

研究報告書

「細胞内 NMR 計測法によるタンパク質の構造多様性解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 猪股 晃介

1. 研究のねらい

タンパク質の立体構造やその動態が生理機能と深く関わっていることは既に自明である。一方で、それらタンパク質の構造・動態は外部環境(温度、pH、塩濃度、密度等)に影響を受けて変化しうる。これを念頭に、タンパク質の多くが実際に機能する細胞内環境を考えると、細胞内部は多種多様な生体分子が高密度に分布し、細胞骨格や細胞小器官によって内部が分けられて非常に混み合っている。更に、外部刺激等により内部環境が変化する非平衡性もある。ゆえにタンパク質の生理機能をより厳密に理解するためには、実際に機能する環境下で計測した知見を基盤とすることが望ましい。上記の要請に答えるための最も有望な手法の一つが in-cell (インセル)NMR 法である。インセル NMR 法は、観察対象のタンパク質を非侵襲的かつ原子核選択的に計測可能という磁気共鳴計測法の特徴を活かし、生きた細胞内におけるタンパク質の立体構造やその変化、分子間相互作用、化学修飾、動的挙動などを原子レベルで解析することができる。そこで本研究では、数年来私が中心となって手法の開発・高度化を進めている、ヒト等高等動物細胞を対象とした in-cell NMR 法を駆使し、生きた細胞内におけるタンパク質の構造・動態解析を行うことを通して、それらタンパク質の「構造の多様性」を明らかにすることを目指している。これより厳密な分子機能の理解を目指すことを主たるねらいとしている。

また本研究は、in-cell NMR 法を用いることにより、生きた細胞内におけるタンパク質の挙動を原子レベルで解析するという特性から、他の構造解析手法に比べ、生体分子が実際に機能する生理的な環境に近い状態で生命現象を明らかにすることを可能にする。これは構造生物学的な知見と細胞生物学の知見とをより直接的に比較できることを意味する。つまり、構造生物学とライフサイエンスの間を取り持つ仲介役となり、両研究領域の融合を促進させることが見込める。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、私が中心となって手法の開発・応用を進めてきたヒト等高等動物培養細胞を用いた細胞内 NMR 法 (in-cell NMR 法) を駆使し、生きた細胞内におけるタンパク質の「構造多様性」を明らかにすることを目指している。これまでに複数のタンパク質を標的として、in-cell NMR 計測・解析を実施してきた結果、さらなる手法の高度化が必要不可欠かつ急務であることがわかった。このことから以下に挙げる3点について in-cell NMR 法の高度化を行った。1点目は、細胞内へ安定同位体タンパク質を導入する方法の再検討である。以前までは標的とするタンパク質に細胞透過性ペプチド (CPP) と呼ばれるペプチドをタグとして共有結合させ、これを試料として細胞内に導入していた。しかしながらタグを結合させるためのタンパク質デザインが必要な場合があり、汎用性が低い手法だった。そこで本研究ではタグの必要ないエレクトロポレーション法への変更・最適化を行い、その基盤を完成させた。2点目は、常磁性金属タグの利用による PCS (Pseudocontact Shift) を用いた細胞内蛋白質の構造解析法の検討である。NMR によるタンパク質の立体構造決定等に必要原子間距離の取得は、常法では NOE 測定によってなされるが、測定感度の制約から in-cell NMR 法での利用には向かない。そこでその代替法の一つである PCS の利用をモデル実験系によって確認し、その有効性を実証した。3点目は NMR 試料管内培地循環系の構築である。これまでの in-cell NMR 測定試料は動物培養細胞の懸濁液を用いてきた。それゆえ細胞は生存しているものの、高度にストレス環境下にさらされた状態での実験を余儀なくされていた。そこで NMR 試料管内培地循環系を構築し、NMR 測定中の細胞を常に健全な状態に保ちつつ実験を行うための基盤構築を行い、実践可能なシステムであることを確認した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「細胞内へ安定同位体タンパク質を導入する方法の再検討」

本研究で用いる in-cell NMR 法は、①安定同位体標識されたタンパク質の調製、②動物培養細胞へのタンパク質の導入、③迅速な NMR 計測、の3つの要素技術を高度に組み合わせることによって達成される。中でも動物培養細胞へのタンパク質導入技術は、本手法の実装安定性や汎用性を決める最も重要な鍵要素である。さきがけ研究開始前までは、標的とするタンパク質に細胞透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide, CPP) と呼ばれるペプチドをタグとして共有結合させ、これを試料として細胞内に導入していた。しかしながら CPP の仕様は下記

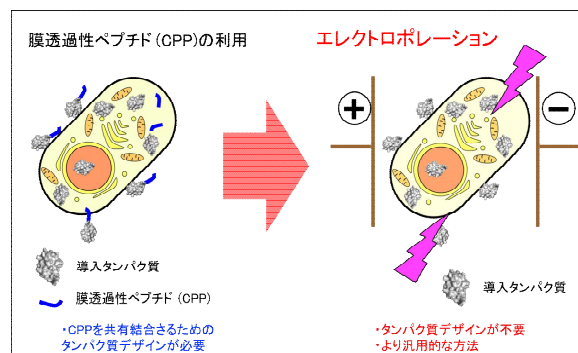


図1 タンパク質導入法の更新

のような制約があることがわかっていった。すなわち、細胞内に導入する際には CPP が共有結合していることが必要だが、一旦細胞内に導入された際には、CPP によって引き起こされる細胞内凝集を避けるため、標的タンパク質から解離されなければならないということである。以上のことから CPP タグ結合のためのタンパク質デザインが必要となり、汎用性の低い手法であった。そこで本テーマではタグの必要ないエレクトロポレーション法への変更・最適化を行い、その基盤を完成させた。これにより、標的タンパク質ごとに in-cell NMR 試料用のデザインをする必要のない、より汎用的な手法を確立した(図1)。

研究テーマ B 「常磁性金属タグの利用による PCS (Pseudocontact Shift)を用いた細胞内蛋白質の構造解析法の検討」

In-cell NMR 法は希薄溶液中におけるタンパク質の構造解析等、生体高分子の溶液 NMR 研究の発展系として位置づけることができると考えられるが、計測対象をより高次で複雑なものにすることと引き換えに、通常の生体高分子 NMR に比べて幾つかの制約を含むこととなった。その際たるものが測定の検出感度である。これによって残念ながら得られる情報量にも制約が生じているのが現状である。たとえば、NMR でタンパク質の立体構造を決定しようとした時、重要となるのが原子間の距離情報の取得である。常法では NOE (Nuclear Overhauser Effect) を利用するが、検出感度の問題から in-cell NMR によって上記を測定するのは現状では不可能である。そこで、距離情報取得の代替法として常磁性金属タグを利用した長距離 (~30 Å 程度まで) 情報取得が可能な PCS (Pseudocontact Shift) 法の検討を行った。この方法の利点は NOE に比べて、測定そのものはより単純かつ検出感度が高いことである。共同研究先によってデザインされたタグ (M8-CAM-I, 図2) を利用し、モデルタンパク質であるユビキチン変異体を用いた in-cell NMR 実験を行った結果、PCS 効果が明確に観察され、本法が細胞内のタンパク質における原子間距離情報取得に有効な手段であることが示された(図2)。また、本法の成果を学術誌に投稿し掲載された。

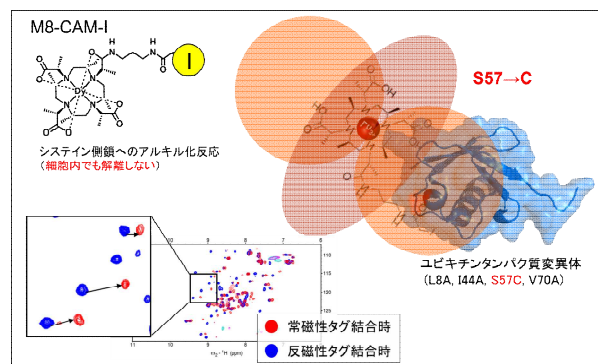


図2 in-cell NMRによるPCS実験

研究テーマ C 「NMR 試料管内培地循環系の構築」

これまでの in-cell NMR 測定試料は動物培養細胞の懸濁液を用いてきた。それゆえ NMR 測定試料として用いる細胞は生存しているものの、実験開始後直ちに細胞内の pH は低下し、酸化ストレスにさらされ、ATP やグルコース等の栄養源が枯渇する。このような状況で

in-cell NMR 実験を行うと様々な不都合が起こることが予想される。例えば、ストレス環境下にさらされることで細胞が死滅しやすくなることによって、NMR 測定時間が極めて制限されることや、本来明らかにしたいタンパク質の構造・動態とは異なる結果を得てしまうなどである。そこで本テーマでは、NMR 試料管内培地循環系を構築し、NMR 測定中の細胞を常に健全な状態に保ちつつ実験を行うための基盤構築を行った。図3に本研究によって構築した NMR 試料管内培地循環系の概略を示す。また、構築された培地循環系を用いて、モデルタンパク質(ユビキチン変異体)を対象とした検証実験を行なった。その結果、本培地循環系が in-cell NMR 測定の実装に耐えうるものであることを確認した。これにより、上記に示した不都合(測定時間の制限や実験結果の誤解釈等)を克服するための基盤を確立した。

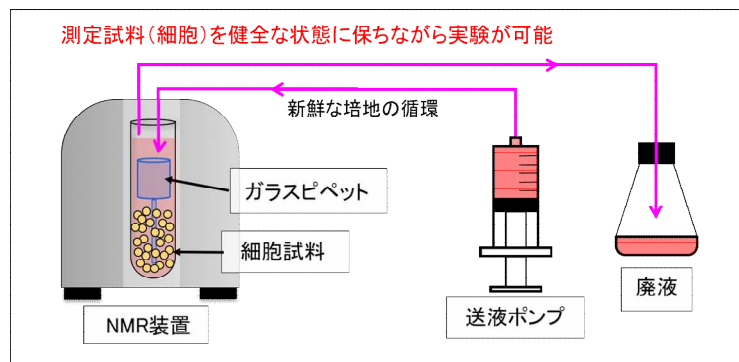


図3 NMR試料管内培地循環システム

研究テーマ D「細胞内におけるタンパク質の「構造の多様性」を明らかにするための試み」

研究テーマ C「NMR 試料管内培地循環系」を活用し、細胞内におけるタンパク質の「構造の多様性」を明らかにするための試みを現在進行中である。

まず1つ目は、FKBP12-rapamycin 複合体と mTOR complex の相互作用解析である。mTOR complex はアミノ酸や酸素の取り込み、エネルギーレベル等の環境の変動に応答し、基質のリン酸化を通して、タンパク質合成や細胞の生育を制御するが、FKBP12-rapamycin 複合体が mTOR の FRB (FKBP12-rapamycin binding) ドメインと相互作用することによって mTOR のキナーゼ活性を阻害することが知られている。しかし、その阻害機構には現在2つのモデル(立体障害モデル、2量大解離モデル)が考えられており、その詳細には不明な点が残されている。そこで私は、in-cell NMR 法を駆使し、細胞内において上記相互作用解析を行うことで、FKBP12-rapamycin 複合体による mTOR complex の阻害機構の詳細に迫ることを目指している。現状では、in-cell NMR の予備検討を実施し、細胞外から導入された FKBP12-rapamycin 複合体と細胞内在性の mTOR complex と相互作用をしていることを示唆する結果(図 S2)を得た段階であり、さらなる実験・解析を進めている。

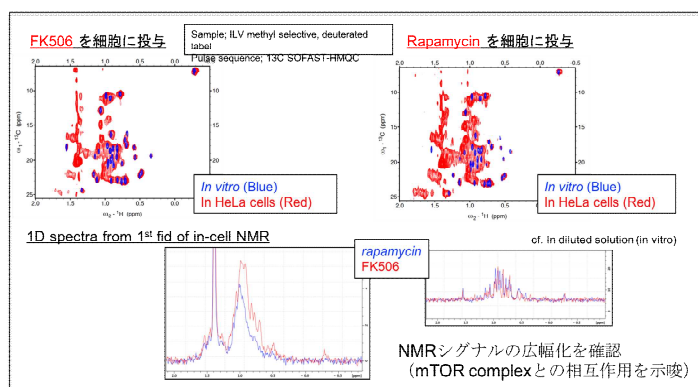


図 S2 FKBP12-rapamycin複合体とmTOR complexとの相互作用解析

2つ目は、アデニンヌクレオチド(AMP, ADP, ATP)の相互転換反応を触媒し、細胞のエネルギー恒常性維持に関わるリン酸転移酵素アデニル酸キナーゼ1 (AK1)の構造・動態・機能相関解析である。本タンパク質は基質結合に伴い大きな構造変化を引き起こす。また、結合する基質の種類や量比に応じて様々な構造変化を引き起こす多様性を有する。そこで私は、in-cell NMR法を駆使し、本酵素が実際に機能する細胞内においてその構造の多様性を明らかにすることを通して、その分子機能のさらなる理解を目指すことを目指している。現状では、in-cell NMRの予備検討を実施し、NMR試料管内培地循環系を用いない場合と比較したところ、NMRスペクトルパターンに大きな違いがあることが確認できた(図 S3)。

これは、細胞試料が置かれている環境(健全な状態 vs ストレス環境)に応じて、本タンパク質の構造が変化している可能性を示している。さらに、培地循環系を用いた際の in-cell NMRスペクトルは、希薄溶液中でATPが過剰に添加した際のものによく似ていた(図 S4)。これは、本タンパク質が細胞内でATPと結合し触媒反応をしている、活性化状態にあることを示唆している。本件に関してもさらなる実験を進行中である。

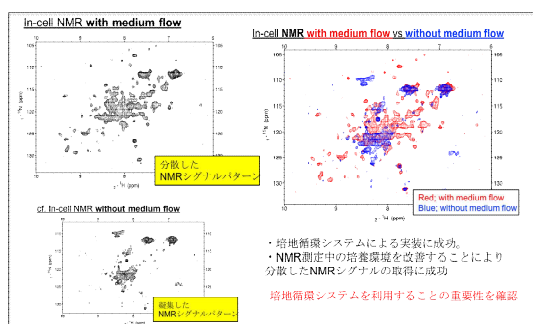


図 S3 hAK1のin-cell NMRスペクトルの比較

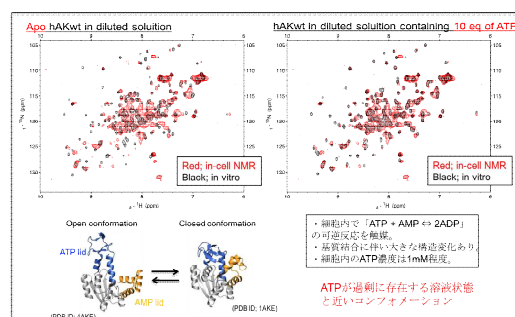


図 S4 hAK1のNMRスペクトルの比較 (in cells vs in vitro)

3. 今後の展開

「2. 研究成果」で述べてきた通り、いくつかの課題は残るものの in-cell NMR法の高度化をほぼ達成し、応用研究の実装を行える段階にある。しかしながら、さきがけ研究期間中に本研究の主たるねらいである「生きた細胞内におけるタンパク質の構造多様性を明らかにする」た

めの応用研究の成果を得るまでには至っていない。そこで今後は現在取り組んでいる標的を含め、本手法の特徴が活きる応用研究の実施例を提示していきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究の目的は大きく分けて、①本研究の主要技術である in-cell NMR 法の高度化と② in-cell NMR 法を用いた応用研究の2つに大別されるか、手法の高度化については研究計画当時の目標をほぼ達成することができた。しかしながら手法の高度化の進捗が計画通り進められなかったため、応用研究を行うための時間を十分に確保することができなかった。研究の実施について、研究計画では研究補助者を招き入れる予定であったが、適切な該当者を選定することができず断念した。その分実験装置等を拡充し、研究の効率化を図った。研究費執行の状況としては、本研究期間中に研究拠点を移動した都合により、計画当初とは一部執行内容の変更はあったが、計画段階で設定した研究費の枠内で、必要かつ十分な予算執行が行えたと考えている。最後に、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果については、本研究期間内に達成した in-cell NMR 法の高度化によって、これまで限定的であった本手法の利用の拡大が見込め、細胞内タンパク質の構造・動態に関する知見が蓄積されることが見込める。よってこれを通して、構造生命科学の発展に貢献するものと期待される。さらに将来的には、疾患関連タンパク質をターゲットとした本法の計測・解析法を確立することによって、新薬候補探索等の先端医療への貢献も期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

細胞内への同位体ラベルタンパク質導入にエレクトロポレーションが有効であること、in cell NMR に PCS(Pseudocontact Shift)法が有用であることを示した。また、NMR 試料管内培地循環システムを改良し、細胞状態の維持を可能とした。上記のように個々の技術課題では一定の成果を得た。

しかし、残念ながら、タンパク質の細胞内での構造多様性を明らかにするまでには至らなかった。in cell NMR を汎用性のある測定法とするためには、未だ多くの技術的な改良が必要であるので、既存技術を直ぐに導入した上で、独自開発すべき問題を絞り込み、技術開発に取り組んで欲しい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yuya Hikone, Go Hirai, Masaki Mishima, Kohsuke Inomata, Teppei Ikeya, Souichiro Arai, Masahiro Shirakawa, Mikiko Sodeoka, and Yutaka Ito. A new carbamidemethyl-linked

lanthanide chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells.
Journal of Biomolecular NMR. 2016, 66, 99-110,

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

～学会発表～

1. Technical improvements for advanced in-cell NMR of mammalian cells

Kohsuke Inomata

第42回内藤コンファレンス(2016)

<ポスター発表>

2. Technical Improvements for Advanced in-cell NMR of Mammalian Culture Cells

Kohsuke Inomata, Hajime Kamoshida, Yutaka Ito, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, &
Takanori Kigawa

The XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (2016)

<ポスター発表>

3. In-cell NMR analysis for protein conformational diversity in cells

Kohsuke Inomata

BMB2015 (2015)

<招待講演, English session>

4. In-cell NMR analysis for protein conformational diversity in a cell

Kohsuke Inomata

第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月25日～9月27日

<招待講演, English session>

5. In-cell NMR 法による細胞内タンパク質の構造多様性解析

猪股 晃介

第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月25日～6月28日

<招待講演>

～著作物～

和文総説

1. 核磁気共鳴法を用いた細胞内タンパク質の無侵襲解析

朽尾 豪人, 村山 秀平, 猪股 晃介, 森本 大智, 大野 綾子, 白川 昌宏
YAKUGAKU ZASSHI, 第135巻, 3号, 391-398 (2015)

<査読あり>

2. in-cell NMR で哺乳動物細胞内タンパク質の分子間相互作用を解析する

猪股 晃介
細胞工学, 第33巻, 8号, 820-824, 特集 (2014)

<査読あり>

3. In-cell NMR 法による細胞内タンパク質の構造動態研究

猪股 晃介
日本分光学会誌「分光研究」, 63巻1号 トピックス (2014)

<査読あり>