

f the United States of America (PNAS)」(米国科学アカデミー紀要) のオンライン版で公開されました。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究 (ERATO)

研究プロジェクト:「浜地ニューロ分子技術プロジェクト」(JPMJER1802)

研究総括: 浜地 格(京都大学 大学院工学研究科 教授)

研究期間: 平成30年10月~令和7年3月

上記研究課題では、独創的な「ケミカルバイオロジー分子技術」の創製により、神経系や脳内での情報伝達や細胞間ネットワーク形成を個々のたんぱく質分子レベルで精密に解明することを目的としています。

<研究の背景と経緯>

細胞や生物個体において特定のたんぱく質を標識（ラベル化）することは、生命現象を理解する上で重要です。例えば、標的たんぱく質にだけ蛍光色素を標識し目印を付けることができれば、そのたんぱく質の動きを可視化（イメージング）することができます。これまで遺伝子工学を用いて標的たんぱく質に蛍光たんぱく質などを融合させ標識する手法は、生命科学における数多くの研究に貢献してきました。しかしこれらは、①遺伝子組み換えを行う必要性、②観測したい標的たんぱく質に対する機能阻害、③非天然型たんぱく質を発現させる際の不具合から、より自然な状態で天然のたんぱく質に目印を付ける技術の開発が望まれていました。

こういった背景のもと、研究グループは、これまでに「リガンド指向性アシルイミダゾール化学（LDAI化学）」と呼ばれる標識試薬（ラベル化剤）で天然に存在するたんぱく質を化学修飾する独自の手法を開発してきました（*J. Am. Chem. Soc.*, 134, 3961（2012）; *Nat. Commun.*, 8, 14850（2017）など）。しかし、これまでのLDAI化学は、動物組織から抽出・単離した培養細胞に発現している受容体たんぱく質への標識に限られており、生命として活動している状態である生きた動物への適用を目指していました。

<研究の内容>

今回、研究グループは、生きた動物の脳内において、LDAI化学により標的とする神経伝達物質受容体の選択的な化学修飾に成功しました（図1）。まず、記憶や学習に関与する重要な神経伝達物質受容体であるAMPA受容体を標的として選択し、ラベル化剤の投与方法や、生きた脳組織においてラベル化反応を進めるためにラベル化剤に求められる性質の検討を行いました。その結果、ラベル化剤の広範囲への浸透・拡散には、脳脊髄液^{注4)}で満たされている側脳室^{注5)}への投与が優れていることが分かりました。また、ラベル化剤の物性も重要な要素であることが分かり、親水性が高いスルホ基が多いラベル化剤とすることで脳全体にラベル化剤が浸透し、標的としたAMPA受容体をマウス全脳で選択的に化学標識することに成功しました（図2）。その一方で、スルホ基がないラベル化剤では脳組織へのラベル化剤の浸透性が悪く標識できませんでした。これらの知見をもとに、さらに3種の神経伝達物質受容体（代謝型グルタミン酸受容体（mGlu1）、NMDA型グルタミン酸受容体（NMDAR）、GABA_A受容体（GABA_AR）に対するラベル化剤の開発に成功し、いずれの受容体に対しても、全脳スケールでの選択的な化学標識を達成しました（図3）。

本手法（脳内LDAI化学）は、ラベル化剤を投与した時点で、細胞表層に発現し、機能している受容体をパルス的に標識できる特徴を持っています。これを利用することで、ある時点で標識した受容体その後どのような運命をたどるのか（例：動きや寿命）を追跡することが可能です。実際に、研究グループでは、多数のシナプスが新しく形成される生後発達期において、受容体の動きをパルスチェイス解析しました（図4）。生後発達期に神経回路が形成されていく過程において、発現したAMPA受容体がどのような運命をたどるのかについてはこれまで不明でした。本手法を用いた解析により、生後4日の時点で一度シナプスや細胞体^{注6)}表面に存在したAMPA受容体が、生後7日の時点では新しく

できた異なる役割を担うシナプスに移動し再利用されていることが明らかになりました。この結果は、新旧の受容体を区別できない既存の抗体を利用した免疫染色などの解析方法では明らかにできないことであり、生きたマウス脳内で受容体を化学標識することによって初めて解明されました。

＜今後の展開＞

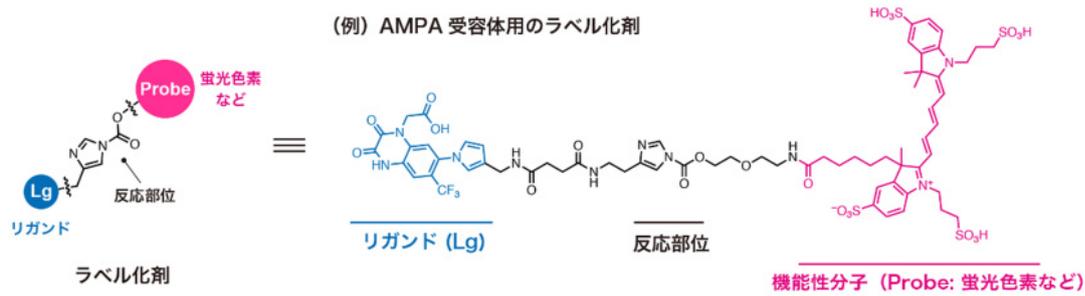
今回明らかになった生後発達期におけるAMPA受容体の再利用がなぜ行われているのか、どのような経路で受容体の移動が行われているのかなどを明らかにしていく予定です。そのことが、生後発達期において行われる効率的な神経回路形成に関するメカニズム解明や、神経回路形成の不調で引き起こされると考えられている精神疾患の原因解明へとつながることが期待されます。

本技術は、原理的にはマウスだけでなく、他の生物種に対しても適用可能です。遺伝学的方法論では標識困難な生物種に対する展開も期待できます。さらに、これまで世界中の研究者らが確立してきたモデル動物実験系（疾患モデルや遺伝子組み換えマウスなど）にそのまま適用可能であり、病態と受容体動態の関連性などが明らかになることも期待できます。

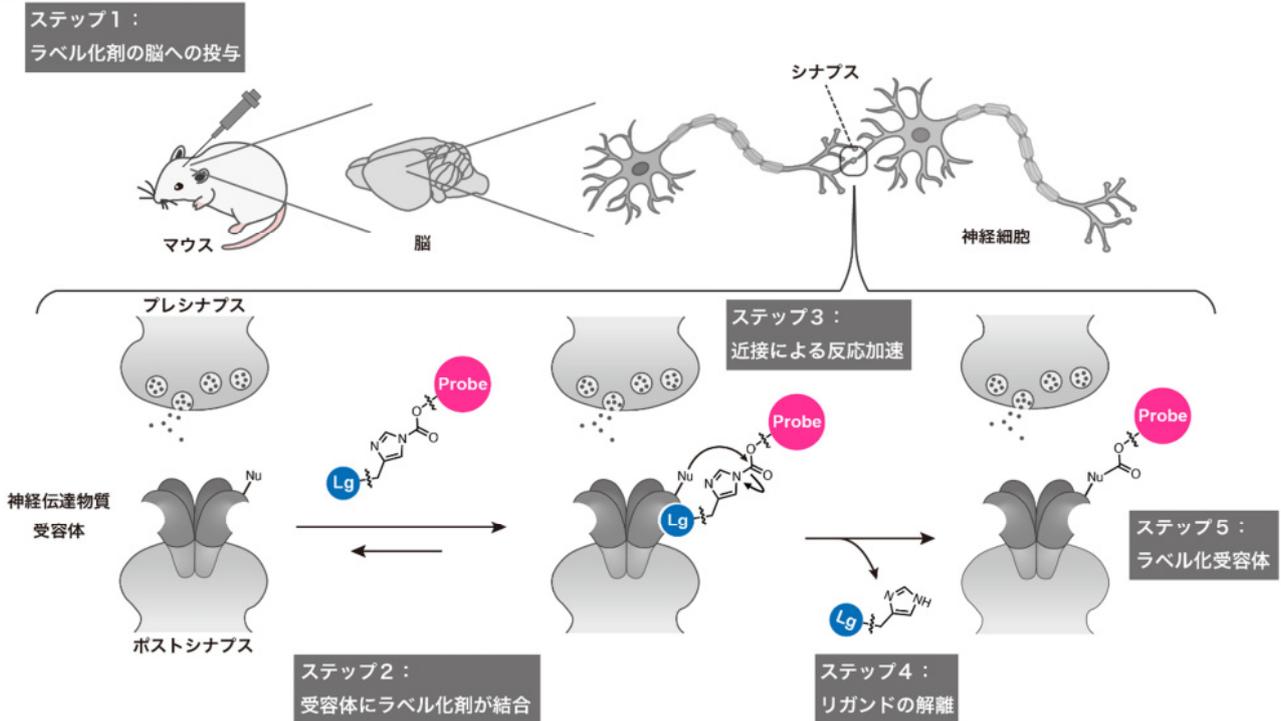
また本技術は、今回発表した受容体の運命（動きや寿命）を追跡できるだけでなく、任意の機能性分子を受容体に導入する手法としても有望です。受容体の近傍環境を解析するための機能性分子を導入することで、生きた動物脳内における分子環境に関する情報が得られることが期待され、現在研究を進めています。

<参考図>

A



B

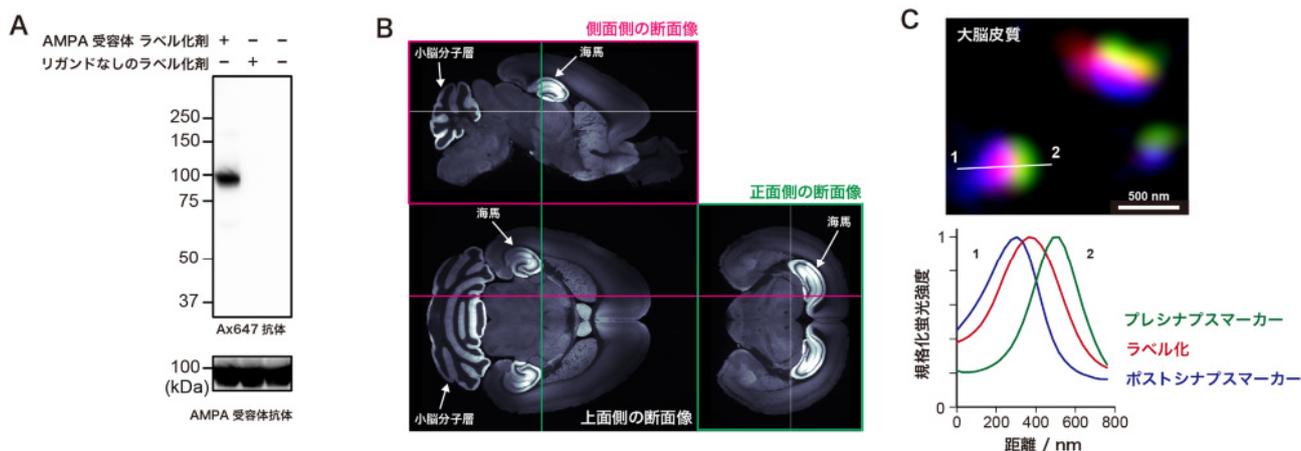


☑ 生きているマウスの脳内で標的受容体を選択的に化学標識（ラベル化）することに成功！

図1 脳内LDAI化学による神経伝達物質受容体の化学標識

A. ラベル化剤の模式図と開発したラベル化剤の1例。

B. 脳内LDAI化学の仕組み。生きた動物脳内で発現している天然の受容体に対して、機能性分子（図中Probe）を共有結合で載せることができる。

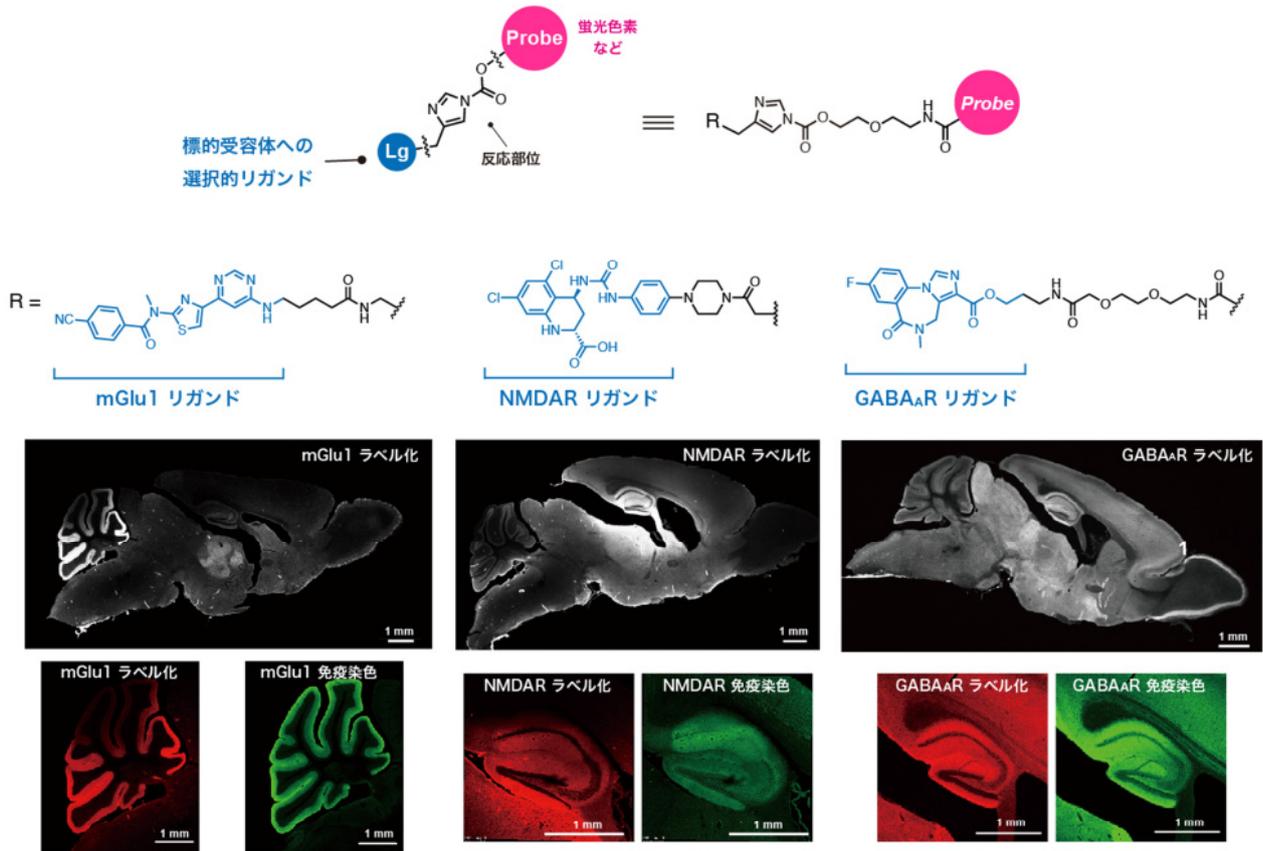


☑ 生きたマウスの全脳スケールで、AMPA 受容体への選択的な蛍光標識を達成。

図2 生きているマウス脳内でのAMPA受容体の蛍光標識

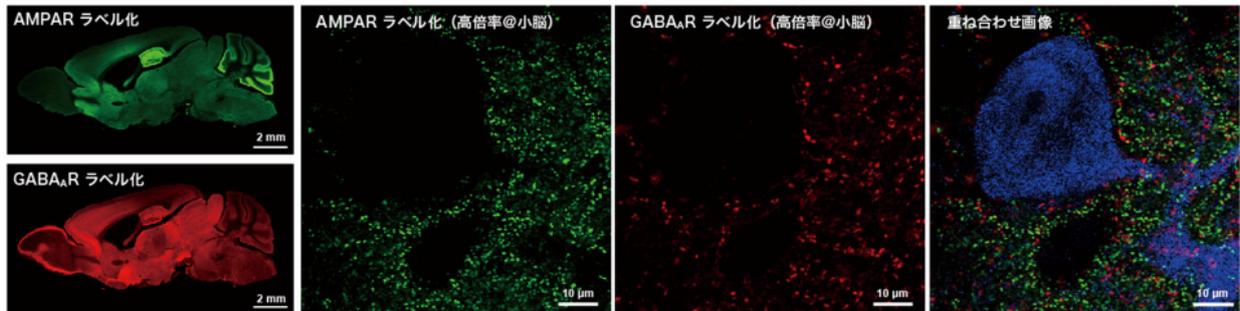
- AMPA 受容体に対する蛍光色素修飾のウェスタンブロット解析。AMPA 受容体に相当するたんぱく質分子量 (kDa) に選択的な色素修飾が確認された。
- LDAI 化学により蛍光修飾されたAMPA 受容体の全脳蛍光イメージング。AMPA 受容体の発現が多いと知られている部位 (海馬や小脳分子層) から蛍光が観測された。AMPA 受容体ラベル化剤投与後に脳を摘出し、脳を組織透明化処理し、ライトシート顕微鏡により撮影。
- LDAI 化学により蛍光修飾されたAMPA 受容体の高解像度解析。大脳皮質部分の脳切片をプレシナプスとポストシナプスのマーカーで免疫染色し顕微鏡観察し、シナプス内のAMPA 受容体を標識できていることを確認した。

A



リガンドを変更することで他の神経伝達物質受容体に対しても選択的標識が可能（受容体汎用性）。

B



標的受容体ごとに蛍光色素の色を変えることで染め分け（多重標識）も可能。

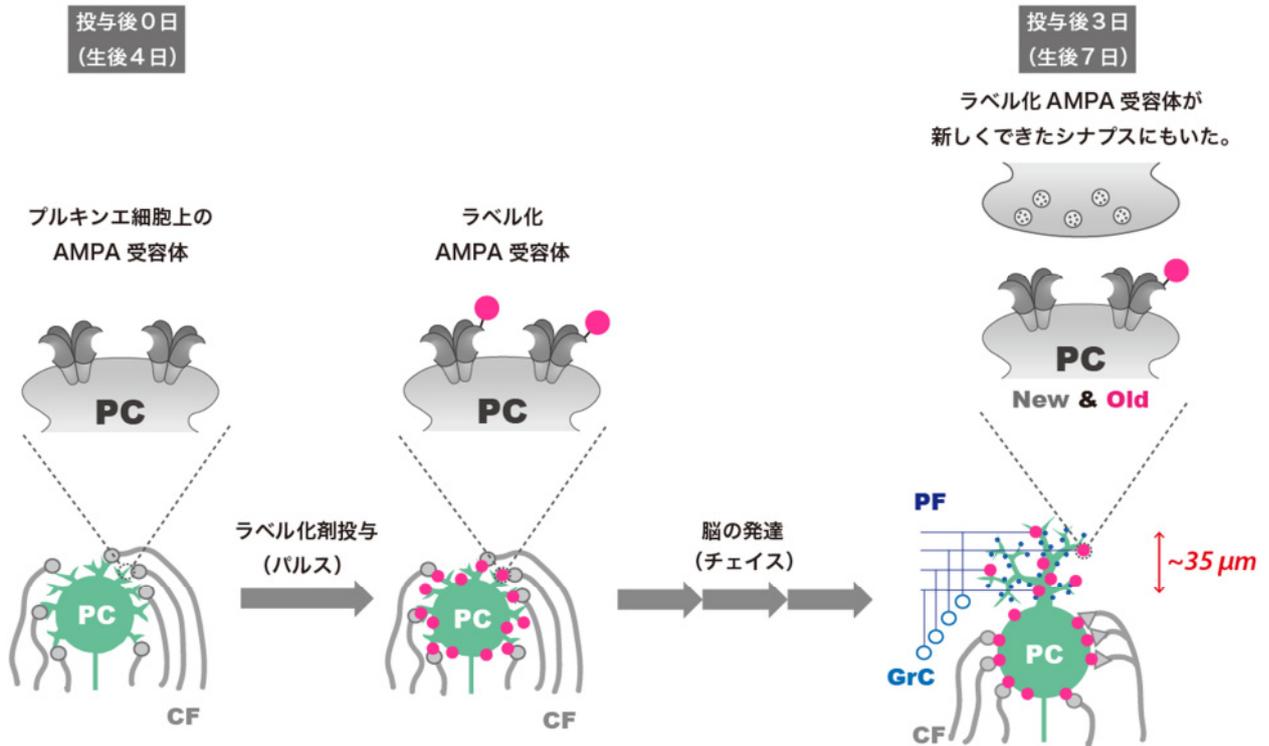
図3 生きているマウス脳内でのmGlu1、NMDA、GABA_A受容体の蛍光標識

- A. 開発した各受容体に対するラベル化剤の構造。リガンドを適切に選択することで、標的受容体選択的なラベル化が可能になった。ラベル化シグナルは免疫染色の結果と一致した。
- B. AMPA受容体とGABA_A受容体の二重標識。全脳スケールからシナプスレベルの分解能まで各受容体の局在を解析可能。青色：小脳の神経細胞（プルキンエ細胞）。

A



B



- ラベル化受容体の運命追跡により、受容体の未知動態を明らかにした。
- 古い受容体は新しくできた別の機能のシナプスに移動し、再利用されている。

図4 生後発達期小脳におけるAMPA受容体動態のパルスチェイス解析

- A. 実験のタイムライン。ラベル化剤投与直後（生後4日）と投与約3日後（生後7日）の様子を比較することで、受容体の動きを解析する。
- B. AMPA受容体動態のパルスチェイス解析の結果。生後4日の段階では、PC（プルキンエ細胞：小脳の代表的な神経細胞）周囲のシナプス（登上線維CFとのシナプス）や細胞体表面にAMPA受容体が観測された。生きた状態で3日成長させると、PCの樹状突起が伸展し、そこに多数の新たなシナプス形成（顆粒細胞（GrC）からの入力である平行線維（PF）とのシナプス）が確認され、そこに生後4日の段階でラベル化したAMPA受容体が観測された。

<用語解説>

注1) リガンド指向性アシルイミダゾール化学 (LDAI 化学)

研究グループが開発してきた天然に存在するたんぱく質を化学修飾できる手法。「LDAI 化学」では、標的たんぱく質に親和性を有するリガンドと標的たんぱく質に導入したい機能性分子を、反応部位 (解離型求電子剤: アシルイミダゾール) でつないだたんぱく質標識試薬 (ラベル化剤) として使用する (図1)。リガンド認識に伴い、標識試薬の反応部位とアミノ酸側鎖が近接し、転移反応が加速され、選択的な修飾が可能となる。この反応の際に、リガンドがたんぱく質に共有結合せず解離するように設計されているため、たんぱく質の本来の機能が保持される。

本手法の標識の選択性は、リガンドの性質 (たんぱく質選択性、親水性・疎水性) や、ラベル化剤の反応部位と標的たんぱく質上の反応性アミノ酸との位置関係に依存する。リガンドに選択性がない場合や、リガンドが存在しないたんぱく質を標的とすることは、本手法では難しい。研究グループでは、良好な性質を示すリガンドの選択と、ラベル化剤全体の分子デザイン (反応部位の位置など) で性能の最適化を図り用いている。

注2) AMPA型グルタミン酸受容体 (AMPA受容体 (AMPA R))

イオンチャネル型グルタミン酸受容体の一種で、中枢神経系に広く分布し、記憶や学習に大きく関与。

注3) パルスチェイス解析

細胞や生体において、短時間標識化合物をさらすことにより標識し (パルス)、その後、標識しない条件とし標識した対象がどのように移動するか追跡する (チェイス) 解析手法。

注4) 脳脊髄液

リンパ液のように無色透明な液体。頭蓋骨の内側に脳があり、脳は脳脊髄液の中に浮いている。

注5) 側脳室

大脳半球内に左右対称で存在する空間。脳の内部には側脳室、第3脳室、第4脳室と名づけられる脳脊髄液で満たされたスペース (脳室) がある。

注6) 細胞体

神経細胞の中で細胞核などの細胞小器官が集中し、樹状突起と軸索が会合する部位。一般的な細胞としての機能を担っている。

<論文タイトル>

“Bioorthogonal chemical labeling of endogenous neurotransmitter receptors in living mouse brains”

(生きたマウス脳における内在性神経伝達物質受容体の生体直交型化学標識)

DOI : 10.1073/pnas.2313887121