

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」  
平成16年度採択研究代表者

白川 昌宏

(京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 教授)

## 「磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測」

### 1. 研究実施の概要

磁気共鳴法は、非侵襲性や不透明試料にたいする深度観察能に優れるため、生体・細胞中の生体分子のその場観察に望ましい手法であり、また特定分子の挙動を選択的に観察する事も可能である。しかし真核生物においては、生体・細胞中の生体分子を、特異的或いは均一に安定同位体等で標識することが困難なため、磁気共鳴法の適用は極めて限られていた。本研究課題では特異的観察のための分子プローブを効率的に導入し、様々な磁気共鳴技法を駆使する事によって、生体・細胞における蛋白質の発現、局在、相互作用、構造変化や物質代謝を非侵襲的に計測する手法の開発を行っていく。

「細胞内遺伝子発現の分子イメージング」については、ポリリン酸をプローブとし定量的なマイクロイメージングを行うことで、遺伝子発現量をモニターすることを試みている。現在までに、酵母においてポリリン酸合成酵素を新規レポーター遺伝子として用いてプロモーター活性を効率よくモニタリングできる手法を開発した。

「細胞内蛋白質の分子間相互作用、立体構造の解析手法の開発」については、In-Cell NMRの研究を進めている。アフリカツメガエル卵母細胞に安定同位体標識蛋白質をマイクロインジェクションし、良好なスペクトルの観察に成功した。そのために必要な要素技術の最適化も行ないつつある。こうした *in vivo* の蛋白質解析と並行して、細胞応答・細胞秩序維持に関わる蛋白質の *in vitro* での立体構造解析も行った。

「蛋白質の細胞内局在の解析手法の開発」については、MRFMの開発研究を進めている。現在、数十 $\mu\text{m}$ の試料に対し1 $\mu\text{m}$ 程度の空間分解能で三次元立体画像を構築することに成功した。更なる分解能と感度の改善を目指して、信号検出部の低温化開発を進める一方で、高周波実験設備の拡充も実施しており、生体系への応用を見据えた予備実験を進めていく。

「生物個体における物質動態の解明を目指したメタボロミクス」に関しては、植物個体の均一安定同位体標識技術の確立に成功した。また動物の均一標識についても良好な結果を得た。今後は有機化合物の植物への吸収過程などのメタボノミクス計測を行う。

このように、生体内の蛋白質の挙動を特異的かつ多面的に計測する事で、生体機能の動態解析への新しい視点の導入を目指す。

## 2. 研究実施体制

### 京都大学 グループ

- ① 研究分担グループ長：白川昌宏（京都大学大学院工学研究科，教授）
- ② 研究項目：磁気共鳴法による非侵襲計測における装置と測定法の高感度化

### 横浜市立大学 グループ

- ① 研究分担グループ長：古久保哲朗（横浜市立大学総合理学研究科、教授）
- ② 研究項目：遺伝子発現の可視化および細胞内蛋白質動態の非侵襲計測のための基盤技術の開発

### 理化学研究所 グループ

- ① 研究分担グループ長：伊藤 隆（理化学研究所生体超分子構造・機能研究協力グループ，前任研究員）
- ② 研究項目：真核細胞におけるIn-Cell NMRの計測技術開発研究、および多次元NMRを用いたメタボロミクス研究

### 日本電子（株） グループ

- ① 研究分担グループ長：吉成 洋祐（日本電子株式会社 開発本部、主任研究員）
- ② 研究項目：MRFMを用いた細胞内蛋白質の細胞内局在と分子間相互作用の解析

## 3. 主な研究成果の発表

### (1) 論文（原著論文）発表

- Ohno, A., Jee, J-G, Fujiwara, K., Tenno, T., Goda, N., Tochio, H., Kobayashi, H., Hiroaki, H., Shirakawa, M. (2005) Structure of the UBA domain of Dsk2p in complex with Ubiquitin: Molecular Determinants for Ubiquitin Recognition. *Structure* 13, 521-532.
- Tanikawa, J., Nomura, T., Macmillan, E. M., Shinagawa, T., Jin, W., Kokura, K., Baba, D., Shirakawa, M., Gonda, T. J., and Ishii, S. (2004). p53 suppresses c-Myb-induced trans-activation and transformation by recruiting the corepressor mSin3A. *Journal of Biological Chemistry* 279, 55393-55400.
- Tanaka, T., Mizuno, T., Fukui, S., Hiroaki, H., Oku, J., Kanaori, K., Tajima, K. and Shirakawa, M. (2004) Two-Metal Ion, Ni(II) and Cu(II), Binding  $\alpha$ -Helical Coiled-coil Peptide. *Journal of American Chemical Society* 126, 14023-14028.
- Shiozawa, K. Maita, N., Tomii, K, Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H. (2004) Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase: characterization of a putative adaptor-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 50060-50068.

- Shiozawa, K., Maita, N., Tomii, K., Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., and Hiroaki, H. (2004). Crystallographic characterization of the N-terminal domain of PEX1. *Acta Crystallography D Biological Crystallography* **60**, 2098-2099.
- Tenno, T., Fujiwara, K., Tochio, H., Iwai, K., Morita, E. H., Hayashi, H., Murata, S., Hiroaki, H., Sato, M., Tanaka, K., and Shirakawa, M. (2004). Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes to Cells* **9**, 865-875.
- Komatsu, T., Mizusaki, H., Mukai, T., Ogawa, H., Baba, D., Shirakawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Yamamoto, H., Kikuchi, A., and Morohashi, K. (2004). Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9. *Molecular Endocrinology* **18**, 2451-2462.
- Kikuchi, J., Shinozaki, K. & Hirayama, T. (2005) Stable isotope labeling of *Arabidopsis thaliana* for an NMR-based metabolomics approach. *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1099-1104.
- Horiuchi, T., Takahashi, M., Kikuchi, J., Yokoyama, S. & Maeda, H. (2005) Effect of dielectric properties of solvents on the quality factor for a beyond 900 MHz cryogenic probe model. *J. Magn. Reson.* **174**, 33-41.