

「新機能創出を目指した分子技術の構築」  
平成 25 年度採択研究代表者

H27 年度 実績報告書
-----------------

浜地 格

京都大学 大学院工学研究科  
教授

生細胞有機化学を基軸としたタンパク質その場解析のための分子技術

## § 1. 研究実施体制

### (1)「浜地」グループ

① 研究代表者: 浜地 格 (京都大学 大学院工学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ 生細胞有機化学反応のレパートリー拡張
- ・ リガンド連結ラベル化剤の拡張
- ・ 分子標的未知タンパク質の同定
- ・ 超分子戦略等による反応性化合物の安定性制御等の検証
- ・ グルタミン酸受容体ケミカルラベル化
- ・ グルタミン酸受容体に対する新規活性化方法の開発

### (2)「柚崎」グループ

① 主たる共同研究者: 柚崎 通介 (慶応義塾大学 医学部、教授)

② 研究項目

- ・ グルタミン酸受容体ケミカルラベル化
- ・ グルタミン酸受容体の機能動態解析、生理機能解明
- ・ グルタミン酸受容体の生理機能解明
- ・ グルタミン酸受容体相互作用分子の機能解析

## § 2. 研究実施の概要

本研究においては、(1)リガンドの拡張や水中で高い選択性を持った反応の探索、組織や個体での選択的反応実現のための新戦略の開発による「生細胞有機化学」の構築、(2)神経細胞／組織における「生細胞有機化学」の実現と新生命現象の発掘、を両輪として研究を遂行する。(1)に関しては浜地グループが主体的に研究を担い、(2)に関しては(1)で開発されたラベル化剤群を柚崎グループの神経細胞／組織操作技術と組み合わせて遂行する。本年度の成果は以下の通りである。

(1)に関しては、有機合成において汎用されるアシル転移反応触媒である

DMAP(4-Dimethylamino pyridine)を低分子量抗体と conjugate した「触媒連結抗体」を作製し、これを用いて生細胞表面の受容体タンパク質を化学修飾する分子技術の開発に成功した<sup>1)</sup>。この技術を用いることで、腫瘍のバイオマーカーとして知られる増殖因子受容体(HER2 および EGFR)に関して、生細胞における可視化およびその寿命解析に成功した。また、本手法と質量分析法を組み合わせたことで、未知の抗原—抗体間相互作用部位(エピトープ)を同定できること初めて実証した。さらに新しいリガンド指向性化学として、Ligand-directed Dibromophenyl Benzoate (LDBB) Chemistry を開発した<sup>2)</sup>。この手法では、フェニルエステル基の両方のオルト位にブロモ基を加えることにより、タンパク質に対する選択性だけでなく、ラベル化剤の加水分解耐性が向上し、2つの細胞内在性タンパク質の迅速的なラベル化に成功した。

(2)に関しては、中・短期の記憶に対応するシナプス可塑性に重要な働きを示す AMPA 受容体に対する可視化方法の開発および動態解析を目指して研究を展開している。昨年度までに、ラットから単離して培養した神経細胞に内在的に発現している AMPA 受容体のラベル化に成功した。今年度は、脳組織におけるラベル化反応について評価した。具体的には、急性海馬スライス切片および小脳スライス切片を用いて、内在性 AMPA 受容体のラベル化効率について評価した。ウェスタンブロッティングおよび共焦点イメージングにより、AMPA 受容体に対して選択的なラベル化反応が進行することわかった。特に、共焦点イメージング解析の結果から、我々の小分子型ラベル化剤が高い組織浸透性を有しており、脳深部における内在性 AMPA 受容体を可視化できることがわかった。一方、ラベル化によって AMPA 受容体の機能が変化しないことを電気生理学的に検証した。

- 1) Hayashi T., Yasueda Y., Tamura T., Takaoka Y., Hamachi I. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 5372-5380 (2015).
- 2) Takaoka Y., Nishikawa Y., Hashimoto Y., Sasaki K., Hamachi I. *Chem. Sci.*, **6**, 3217-3224 (2015)