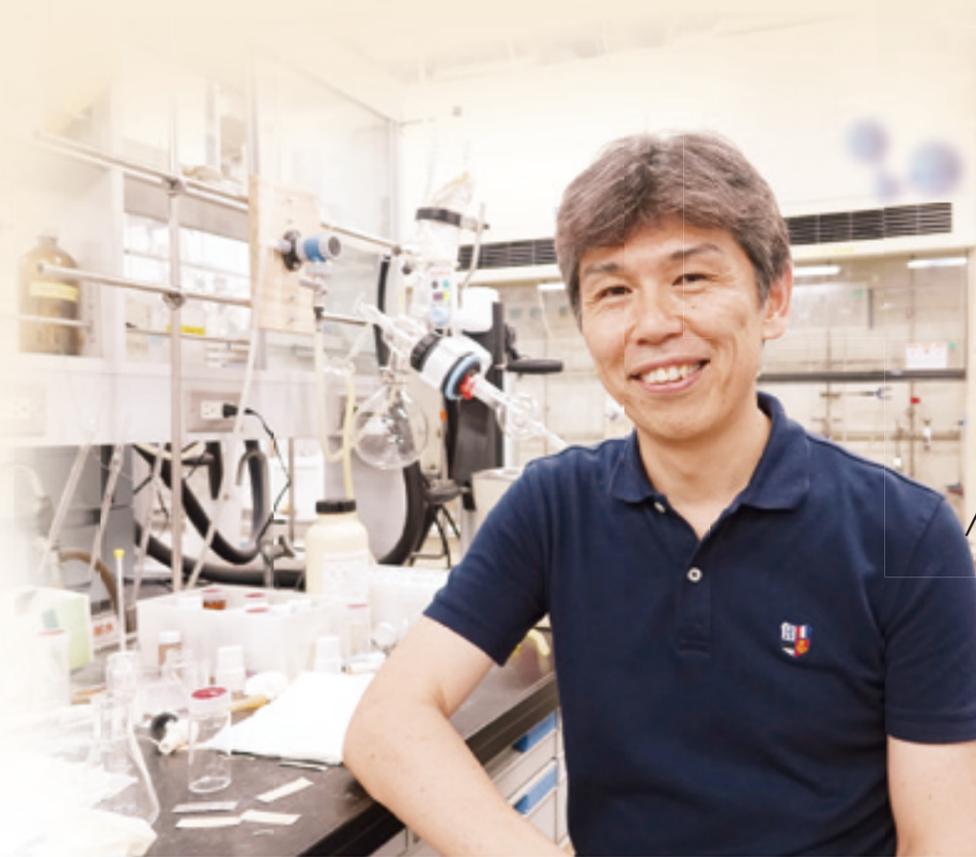


分子の目印で 生命現象の謎を解く

生きた細胞の中でたんぱく質はどのように振る舞い、どのような働きをしているのか。その解明に一步近づく分子技術に挑むのが、京都大学大学院工学研究科の浜地格教授だ。狙ったたんぱく質に分子の目印を付けるラベル化技術「リガンド指向性化学」は、生命化学研究や医薬品開発の新しい基盤を築くと期待されている。



はまち いたる
浜地 格
京都大学 大学院工学研究科 教授
2013~18年CREST研究代表者、
14年よりさきかけ研究総括、18年
よりERATO研究総括

試験管から生細胞へ 内在性たんぱく質に挑戦

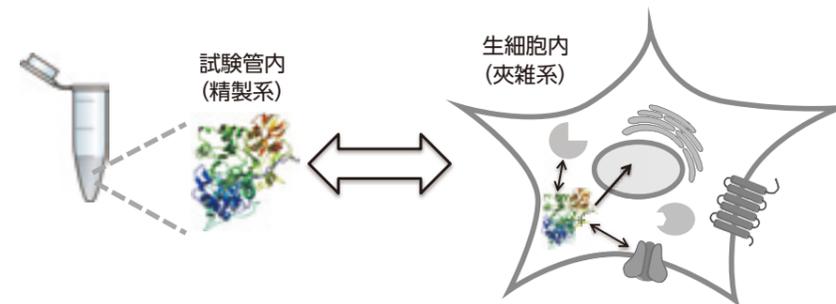
生命現象の謎を解き明かす鍵となるのが、遺伝子を基に作られる多様なたんぱく質だ。人間の体を構成する約37兆個の細胞内で、エネルギー生産、代謝や情報伝達などの多彩な生命活動を担っている。

これまでのたんぱく質の解析手法は、狙ったたんぱく質(標的たんぱく質)を取り出して精製し、試験管内の人工的な環境で調べる「精製系」が多かった(図1)。しかし生きた細胞は、標

的たんぱく質以外にも多くのたんぱく質やイオン、アミノ酸、核酸、糖鎖、脂質などの分子が混在している「夾雑系」である。「試験管のたんぱく質が生細胞にいる時と同じような振る舞いや働きをしているとは限りません。生体分子本来の機能を解析したり制御したりするため、生細胞でのたんぱく質を解析する分子技術を実現したいと考えました」と、京都大学大学院工学研究科の浜地格教授は語る。医薬品として有機合成された分子が、生体内でその効果を最大限に発揮するには、夾雑系でのたんぱく質の精密

解析が求められる。

標的たんぱく質の周りは、数万種類以上の多様な分子で混み合っている。いわば大勢の乗客がひしめきあう通勤電車のような環境で、標的たんぱく質だけの動態を解明することは極めて難しく、標的たんぱく質に目印を付けるラベル化技術が生まれた。現在の主流は、標的たんぱく質を作る遺伝子に蛍光たんぱく質の遺伝子を組み込み、蛍光の目印を持った標的たんぱく質を合成する遺伝子工学的手法だ。蛍光たんぱく質の発見は、たんぱく質の構造や機能の研究を大きく前進させたが、万



■図1 たんぱく質の構造と機能解析は生命科学の発展に極めて重要で、疾病診断や創薬開発への波及効果が期待される。細胞内のたんぱく質は動的な相互作用や局在変化で機能が制御されるので、精製系と夾雑系では構造・機能が大きく異なる。これまで生細胞内でのたんぱく質解析の分子技術が欠如していた。

能なツールではない。「新しく合成されるたんぱく質はラベル化できますが、元から細胞に存在している内在性たんぱく質は修飾できません。本来の生命現象を知るためには、内在性たんぱく質にこそ、目印を付けたいのです」。

蛍光たんぱく質は分子量が大きく、標的たんぱく質が小さい場合は、その機能を損なう可能性も危惧された。標的たんぱく質の検出モードが蛍光イメージングに限られる点も課題だった。「蛍光たんぱく質よりも小さい分子を目印にすれば、機能阻害を最低限に抑えられるのではないかと」浜地さんはひらめいた。小分子であれば多くの種類のたんぱく質を検出可能な上、実験目的に合わせて蛍光以外の目印も化学合成できると、期待に心が躍った。

認識と反応の組み合わせ 膜たんぱく質をラベル化

同じ20種類のアミノ酸で構成され

るたんぱく質が夾雑する生細胞内で、標的たんぱく質だけを化学修飾することは容易ではない。「無謀な挑戦」とも言われたが、浜地さんはひるまず、「フラスコや試験管内の純粋な環境の化学ではなく、混み合った生細胞の化学に挑戦することが自分の役割」と、信じた道を突き進んだ。

「いきなり標的たんぱく質に目印を付ける化学反応は難しいだろう」と考えた浜地さんは、「苦肉の策」として、目印を付ける前に標的たんぱく質を認識する過程を入れることを思いついた。生命の仕組みとしてたんぱく質が持つリガンド認識機能を利用したもので、「リガンド指向性化学」と名付けた。

リガンドと呼ばれる小分子は、生細胞中の特定のたんぱく質とだけ結合する。標的たんぱく質とリガンドはいわば鍵穴と鍵の関係にある。鍵であるリガンドが目印となるプローブ(機能性分子)を運び、標的たんぱく質に結合して目印を移す(図2)。「リガンド

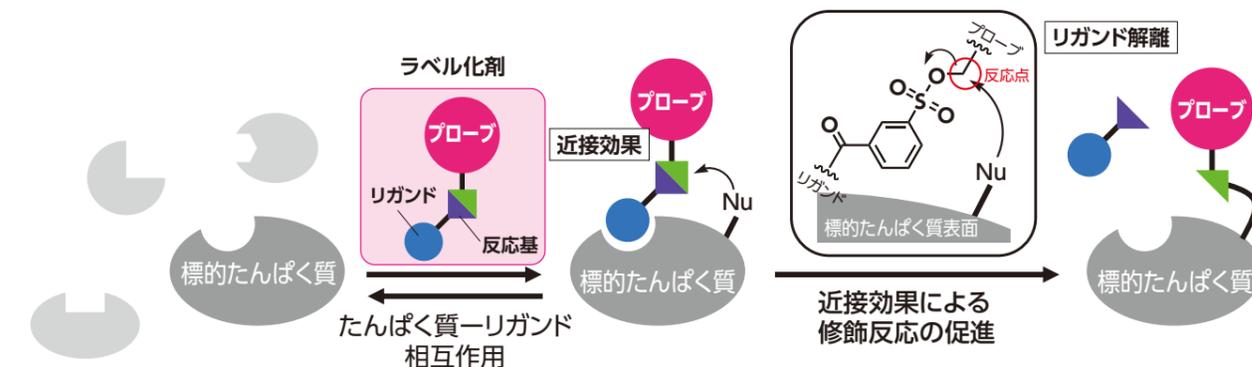
とプローブ、そして標的たんぱく質にプローブを付ける役割を担う反応基で構成される『ラベル化剤分子』の合成に成功しました」。緑色蛍光たんぱく質の分子量は約2万5000と大きいですが、ラベル化剤によって蛍光プローブを分子量300程度まで小型化し、標的たんぱく質に付けることができた。

リガンドが標的たんぱく質に認識されると、たんぱく質上の反応性アミノ酸とラベル化剤の反応基が近接するため、修飾反応が促進される仕組みだ。近接効果を活用したこのラベル化技術は、認識と反応の組み合わせが重要となる。生細胞の表面や内部には多種多様なたんぱく質が混在し、とりわけ膜たんぱく質の解析は難しいが、リガンドとプローブを適切に組み合わせたラベル化剤を作製することで、形状や機能が異なるさまざまな膜たんぱく質にも適用可能であると実績を積み上げている。

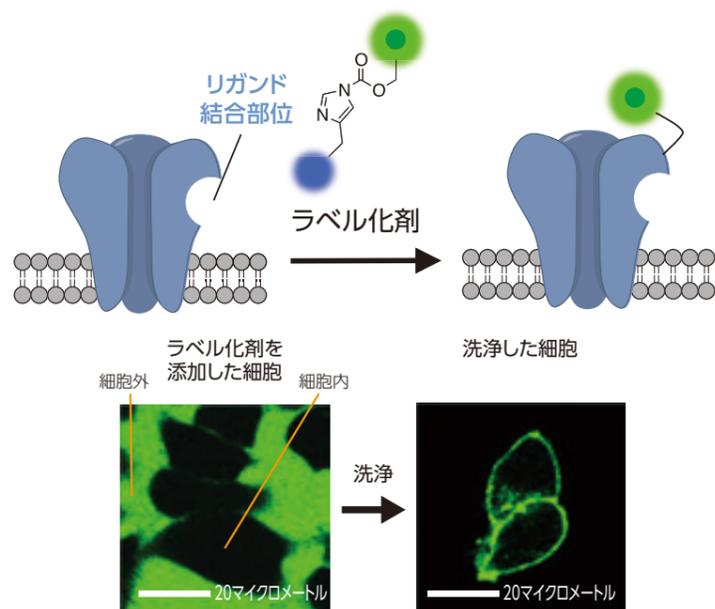
細胞膜上から脳深部まで 機能維持して動態を観察

発展したゲノム編集技術に基づく遺伝子工学的手法に対して、化学修飾によるラベル化は困難が予想されたが、リガンド指向性化学は、蛍光たんぱく質を補って余りある結果をもたらした。

代表的な成果の1つが、マウスの培養神経細胞および脳細胞で内在的に発現するAMPAグルタミン酸受容体のラベル化だ。AMPA受容体は、記憶や学習に欠かせない神経伝達物質



■図2 リガンド指向性ラベル化剤は、標的たんぱく質と結合するリガンドと、標的たんぱく質の目印となるプローブ、両者をつなぐ反応基の3つの部分で構成されている。リガンドが標的たんぱく質に認識されると、たんぱく質上の反応性アミノ酸(Nu)とラベル化剤の反応基が近接するため、修飾反応が促進される。認識されたリガンドはラベル化と同時に標的たんぱく質から切り離される。



■図3 AMPA受容体の蛍光標識の模式図(上)。AMPA受容体を発現させた細胞にラベル化剤を添加し、洗浄した際の顕微鏡観察結果(下)。ラベル化剤は細胞膜を透過せず、細胞膜上にあるAMPA受容体だけがラベル化されている。

であるグルタミン酸をリガンドとして認識する。AMPA受容体は細胞膜上だけでなく細胞内にも存在するが、記憶の強化や減弱に伴って細胞膜上での発現量が変わるため、「記憶の分子メカニズムを解明するには、細胞膜上にあるAMPA受容体だけに目印を付けて、その動態を解析する手法が求められていました」と浜地さん。細胞膜を透過しないようにラベル化剤を設計し、細胞膜上の受容体だけの目印付けに成功した(図3)。「受容体の機能を維持したまま、内在的に発現するAMPA受容体の動態解析が可能となりました」。蛍光たんぱく質で標識した受容体の動態と大きく異なることも明らかにした。

AMPA受容体を蛍光標識する方法には、蛍光たんぱく質の他に、免疫機能に関わる抗体を利用したものがある。蛍光たんぱく質は細胞内の受容体も標識してしまい、細胞膜上の受容

体だけを調べることは容易ではなかった。「抗体は約10ナノメートルと大きく、神経細胞が密集する脳組織の奥まで浸透しないため、深部にある受容体を正確に調べることは困難でした。しかしラベル化剤は1ナノメートル未満と小さいため、抗体より深い部分まで浸透します」。これまで届かなかった脳組織の深部にある受容体にも蛍光の目印を付けられることを実証した(図4)。

受容体を蛍光センサーに 新薬を効率的に探索

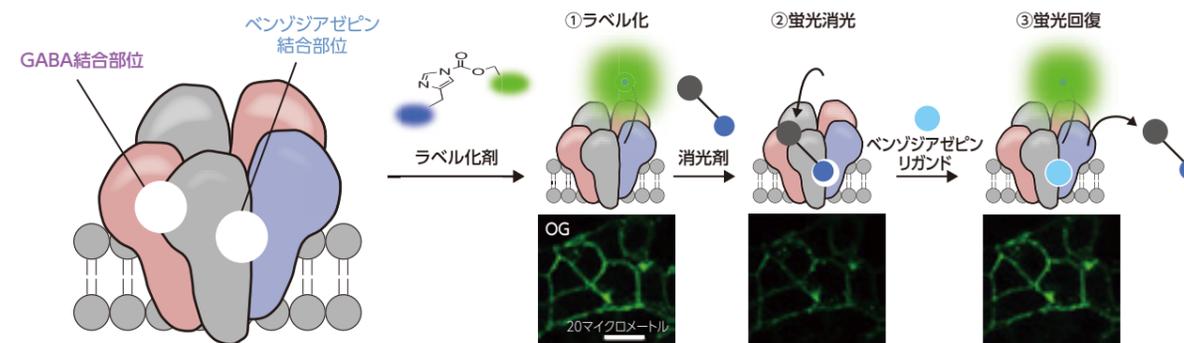
リガンド指向性ラベル化剤を利用して、標的たんぱく質に蛍光センサーの役割を持たせ、新しい向精神薬の候補となる化合物を見いだすことにも成功した。

GABA_A受容体は、抗うつ剤や不安を和らげる作用がある薬剤が結合する神経伝達物質受容体だ。新しい薬剤は受容体の構造に合わせて開発されるが、複数のたんぱく質ユニットの複合体であるGABA_A受容体は、分子量が40万以上もある巨大分子で、構造が不明だった。しかもGABAやベンゾジアゼピンなど複数の薬剤結合部位を持つ複雑な構造をしており、効率的な薬剤設計が難しかった。既存の向精神薬は複数種類のGABA_A受容体に作用してしまうため、依存症や眠気などの副作用が問題となっており、特定のGABA_A受容体にしか作用しない薬剤が求められていた。

「向精神薬に使われているベンゾジアゼピンは、ほぼ全種類のGABA_A受容体に結合します。特定のGABA_A受容体上にあるベンゾジアゼピンの結合部位を認識できる化合物を見つければ、副作用の少ない新たな向精神薬の開発につながります」と浜地さんは期待を込める。そこでベンゾジアゼピンを基に蛍光ラベル化剤を作製した。GABA_A受容体の薬剤結合部位を蛍光センサー化する狙いだ。

「ある化合物が、ある受容体に作用するかしないかを判断するためには、手間のかかる実験が必要でした。しかしリガンド指向性ラベル化剤を使えば、ベンゾジアゼピンの作用部位に結合する化合物を簡単に判別できます」。蛍光ラベル化剤を受容体に付けておけば、別の物質が作用した時に蛍光変化が起こるので、受容体の構造がわからなくても薬剤候補を探索できる(図5)。

1280種類の中から4種類の候補



■図5 GABA_A受容体の構造とその薬剤結合部位。GABA_A受容体には抗うつ剤、抗不安薬、麻酔薬、睡眠薬などさまざまな薬剤が結合する。GABA_A受容体のベンゾジアゼピン結合部位をラベル化することで、特定の薬剤結合部位に作用する化合物を見つける蛍光センサーの役割を持たせた。①ラベル化剤添加によって薬剤結合部位に目印(蛍光団、緑丸)を付ける。②消光剤の添加によって目印の蛍光を弱める。③ベンゾジアゼピン結合部位に作用する薬剤(ベンゾジアゼピンリガンド)の添加によって消光剤が追い出され、目印の蛍光が回復する。画像は共焦点顕微鏡による観察結果。

化合物が選別され、そのうちの2種類はGABA_A受容体に作用する化合物として、新たに発見されたものだった。「GABA_A受容体だけでなく、他の細胞膜受容体を対象とした薬剤探索にも応用できます」と適用性の広さを強調する。

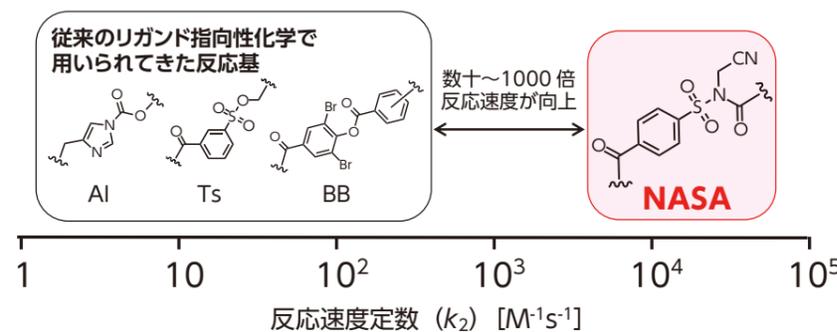
1000倍の反応速度 次世代ラベル化剤へ

「将来は、生きている生物の脳中で、たんぱく質の振る舞いや薬の動きをリアルタイムで解析できるようにしたいですね」。その夢を実現するためにも、浜地さんはラベル化剤をさらに発展させたいと考えている。幅広い種類のたんぱく質を標的とするために、より多くのリガンドやプローブの組み合わせに対応したラベル化剤を設計している。

初期のラベル化剤は反応速度が遅く、数時間から数日の時間を要するため、使い勝手が悪く、応用が限

定されてしまう問題もあった。「最初が開発したラベル化剤を第1世代とすると、最新のラベル化剤は第4世代で、NASAと呼ばれる物質を目印の運び手に使いました。一番の進化は反応速度で、第1世代と比較して1000倍になりました。第1世代で3時間必要だった反応時間が、第4世代では10分以下で済むようになりました」。

ラベル化に必要な時間が短縮されることで、より多くの実験を効率的にできるようになる(図6)。メリットはそれだけではない。「たんぱく質の中には、寿命が短いものもあります。ラベル化している間に寿命が尽きて分解してしまうのです。ラベル化に要する時間を短くする、すなわち反応時間を早めることで、より多くのたんぱく質に目印を付けて解析できるようになります。標的たんぱく質の時間経過の可視化や定量化も可能になります」と、浜地さんは次世代ラベル化剤開発の重要性を強調する。



■図6 N-アシル-N-アルキルスルホンアミドを使用することからNASAと呼ばれるラベル化剤は、従来のリガンド指向性化学の反応基と比較して、数十から1000倍以上の反応速度の向上を実現し、反応性の低いリジン残基のみを高速に修飾できた。最も高速といわれる酵素反応に匹敵する反応速度だ。



■図4 脳組織のAMPA受容体をラベル化剤と抗体を用いて蛍光標識した際の組織表面および組織深部の蛍光画像。抗体を用いたラベル化手法(左)では、表面はラベル化されているが、組織の深さ方向へのラベル化は不十分である。リガンド指向性ラベル化剤(右)では組織の深い部分までラベル化されている。

分子技術で新しい 生細胞有機化学を

2014年、さきがけ「統合1細胞解析のための革新的技術基盤」研究領域の研究総括として、浜地さんは40人近くの若手研究者を率いる立場になった。数年の研究期間での成果を求めず、数十年先に大きく花開けばいいと期待している。「若手の研究は失敗してもかまいません。ただし、成功も失敗も自分の選択の結果です。研究者は自分の研究に対して自信と責任を持つべきなのです」。「自分が本当に面白いと感じる研究を続けることが大切」と若手研究者には伝えている。「流行り廃りに振り回されず、今後の数十年を賭けるのに値する研究テーマを見つけてほしい。もしかしたら20年研究しても、成果が得られないかもしれない。それでも、自分が本当に好きで面白いと思うことを目指しているのか、常に自問自答する必要があります」。

「リガンド指向性化学の着想を得た20年前、誰も面白いとは言ってくれませんでした」と浜地さんは振り返る。「他人がどう言おうと、自分が価値があると信じることを突き詰めていくと、それが研究者に不可欠な個性や独創性になります。研究の岐路に立った時はいつも、自分にしか見られない景色がその先にあると信じる道を選んできました」。分子技術で新しい生細胞有機化学をつくりたいと、浜地さんが編み出したラベル化技術は、誰も見たことのない光景を描き続けていく。