

(O-3)

化合物ライブラリーを用いた遺伝子発現促進化合物の探索

野呂田 郁夫（山形大学医学部技術部 薬理学講座）

NOROTA Ikuo : Screening of Gene Expression-Enhancing Compounds Using a Compound Library

To develop therapeutic drugs for Parkinson's disease, we aimed to identify compounds that promote *MIDN* expression. A three-stage screening process using a compound library was conducted, ultimately leading to the discovery of compounds that increase *MIDN* mRNA levels. The compound library was provided by the Drug Discovery Research Projects at Yamagata University. A luciferase reporter vector containing the *MIDN* promoter region was transfected into a neuroblastoma cell line. After reseeding, the compound library was administered using an automated liquid handler, and luminescence signals were detected. Out of 2,334 compounds, 256 exhibited positive results. Secondary screening narrowed this down to 26 compounds, and ultimately, 10 compounds demonstrated reproducibility. Among the final candidates, methacholine, a diagnostic agent for airway hyperreactivity, showed the highest activity. Investigation of acetylcholine (ACh), which is related to methacholine, revealed similar activity, and acetylcholinesterase inhibitors were found to enhance this effect. These findings clarified that the muscarinic ACh receptor pathway is involved in promoting *MIDN* expression. While we successfully identified compounds that increase *MIDN* levels, the primary screening process faced challenges due to issues related to the physical properties of certain compounds, requiring manual adjustments. For precise drug administration, careful handling of compound solutions is essential. Additionally, managing the metadata of the compound library is a labor-intensive task but crucial for selecting candidates for subsequent validation experiments.

1. はじめに

山形大学医学部の薬理学講座と神経内科の共同研究から、2017年に行われた山形県のコホート研究のデータからパーキンソン病（PD）患者の約1割の方が *MIDN* 遺伝子の欠損（1コピー欠損）していることが発見された¹⁾。また、この遺伝子が神経突起の形成に関わる^{1,2)}ことも明らかとなった。この遺伝子の発現を促す化合物があればPDの治療につながるのではと考え、山形大学創薬研究拠点の化合物ライブラリーの提供に応募した。大学や研究施設の多くはライブラリーの規模が大きいが、山形大学創薬研究拠点のプロジェクトでは、目的を絞って商用の小規模パッケージを提供している。本稿では化合物ライブラリーのスクリーニングの具体的な流れや方法を中心に紹介する。

2. 方法

(1) 化合物ライブラリーの申請について

山形大学創薬研究拠点では、化合物ライブラリーを提供する際、指針（受入機関の制限、守秘義務、提供側の制限、知的財産権、使用制限・返却、状況・成果報告など）に基づいて供給している。申請者は山形県内に限られ、所属機関と代表責任者、ライブラリーの種類、実施期間、陽性該当化合物の最適化合成支援の

必要性、試験の背景と目的、アッセイ内容を明記した書類を提出すると、ライブラリープレートが提供される。また、アッセイ系の感度と精度（陽性活性値、陰性活性値、S/B比、CV値、Z'値）の評価結果も求められる。そのため、予備実験を行い、プロトコルやデータを供与元に提示しなければならない。申請の為の実験結果をまとめ、書類を提出し、許可の連絡があるまでにおよそ1ヶ月程度要した。なお、研究結果のヒット化合物の情報は、論文や特許申請などの公開まで、化合物名や構造式等は掲載せず、化合物サンプルID等を用いてヒット化合物が特定されない様に取り扱うことになっている。

(2) 化合物ライブラリーの構成内容

ライブラリーはMed Chem Express社のドラッグリポジショニング（既存薬に新たな薬効を見出す）シリーズのFDA-Approved Drug Library; HY-L022を使用した。2334種類（2022年時点；現在は3047種類）があり、米国食品医薬品局（FDA）や欧州医薬品庁（EMA）で認可された医薬品（癌、循環、感染症、内分泌、代謝、炎症・免疫、神経、皮膚、その他）で構成される。山形大学創薬研究拠点ではライブラリーを分注保管（10 mM、1 μ L）しており、レプリカとしてV底96ウェルプレートの仕様で提供している。

(3) レポーターアッセイ
 タンパク質を増やすシグナル経路の最下流には、遺伝子発現のプロモーター領域が存在する。本研究では、MIDNのプロモーター領域 (-150 bp から +125 bp) をレポーターのホタルルシフェラーゼ遺伝子に連結したベクターを作製し、ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y に導入して、レポーターの活性 (化学発光) を測定する実験系を構築³⁾した (図 1)。実験は、初日に細胞を播種、二日目にトランスフェクション、三日目に 96 ウェル測定用プレートに再播種 (20,000 cell/100 μ L/ well)、四日目に化合物ライブラリーを処置、五日目に発光測定を行った (図 2)。

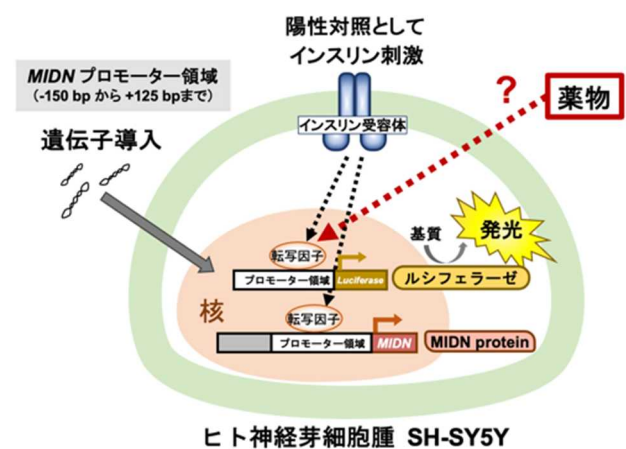


図 1. レポーターアッセイの原理

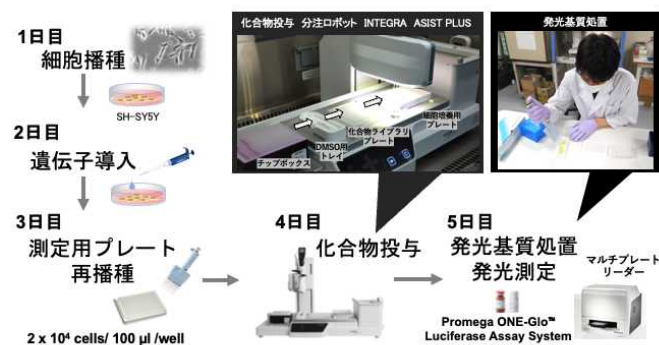


図 2. 測定までの流れ

(4) ライブラリーの投与方法

予めメーカーサイト (INTEGRA Biosciences AG) から提供されているアプリケーション (INTEGRA VIALAB ver 3.1.0.0) で動作プログラムを設定し、分注ロボット (INTEGRA; ASSIST PLUS) を用いて希釈操

作と投与操作を行った。本研究では、リザーバーから DMSO 9 μ L を化合物プレートに投与し、10 倍希釈したものを一時保存プレートとした。そこから細胞のプレートに 0.5 μ L を投与し、最終濃度 5 μ M で使用した。予め培地だけの背景信号分と、予備のウェルに陽性対照として Insulin 1 μ M、陰性対照として DMSO 0.5% をそれぞれ 3 ウェル/プレートに投与した。明らかに失敗したウェルは手動ピペットで再投与した。投与後、細胞プレートは CO₂ インキュベーター内に保管し、24 時間後に発光測定を行った。

(5) 発光シグナルの検出

細胞プレートに発光試薬 (Promega ONE-GloTM Luciferase Assay System) を培地の等量分に加え、3 分後にプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific Inc. Varioskan LUX) で発光測定 (1 sec/well) を行った。測定結果のデータは CSV 形式で出力し、プレートの情報に化合物 ID を入力して、データ照合の確認作業を行った。陽性サンプルの基準は、各サンプルが陰性対照の値を差し引いた後、陽性対照の平均値を 100% とし、その 75% を基準値とした (図 3)。

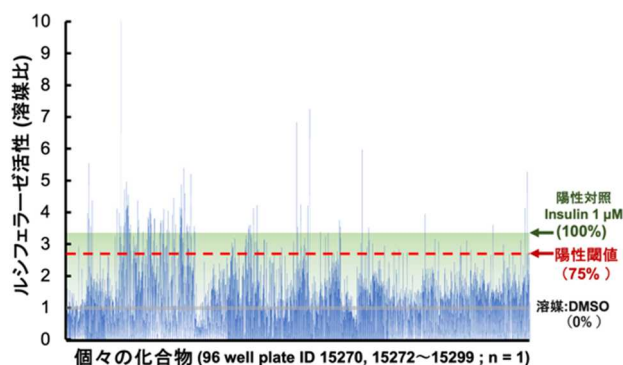


図 3. 一次スクリーニングの結果

3. 結果

256 のサンプルが陽性を示した (図 3)。ライブラリーの治療標的のカテゴリの割合は、癌 (14% から 23%) と内分泌 (4% から 11%) で増加し、神経 (20% から 13%) と循環 (13% から 9%)、代謝 (7% から 4%) で減少していた (図 4)。感染症 (19%)、炎症・免疫 (15%) はほとんど変わらない (図 4)。増加した化合物群は DNA に関連するものが多く、プロモーターに直接または間接的に影響を与える可能性が考えられた。一方で、減少した化合物群には阻害剤が多く、構造活性を持たないためと考えられた。この結果をもとに、陽性サンプル 256 種類から応用可能性の高い 26 種類を選定し、再

現性を確認した結果、10種類が陰性値の1.5倍以上を示した。さらに絞り込んで活性の詳細を検討した結果、最終候補の中で気道過敏性検査薬のメタコリンが最も活性を示し、生体内物質の類縁体であるアセチルコリンも高い活性を持つことが判明した(図5)。さらに研究を進めたところ、単独では活性を示さなかったコリンエステラーゼ阻害剤ピリドスチグミンもアセチルコリンの作用を増強することが分かった(図5)。

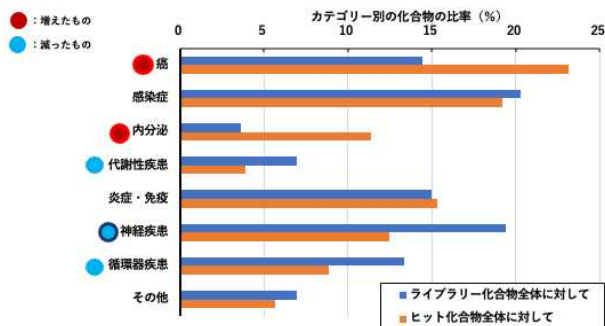


図4. 治療標的毎の陽性化合物の割合

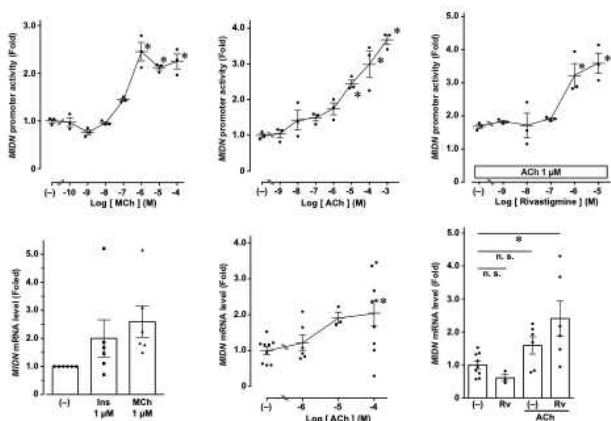


図5. MIDN プロモーター活性と mRNA の発現

4. 最後に

今回の化合物ライブラリーの研究で特に重要だと感じたのは、ライブラリーの分注投与と化合物情報の管理でした。ライブラリー分注はサンプル数が多いので人的にも機械的にも全てを網羅することは難しいと感じました。「自分の設定や操作が間違っているのではないか?」、「コンタミネーションを起こしているのではないか」という不安がいつも付き纏っていました。また、化合物の液性やチップ形成のバラツキによる「吸引がうまくいかない」、「液切れが悪い」といった問題が発生した時は途方に暮れました。ロボットなので「使

い方を熟練しなければならない」とは微塵も思わずに使い始めたのが甘かったと反省しています。実験が終わった後も、測定データと化合物データの照合、確認、ソートなどの作業量も多く、大変でした。付属の化合物情報も当初はコピー冊子だったので苦悶した時期もありましたが、一次スクリーニングが終わる頃にデジタルデータを頂けたので救われました。その後の再現性を確認する実験や二次スクリーニング候補の選定基準を決めるのは非常に難しい作業でしたが、教員の方の的確なご指示を頂いたお陰で候補を上手く絞り込むことが出来ました。今回得られたデータは、「地球のどこかに眠っている宝箱の地図のようなもの」だと思います。ただし価値のある宝かどうかは開けてみるまでは判らないので、引き続き研究を進めていく必要があると感じています。

謝辞

化合物ライブラリーと関連情報をご提供くださった小倉 次郎 准教授、山口 浩明 教授 (YU-COE(山形大学先進的研究拠点)(S)山形大学創薬研究拠点)、研究のご指導をしてくださった千葉 彩乃 講師、小原 祐太郎 教授 (薬理学講座)そして、一緒に実験をしてくれた 瑞木 優祐 氏に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Yutaro Obara, Toru Imai, Hidenori Sato, Yuji Takeda, Takeo Kato, Kuniaki Ishii (2017) Midnolin is a novel regulator of parkin expression and is associated with Parkinson's Disease. *Sci Rep.* 19;7(1):5885.
- 2) Ayano Chiba, Chisato Kato, Tadashi Nakagawa, Tsukasa Osaki, Kohei Nakamura, Ikuo Norota, Mikako Nagashima, Toru Hosoi, Kuniaki Ishii, Yutaro Obara (2024) Midnolin, a Genetic Risk Factor for Parkinson's Disease, Promotes Neurite Outgrowth Accompanied by Early Growth Response 1 Activation in PC12 Cells. *Mol Cell Biol.* 44(11):516-527.
- 3) Naoki Sagehashi, Yutaro Obara, Ohki Maruyama, Tadashi Nakagawa, Toru Hosoi, Kuniaki Ishii (2022) Insulin Enhances Gene Expression of Midnolin, a Novel Genetic Risk Factor for Parkinson's Disease, via Extracellular Signal-Regulated Kinase, Phosphoinositide 3-Kinase and Multiple Transcription Factors in SH-SY5Y Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 381(2):68-78.