

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－スウェーデン研究交流）

1. 研究課題名：「細胞内における SOD1 タンパク質の構造・運動性解析による神経変異疾患の発症機構の解明」
2. 研究期間：平成23年4月～平成26年3月
3. 支援額： 総額 14,000,000 円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	白川 昌宏	京都大学大学院工学研究科	教授
研究者	朽尾 豪人	京都大学大学院工学研究科	准教授
研究者	有吉 真理子	京都大学物質細胞統合システム拠点	准教授
研究者	猪股 晃介	(独) 理化学研究所生命システム研究センター	特別研究員
研究者	森本 大智	京都大学大学院工学研究科	博士課程
研究者	村山 秀平	京都大学大学院工学研究科	博士課程
参加研究者 のべ 6 名			

相手側（研究代表者を含め6名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	Mikael Oliveberg	ストックホルム大学	教授
研究者	Jens Danielsson	ストックホルム大学	研究員
研究者	Lina Leinartaite	ストックホルム大学	博士課程
研究者	Martin Kurnik	ストックホルム大学	博士課程
研究者	Lisa Lang	ストックホルム大学	博士課程
参加研究者 のべ 5 名			

5. 研究・交流の目的

タンパク質の殆どがその機能を発揮する場である細胞内部は、タンパク質、核酸といった生体高分子や細胞小器官の内膜構造が高度に凝集した過密状態にある。これは生化学、分子生物学実験で一般的に用いられる溶液条件とは大きく異なる。この細胞内環境を特徴付ける「高分子込み合い効果」は、タンパク質に空間的な制約を与えるだけでなく、様々なタンパク質恒常性維持システムとの相互作用を介して、多面的にタンパク質の機能に影響を及ぼす。

タンパク質のミスフォールディングは神経変性疾患などの病変部位に見られるタンパク質凝集体の形成に直接的に関与すると考えられている。しかし、これまでのタンパク質のフォールディングに関する知見は、in vitro の実験で得られたものが殆どであり、哺乳動物の細胞内にも適用できるのかどうかについては、全く確証がない。これは、細胞内タンパク質の高次構造を詳細に調べる方法がなかったからである。本研究では、京都大学グループが開発した、in-cell NMR 法 (Inomata et al. Nature 2009) を用いて、神経変性疾患の分子機構解析を解明することを目指す。特に、ストックホルム大学のグループでは、代表的な神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の関連タンパク質、SOD1 (Cu/Zn

superoxide dismutase 1) について細胞生物学的及び構造生物学的な研究の蓄積がある。両者が協働することにより、SOD1の細胞内状態をin-cell NMR 法を用いて直接解明し、ALS 発症機構の解明に資することを目的とする。

## 6. 研究・交流の成果

### 6-1 研究の成果

SOD1 変異体 (apoSOD1<sup>ΔIVΔVII</sup>) について、良好な in-cell NMR スペクトルが得られる細胞導入条件、NMR 測定条件を見出した。特に、SOD1 試料に関して、ストックホルム大学側の研究の蓄積に基づいて、本研究に最も適切なコンストラクトをデザインすることができた。今回の in-cell NMR 測定の実現には、この試料調製ノウハウが鍵となっており、本共同研究体制がなければ為し得なかった。ALS では SOD1 のミスフォールディングが発症機構に深く関わりとされることから、ALS-SOD1 が細胞内でどのような状態にあるかを調べることは ALS の医学的研究にも極めて有用な情報をもたらすと期待される。今回の成果に基づき、ALS 関連変異を有する SOD1 (ALS-SOD1) についても in-cell NMR 実験を進め、ALS-SOD1 の細胞内での状態を解析すれば、ALS 発症機構の分子論的解明に貢献することができるものと考えられる。

### 6-2 人的交流の成果

本研究遂行にあたり、短期ではあるものの、ストックホルム大学側の研究員および学生が複数回京都大学に滞在し協働で実験を行った。これにより、ストックホルム大学側が京都大学側の保有する in-cell NMR の技術ノウハウを習得し、独自に同様の実験を行えるようになった。また、京都大学側のスタッフがストックホルム大学に滞在し、協働実験の打合せやセミナーを行い、相手方研究室メンバーのみならず、その周辺研究者との交流も深めた。

本共同研究が始まる前の時点では、京都大学側の研究室では ALS を始めとする神経変性疾患についての研究歴は浅く、知識や実験ノウハウの蓄積は殆ど無かったが、今回の交流で、神経変性疾患とタンパク質物性（フォールディング安定性やミスフォールディング）の関係について様々な知識や関連する研究手法を学ぶことができた。今回のように互いの研究室を行き来する人的交流から得られたものは、相手方の論文を読んだり学会での講演を聴講するだけで得られる単なる「知識」を超え、互いの研究理念を共有するような形のものとなった。これは、お互いにとって今後展開する研究の幅を大きく広げるものであり、極めて意義深い体験となった。

特に、若手研究員や、博士課程の学生同士の交流は大きな意義を持つ。若手研究者は、今後も長期にわたって、関連分野で研究を進めていくことになる。本研究課題終了後も、互いの知識や理念を共有することから新しい着想に基づく研究が発案され、また、互いの技術を相補することで、単独では決して為し得ない、広がりや深みのある研究が持続的に展開されて行くものと確信する。

7. 主な論文発表・特許等（5件以内）

相手側との共著論文については、その旨を備考欄にご記載ください。

論文 or 特許	<ul style="list-style-type: none"> <li>・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年</li> <li>・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、出願番号、出願人、発明者等</li> </ul>	備考
論文	Danielsson, J.; Inomata, K.; Murayama, S.; Tochio, H.; Lang, L.; Shirakawa, M.; Oliveberg, M., Pruning the ALS-associated protein SOD1 for in-cell NMR., <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , <b>135</b> , 10266 (2013).	共著
論文	Hamatsu, J., O'Donovan, D., Tanaka, T., Shirai, T., Hourai, Y., Mikawa, T., Ikeya, T., Mishima, M., Boucher, W., Smith, BO., Laue, ED., Shirakawa, M., Ito, Y.. High-resolution heteronuclear multidimensional NMR of proteins in living insect cells using a baculovirus protein expression system. <i>J Am Chem Soc.</i> <b>135</b> , 1688 (2013).	
論文	Hembram DS, Haremake T, Hamatsu J, Inoue J, Kamoshida H, Ikeya T, Mishima M, Mikawa T, Hayashi N, Shirakawa M, Ito Y., An in-cell NMR study of monitoring stress-induced increase of cytosolic Ca <sup>2+</sup> concentration in HeLa cells., <i>Biochem Biophys Res Commun</i> , <b>438</b> , 653 (2013)	
論文	Takaoka Y, Kioi Y, Morito A, Otani J, Arita K, Ashihara E, Ariyoshi M, Tochio H, Shirakawa M, Hamachi I., Quantitative comparison of protein dynamics in live cells and in vitro by in-cell (19)F-NMR., <i>Chem Commun</i> , <b>49</b> , 2801 (2013).	
論文	Igarashi R, Yoshinari Y, Yokota H, Sugi T, Sugihara F, Ikeda K, Sumiya H, Tsuji S, Mori I, Tochio H, Harada Y, Shirakawa M., Real-time background-free selective imaging of fluorescent nanodiamonds in vivo., <i>Nano Lett</i> , <b>12</b> , 5726 (2012).	