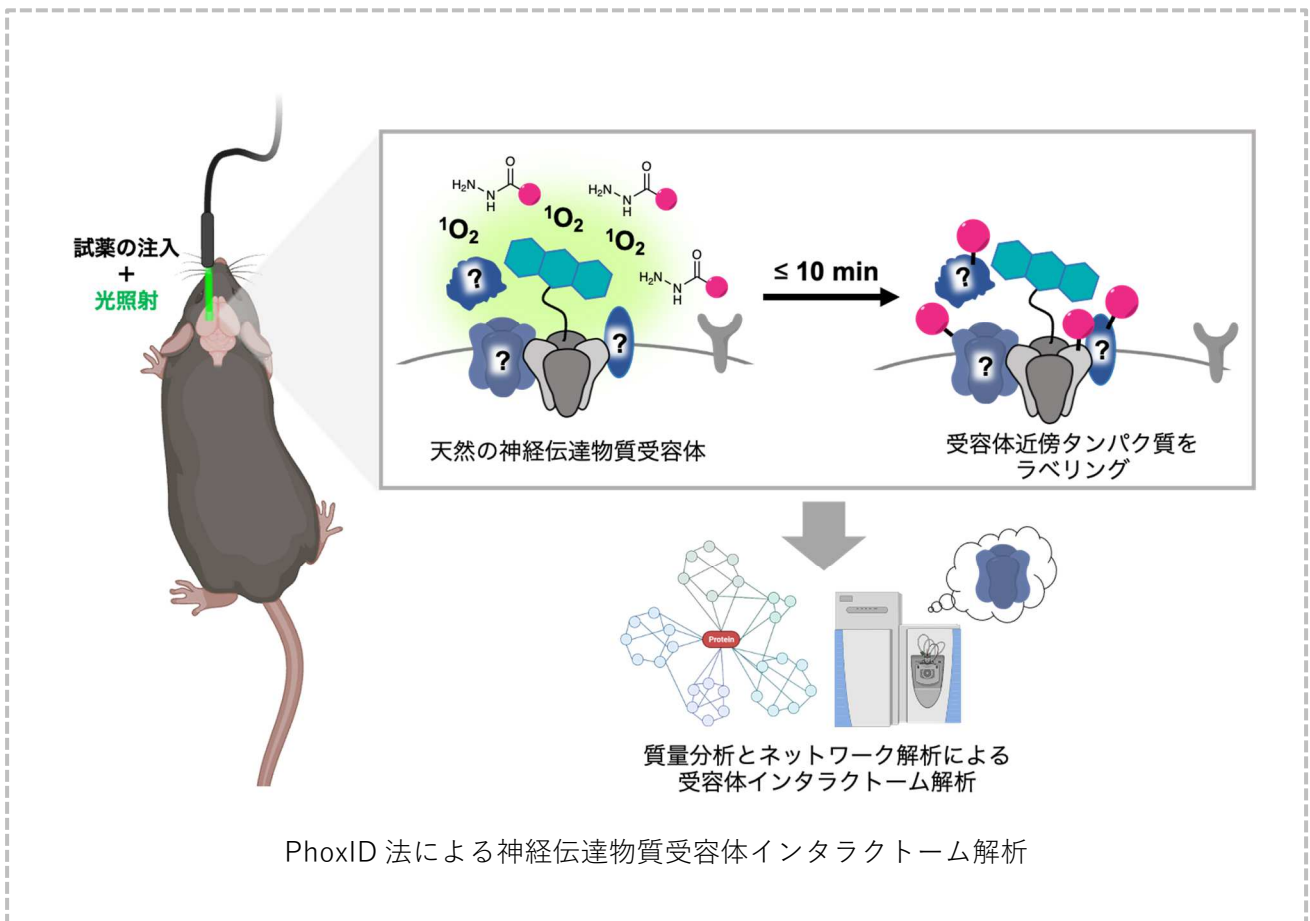


生きた動物脳内の受容体近傍タンパク質を検出する新手法を開発

— 遺伝子操作不要、高時間分解能で解析可能に —

概要

京都大学 大学院工学研究科 浜地 格 教授、田村 朋則 講師、高遠 美貴子 博士課程学生（研究当時）らは、神経伝達物質受容体の周辺に存在するタンパク質を生きたマウスの脳内で網羅的に標識（ラベリング）し、同定する新手法を開発しました。神経伝達物質受容体のタンパク質間相互作用ネットワーク（インタラクトーム）の解明は、記憶、学習といった複雑な脳機能を理解する上で重要です。本研究グループは今回、光を駆動力とした新たな近傍ラベリング法^{注1}として PhoxID 法を開発し、高い時空間分解能で生きたマウス脳内の受容体インタラクトームを同定することに成功しました。また、生後発達期から成熟期にかけて、シナプス形成に重要な AMPA 受容体（AMPA）^{注2}の周辺タンパク質群が変化することを見出し、幼若期特異的に AMPAR の周辺に存在する複数のタンパク質を発見しました。本技術は原理上あらゆるタンパク質を標的とした近傍タンパク質解析に適用可能であり、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しての発展が期待されます。本研究成果は、2024年8月1日10:00(現地時間)に米国科学誌「Nature Chemical Biology」のオンライン版で公開されました。



1. 背景

ヒトの脳内には約 1,000 億個もの神経細胞が存在し、それらがシナプスという接続部分を介してつながることによって複雑な神経回路を形成しています。シナプスでは神経伝達物質が神経細胞のシナプス前終末（プレシナプス）から放出され、それが別の神経細胞のシナプス後膜（ポストシナプス）に発現している神経伝達物質受容体（以下、受容体）と結合することを起点として情報が伝達されます（図 1A）。これまでの研究から、神経伝達にはシナプス後膜における受容体の活性と数が重要であることが明らかになっています。受容体の活性や局在の変化は、受容体周辺の他のタンパク質との間の相互作用を介して厳密かつ動的に制御されており、受容体のタンパク質間相互作用ネットワーク（インタラクトーム）の解明は、脳機能を分子レベルで理解する上で重要な課題となっています。

従来、こうしたインタラクトーム解析には、免疫沈降やアフィニティー精製と質量分析^{注3)}を組み合わせた方法（IP/AP-MS）^{注4)}が広く用いられてきました。しかし、細胞破碎液を用いるこの方法では偽陽性/偽陰性が多く、一過的で弱い相互作用を捉えられないといった問題があります。こうした問題を克服する方法として、最近では APEX 法^{注5)}や BioID 法^{注6)}に代表される近傍ラベリング法が盛んに利用されています（図 1B）。一方、これらの手法は、遺伝子工学的な手法を用いて標的タンパク質にサイズの大きな非天然酵素（分子量 25,000–35,000）を融合するの必要があり、精巧に制御された神経伝達物質受容体の構造や局在、相互作用への影響が懸念されます。また、遺伝子導入や毒性の高い反応基質（過酸化水素など）によって、細胞内環境を改変してしまうことも問題です。さらに、マウスなどの動物個体への応用はいまだ限られており、数少ない成功例である BioID 法では基質のビオチンを 7 日間投与し続けなければ解析に十分なラベリングが進行しないなど、生体適合性や時間分解能の面で課題が残されていました。

2. 研究手法・成果

今回、研究グループは、時空間分解能に優れた光を駆動力とした新たな近傍ラベリング法として PhoxID 法（Photooxidation-driven proximity labeling for protein identification）を開発し、これらの課題を克服しました（図 2A）。本手法ではまず、研究グループが長年開発してきた独自のタンパク質化学修飾技術（リガンド指向性化学）^{注7)}を用いて、生きたマウス脳内の標的受容体に光増感剤を修飾します（図 2）。その後、光ファイバーを用いて脳内に緑色光（520 nm）を照射し一重項酸素（ 1O_2 ）^{注8)}を発生させ、周辺タンパク質を酸化します。この酸化タンパク質をヒドラジド連結デスチオビオチン標識剤^{注9)}によって修飾し、質量分析することで、受容体インタラクトームを網羅的に同定することが可能です（図 2）。実際に本手法をマウス脳内海馬領域の AMPAR および GABA_A 受容体（GABA_AR）^{注10)}を対象に適用したところ、わずか 1–10 分の光照射で、既知相互作用タンパク質を含む複数の受容体インタラクトームの同定に成功しました（図 3）。また、光照射部位を小脳に変更して同様の実験を行うと、既知の小脳特異的 AMPAR 相互作用タンパク質が検出されました。このことから、本手法は様々な脳領域に適用可能であることがわかりました。

さらに研究グループは、本手法の高い時間分解能を活用して、生後発達過程における AMPAR インタラクトーム変化を追跡しました。生後 8 日齢、13 日齢および 5 週齢のマウス小脳に対して PhoxID 法を適用し、定量質量分析を行ったところ、マウスの成長とともに多くのタンパク質でラベリング強度が増加する傾向が見られました。これは脳の発達に伴って AMPAR の発現量が増加し、より多くの神経回路が形成されることと関連していると考えられます。一方、いくつかのタンパク質については、ラベリング強度が生後 13 日齢のマウスで最も高く、逆に 5 週齢では顕著に低下することがわかりました（図 4A）。この通常とは異なる挙動を示したタンパク質のうち、細胞接着因子である NECTIN3、IGSF3、LRRC4B に着目し、特定のタンパク質を検出

するウエスタンブロット解析により各発達時期における発現量を調べました。その結果、NECTIN3、IGSF3、LRRRC4B はいずれも5週齢のマウス小脳において発現量が低下しているため、PhoxID法のラベリング強度が低いことがわかりました(図4B)。さらに、免疫染色によりNECTIN3は8日齢では小脳プルキンエ細胞においてAMPAと離れた位置に発現しているのに対して、13日齢では共局在することがわかりました(図4C)。以上の結果より、マウス小脳においてAMPAとNECTIN3は幼若期特異的に近接することがPhoxID法を用いたスナップショット解析により初めて明らかとなりました(図4D)。この現象が神経科学的にどのような意義があるのかはいまだ不明であり、今後より詳細な検討を進める予定です。

3. 波及効果、今後の予定

PhoxID法は、受容体に対する親和性リガンドや抗体が利用可能であれば様々なタンパク質に対して適用できるため、今後は適用タンパク質を拡張し、手法の一般性を実証していく予定です。加えて本手法は、細胞・組織・動物個体といった様々な階層の生物検体に適用でき、原理的にはマウスだけではなく他の生物種に対しても適用可能です。特に、遺伝子操作を必要としないため、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、病態と受容体インタラクトームの関連性が明らかとなることが期待されます。

近年、行動学や光遺伝学の技術革新によって、神経細胞間ネットワークと行動や記憶などの個体レベルの脳機能との相関解析が飛躍的に進んでいます。一方、これらの解析は一細胞レベルの興奮/抑制といった分解能にとどまっており、行動や光刺激によってシナプス中のタンパク質がどのように変化するのかを分子レベルで網羅的に調べた例はほとんどありません。これに対してPhoxID法は高い時間分解能で受容体インタラクトームをin vivo解析できる有力な手法です。また、行動学や光遺伝学と組み合わせることにより高次脳機能の分子メカニズムの解明への展開が期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

●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)

●文部科学省 科学研究費助成事業 新学術領域研究

研究領域:「「生命金属科学」分野の創成による生体内金属動態の統合的研究」

研究課題名:「生命金属動態の理解に向けた金属イオン Conditional プロテオミクス法の開発」(研究代表者:田村 朋則 京都大学 講師)(課題番号 19H05764)

●文部科学省 科学研究費助成事業 基盤研究(B)

研究課題名:「オルガネラ代謝物の化学標識による時空間メタボローム解析」(研究代表者:田村 朋則 京都大学 講師)(課題番号 21H02058)

<用語解説>

注 1) 近傍ラベリング

標的となるタンパク質の周辺で短寿命活性種を発生させ、これにより近傍に存在するタンパク質をビオチン標識する手法。

注 2) AMPAR

人工アミノ酸である AMPA (α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸) を選択的に受容することから名づけられた、四量体イオンチャネル型グルタミン酸受容体。興奮性シナプス後膜に発現し、記憶・学習において重要な役割を担っている。

注 3) 質量分析

分子をイオン化し、その質量電荷比を測定することによってイオンや分子の質量を測定する分析法。タンパク質同定の際には、タンパク質を消化酵素によってペプチド断片化し、これを液体クロマトグラフィーにつないだ質量分析計で解析することでアミノ酸一次配列を決定する。

注 4) IP/AP-MS

抗体や親和性リガンドを修飾したビーズによって標的タンパク質とその相互作用タンパク質をプルダウンし、続く質量分析によって相互作用ネットワークを解析する手法。

注 5) APEX 法

人工的に機能改変したアスコルビン酸ペルオキシダーゼ変異体が過酸化水素存在下でフェノール基質を高反応性のフェノキシラジカルに変換することを利用した近傍ラベリング法。

注 6) BioID 法

人工的に機能改変したビオチンリガーゼ変異体がビオチンを高反応性の biotinyl-5'-AMP に変換することを利用した近傍ラベリング法。

注 7) リガンド指向性化学

研究グループが開発した天然タンパク質を生体環境中で選択的に化学修飾できる手法。標的タンパク質に親和性を有するリガンドと標的タンパク質に導入したい機能性分子を、脱離性反応基で繋いだ標識試薬（ラベル化剤）を利用する。本研究では、最近マウス脳内での適用に成功したりガンド指向性アシルイミダゾール型ラベル化剤を使用した (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 121, 2313887121, 2024)。

注 8) 一重項酸素

活性酸素の一種。励起状態にある酸素分子であり高い酸化活性をもつ。生体内で発生した場合、その寿命は数百ナノ秒程度である。

注 9) デスチオビオチン標識剤

ビオチンのチオエーテル部分を除いたビオチンアナログであり、ビオチンよりもアビジンとの親和性が低下しているため、より穏和にアビジンビーズから溶出することができる。

注 10) GABA_AR

中枢神経系において抑制性神経伝達を担う、5つのサブユニットから構成されるイオンチャネル。神経伝達物質の1種であるγアミノ酪酸（GABA）が結合することで開口し、塩化物イオン（Cl⁻）を透過させる。

<研究者のコメント>

光遺伝学の研究発表でよく示される「光ファイバーが頭に刺さったマウス」にインスピレーションを受けて、光反応で脳内タンパク質をマッピングできないか？と夢想したのがこの研究のはじまりでした。足掛け6年、とてもチャレンジングなこのプロジェクトを成果につなげることができたのは、様々な困難にもめげず着実に研究を進めてくれた筆頭著者の高遠さんの努力の賜物です。今後はこの技術を脳機能の分子メカニズム解明に応用していきたいと考えています。（田村朋則）

<論文タイトルと著者>

タイトル：“Photoproximity labeling of endogenous receptors in the live mouse brain in minutes”
（生きたマウス脳において分単位で進行する内在性受容体の光近傍ラベリング）

著者：高遠美貴子、坂本清志、野中洋、Fátima Yuri Tanimura Valor、田村朋則、浜地格

掲載誌：Nature Chemical Biology DOI：10.1038/s41589-024-01692-4

<参考図表>

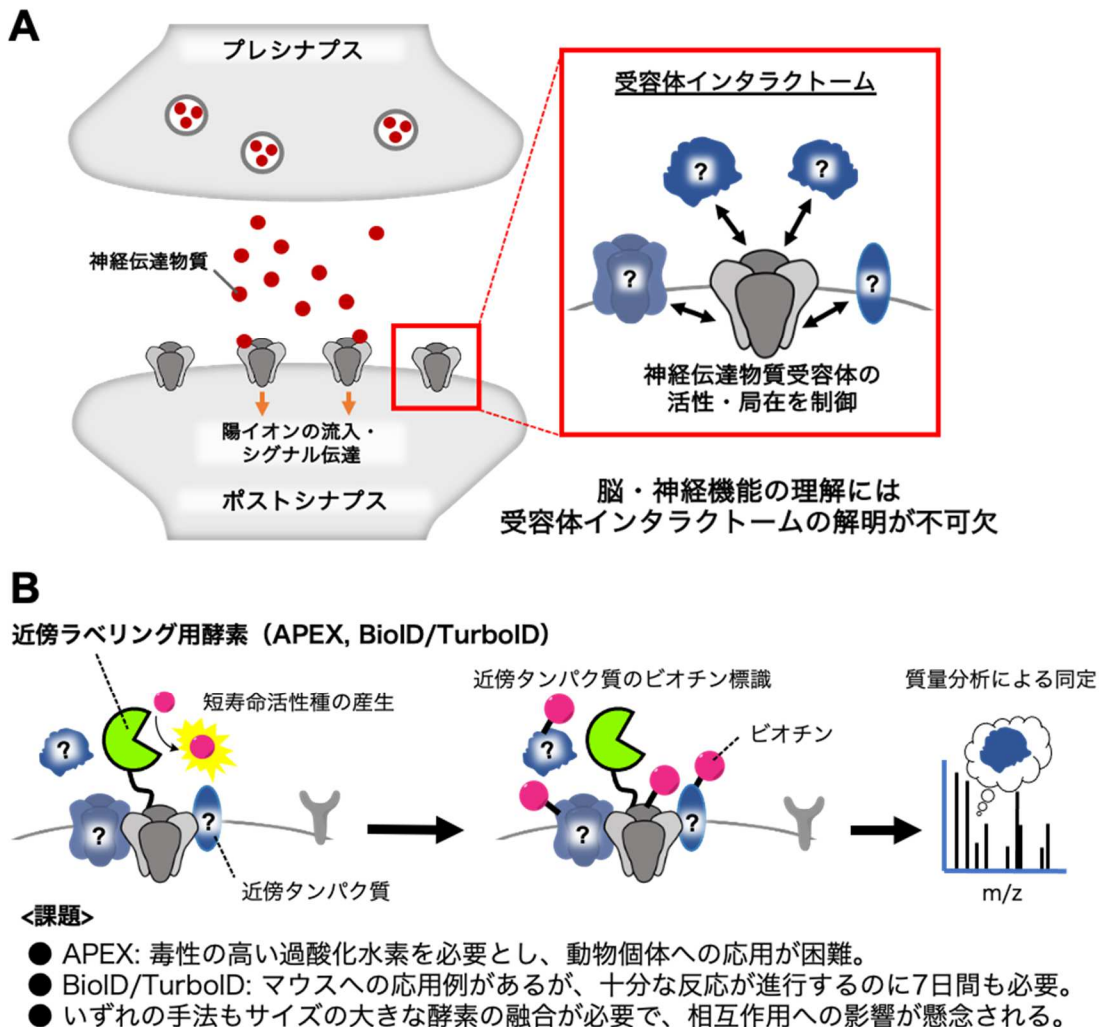


図1 研究背景と従来法の問題点

A. シナプスにおける情報伝達と神経伝達物質受容体。電気信号がシナプス前終末（プレシナプス）に到達すると、神経伝達物質がシナプス間に放出されます。シナプス後膜（ポストシナプス）に発現する神経伝達物質受容体は伝達物質を受け取り、陽イオンを流入させることで情報の受け渡しがなされます。

B. 従来の近傍ラベリング法の原理と課題。従来の近傍ラベリング法では、標的タンパク質に融合した近傍ラベリング用酵素が短寿命活性種を生成する反応を利用して近傍タンパク質をビオチン標識します。この手法では、遺伝子導入や毒性の高い反応基質が必要なこと、時間分解能が低いこと、酵素のサイズが大ききこと（分子量 25,000–35,000）が課題です。

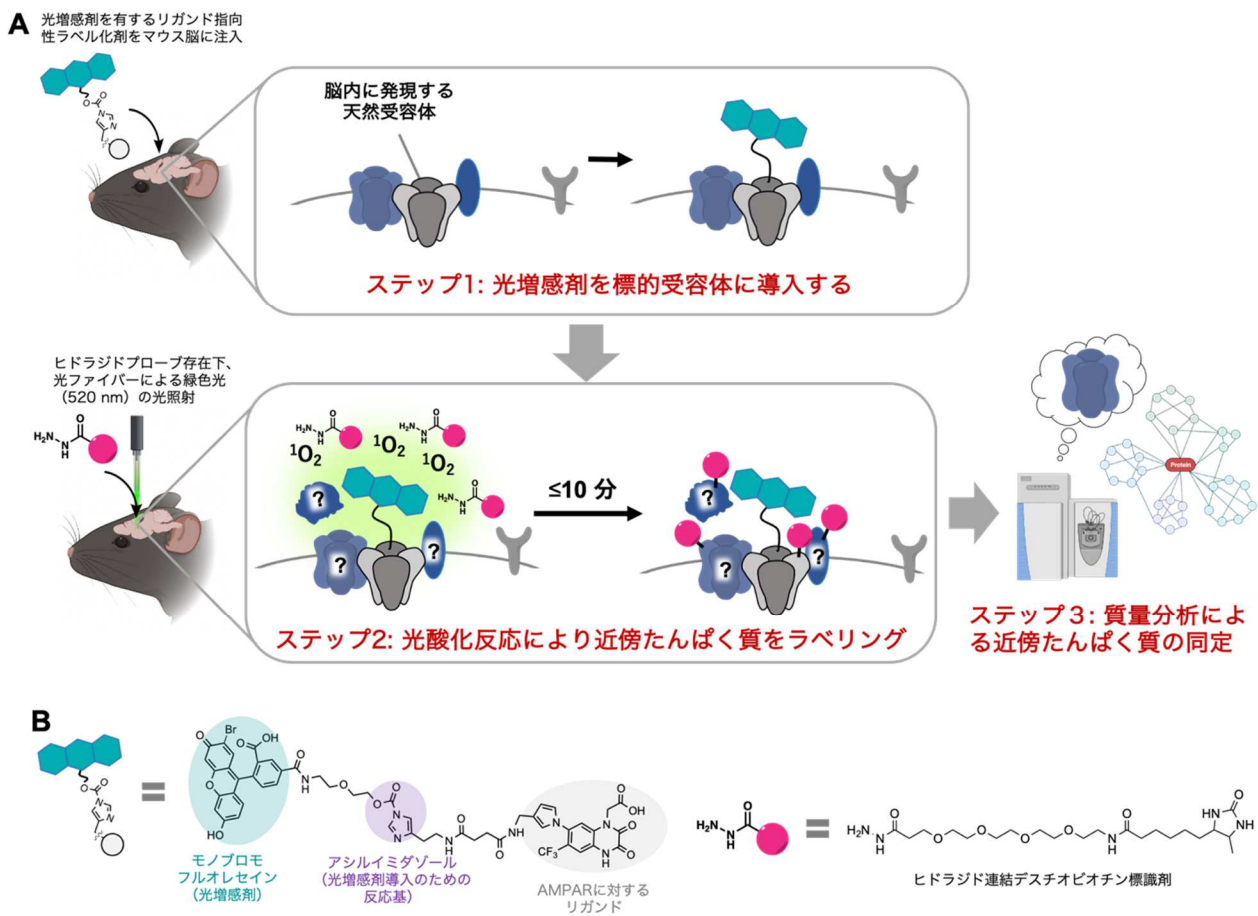
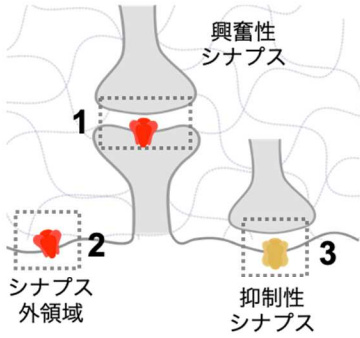
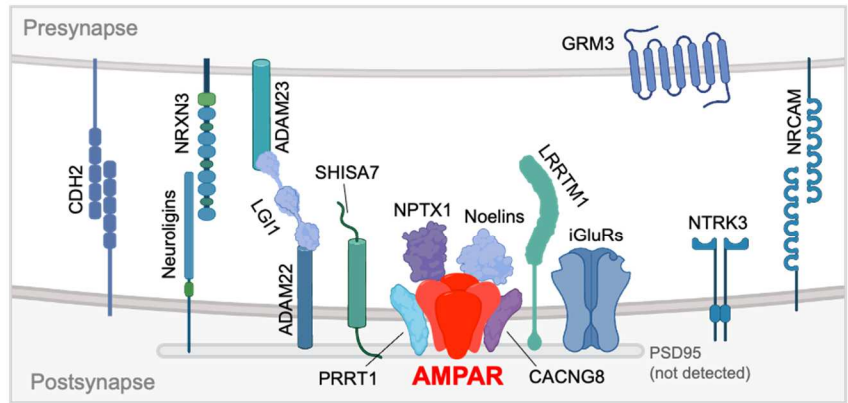


図2 PhoxID法の原理

A. 本手法ではまず、光増感剤を有するリガンド指向性ラベル化剤 (図 2B) をマウスの脳に注入することで、光増感剤を標的の受容体を選択的に導入します (ステップ1)。次に、ヒドラジドプローブ (図 2B) を注入後に同一箇所にも光ファイバーによって緑色光 (520 nm) を1-10分照射することで、標的受容体の近傍タンパク質をデスチオビオチンで標識 (ラベリング) します (ステップ2)。デスチオビオチン標識されたタンパク質をアビジンビーズによって精製・濃縮し、ペプチド断片にした後、質量分析を行うことで近傍タンパク質が同定されます (ステップ3)。

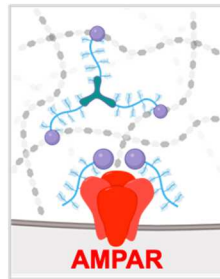
B. PhoxID法で使用されるリガンド指向性ラベル化剤とヒドラジドプローブの分子構造。

1 興奮性シナプスにおけるAMPAR近傍たんぱく質



2 AMPAR近傍細胞外マトリックス

- Lecticans**
BCAN, NCAN, VCAN
- Link proteins**
HAPLN1
- Tenascin-R**



3 抑制性シナプスにおけるGABA_AR近傍たんぱく質

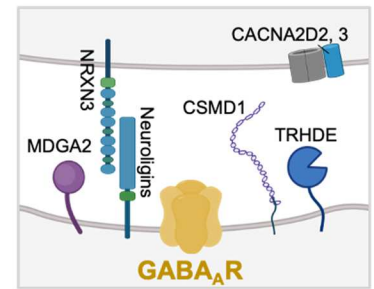


図3 PhoxID法で同定されたAMPAR/GABA_AR近傍タンパク質

(同定されたタンパク質のうち相互作用が既に知られているタンパク質のみを表示)

本手法によってプレシナプスとポストシナプスに発現する数多くのAMPAR/GABA_AR既知相互作用タンパク質が検出され、本手法の有効性が実証されました。また、単離した神経細胞では再構築することが困難な細胞外マトリックスも検出することができました。

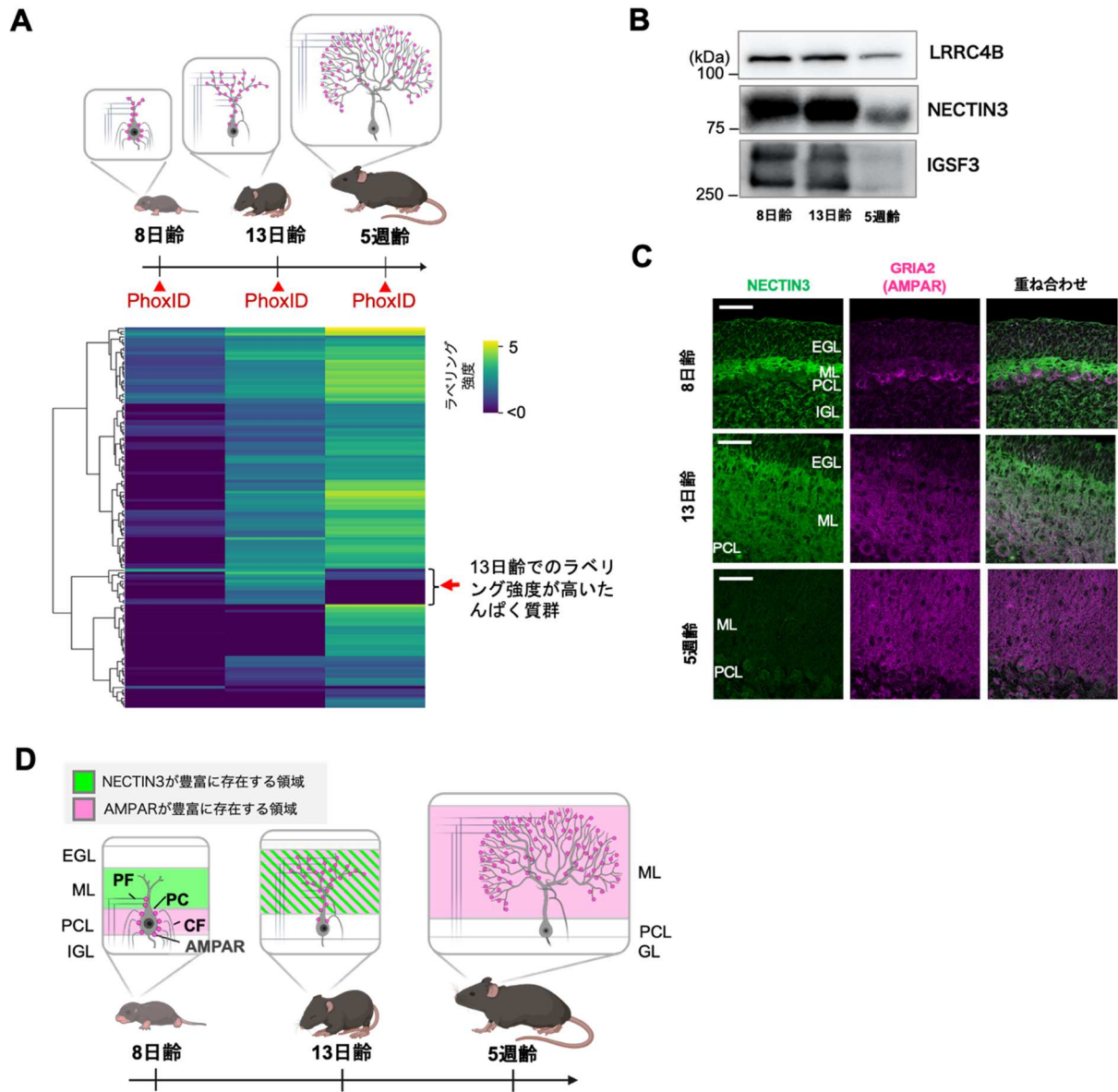


図4 生後発達期における小脳 AMPAR 近傍タンパク質の变化解析

- A. 各日齢における Phox1D ラベリングの強度変化。成長に伴い AMPAR の発現量が増加するため全体的にラベリング強度が増加する傾向がありますが、13 日齢でのラベリング強度が高く、8 日齢と 5 週齢でのラベリング強度が低いタンパク質群が見つかりました。
- B. ウェスタンブロッティングによる LRRRC4B, NECTIN3, IGSF3 の発現量解析。これらのタンパク質は 5 週齢で発現量が顕著に低下することがわかりました。
- C. 免疫染色による NECTIN3 の局在解析。NECTIN3 は 8 日齢と 13 日齢では主に小脳プルキンエ細胞 (Purkinje cell: PC) の分子層 (Molecular layer: ML) に発現し、5 週齢で発現量が低下しました。一方、AMPA は 8 日齢ではプルキンエ細胞の細胞体層 (Purkinje cell layer: PCL) に主に発現するのに対し、13 日齢以降は ML に豊富に発現していました。
- D. 本研究から明らかとなった AMPAR と NECTIN3 の関係性。8 日齢では NECTIN3 は ML に、AMPA は PCL に主に発現しており、両者は離れているためラベリング強度は低い値となります。13 日齢では両者は同じ ML に発現するためラベリング強度が増加します。5 週齢では NECTIN3 の発現量が低下するためラベリング強度は低下します。