン受容体のオルソステリックサイトに結合することが明らかになった。

この構造的差異を踏まえ、シグナル解析を行った結果、アナモレリンが G タンパク質および β アレスチンシグナルの両方を活性化するのに対し、化合物 X は G タンパク質シグナルを活性化する一方で、 β アレスチンシグナルに顕著な影響を及ぼさなかった。これらの結果から、化合物 X は G タンパク質シグナルに偏った特性を有するバイアスドアゴニストである可能性が強く示唆された。

β アレスチンは、受容体の内在化を介して、シグナルの減衰に関与することが知られている。そのため、 β アレスチンシグナルを惹起しない化合物 X は、従来の作動薬とは異なるシグナル制御特性を示す新規リガンドとして位置付けられる。

2.3 ポジティブアロステリックモデュレーター (PAM) の同定

選抜した化合物の中から、単独では顕著なアゴニスト活性を示さない一方で、オルソステリックリガンド存在下において受容体応答を増強する化合物 (化合物 Y) を同定した。細胞内 Ca²⁺濃度を指標とする FLIPR assay では、アナモレリンの EC₅₀ が化合物 Y (1 μ M) 共存下では単独添加時のおよそ 30 倍まで低下することが明らかとなった。この EC₅₀ のシフトは化合物 Y の用量依存的に増強されることを確認している。

結合様式の理解を目的として Cryo-EM による構造解析を行い、化合物 Y 結合型グレリン受容体-G_q タンパク質複合体の立体構造を 4.3Å 分解能で決定した。その結果、化合物 Y は受容体側面のアロステリックサイトに結合していることが示唆された。

化合物 Y はオルソステリックリガンドと協調して、受容体応答を増強する特性を示し、その作用は受容体構造をアロステリックに変化させることで発現すると考えられる。本結果は、PAM が受容体シグナルの強度や応答特性を調節することで機能することを示しており、バイアスドリガンドとは異なる制御様式を有することを示すものである。

これらの結果から、DEL スクリーニングにより、異なるシグナル制御様式を持つリガンドを同一基盤から同定

可能であることを実証した。

【3. 技術的意義】

本研究開発における重要な技術成果は、GPCR における DEL スクリーニング、薬理学評価および構造解析を統合した創薬プロセスを構築した点にある。

従来の HTS は機能評価に依存するため、条件依存的に作用する化合物の同定が困難である。一方で DEL スクリーニングでは、まず受容体に対する結合化合物を選抜した後に、機能評価を行う段階的アプローチとなっている。このため、選抜された有望化合物について、多面的な評価を実施することで詳細な薬理プロファイルを作成することが可能である。

さらに、このスキームに構造解析を組み合わせることで、構造情報に基づく分子設計と、薬理学評価する創薬戦略が実現可能であることを示した。特に PAM 創製においては、結合部位の多様性と薬理作用の複雑さから、結合様式の可視化が重要な開発情報となる。本研究は、開発初期から積極的に Cryo-EM を活用することで、構造情報に基づいた合理的かつ確度の高い創薬設計が可能であることを実証した。

本研究開発は、DEL の特性を活かし、結合分子を取得した後に薬理学解析および構造解析を段階的に適用することで、HTS で開発困難であった次世代型 GPCR 標的医薬品創製に資する開発スキームを構築した。また本アプローチは、バイアスドリガンドおよび PAM の両者を同一基盤から同定できる点でも大きな利点を有すると考える。

【4. 創薬上の意義と展望】

現在の GPCR 創薬では、副作用低減や作用最適化の観点から、これまでの「量的制御」に加えて「質的制御」も重視されつつある。この転換期において、本研究開発は、当初の目的であるバイアスドリガンドの創製に加え、PAM という異なる作用様式を持つ 2 種類の次世代型 GPCR 標的薬候補の同定に成功した。さらに、本研究で構築した DEL を起点とする創薬スキームはグレリン受容体に限らず、他の GPCR にも応用可能な技術基盤である。GPCR は依然として多くの未開拓な創薬標的を含んでおり、本手法の応用により、従来困難であった標的に対する創薬の可能性が広がることが期待される。

以上より、本研究は、GPCR におけるアロステリックシグナル制御およびバイアスドシグナル制御に基づく創薬戦略の実現に向けた基盤を提供するものである。また、構造と機能の統合による創薬設計の新たな方向性を提示するものである。

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent one of the most important classes of drug targets, and numerous small-molecule therapeutics have been developed and clinically approved. Conventional GPCR drug discovery has primarily relied on orthosteric agonists and antagonists to achieve quantitative control of signaling. In contrast, recent advances have highlighted the importance of qualitative control of signaling, aiming to optimize therapeutic efficacy while minimizing adverse effects. Biased agonists and positive allosteric modulators (PAMs) have therefore attracted attention as promising next-generation ligand classes. However, conventional high-throughput screening (HTS), which relies on predefined functional readouts such as cAMP accumulation or Ca^{2+} mobilization, has intrinsic limitations in identifying ligands with pathway- or ligand-dependent pharmacological properties. In particular, the discovery of PAMs is further complicated by the diversity and unpredictability of allosteric binding sites.

To address these challenges, we established an integrated drug discovery framework combining DNA-encoded library (DEL) screening, pharmacological evaluation, and structural analysis. Using a purified ghrelin receptor- G_q protein complex, we performed DEL screening and identified multiple compounds that specifically bind to the receptor. This binding-first approach enabled the efficient acquisition of candidate molecules that are difficult to detect using conventional function-based screening. Subsequent pharmacological profiling led to the selection of four compounds for further characterization.

Among these, one compound (compound X) exhibited agonist activity at the ghrelin receptor. Cryo-electron microscopy (Cryo-EM) analysis of the compound X-bound ghrelin receptor- G_q complex at 3.2 Å resolution revealed that compound X bound to the orthosteric site, while adopting a binding mode distinct from that of the approved agonist anamorelin. Functional analysis demonstrated that, whereas anamorelin activates both G protein and β -arrestin signaling pathways, compound X preferentially activates G protein signaling with minimal effect on β -arrestin signaling. These results indicate that compound X functions as a biased agonist with a preference for G protein-mediated signaling.

In addition, we identified another compound (compound Y) that enhances receptor responses only in the presence of an orthosteric ligand, consistent with PAM activity. Pharmacological analysis showed a significant leftward shift in the EC_{50} of anamorelin in a concentration-dependent manner. Cryo-EM analysis at 4.3 Å resolution suggested that compound Y binds to an allosteric site on the receptor. These findings indicate that compound Y enhances receptor signaling in an allosteric manner by modulating signaling amplitude and responsiveness. Taken together, our results demonstrate that DEL screening enables the identification of ligands with distinct modes of signaling control from a single platform.

Importantly, by integrating DEL screening with pharmacological and structural analyses, we established a rational drug discovery strategy in which mechanistic understanding can guide ligand design. This framework provides a technological basis for next-generation GPCR drug discovery and is broadly applicable to other GPCR targets. It also highlights a new direction for structure-guided design of ligands with diverse signaling control properties.