

受容体を基体とする蛍光センサーの構築と生きたマウス脳内でのプロテアーゼ活性検出

(京大院工¹・JST ERATO²) ○坂本清志^{1,2}・王萌初¹・白岩和樹¹・野中洋^{1,2}・浜地格
Creation of Receptor-Based Fluorescent Sensor and Mapping of Protease Activity in Live
Mouse Brain. (¹ Graduate School of Engineering, Kyoto University, ²JST ERATO) ○Seiji
Sakamoto,^{1,2} Mengchu Wang,¹ Kazuki Shiraiwa,¹ Hiroshi Nonaka,^{1,2} Itaru Hamachi^{1,2}

A variety of extracellular proteases in central nervous system (CNS) play significant roles to maintain the highly ordered brain functions. However, methods for analyzing detailed localization and activity of each protease in live mouse brain are still limited. In this study, we attempted to construct an AMPA-type glutamate receptor (AMPA) based fluorescent protease sensor in live mouse brain by a combination of ligand directed acyl imidazole (LDAI) chemistry and inverse electron demand Diels–Alder (IEDDA) click reaction. For creating AMPAR-based protease sensor, we initially introduced trans-cyclooctene (TCO) click handle and Alexa Fluor 555 (Ax555) fluorophore on AMPARs in live mouse brain using the LDAI chemistry. In the second step, Ax647 and methytetrazine (MeTz) conjugated substrate peptide for a target protease was directly administrated into the mouse brain, which allowed the rapid and selective chemical labeling of target receptors *via* IEDDA reaction.

Keywords : *In-Brai Ligand Ddirected Chemistry; Inverse Electron-Demand Diels-Alder (IEDDA) Reaction; Gluramate Receptor; Protein Labeling; Protease Sensor*

脳内には様々な細胞外プロテアーゼが存在し、細胞外マトリックスやシナプス構成因子の切断を介して、神経突起伸長、シナプス形成、シナプス可塑性などに関与し、高次脳機能を支える重要な役割を果たしている。しかしながら、生きた動物の脳内で、どのプロテアーゼが、どこで、どのようなタイミングで活性化され機能しているかについての詳細は未だ不明な点が多い。本研究では、当研究室で開発した脳内リガンド指向性アシルイミダゾール (in-brain LDAI) 化学と逆電子要請型 Diels-Alder (IEDDA) クリック反応の組み合わせによって、生きたマウス脳内で、AMPA 型グルタミン酸受容体を基体とするプロテアーゼセンサーの構築を試みた [1,2]。具体的には、LDAI 化学を用いて、生きたマウス脳内のグルタミン酸受容体に、trans-cyclooctene (TCO) 基と Alexa Fluor 555 (Ax555) を特異的に導入した。次の段階では、Alexa Fluor 647 (Ax647) と methytetrazine (MeTz) 基を付加した標的プロテアーゼ特異的な基質配列ペプチドを投与し、IEDDA クリック反応を介した迅速かつ選択的なラベル化を行なった。ラベル化された受容体に活性型プロテアーゼが近接した場合、基質ペプチドの切断を介して Ax555/Ax647 蛍光強度のレシオ値もしくは蛍光色素間の FRET 効率が変化するセンサー設計である。今回の報告では、脳内での発現が知られる Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) を標的として、生きたマウス脳内での MMP9 活性のマッピングに成功したのでその詳細について報告する。

1. H. Nonaka and I. Hamachi *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **121**, 6:2313887121 (2024).
2. S. Sakamoto, H. Nonaka, I. Hamachi *et al.* doi: [biorxiv.org/content/10.1101/2024.05.23.594618v1](https://doi.org/10.1101/2024.05.23.594618v1).