

「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

H25 年度
実績報告

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

(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、本年度は、研究基盤となる「リガンド指向性化学」における新規反応部位として、スルホニルピリドンを組み込んだラベル化剤を開発した。ターゲットタンパク質としては、我々が予備的な知見を豊富に持っている、ヒト由来炭酸脱水酵素(hCA)、FK506 binding protein (FKBP)を対象として、これらに対応するラベル化剤を設計および合成し、リガンド指向に基づく選択的なラベル化を確認した。ラベル化の確認においては、試験管実験手法(質量分析や SDS-PAGE、グルイメジャーなどの種々の生化学的アッセイ)を駆使して、ラベル化効率、ラベル化サイトの選択性などを定量的に検証した。その結果、我々がこれまでに有効性が実証している反応基(トシル基、アシルイミダゾール基)に比べて、スルホニルピリドンを組み込んだラベル化剤の反応性が高いことを確認した。

(2)に関しては、本年度は、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 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) を標的タンパク質として、これのアンタゴニストをリガンドに有するラベル化剤群を合成した。AMPA 受容体のアンタゴニストとの共結晶構造は既に報告があり、その構造情報を元に、これまでに細胞表層で有効性が実証されているアシルイミダゾール基を有するラベル化剤を設計した。AMPA 受容体のリガンド結合部位だけを切り出したリコンビナントタンパク質(S1S2J)を用いた試験管レベルの実験から、ラベル化の進行を確認した。また、ラベル化部位の決定など定量的な検証を行い、リガンド指向に基づく選択的なラベル化進行を確認した。次に、全長の AMPA 受容体の HEK293T 細胞への過剰発現系を構築し、培養液にラベル化剤を投与することで、生細胞における AMPA 受容体のラベル化について評価した。その結果、生細胞においても、AMPA 受容体のリガンド結合部位近傍に対して、蛍光色素を選択的に蛍光ラベル化できることを確認した。興味深いことに、AMPA 受容体リガンド添加により、AMPA 受容体にラベル化された蛍光色素の蛍光が変化することを見いだした。神経細胞において内在的に発現する AMPA 受容体のラベル化に関しても、ラベル化条件の検討を開始し、定性的ながら AMPA 受容体に対するラベル化を確認した。一方、神経活動が中等度亢進すると内在性 AMPA 受容体が細胞表面から取り込まれ、さらにリゾソームに移動する時間経過と分子機構を明らかにした。このような神経活動に伴う内在性 AMPA 受容体の挙動についての知見は、ラベル化による AMPA 受容体の輸送への影響について検討するための基盤的データとなる。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国内)

なし

論文詳細情報(国際)

1

Ippei Takashima, Miyuki Kinoshita, Ryoussuke Kawagoe, Saika Nakagawa, Manabu Sugimoto, Itaru Hamachi, Akio Ojida. "Design of Ratiometric Fluorescent Probes Based on Arene-Metal Ion Contact and Their Application to Cd(II) and Hydrogen Sulfide Imaging in Living Cell.", *Chemistry - A European Journal*, vol. 20, No. 8, pp.2184-2192, 2014 (doi: 10.1002/chem.201304181).

2

Shinji Matsuda, Wataru Kakegawa, Timotheus Budisantoso, Toshihiro Nomura, Kazuhisa Kohda, Michisuke Yuzaki, "Stargazin regulates AMPA receptor trafficking through adaptor protein complexes during long-term depression," *Nature Communications*, vol. 4, No. 2759, 2013 (doi: 10.1038/ncomms3759)

(3-2) 知財出願

① 平成 25 年度特許出願件数(国内 2 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)