

「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

H26 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

(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、細胞膜に発現するタンパク質ラベル化法として、「リガンド指向性アシルイミダゾール(LDAI)化学」の有用性および一般性を示した¹⁾。具体的には、一回膜貫通型の炭酸脱水素酵素 12、GPI アンカー型の葉酸受容体、G タンパク質共役型のブラジキニン受容体、4 量体型イオンチャネルである NMDA 受容体を標的として、それぞれの膜タンパク質に特異的に作用するラベル化剤を設計・合成してラベル化を評価したところ、それぞれのタンパク質に対する選択的なラベル化および可視化に成功した。また、本手法を用いることで、各種膜タンパク質の細胞内における寿命を評価することに成功した。また、「リガンド指向型トシル(LDT)化学」の薬剤オフターゲット同定法としての有用性を示した²⁾。具体的には、HER2 タンパク質を標的とした抗がん剤として知られるラパチニブに着目し、HER2 タンパク質を選択的にラベル化可能な LDT 型ラベル化剤を設計した。実際に HER2 を発現する癌細胞株において、このラベル化剤が HER2 を選択的にラベル化することを示した。また、50kDa 付近に過剰のラパチニブでラベル化が競合阻害されるタンパク質を見だし、LC/MS を用いてタンパク質同定を行ったところ、protein disulfide isomerase (PDI)2 であることを見いだした。

(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確立および動態解析を目指して研究を展開している。本年度は、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ついて検討した。小脳あるいは大脳皮質から単離した神経細胞を用いて AMPA 受容体のラベル化をウェスタンブロットティングで定量的に評価したところ、AMPA 受容体に対して特異的にラベル化が進行していることを確認できた。また、共焦点顕微鏡でラベル化した神経細胞を観察したところ、興奮性シナプス後膜に存在する AMPA 受容体を選択的に可視化できることが判明した。今後、このラベル化手法を用いることで AMPA 受容体の動態解析を行うことができると期待される。

1) Miki T, Fujishima S, Komatsu K, Kuwata K, Kiyonaka S, Hamachi I. *Chem. Biol.* **21**, 1013-1022 (2014).

2) Yamaura K, Kuwata K, Tamura T, Kioi Y, Takaoka Y, Kiyonaka S, Hamachi I. *Chem. Commun.* **50**, 14097-14100 (2014).