

251-am08

TR-FRET による低分子 CLDN-4 binder スクリーニング系の構築

○坂本 雄太¹, 渡利 彰浩¹, 小高 美樹¹, 久家 広大¹, 八木 清仁¹, 近藤 昌夫¹ (¹阪大院薬)

【背景・目的】細胞間隙においては主にTight Junction (TJ) が受動拡散による物質の透過を制限し、上皮のバリア機能を担っている。TJの構成分子であるClaudin (CLDN) がTJバリアの機能本体であり、CLDNを標的とした薬物吸収促進法開発の可能性が示唆されている。当研究グループでは、ウェルシュ菌エンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin, CPE) のC末断片 (C-CPE) がCLDN-4に結合することで、腸管での薬物吸収促進作用を有することを確認している。しかしながら、C-CPEは菌由来のタンパク質であることから抗原性や製造コストの問題がある。そのため、本研究では低コストかつ抗原性のない新規CLDN-4 binderの創製を目指し、スループット性に優れた低分子CLDN-4 binderのスクリーニング系の構築を試みた。

【方法・結果・考察】C-CPE と CLDN-4 の結合を Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) 法を用いて検出する系を作製し、CLDN-4 と C-CPE の結合による FRET シグナルを阻害する binder の検出系を構築した。実際に CLDN-4 の細胞外領域を認識する binder により FRET シグナルの阻害が確認された。続いて、各種タンパク質濃度、反応スケール、反応時間、反応ステップ数等を検討することにより、アッセイ系の精度を示す S/B 比が 7~8、Z' 値が 0.8 以上と HTS に適した実験系に再構築した。最適化したアッセイ系により 3 万化合物のライブラリから CLDN-4 binder 候補化合物のスクリーニングを行った結果、FRET シグナルを 50 %以下に低下させる化合物を 144 種同定した。

本研究にて構築した CLDN-4 binder スクリーニング系は、高精度かつスループット性に優れた有用な実験系と考えられる。