

生きた動物脳内で蛍光センサーを組み立てる

—遺伝子操作不要。脳内有機合成化学の新戦略—

概要

京都大学大学院工学研究科の浜地 格 教授、野中 洋 准教授、坂本 清志 特定准教授、白岩 和樹 同博士課程学生（研究当時）らの研究グループは、生きた動物脳内の特定受容体上で蛍光センサー分子を化学合成する新規手法を開発しました。

生体内で天然のタンパク質を化学修飾・機能化することは、化学と生物学の境界領域における最先端研究において有用です。これまで、本研究グループでは、遺伝子操作を伴わずに動物脳内の天然に存在する受容体を化学修飾する「脳内リガンド指向性化学」^{注1)}の開発に成功していましたが、導入できる分子種に限りがありました。今回、「脳内リガンド指向性化学」と「クリック化学」^{注2)}を組み合わせることで、標的受容体への多様な分子種の修飾を可能にしました。本手法により、シナプスの形成や可塑性^{注3)}に關与する脳内の分泌性プロテアーゼに対する蛍光センサーを標的受容体上で構築できました（図1）。このセンサーにより、生きている脳内の特定プロテアーゼ活性をセンシングできました。この成果は、脳機能の理解や脳神経疾患のメカニズム解明につながると期待されます。

本研究成果は、2025 年 6 月 2 日に国際学術誌「*Nature Synthesis*」にオンライン掲載されました。

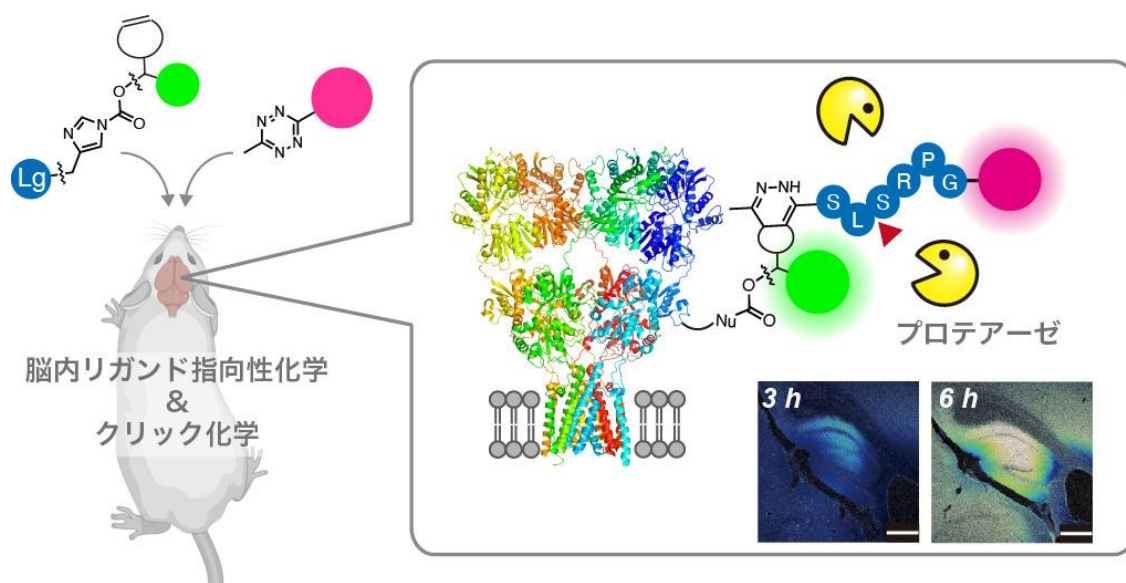


図1. 生きている動物の脳内の特定受容体上で蛍光センサー分子を構築

1. 背景

生体において特定のタンパク質を化学修飾・機能化することは、生命現象を理解する上で有用なアプローチです。例えば、自然界にはない機能を持つ分子を標的タンパク質に付与することで、各種の解析や新たな機能の発現が期待できます。こういった背景のもと、本研究グループは、これまでに生きている動物脳内で標的とする受容体に蛍光色素などの小分子を導入することに成功し（図2）、受容体動態のイメージングや近傍タンパク質の解析を展開してきました（*PNAS*, 121, e2313887121 (2024)., *Nat. Chem. Biol.* 21, 109 (2025).）。

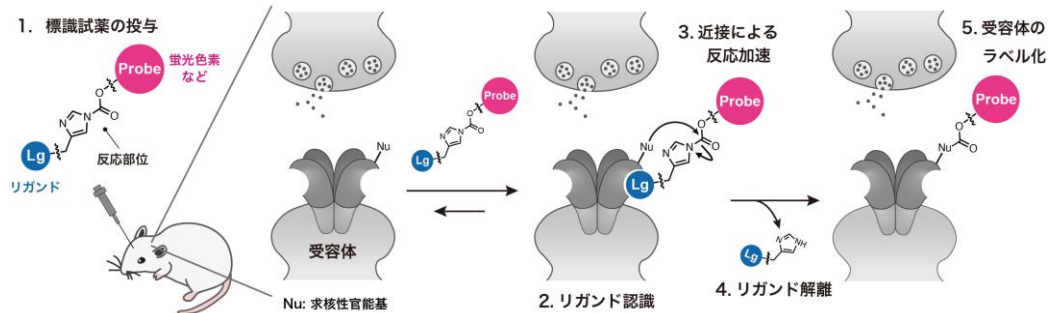


図2. 脳内リガンド指向性化学。生きた動物脳内で発現している天然の受容体に対して、機能性分子（図中 Probe）を共有結合で載せることができる。

2. 研究手法・成果

以前の「脳内リガンド指向性化学」は、脳内の狙った受容体に対して機能性分子を化学修飾できる優れた手法でしたが、いくつかの問題がありました。修飾反応に10時間程度を要するため速い生命現象の観測に対応できない点や、導入したい分子の構造中にアミノ基などの反応性官能基を持つ場合（ペプチドなど）は望まない副反応が起こりうる点です。そこで、本研究グループは、受容体への標識反応を2段階に分け、「脳内リガンド指向性化学」による標的タンパク質への選択的なクリック官能基^{注4}の導入と、「クリック化学」を利用し1時間以内で多様な機能性分子の導入を実現する新規手法の開発を目指しました（図3）。

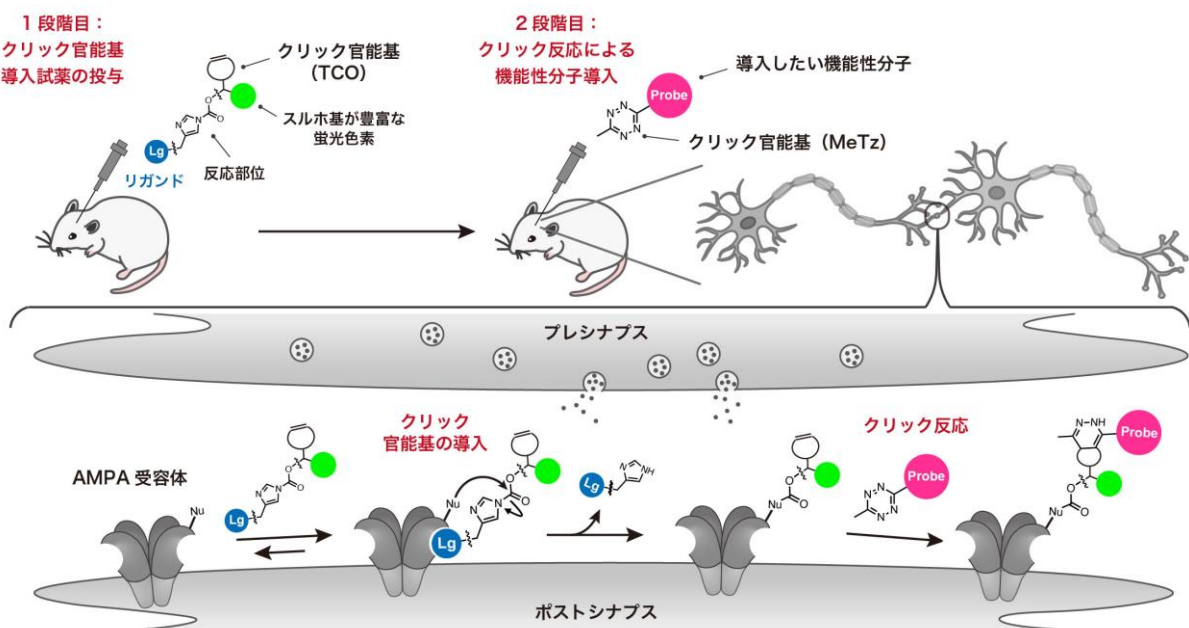


図3. 「脳内リガンド指向性化学」と「クリック化学」による高速で多様な機能性分子の導入法

まず、第一段階として「脳内リガンド指向性化学」による AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体)^{注5)} への選択的なクリック官能基の導入を試みました。本研究グループがこれまで設計したクリック官能基導入試薬は、2次元培養細胞系で成功していましたが、生きている動物の脳内での導入はうまくいきませんでした。これは、脳はさまざまな細胞集団による複雑な3次元構造をとっていることや、組織液などの流れがあることなどの要因により、2次元培養された細胞での実験系とは環境が大きく異なることが要因と考えられました。検討を重ねた結果、クリック官能基導入試薬へのスルホ基^{注6)}の付与と部分構造の調節でクリック官能基の導入効率が変わることがわかり、最終的に良好なクリック官能基導入試薬を得ました。この際、脳内で用いる反応試薬の設計において、どのような分子構造が望ましいかの知見を得る目的で、分子の脂溶性を示すパラメータである ClogP 値と反応効率を比較しました。すると、ClogP 値と反応効率に相関が見られ、脳内で用いる反応試薬開発において ClogP 値が良い指標になりうることを見出しました。

次に、第二段階として「クリック化学」による AMPA 受容体への機能性分子導入を行いました。二段階目を使用する試薬においても、ClogP 値を考慮することで効率的な機能性分子の導入に成功しました。今回開発した修飾法により、従来 10 時間程度要していた機能性分子導入のステップが、わずか 1 時間以内で可能になりました。また、ペプチドのような様々な官能基を持つ中分子でも導入を確認できました。

最後に、今回の手法を用いて、興奮性の神経伝達を担う AMPA 受容体上で、周囲の環境をセンシングできる蛍光センサー分子の構築を試みました。マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9)^{注7)} は、脳内においてシナプスの形成・可塑性の調整などに関与すると考えられている分泌性プロテアーゼであり注目されてきましたが、生きている脳の状態を反映した活性検出法がこれまでありませんでした。本研究グループは、開発した手法を用いて、AMPA 受容体上に MMP-9 の蛍光センサー分子の選択的合成を実現しました。構築された MMP-9 センサーを用いて、AMPA 受容体が局在する興奮性シナプス近傍の MMP-9 活性を高解像度でマッピングすることに初めて成功しました (図4)。この結果は、MMP-9 が関与すると考えられているシナプス可塑性の調整や脳神経系疾患のメカニズム解明につながる成果です。

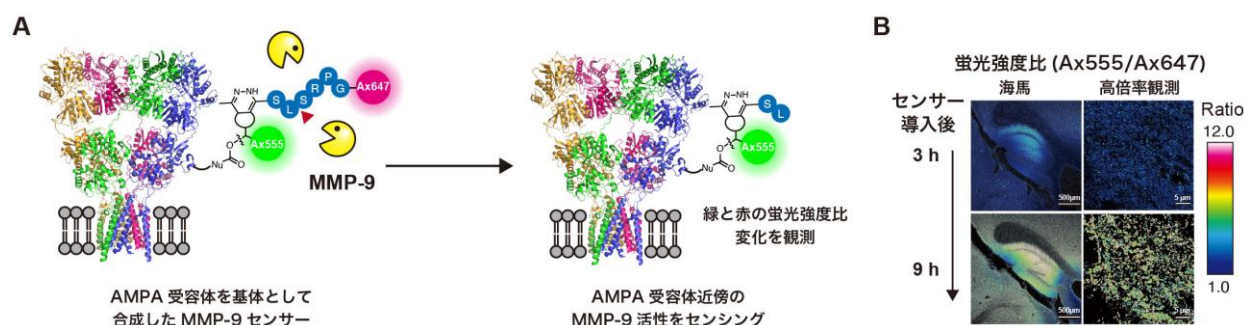


図4. (A)脳内で AMPA 受容体上に合成した MMP-9 センサーの概念図
(B) 生きた動物脳内での MMP-9 活性の蛍光検出

3. 波及効果、今後の予定

今回開発した手法による脳内での特定受容体上でのセンサー構築は、MMP-9 のみならず様々なプロテアーゼ、酵素、化学種などのセンシングに原理的に展開可能です。今後、合成するセンサーの種類の拡張、基体とする受容体の拡張、各種病態モデルでの評価を進めることで、脳機能を分子レベルで解析するための強力な研究ツールとなることが期待できます。

また、本研究の過程で得られた脳内で有効に機能する化学反応剤の設計指針は、脳内有機合成化学とも言える新しい学術領域を切り拓いていく上での重要な知見になると思われます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、以下の支援を受けて実施いたしました。

●科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 ERATO

研究領域：「浜地ニューロ分子技術プロジェクト」(研究総括：浜地 格 京都大学 教授)(課題番号 JPMJER1802)

●文部科学省 科学研究費助成事業 特別推進研究

研究課題名：「生体分子夾雑の有機化学の開拓」(研究代表者：浜地 格 京都大学 教授)(課題番号 23H05405)

●武田科学振興財団 ライフサイエンス研究助成

研究課題名：「生きた動物脳内の分泌性プロテアーゼ活性を検出可能な手法の開発」(研究代表者：野中 洋 京都大学 准教授)

<用語解説>

注 1) 脳内リガンド指向性化学

本研究グループが開発してきた脳内の天然に存在する受容体を化学修飾できる手法です。標的受容体に親和性を有するリガンドと標的受容体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)でつないだ受容体標識試薬として使用します(図2)。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ります。この反応の際に、リガンドが受容体に共有結合せず解離するように設計されているため、受容体の本来の機能が保持されます。

注 2) クリック化学

特定の反応基のペアにより、高い反応性と選択性で新たな分子を合成する手法です。2022 年、「クリックケミストリーと生体直交化学の開発」に対して、ノーベル化学賞が授与されています。「クリック」は、シートベルトが「カチャ」と音を立ててロックされるように、素早く簡単に結合を作る様子を例えた言葉です。

注 3) シナプス可塑性

シナプスの活動の増加または減少に応じて、シナプスの結合を強めたり弱めたりすること。シナプス可塑性は学習と記憶の重要な神経化学的基盤の 1 つです。

注 4) クリック官能基

クリック化学による反応を起こすことが可能な官能基です。本研究では、高速で反応が可能なトランスシクロオクテン (TCO) とメチルテトラジン (MeTz) のクリック官能基のペアを用いています。

注 5) AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体)

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しています。

注 6) スルホ基

-SO₃H を持つ官能基で水によく溶けます。中性条件では -SO₃⁻ となり負電荷を持ちます。

注7) マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9)

マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) は、細胞外マトリックスを分解するタンパク質分解酵素の一種です。脳においても様々な生理学的、病理学的な過程に関与していることが近年明らかになっています。

<研究者のコメント>

「19 世紀から始まった有機合成化学ですが、近年では反応場をフラスコの中から細胞や生物個体で目的分子を合成する試みが行われています。本研究では、未踏の脳を舞台にして、どのような反応剤が脳という環境で効率よく反応するのかや、脳内で有機合成することでどのような展開が可能かをデモンストレーションしました。今後、この技術を用いて、化学的アプローチを活かした脳研究へと役立てていく予定です。」(野中 洋)

<論文タイトルと著者>

タイトル: In-brain synthesis of receptor-based protease sensors by coupling ligand-directed chemistry and click chemistry (リガンド指向性化学とクリック化学による受容体を基体としたプロテアーゼセンサーの脳内合成)

著 者: Seiji Sakamoto, Kazuki Shiraiwa, Mengchu Wang, Mamoru Ishikawa, Hiroshi Nonaka,* Itaru Hamachi*

掲 載 誌: *Nature Synthesis* DOI: 10.1038/s44160-025-00815-6

Created in BioRender. Nonaka, H. (2025) <https://BioRender.com/l00t998>