

G 蛋白偶合接受器藥物篩選之曙光

G 蛋白偶合接受器(G-protein coupled receptors)與一些情緒相關狀態，如高血壓、睡眠失調、痛覺及生長、免疫反應等頗為密切。因其含有嵌入細胞膜之胺基酸序列，並可偶合位於細胞膜附近之訊息蛋白，結合外來刺激引發重要生理反應機制。又因其能被某些藥物加以活化或抑制其活性，因此，這種接受器成為高度可藥物性之標的物。

此類藥物目前占有製藥工業篩選新藥物的30%，且其比例正逐漸增加中。科學家嘗試利用高效率篩選平台，同時測試上千種候選分子活化G 蛋白偶合接受器的能力，希望能找到高敏感度、快速、節省成本的分析方法。

G 蛋白偶合接受器的活化，主要經由兩種途徑。第一種稱為環腺核單磷酸鹽(cAMP)或G 蛋白(又分為刺激性(Gs)及抑制性(Gi)兩類)路徑，第二種路徑稱為磷酸解脂酵素C (phospholipase C)路徑，偶合到另一不同G 蛋白(Gq)。幾乎50% G 蛋白偶合接受器之活化經由第二路徑。因此，研發合適方法以偵測其活化為當務之急。可惜經由Gq 活化而來的第二訊息—肌醇三磷酸鹽(IP3)，會受特異性磷酸酵素分解，無法於細胞內累積而難以偵測其濃度。

目前大部分均採用 FLIPR (flash fluorescence instrumental method)

來偵測 Gq 蛋白質的活化，其原理即是偵測 Gq 活化後所激發之肌醇單磷酸鹽(IP)連鎖反應而引起之胞內鈣離子增加。然而，此法需要非常精密且昂貴的螢光偵測器，同時，胞內鈣離子濃度的爆增訊息，早已遠離起始的 Gq 活化點。因此，會因為化合物干擾整個訊息路徑或最終螢光之偵測，出現過多偽陽性。因此，經由 FLIPR 篩選之標的物必須再重新篩選，或以另一技術再確定以降低偽陽性機率。

目前解決的方案是凍結信息連鎖反應的某一特定點，再偵測其所累積的產物。利用氯化鋰阻斷 Gq 訊息連鎖反應路徑的最後步驟：將肌醇單磷酸鹽-1(IP-1)轉換成肌醇；則 IP-1 即會累積在細胞內，再將細胞溶解，以 IP 單株抗體進行免疫分析法，測量 IP-1 濃度(此方法稱為 IP-One 分析法)。經由細胞內 IP-1 量，可以決定細胞 Gq 接受器活化程度。不論是活化 Gq 接受器之化合物或抑制活化之拮抗劑，均能從 IP-1 增加或降低而得知，實驗結果與實驗標準方法如親和性層析法偵測放射性肌磷酸結果相同。

此法亦可篩選某些特別類型藥物；如反向致效劑，這些化合物會抑制某些 G 蛋白偶合接受器的組成活性(constitutive activity)。這類化合物最近深受製藥界重視，但組成活性大多為低濃度，這對於鈣離子感應器是一大挑戰，然而在許多案例中，IP-1 敏感度足以偵測這些反向刺激物活性。IP-1 分析法所用之單株抗體具有高度專一性，不會與 IP-2、IP-3 或其他磷酸肌醇相關化合物，甚至肌醇有交叉反應。

IP-1 應用原理屬於典型競爭性免疫分析，細胞溶解產物若含有游離鈣離子，會防止 IP 偶合體與單株抗體結合，進而降低螢光呈色訊號，訊號與雜訊比為 10，50%抑制濃度為 500 nM。IP-1 色技術源自於 Cisbio 公司的均一性時間解析螢光技術(homogeneous time-resolved fluorescence technology；HTRF)，具有較好敏感度，對干擾較有抗性。不會受到篩選藥物原有光學特性所影響，對於快速篩選具不同光學特性之化合物時格外重要。

總結來說，IP-1 分析法在篩選 G 蛋白偶合接受器藥物上，可以進一步發展成高效率篩選平台，將有助於藥物之開發。

(周佑吉摘譯 / 楊啟裕審 Genetic Engineering News, 25(16):40, 44, 2005)