

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14334

研究課題名(和文) 電位依存性カルシウムチャネルの電子顕微鏡観察を可能にする新規化学修飾法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel chemical modification method to enable electron microscopic observation of voltage-dependent calcium channels

研究代表者

田村 朋則 (Tamura, Tomonori)

京都大学・工学研究科・講師

研究者番号：10746639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳組織中の内在性Ca²⁺チャネルを化学修飾し、ナノメートル分解能で可視化可能な新手法を開発することを目的とし、アガトキシン毒素を基盤としたケミカルプローブを開発した。具体的には、小脳プルキンエ細胞に豊富に存在するP/Q型Ca²⁺チャネルに標的を絞って、そのアンタゴニストであるアガトキシン 1VAのN末端に蛍光色素やオキシム触媒を連結した化合物を合成した。実際に、マウス脳スライスにおいて蛍光色素-アガトキシンコンジュゲートがP/Q型Ca²⁺チャネルに結合することをイメージング解析によって確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電位依存性カルシウム(Ca²⁺)チャネルとシナプス小胞間の距離は神経伝達物質放出を制御する主要因子であると考えられている。しかしその重要性にも関わらず、従来の電子顕微鏡技術では両者を同時に観察できないため、実際のCa²⁺チャネル-シナプス小胞間距離やその空間分布は不明であった。そこで本研究では脳組織中のCa²⁺チャネルを化学修飾し、ナノメートル分解能で可視化可能な新手法を開発する。本手法によってCa²⁺チャネル-シナプス小胞間の距離が決定できれば、記憶・学習に関わる神経伝達機構の分子論的理解がより深まり、神経疾患の病態解明や治療法開発に貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to develop a chemical probe based on agatoxin toxin to chemically modify endogenous Ca²⁺ channels in brain tissue and visualize them at nanometer resolution. Specifically, we targeted P/Q-type Ca²⁺ channels that is abundant in cerebellar Purkinje cells, and synthesized agatoxin derivatives linked to fluorescent dyes or oxime catalysts. Indeed, imaging analysis confirmed the binding of fluorescein-agatoxin conjugates to P/Q-type Ca²⁺ channels in mouse brain slices.

研究分野：生物有機化学

キーワード：カルシウムチャネル 神経 可視化

1. 研究開始当初の背景

神経伝達は神経情報伝播における最も重要な素過程の一つである。神経伝達過程では、シナプス前終末から神経伝達物質が放出され、これがシナプス後終末で受容されることで情報が伝達される。神経伝達物質の放出には、活動電位に依存したシナプス前終末の Ca^{2+} 濃度上昇が必須であり、その分子メカニズムを解明することは、神経生物学の最重要課題の一つに掲げられている。近年の研究から、神経伝達物質の放出は前シナプスのアクティブゾーンと呼ばれる特殊な構造体で起こることが明らかとなっている(図1)。アクティブゾーンには、電位依存性カルシウムチャネル(以下 Ca^{2+} チャネルと省略)、シナプス小胞、 Ca^{2+} 依存的に開口放出を制御する SNARE タンパク質などが足場タンパク質を介して集積している。これらの中でも Ca^{2+} チャネルは細胞内 Ca^{2+} 濃度を規定する主要分子であることから、その機能や局在に関して盛んに研究が行われてきた。特に、 Ca^{2+} チャネルの空間分布に関して『活動電位に依存した神経伝達物質の放出には Ca^{2+} チャネルとシナプス小胞が近接することが必須である』という学説が現在広く受け入れられている (*J. NeuroSci.*, **11**, 1496, 1991)。この仮説は他の多くの分子生物学的知見やシミュレーション結果とも一致することから非常に有力である一方、これを裏付ける決定的な証拠は未だ得られていない。この説を実証/反証するための最も有効な手段は、免疫電子顕微鏡技術を用いた Ca^{2+} チャネルの高空間分解能局在解析である。しかしながら、翻訳後修飾やスプライシングバリエーションによる構造多様性、他のタンパク質との相互作用による抗原のマスク等のため、 Ca^{2+} チャネル抗体による検出は極めて困難であり、 Ca^{2+} チャネル-シナプス小胞間距離を直接観察した例は全く無い。以上のような背景から、『前シナプスにおいて Ca^{2+} チャネルとシナプス小胞はどういった空間配置にあるのか?』という神経機能を理解する上で基礎的かつ重要な問いに対して、明確な解を与える新しいイメージング技術の開発が求められている。

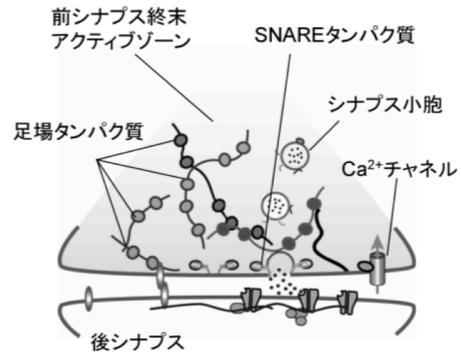


図1 アクティブゾーン構造の模式図

2. 研究の目的

本研究では、脳組織中の『内在性 Ca^{2+} チャネル』を選択的に化学修飾し、その空間配置をナノメートルレベルの分解能でマッピング可能な新規イメージング技術の確立を目的とする。

本申請で提案する手法は、ごく最近申請者らが独自に開発したタンパク質化学修飾手法である“Affinity-guided Oxime Chemistry (以下 AGOX 法と省略)”に基づいている (*T. Tamura, et al, J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 14181, 2017)。AGOX 法では、標的タンパク質に親和性を有するリガンドにアシル転移反応を促進する Pyridinium Oxime (PyOx) 触媒を連結した「リガンド連結 PyOx 触媒」を用いてタンパク質ラベリングを行う(図2)。この分子のリガンド部位がタンパク質に結合すると、PyOx 触媒がタンパク質表面に配置される(ステップ1)。そこに標識プローブを有する *N*-acyl-*N*-alkylsulfonamide 型アシルドナーを加えると、PyOx 触媒がこのアシルドナーを活性化する(ステップ2)。この活性中間体に対して近傍に存在するアミノ酸残基が求核攻撃することで、標的タンパク質に対するプローブの導入が完了する(ステップ3)。特筆すべきことに、AGOX 法は従来の化学

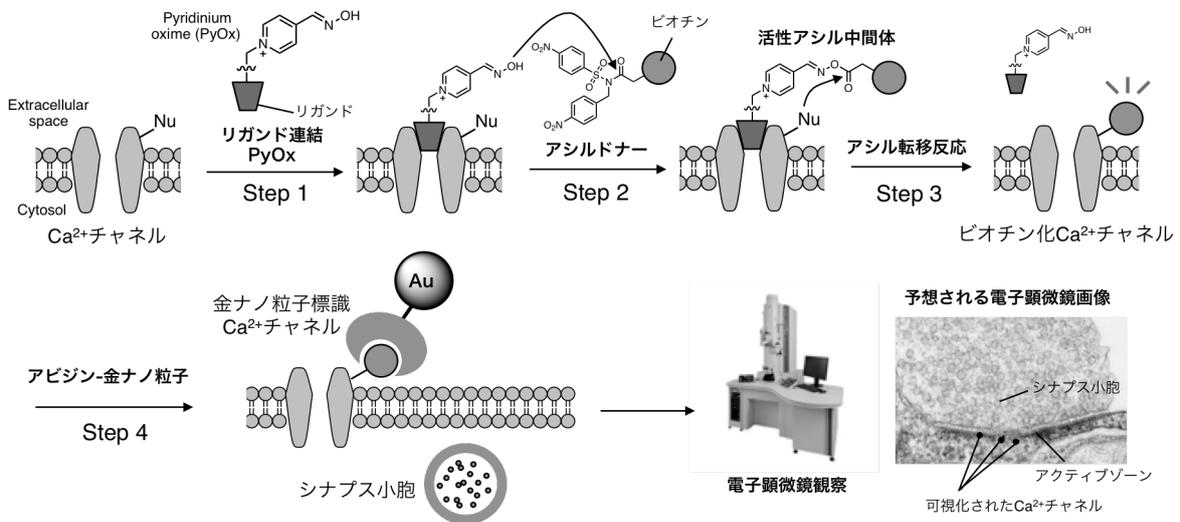


図2 AGOX 法による Ca^{2+} チャネルの金ナノ粒子標識スキームと予想される電子顕微鏡画像

修飾法が不得手としてきた生体組織（脳切片など）においても適用可能である。従って、この戦略によって脳組織中の内在性 Ca^{2+} チャンネルにビオチン分子を導入し、さらにアビジン-金ナノ粒子コンジュゲートを標識すれば（ステップ 4）、内在性 Ca^{2+} チャンネルを電子顕微鏡で可視化できると期待される。また、この手法ではチャンネルの細胞外ドメインに対する標識を行うため、抗体を用いた検出で一般に行われる膜透過処理や細胞（膜）内部の露出操作が不要である。このため、電子顕微鏡観察においてシナプス小胞の構造を保ったまま Ca^{2+} チャンネルを可視化でき、従来不可能であった Ca^{2+} チャンネルとシナプス小胞の位置関係を直接観察できると考えられる。

3. 研究の方法

本申請課題では、AGOX 法によって Ca^{2+} チャンネルに金ナノ粒子を標識し、内在性 Ca^{2+} チャンネルとシナプス小胞の空間配置を可視化する。AGOX 法による化学修飾では、標的タンパク質に対するリガンド連結 PyOx が必要である。神経系に発現する Ca^{2+} チャンネルは電気生理学的・薬理的性質により T, N, P/Q, R 型の 4 つのサブタイプが存在するが、それぞれに対して選択的な環状ペプチド性ブロッカーが報告されている（図 3 a）。本研究では特に、研究例が多く、小脳プルキンエ細胞に豊富に存在する P/Q 型 Ca^{2+} チャンネル (P/Q 型 VDCC) に標的を絞り、 ω -アガトキシン IVA の N 末端に蛍光色素プローブや PyOx 触媒を連結した化合物を合成した（図 3 b）。次に、このアガトキシン連結 PyOx を用いて、 Ca^{2+} チャンネルの安定発現細胞株 (HEK293 細胞) や、マウス脳スライスにおいて P/Q 型 Ca^{2+} チャンネルのビオチン修飾を検討した。また、結合性能評価のため、アガトキシン-色素連結プローブを用いた脳スライスイメージングも並行して進めた。

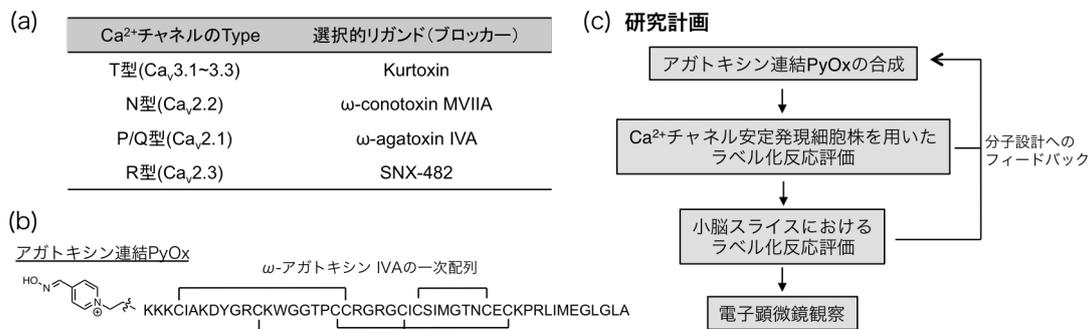


図 3 (a) Ca^{2+} チャンネルの種類とその選択的リガンド、(b) ω -アガトキシン連結 PyOx 触媒 (c) 研究実施計画

4. 研究成果

初めにプローブ導入のためにアジド (N_3) 基を N 末端に導入した N_3 -アガトキシン (以下 AgTx と略) の合成経路を確立した。全長 48 残基にもなる AgTx を通常のペプチド合成法である Fmoc 固相合成法で合成するのは困難である。したがって、本研究では N_3 -AgTx を 2 つのフラグメントペプチドに分けてそれぞれ固相合成し、Native Chemical Ligation 法により連結することで全長の直鎖 N_3 -AgTx を合成した。さらに得られた直鎖 N_3 -AgTx を空気酸化することでジスルフィド結合を形成し、天然の Conformation 同様の N_3 -AgTx を得た。続いて、クリックケミストリーによって PyOx や色素 (Fluorescein, AlexaFluor555, AlexaFluor647) などの分子を N_3 -AgTx に導入することで、様々な AgTx 誘導体の合成に成功した。化合物の同定は HPLC と、高分解能質量分析 (ESI-orbitrap MS) により行なった。

続いて、合成した AgTx 誘導体の小脳における局在を調べるために、これらの色素連結 AgTx IVA を用いてマウス小脳スライスに存在する P/Q 型 VDCC のイメージングを試みた。その結果、いずれの蛍光色素連結 AgTx を使用した場合でも小脳の分子層が強く染色される画像が取得された。20 倍レンズにより撮影された画像では、Purkinje 細胞の発達した樹状突起から明瞭な蛍光が観測された。この蛍光は競合阻害剤として色素未修飾 AgTx (WT-AgTx) を添加した条件では顕著に抑制された。以上の結果から、色素修飾 AgTx が P/Q 型 VDCC に対する親和性を保っており、脳スライスサンプルで P/Q 型 VDCC を可視化できることが示された。

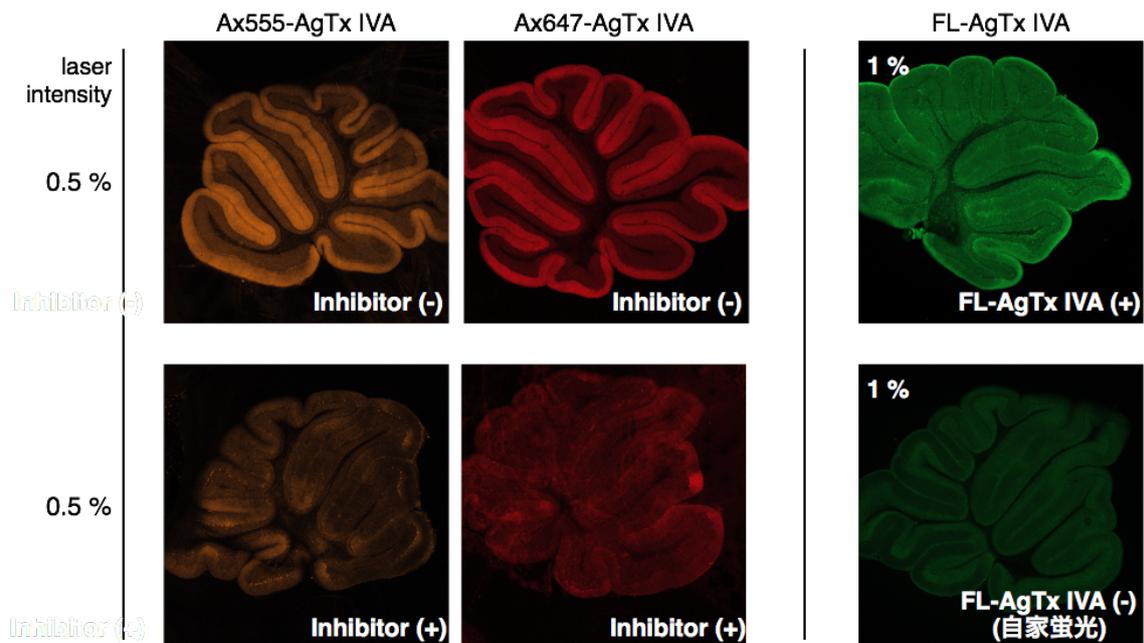


図4 蛍光色素-AgTx コンジュゲートによる P/Q 型 VDCC の可視化

さらに、色素連結 AgTx で処理したのちパラホルムアルデヒドで固定化した小脳スライスを、組織透明化法の一つである CUBIC 法によって透明化した。透明化操作では繰り返しかつ長時間の洗浄操作を必要とするが、それでもなお分子層から明確な色素連結 AgTx IVA 由来の蛍光が観測されたことから、固定化によって色素連結 AgTx が P/Q 型 VDCC に共有結合的に架橋された可能性が強く示唆された。さらに、透明化したスライスを Z-stack imaging したところ、色素連結 AgTx IVA は組織深部まで浸透し、小脳スライス全体を均一に染色していることが明らかになった。

以上の結果から、本プローブを用いて他のタンパク質との多重染色や電子顕微鏡解析などへ展開できる可能性が示唆された。特に、本研究で得られた画像は過去の P/Q 型 VDCC 局在解析で得られたものと比べ非常に明瞭であり、かつ超解像顕微鏡解析によって 100-200 nm 分解能でのイメージングが可能であり今後強力な P/Q 型 VDCC イメージングツールとしての応用が期待される。

次に、PyOx 触媒を連結した AgTx を用いて、P/Q 型 VDCC のビオチン修飾を検討した。その結果、PyOx を 2 個連結した 2PyOx-AgTx を用いた場合において、P/Q 型 VDCC full length の α サブユニット分解体と思われるバンドがウエスタンブロッティング解析によって検出された。現在は、この修飾産物の同定と、修飾効率の高効率化を目指して触媒およびアシルドナー分子構造の最適化を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hao Zhu, Tomonori Tamura, Itaru Hamachi	4. 巻 48
2. 論文標題 Chemical Proteomics for Subcellular Proteome Analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current opinion in chemical biology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbpa.2018.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomonori Tamura, Itaru Hamachi	4. 巻 141
2. 論文標題 Chemistry for Covalent Modification of Endogenous/Native Proteins: From Test Tubes to Complex Biological Systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 2782-2799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.8b11747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuki Nishikawa, Takayuki Miki, Masashi Awa, Keiko Kuwata, Tomonori Tamura, Itaru Hamachi	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of a nitric oxide-responsive labeling reagent for proteome analysis of live cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 397-404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.8b01021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuyoshi Ueda, Tomonori Tamura, Itaru Hamachi	4. 巻 59
2. 論文標題 Development of a cell-based ligand-screening system for identifying Hsp90 inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 179-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.9b00781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomonori Tamura, Mikiko Takato, Keiya Shiono, Itaru Hamachi	4. 巻 49
2. 論文標題 Development of a Photoactivatable Proximity Labeling Method for the Identification of Nuclear Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 145-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 美野 文晴、後藤 大輝、田村 朋則、坂本 清志、浜地 格
2. 発表標題 ペプチド毒素アガトキシンを用いたCa ²⁺ チャネルのlive brainラベリング
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美野 文晴、後藤 大輝、田村 朋則、坂本 清志、浜地 格
2. 発表標題 生物毒素由来アガトキシンを用いた電位依存性Ca ²⁺ チャネルの可視化
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天池一真、山上禎俊、西川雄貴、後藤大輝、清中茂樹、浜地格
2. 発表標題 細胞および脳組織における内在性タンパク質の固定化駆動型アフィニティーラベリング
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----