

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「新機能創出を目指した分子技術の構築」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 2013年10月～2019年3月

研究代表者: 浜地 格
(京都大学大学院工学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

タンパク質は、生命現象を第一義的に担っている分子群であり、その構造と機能解析は生命科学的興味だけでなく、それが関与する疾病の迅速診断や創薬開発への波及効果という観点からも、極めて重要である。ゲノムプロジェクトの完結以降、タンパク質研究では単離精製したタンパク質の精密構造解析から、それが本来機能する生細胞・組織そのままの解析・評価へと重要性が移ってきている。この流れに対応するように、(蛍光)タンパク質タグを遺伝子工学的に融合した改変タンパク質を用いる分子生物学的な技術が開発された。しかし、これらは内在的に発現しているタンパク質の量や構造機能解析には適用できなかった。一方、化学的手法は、潜在的には天然タンパク質をそのままの環境で解析する能力が期待されるものの、その選択性の低さへの懸念から開発は遅れていた。

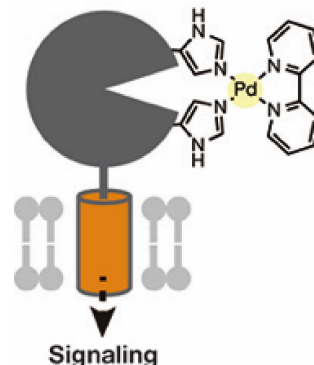
このような背景の下、本研究では、細胞や組織などの複雑な生体系で機能するタンパク質を標的に、その場で設計通りに化学修飾を施すことのできる「生細胞有機化学反応」を開発し、これを基軸にして、タンパク質が本来あるがままの環境での構造・機能の精密評価やそれと相互作用する種々の分子群(タンパク質や合成小分子)の網羅的解析を実現する独創的な分子技術の創成を目標とした。そのために、これまで浜地グループが世界に先駆けて開発してきた「リガンド指向性化学」を基盤として、(1)リガンドの拡張や水中で高い選択性を持った反応の探索、組織や個体での選択的反応実現のための新戦略の開発による「生細胞有機化学」の構築、および(2)生物学的に未知な点が多い、神経細胞/組織における「生細胞有機化学」の適用と新しい生命現象の発掘を目指して研究を展開した。(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や脳組織操作技術と組み合わせ、その結果を(1)にフィードバックする事で、両研究を効率的に進めた。

5年間で、神経系や脳組織切片などの複雑な生体サンプルでも高い選択性を示すリガンド指向性化学の拡張に成功した。その中の LDAI 化学が神経伝達物質受容体などの膜タンパク質を生細胞でラベル化することのできる強力な分子技術であり、このラベル化を基軸として GABA 受容体の新しいアロステリックリガンド分子探索法を開発し、さらに、柚崎グループの協力のもと、神経細胞や脳組織切片での内在性グルタミン酸受容体のラベル化と蛍光ライブイメージングに成功した。また当初計画にはなかった新たな展開として、特定の変異導入したグルタミン酸受容体の活性化を Pd 錯体を用いて可能とする新規な化学遺伝学的な分子技術戦略(OcCC 法)の開発に成功した。これらは浜地グループと柚崎グループとの化合物やプラスミドの提供、緊密な情報交流やノウハウの交換など、まさにがっぷり四つに組んだ異分野融合的共同研究の成果である。また浜地グループでは独自に、LDAI 化学をベースに生体内亜鉛イオン周辺のタンパク質群を網羅的に解析できる亜鉛 conditional プロテオミクスという斬新な分子技術や、リガンド指向性 NASA 化学の共有結合型阻害剤設計への展開も生まれた。一方、柚崎グループでは、シナプスに局在し神経活動に寄与するデルタ型グルタミン酸受容体の構造解析に成功し、カイニン酸型受容体のシナプス局在機構を独自に発見した補体分子群を手掛かりに解明した。これらの成果は、新しく設計合成した化合物とその制御された反応特性を特徴とする分子技術の開発が、極めて複雑で複雑な神経・脳組織の研究や創薬開発に大きく貢献しうることを端的に示すものであり、今後のさらなる展開が期待できる。

(2) 顕著な成果

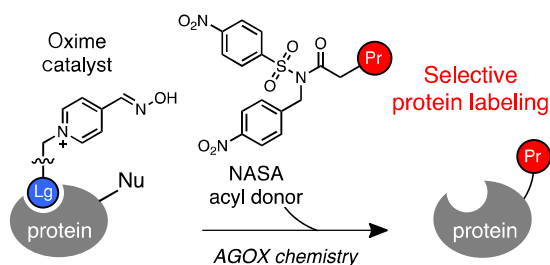
1. 細胞表層配位化学による受容体の人為的活性化法の開発 (*Nature Chem.*, 2016)

概要：興奮性神経伝達物質受容体であるグルタミン酸受容体を人工的に活性化する新たな分子技術として、遺伝子工学と錯体化学を組み合わせた細胞表層配位化学 (On-cell Coordination Chemistry) を開発した。グルタミン酸結合部位近傍に変異導入した His と Pd²⁺ 錯体の配位結合により、活性化構造を安定化・惹起することで、培養神経細胞においてグルタミン酸受容体の選択的な活性化に成功した。グルタミン酸受容体は記憶や学習に関与していることから、本技術により脳機能の分子レベルでの解明につながると期待される。



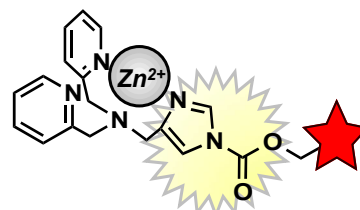
2. アフィニティ駆動型 Oxime 触媒の開発 (*J. Am. Chem. Soc.*, 2017)

概要：細胞内在性膜タンパク質の効率的ラベリング手法として、アフィニティ駆動型 Oxime 触媒を開発した。本手法は既存の触媒のタンパク質修飾法と比較して、標的選択性・生体適合性が飛躍的に向上した。このラベル化法を用いて生細胞上で内在性膜タンパク質を蛍光ラベルし、イメージング解析による拡散係数の計測に成功した。加えて、脳組織に内在的に発現する AMPA 型グルタミン酸受容体の化学修飾にも成功した。



3. 亜鉛応答性化学プロテオミクス法の開発 (*Nature Meth.*, 2016)

概要：細胞内で亜鉛イオンの周囲に存在するタンパク質を選択的にタグ付けする新しい亜鉛応答分子 (以下、AIZin) を合成し、それを用いて亜鉛関連タンパク質を一挙に同定・解析するこれまでにない全く新しい分子技術を開発した。AIZin は亜鉛イオンとの結合によって活性化し、周辺のさまざまなタンパク質と反応して蛍光タグを付けることができる。また、蛍光タグを目印としてタンパク質を捕捉・濃縮し質量分析装置を用いた解析を行うことで、亜鉛イオンの周囲に存在するタンパク質の種類や名前を同定できる。本手法を用いることで、脳内虚血をモデルとした酸化ストレスによって生じる亜鉛イオンの濃度・分布の変動と、それに伴う周辺タンパク質の変化を捉えることができた。



亜鉛応答分子 AIZin

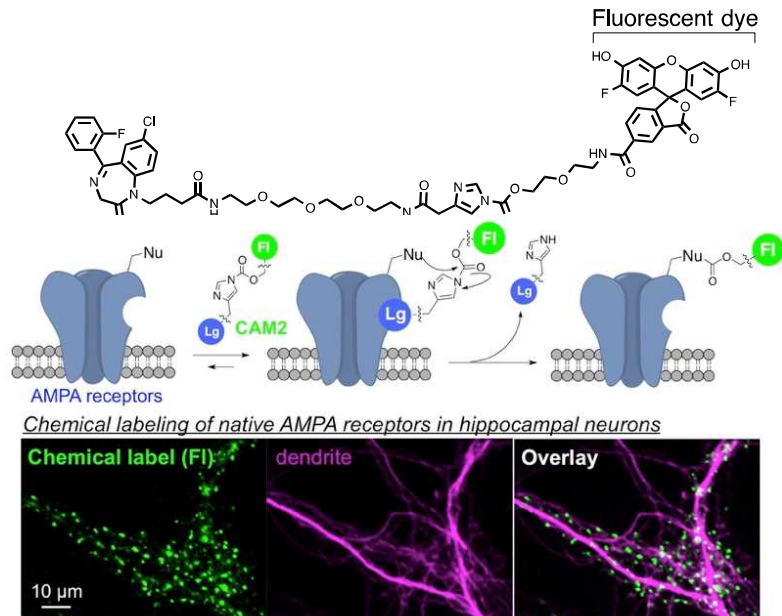
< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 抑制性神経伝達物質受容体 GABA_A 受容体のラベル化および薬剤スクリーニングシステムの構築 (*Nature Chem. Biol.*, 2016)

概要：我々が開発したタンパク質修飾法であるリガンド指向性アシルイミダゾール (LDAI) 化学を用いることで、抑制性神経伝達物質 GABA に対する受容体 (GABA_A 受容体) リガンドに対するバイオセンサーの構築に成功した。また、このバイオセンサーを用いることで、化合物ライブラリーの中から、2種類の新たな GABA_A 受容体作用薬を見いだすことにも成功した。

GABA_A 受容体は、抗うつ剤・抗不安薬など向精神薬の重要な標的であるため、本研究成果は、GABA_A 受容体創薬を大きく加速させると期待される。

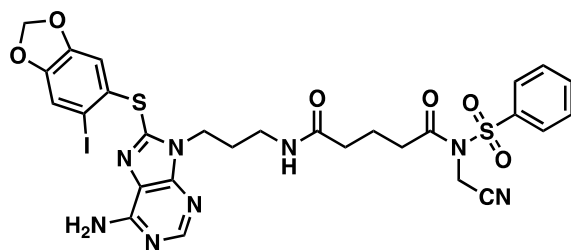
2. 神経細胞および脳組織の AMPA 型グルタミン酸受容体の選択的なラベル化および動態解析 (*Nature Commun.*, 2017)



概要：我々が開発したリガンド指向性アシルイミダゾール化学 (LDAI 化学) を用いることで、培養神経細胞および脳組織において、内在的に発現する AMPA 型グルタミン酸受容体を選択的にケミカルラベル化することに成功した。本手法では受容体機能を維持したままラベル化できるので、神経細胞および脳組織における AMPA 型グルタミン酸受容体の動態解析が可能となった。また、我々のラベル化により、内在的に発現する AMPA 受容体の動態は広く用いられる蛍光タンパク質を融合した受容体の動態と大きく異なることを明らかにした。

3. 細胞内の狙った天然タンパク質を迅速に化学修飾するリガンド指向性 NASA 化学の開発 (*Nature Commun.*, 2018)

概要：生細胞内の狙った天然タンパク質を高速かつ高選択的に化学修飾可能な新たな手法として『リガンド指向性 N-アシル-N-アルキルスルホンアミド (NASA) 化学』を開発した。NASA 化学は、従来法より数十倍から数千倍以上速く反応が進行し、タンパク質表面のリジン残基を選択的に修飾できた。さらに本手法を応用することで、癌の創薬ターゲットである熱ショックタンパク質 90 (Hsp90) の不可逆阻害剤開発に世界で初めて成功した。



NASA反応基を有する新規Hsp90不可逆阻害剤

< 代表的な論文 >

1. S. Wakayama, S. Kiyonaka, I. Arai, W. Kakegawa, S. Matsuda, K. Ibata, Y. L. Nemoto, A. Kusumi, M. Yuzaki, I. Hamachi, Chemical labeling for visualizing native AMPA receptors in live neurons. *Nature Commun.*, **8**, 14850 (2017).

2. T. Miki, M. Awa, Y. Nishikawa, S. Kiyonaka, M. Wakabayashi, Y. Ishihama, I. Hamachi, A conditional proteomics approach to identify proteins involved in zinc homeostasis. *Nature Meth.*, **13**, 931–937 (2016).
3. S. Kiyonaka, R. Kubota, Y. Michibata, M. Sakakura, H. Takahashi, T. Numata, R. Inoue, M. Yuzaki, I. Hamachi, Allosteric activation of membrane-bound glutamate receptors using coordination chemistry within living cells. *Nature Chem.*, **8**, 958–967 (2016).

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「浜地」グループ

- ・研究代表者: 浜地 格 (京都大学大学院工学研究科、教授)
- ・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

- ・主たる共同研究者: 柚崎 通介 (慶応義塾大学医学部、教授)
- ・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) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

より精密な神経生理学評価・測定を行うために、上記の2グループ間の連携に加えて、福岡大学医学部 井上教授／沼田講師との共同研究を行った。また、OcCC 論文作製において、より精密なタンパク質と Pd 金属錯体との結合様式の構造生物学的解析について、横浜市立大学 高橋教授のグループとの共同研究を行い、いずれの場合も信頼できるネットワーク構築に成功したと確信している。

また内在性 AMPA 受容体のケミカルラベルに関しては、論文発表直後から海外から多くの問い合わせがあり、市販化を進めるだけでなく、Stanford 大学や New York 大学の研究者と共同研究をスタートさせている。亜鉛 conditional proteomics に関しても、そのコンセプトをほかの環境因子に拡張する過程で、国内外 (UC Berkeley など) で多くのネットワーク形成が見込まれる。