

浜地 格 Hamachi Itaru

京都大学 大学院工学研究科 教授
2018年よりERATO研究代表者

特集 1

OVERVIEW

化学と生物分野連携でたんぱく質に目印 空間解析から脳内分子地図作成を目指す

記憶や学習などの高度な脳機能を解明するためには、脳内の情報伝達や細胞間ネットワーク形成に関わるたんぱく質を分子レベルで解明する必要がある。京都大学大学院工学研究科の浜地格教授は、化学・生物学分野の連携によって遺伝子操作を伴わない独自のたんぱく質ラベル化技術を開発し、これを基に脳機能をつかさどるたんぱく質の空間情報解析、機能制御の手法を開発するとともに、分子機能の脳内地図を作成することを目指している。

「GFP融合法」の課題をクリア 遺伝子操作不要のラベル化法

私たちの体は、さまざまなたんぱく質の機能により成り立っている。筋肉や臓器などの体の組織をつくる材料である以外にも、免疫や代謝、血圧の調整などにも重要な役割を果たしている。生体活動の仕組みを解明するには、個々のたんぱく質の機能解明が欠かせない。そこで、研究対象のたんぱく質に目印を付ける「ラベル化」を施し、その機能を調べる研究が進められている。京都大学大学院工学研究科の浜地格教授は、このラベル化に化学的なアプローチで挑んでいる。

従来のはたんぱく質ラベル化法は、2008年に故・下村脩博士がノーベル賞を受賞して話題になった「GFP (グリーン フルオロレッセント プロテイン)」と呼ばれる緑色蛍光たんぱく質を用いたGFP融合法が主流である。遺伝子組み換え技術によりGFP配列を融合した遺伝子をマウス体内に導入し、転写翻訳されたたんぱく質に可視光を当てて蛍光するたんぱく質を見る方法だ(図1)。しかしこの方法は、生体内の目的たんぱく質に直接目印を付けるわけではないので、たんぱく質本来の働きを見ることはできない。また、GFPは大きいため、修飾したたんぱく質に影響して、元の機能が損なわれている可能性もある。

そこで浜地さんは「遺伝子进行操作せずに、小さい分子でたんぱく質に直接目印を付ける」ことを目標に設定。2009年に、たんぱく質に相互作用で緩く結びつく特性を持つ分子「リガンド」を用いて、独自のたんぱく質ラベル化技術を世界で初めて開発した。浜地さんは「特定のたんぱく質と相互作用のあるリガンドは以前から知られていました。それをラベル化に活用できないかと研究を進めていたら、リガンドが結合している近くで、特定の反応基とアミノ酸が近接効果によって反応することを発見しました」と振り返る。

浜地さんらの研究グループは、この反応基にリガンドと修飾させたい機能性分子である「プローブ」をつないだらベル化剤を分子設計した。これを標的たんぱく質と一緒に混ぜると、リガンドが相互作用で緩く結びつき、次に反応基が近くのアミノ酸と結合する。この有機化学反応の際に、リガンド側が切り離され、プローブ側だけがたんぱく質に修飾される(図2)。この反応を、最初は目的物質のみを入れた試験管内で確認した後、不純物が多く複雑な細胞培養のシャーレでも成功させた。

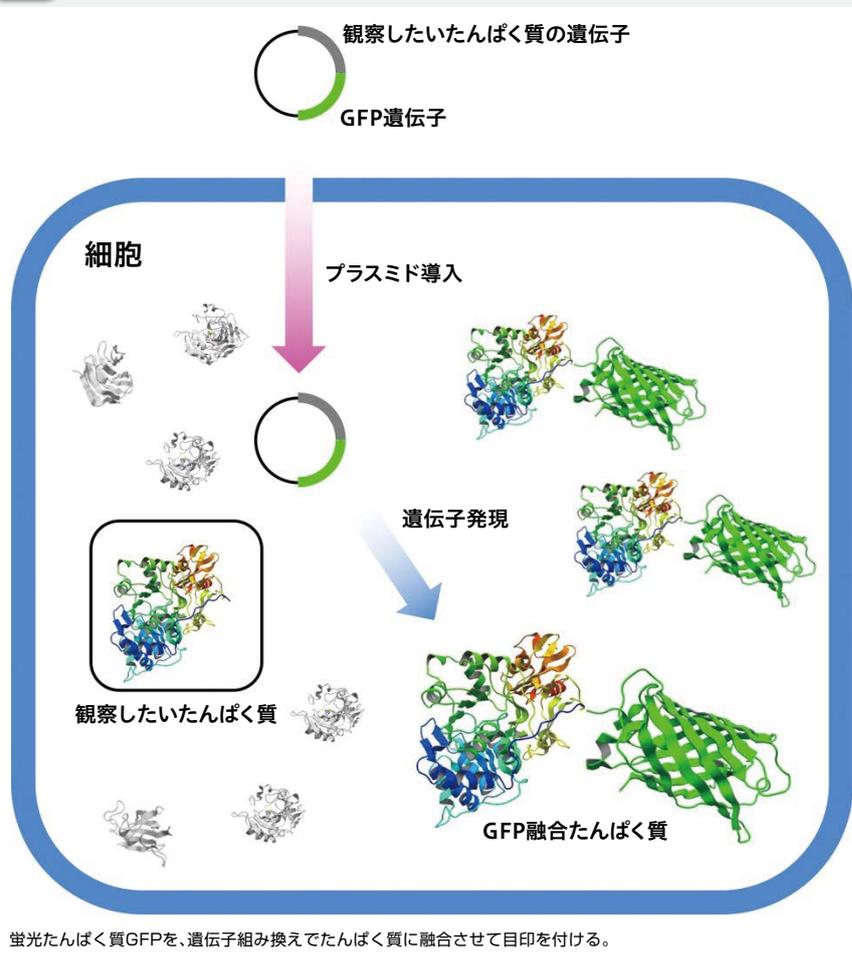
「リガンド指向性化学」で 複雑な生体内での反応を実現

試験管やシャーレでの培養細胞と違い、実際の生体内は、種々雑多なたんぱく質分子などが高濃度に濃縮された「分子夾雑^{きょうざつ}」な環境になってい

る。そこで浜地さんらの研究グループは、開発した新しいたんぱく質ラベル化技術を「リガンド指向性化学」と名付けて、試験管やシャーレの中だけでなく、生体内で使用する実験を進めた。生体内の混みあった状態での化学反応は、不純物が邪魔をしたり目的のもの以外との反応が起こってしまったりなど、精製系での反応よりもはるかにコントロールが難しい。

だが、生きた動物のたんぱく質に目印を自在に付けられるようになれば、特定のたんぱく質がどのような機能を果たしているかを直接調べることができる。さらに、例えば目印の代わりに薬物を搭載できれば、目指す部位に選択的に薬効を届けるなどの創薬利用にもつながる。浜地さんらの研究グループはリガンド指向性化学を使って、脳内の神経伝達に関わるたんぱく質に目印を付け、その

図1 GFP融合法によるラベル化の仕組み



機能を解明することに取り組んだ。

人間の脳には1000億個以上の神経細胞が存在し、神経細胞の端にあるシナプスを介して情報伝達を行っている。シナプスには、異なる神経細胞のプレシナプスとポストシナプスが隣接しており、プレシナ

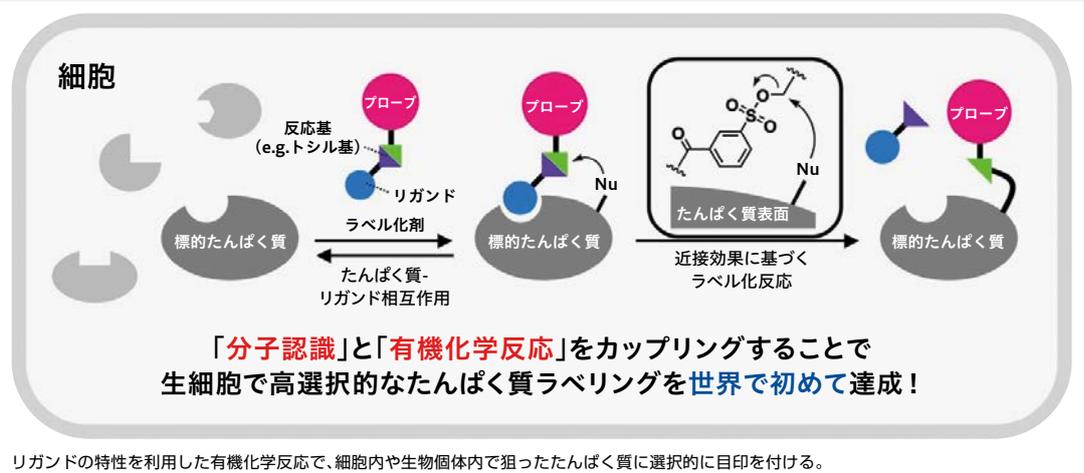
プスから放出された神経伝達物質を、ポストシナプスにある神経伝達物質受容体が受け取ることで、情報が伝達される仕組みだ(図3)。浜地さんらは、この神経伝達物質受容体のたんぱく質をターゲットとして、目印を付ける方法の開発に取り組むこととした。そして2018年に、ERATO「浜地ニューロ分子技術プロジェクト」を立ち上げた。

脳の受容体の機能解明で精神疾患の原因究明へ

「生きた動物の脳内で発現する神経伝達物質受容体に目印を付ける」という手法の開発のためには、生体に詳しい生物学分野の研究者との連携が必要だ。ERATOのプロジェクトは、化学から生物学までの分野の異なる四つの研究グループがある。研究グループ1は、脳内でも使える生体有機化学反応の開発、研究グループ2は、神経伝達物質受容体のたんぱく質活性制御技術の開発、研究グループ3は、神経細胞、脳組織での活性制御と可視化に挑んだ。研究グループ4は、これらの分子技術を実際に生きたマウスへ適応させることを目的とした(図4)。

プロジェクト開始直後は、それぞれの専門分野で役割分担して進めようとしていた。しかし、研究グループ間の壁ができて研究の効率が悪くな

図2 リガンドによるラベル化の仕組み



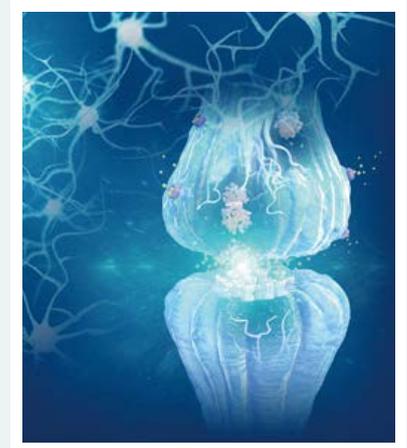
リガンドの特性を利用した有機化学反応で、細胞内や生物個体内で狙ったたんぱく質に選択的に目印を付ける。

りがちだったという。「そこで、必要なことは教え合いながら進めるというスタンスに変えて、私たち化学分野の研究者もマウスや脳の扱い方を学び、自分たちである程度、評価できるようにになりました。もちろん、特に専門的な技術や知識が必要なことは専門家に任せますが、他領域に踏み出すことで見えてきたものは大きいですね」と浜地さんは振り返る。

ERATOのプロジェクトが本格始動してからは、まず「AMPA受容体」に注目した。中枢神経系に広く分布し、記憶や学習に関与するグルタミン酸受容体の一種である。「この受容体の機能が解明されれば、記憶や学習のメカニズムの解明、神経回路形成の不調で引き起こされると考えられている精神疾患の原因究明、創薬にもつながる可能性があります」と浜地さんは語る。

このAMPA受容体を標的としたラベル化に「リガンド指向性アシルイミダゾール化学」を使って挑み、成功させた。AMPA受容体に対して、脳内での蛍光標識に適した小分子化合物を見だし、この蛍光色素をプローブとしてつないだらベル化剤をマウスの脳に直接注入し、それを観察する方法だ(図5)。標的としたAMPA受容体を、マウス全脳で選択的に化学標識し、イメージングすることを可能にした。また、研究グループは、AMPA受容体以外に、代謝型グルタ

図3 シナプスの情報伝達のイメージ

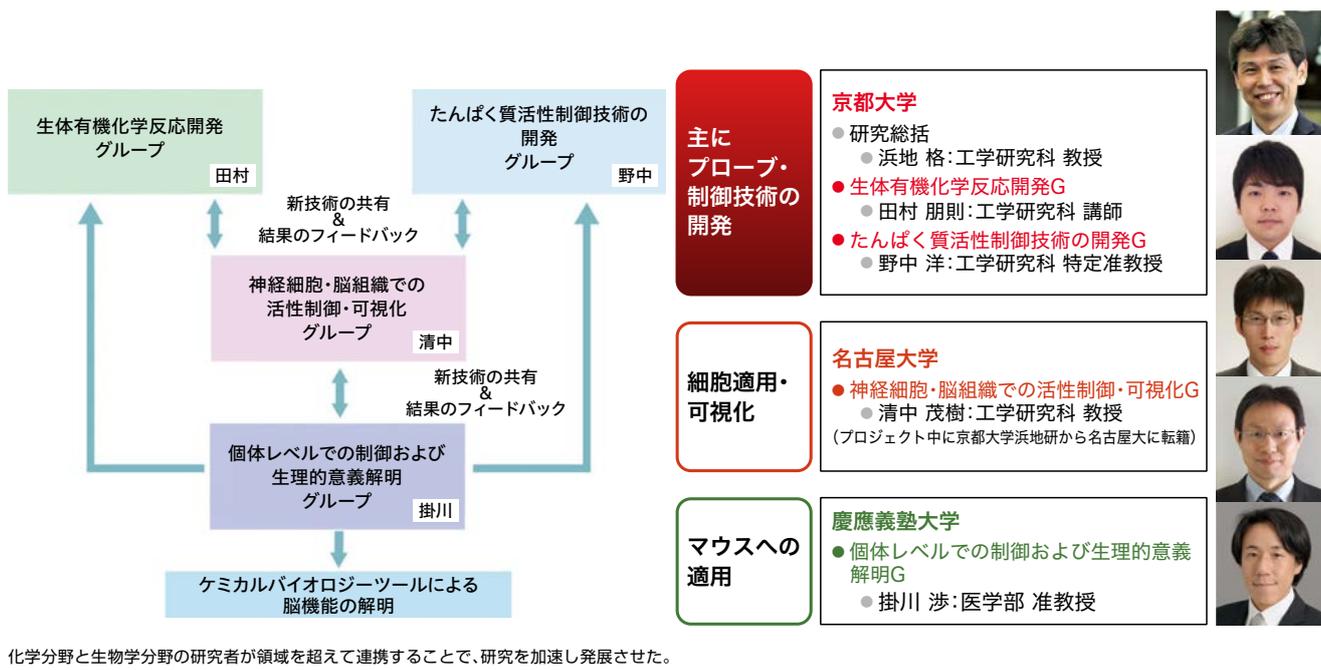


脳の神経細胞にあるプレシナプスが神経伝達物質を放出し、ポストシナプスにある神経伝達物質受容体が受け取ることで、情報が伝達される。

ミン酸受容体、NMDA型グルタミン酸受容体、GABA受容体に対するラベル化にも成功した。

さらに、多数のシナプスが新しく形成されるマウスの生後発達期において、受容体がどのような運命をたどるのかを調べるために「パルスチェイス解析」を行った。細胞や生体において、短時間ラベル化剤をさらすことにより標識し、その後、標識した対象がどのように変化するのかを追跡する解析手法である。これをAMPA受容体に適用したところ、生後4日の時点で一度シナプスや細胞体表面に存在したAMPA受容体が、生後7日の時点では新しくできた異なるシナプスに移動し、再利用されていることが明らかとなった。

図4 ERATOのプロジェクト体制



主役の周囲にも光を当てる たんぱく質を網羅的に検出

浜地さんらは、標的たんぱく質周辺を調べるための光を駆動力とした近傍ラベリング法「PhoxID法」の開発にも成功した。具体的には、生きたマウスの脳内シナプスの標的受容体に光増感剤を修飾し、マウスの脳に光ファイバーを使って520ナノ(ナノは10億分の1)メートルの緑色光を直接照射する。受容体たんぱく質に修飾した光増感剤に光が当たると化学反応性の高い一重項酸素が発生し、周辺たんぱく質が酸化される。この酸化たんぱく質を選別し、質量分析することで、標的受容体の周りにあるたんぱく質を網羅的に検出することができる(図6)。

実際に、この方法をマウスの脳の海馬領域のAMPA受容体とGABA受容体に適用したところ、わずか1~10分の光照射で、既知相互作用たんぱく質を含む複数の受容体近傍たんぱく質を検出できた。これまでのAMPA受容体を標的とした研究では、主役のAMPA受容体の周囲に何があるかまでは十分には見ていなかった。しかし、浜地さんは周りにいる脇役が重要な役割を果たしている

かもしれないと考えたという。「そこで、主役に目印を付けた箇所を手掛かりに、周りにも目印を付けようというアイデアが、この新しい検出手法開発の発端です」と浜地さんは説明する。

実際にAMPA受容体とGABA受容体では、近傍たんぱく質の種類が違うことが明らかになった。これまでの研究からAMPA受容体は興奮性のシナプスにいるたんぱく質であ

図5 マウスの生体内での有機化学反応

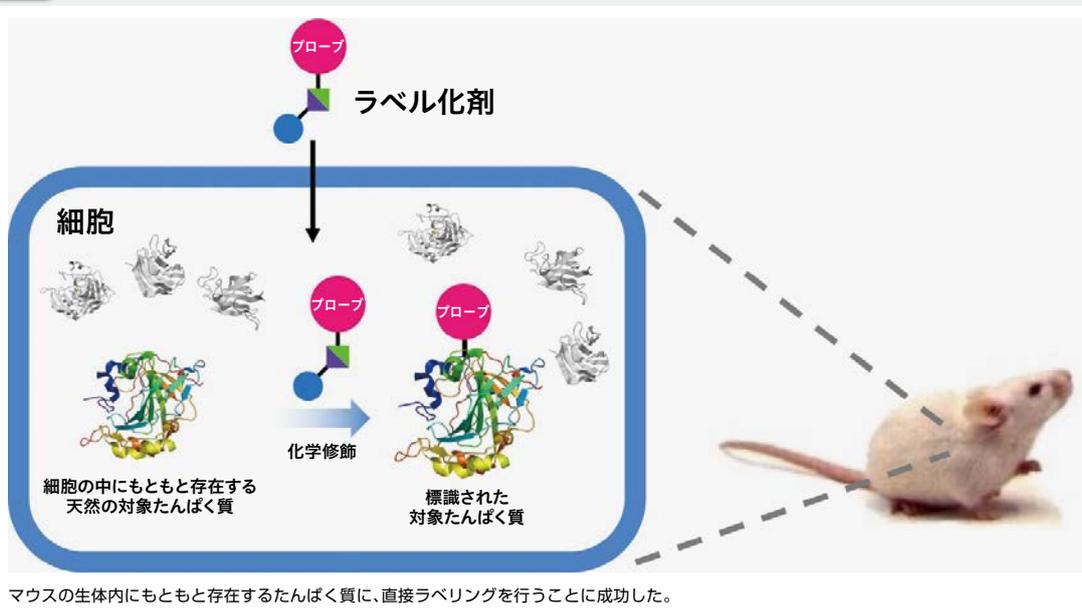
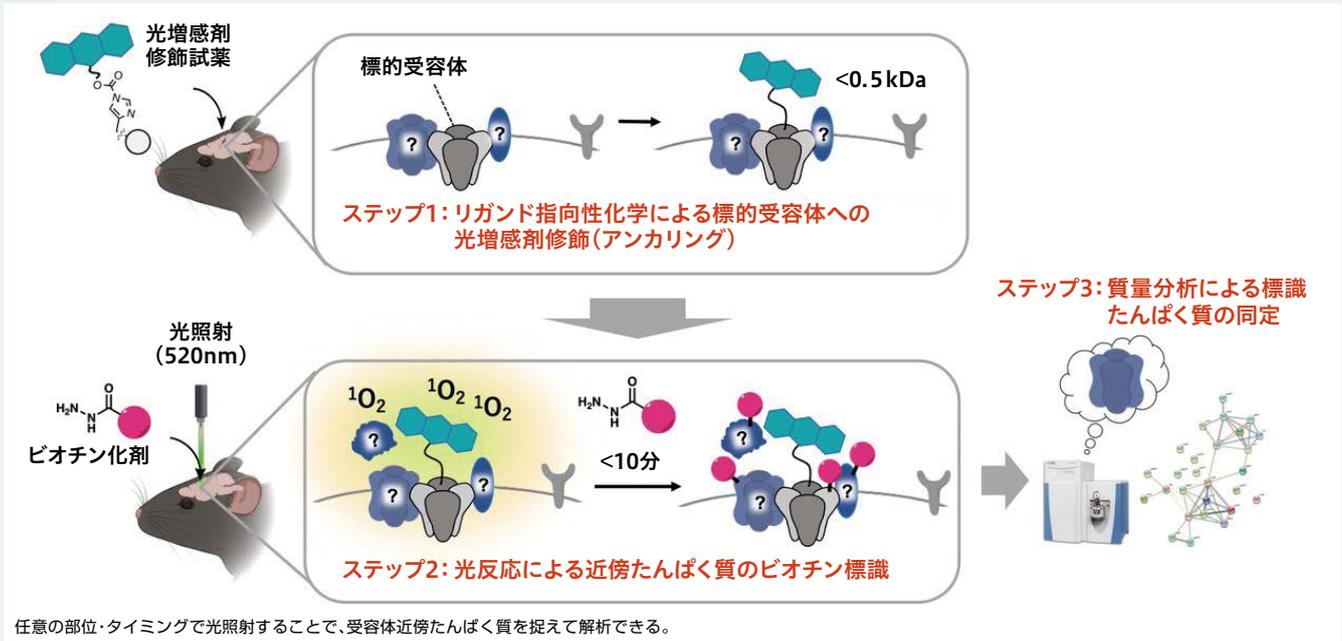


図6 光駆動近傍ラベリング法「PhoxID法」



ることがわかっていました。しかし、興奮性が抑制性かで議論が別れていたSHISA7が、今回AMPA受容体近傍たんぱく質として同定された。抑制性のシナプスにいるGABA受容体を見てみると、GABA受容体近傍たんぱく質は、AMPA受容体近傍たんぱく質と全く異なる種類であることがわかった。「特に認知機能との関係が議論されているCSMD1が、抑制性のシナプスで検出されたことは興味深い発見でした」と浜地さんは語る。

大学院時代に米国に留学して、研究に対する自由さやスケールの大きさを実感し、世界で闘うことの意味を考えたという。だが、帰国後に助手となり研究テーマを考え、いろいろなアイデアを提出しても、恩師からことごとく却下されることが続いた。行き詰まりかけたとき、恩師に「これは本当に面白いの？本当に君がやりたいことなの？」と問われたという。

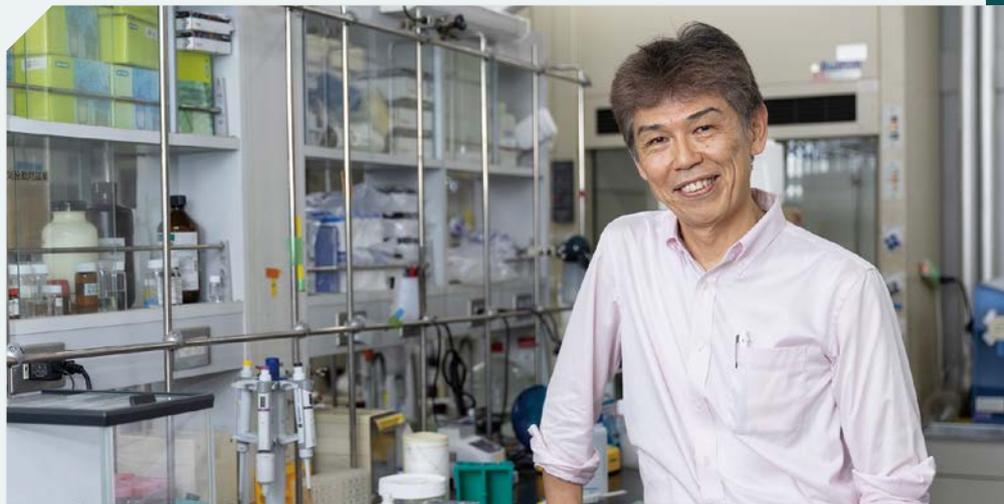
そこであらためて、その時代のトレンドのテーマを追うのではなく、

今後何十年も研究を続けるに値する本当に自分がやりたいことは何かと考えた。そうして出てきたのが現在につながるたんぱく質を自在に有機化学する研究テーマだったという。「今の若い研究者にも、自分が面白いと思うこと、価値があると思ったことを、生涯の研究テーマとして選んでもらえたらと思います」。これから研究を引き継いでいく研究者たちに、浜地さんはそうエールを送った。(TEXT:伊藤左知子、PHOTO:石原秀樹)

研究は時代のトレンド追わず 面白く価値あることをテーマに

脳内の神経伝達に関わるたんぱく質が、それぞれどこに分布しているのかを知ることは、おのおのがどのような機能を果たしているかを知る手掛かりとなる。浜地さんは研究を進めて「分子機能の脳内地図」を作ることが目標だという。「脳内地図を作るプロジェクトは世界中で行われていますが、その中に神経伝達物質受容体などの分子レベルの分解能を組み込みたいと考えています」と浜地さんは展望を語る。

現在の研究テーマのルーツには、学生時代の経験がある。浜地さんは



脳のネットワークにどんな分子がどう関与しているかがわかれば、将来的には病気の診断や治療にも貢献できると期待しています。複雑な脳という分子夾雑系で、化学に根ざした問いをこれからも証明していきたいですね。