

## シナプスプロテオミクスを志向した チロシナーゼによる *in vivo* 近傍タンパク質ラベル化法

○美野丈晴<sup>1</sup>・Hao Zhu<sup>1</sup>・Oh Jae Hoon<sup>2</sup>・浜地格<sup>1,2</sup> (1京大院工、2JST ERATO)

**Tyrosinase-based proximity labeling in the mouse brain** (Graduate School of Engineering, Kyoto University<sup>1</sup>, JST ERATO<sup>2</sup>) MINO, Takeharu<sup>1</sup>; HAO, Zhu<sup>1</sup>; OH, Jae Hoon<sup>2</sup>; HAMACHI, Itaru<sup>2</sup>

シナプスはニューロン間情報伝達の場合であり、あらゆる脳高次機能に関与している。シナプスでは多種多様なタンパク質が互いに協調することでその機能を発現しており、シナプスのプロテオーム解析は脳機能の分子機構を理解するために必要不可欠である。

近年、酵素を用いた近傍ラベル化 (proximity labeling, PL) が標的領域プロテオミクスのための新たなアプローチとして注目されている。PL で利用される酵素は peroxidase 型と biotin ligase 型に大別される。APEX2 に代表される peroxidase 型酵素を用いた PL では、外因性に添加された phenol プローブが radical 種へと活性化されることで近傍タンパク質への迅速な ( $\leq 1$  min) ラベル化を達成する。同じく peroxidase 型の HRP を用いた PL は初代培養神経細胞にも適用されており、興奮性/抑制性シナプス選択的なラベル化が達成されている。しかし peroxidase ベースの PL では酵素の活性化に毒性の高い H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の添加が不可欠であるため、生物個体への適用が困難である。一方で BioID や TurboID を含む biotin ligase 型酵素を用いた PL では、内因性/外因性の biotin が活性化されることで周囲のタンパク質を標識する。Biotin ligase での PL は毒性が低いため *in vivo* での実験も広く行われている。しかし BioID は反応が穏和であるために高い時間分解能を要する系に適用できない。進化学によって得られた TurboID は  $\leq 10$  min という速い標識速度を達成しているが、内因性 biotin に由来するバックグラウンドを無視することができない。

これらの方法論に対して、当研究室では細菌 *Bacillus megaterium* 由来の tyrosinase (bmTYR) を用いた新たな PL 戦略の開発をおこなっている。bmTYR は二核銅を有する金属タンパク質であり、phenol 類を *o*-quinone へと変換する反応を触媒する。標的領域へ bmTYR を局在させた状態で phenol プローブを添加することで、領域選択的に *o*-quinone 型へと活性化され周囲のタンパク質へ無差別にラベル化することができる。これまでの我々の *in vitro* および培養細胞系での検討によって bmTYR による PL は、(i) 毒性の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を必要とせず、また (ii) 内因性 biotin によるバックグラウンドを無視でき、さらに、(iii) 迅速な ( $\sim$  min) ラベル化が可能であることが明らかになっている。

本研究では bmTYR による PL を生きたマウス脳内へ適用し、さまざまなシナプスのプロテオーム解析を実施することを目指している (Figure)。具体的には標的シナプスに特徴的なタンパク質に対するリガンドを連結した bmTYR プローブをマウス脳へ投与し、bmTYR を標的シナプスに局在させて PL を行う。今回は小脳分子層上の興奮性シナプスを標的とし、mGlu1 受容体リガンドを連結した bmTYR を設計および合成した。本プローブは mGlu1 親和性を示し、マウス脳内で mGlu1 発現シナプスへ分布することが判った。さらに本プローブを用いて、mGlu1 の発現するマウス小脳興奮性シナプスのプロテオーム解析を試みたのでその詳細を報告する。

