「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対する深度観察能に優れるため、細胞・生体中の生体分子のその場観察に望ましい手法である。本研究課題は、特定分子の挙動の選択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、細胞・生体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目的とする。そのため①細胞内遺伝子発現の分子イメージング、②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、③蛋白質の細胞内局在の解析手法の開発、④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、の 4 つのテーマについて研究を進めている。

「細胞内遺伝子発現の分子イメージング」については、ポリリン酸を分子プローブとした酵母細胞における遺伝子発現の分子イメージング手法の開発を行った。特に T_1 緩和時間の変化を ^{1}H-MRI により画像化することにより、高感度化を図ることに成功した。

「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、^{15}N 標識したユビキチン及びその誘導体蛋白質をアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることで、In-Cell NMR の技術開発を手がけた。細胞内のユビキチン変異体に由来すると思われるシグナルの観察や、細胞内の酵素によるプロセッシングに起因すると思われるシグナル変化の検出にも成功した。また培養動物細胞に対して蛋白質をとりこませる方法の開発として、HIV-Tat 配列を使った系や、新規 PTD 配列の検討を行なった。更に、In-Cell NMR を短時間で感度よく測定する方法などの要素技術の検討も行なった。

「蛋白質の細胞内局在の解析手法の開発」については、磁気共鳴力顕微鏡（MRFM）の開発研究を進め、低温実験環境下で稼動する高精度 3 次元ステージの開発と、ステージ位置を検出するセンサー開発や制御システムの改良を重点的に行なった。

「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」については、動植物個体、ならびにその常在微生物を均一に安定同位体標識し、異種核多次元 NMR 計測により生体内物質を、分離良く経時的に観測する手法の開発を行なった。

２．研究実施内容

本研究の目的は、「細胞・生体中に存在する特定の生体分子の詳細なその場観察」を可能にするような、磁気共鳴法を用いた新しい計測法を開発することにある。①細胞内遺伝子発現の分子イメージング、②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、③蛋白質の細胞内局在の解析手法の開発、④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、の 4 つのテーマについて、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，細胞・生体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る。

「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。無機リン酸のポリマーであるポリリン酸は、全ての生物に普遍的に存在し、^{31}P-NMR による定量的なマイクロイメージングが可能であることから、遺伝子発現量をモニターする上で非常に有効なプローブになりうるものと考えられる。

現在までの研究進捗状況としては、酵母細胞においてポリリン酸の合成・蓄積に関与する複数の蛋白質を新規レポーター遺伝子として利用し、プロモーター活性を効率よくモニタリングできる手法の開発を試み、オンとオフそれぞれのキネティックスを測定する上で最適と考えられるレポーター遺伝子を同定することに成功している（Nucleic Acids Research, vol.34, No.6, e51, 2006)。H17 年度は、T_1 緩和時間の変化を ^{1}H-MRI により画像化する新規モニタリング手法の開発を行った。この手法は ^{31}P-MRI 測定系に比べてはるかに感度が高く、十分な定量性も確認できたことから、今後有用な実験系になると考えられる。

「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，主として In-Cell NMR の研究を進めている.

アフリカツメガエルの卵母細胞を使った In-Cell NMR 法の開発については、^{15}N 標識したユビキチン蛋白質を卵母細胞にマイクロインジェクションし、^{1}H-^{15}N HSQC 測定を行なった。野生型ユビキチンを用いた場合は、蛋白質由来のシグナルがほとんど観測されなかったが、変異導入によってユビキチン結合蛋白質との相互作用を弱めたユビキチンを用いた場合は良好なスペクトルを観測することができた。またユビキチン誘導体の卵母細胞内でのスペクトル変化から、ユビキチン誘導体が細胞内でユビキチンカルボキシ末端加水分解酵素による切断を受けていることが示された。

また、哺乳類培養細胞に対してレポーター遺伝子産物や ^{15}N 標識蛋白質を外から細胞内にとりこませる方法の開発の一環として、蛋白質トランスダクション(PTD)活性を有する新規ペプチドの同定を試みた。まず、標的遺伝子の PCR 産物を、PRESAT 技術を用いて簡便にクローニングすることを可能にする、融合蛋白質発現ベクターの開発に成功した。PTD 活性を有する既知の配列としては HIV の Tat 配列が知られているが、この発現システムを用いた場合、HIV-Tat を C 末端に、蛍光または ESR で観測可能な性質を有する種々のランタニドに

結合する事ができるタグ配列を N 末端に有する蛋白質を効率よく作成することが可能になる．このシステムを用いて、蛋白質が細胞に取り込まれた事を、生細胞中で Tb^{3+}による蛍光により観察することができた。

更に、哺乳類のサイトカインから得られたプロテオグリカン結合モチーフを含む 22 残基のペプチドをデザインし、その融合蛋白質のヘパリン結合能と細胞内取り込み活性を調べた。その結果、新規ペプチドは、HIV-Tat 配列よりは活性が低いものの、PTD 活性を有することが明らかになった。

以上の In-Cell NMR 研究に加えて、In-Cell NMR が本質的に持つ「短寿命」と「低感度」を克服するための迅速な NMR 測定法の開発も行なった。本研究では、多次元 NMR 測定に際して間接観測軸について非線形サンプリングを行い、それらの軸について最大エントロピー法を用いてデータ処理をすることによって、細胞試料であっても、3～12 時間程度で十分な感度の NMR スペクトルを観測することが可能であることを示した。この手法は、In-Cell NMR のみならず試験管内の NMR においても、不安定でかつ溶解度が低い蛋白質や高分子蛋白質の解析に極めて有用であることも示すことができた。

また本研究では、上記 *in vivo* での研究に加えて、NMR 等を使った *in vitro* でのたんぱく質の構造解析といった構造生物学的研究も進めた。

「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。

現在までの進捗状況として、サブミクロンの空間分解能で試料の MRI 画像構築を可能にする MRFM 装置実現のために、低温実験環境下（飛躍的な感度向上が期待できる）で稼動する高精度 3 次元ステージや、ステージ位置検出センサーの開発、および制御システム改良を実施した。一方、個別に実証してきたこれら要素技術を導入するために新規 MRFM プローブ製作を開始し、部品製作と組立までを完了した。3 次元ステージ統合システム構築に向けて引き続き開発を継続する。

分解能改善に向けての研究としては、電解研磨された磁性針を使用し、室温下、サブミクロンの分解能で ESR 標準試料：DPPH（約φ5μm）の 3 次元 MRI 画像取得が可能である事を確認した。

更に、試料深部に局在する物質が表皮構造に影響を与えているような場合に、その原因物質を特定する手法探索の一環として、「MRFM 測定による 3 次元画像と表面凹凸画像が同視野内で観測・重畳できる測定手法」を開発中の室温 MRFM 装置を使って実証した。画像構築技術の改善など引き続き開発を進める。

「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」については、まず抽出状態における解析手法の検討を行なった。これは、後の非侵襲計測における不均一系での物質同定に有用な標準化学シフトを整備するためである。有機溶媒、ならびに後の非侵襲計測のために水溶液(0.1M-KPi)の両者について pH=7、25℃の同一条件で標準化合物の化学シフトデータ、および $^{1}J_{CC}$ スピン・カップリングのデータを収集した。H17 年度終了時で 1245 の ^{1}H、^{13}C、ならびに 19 の ^{31}P 化学シフトがデータベースとして蓄積されている。これらを

自動検索しながら、直接多次元 NMR スペクトル上でシグナル帰属を行う、Java 言語プログラム SpinAssign 開発にも着手した。これらの基盤技術開発を受けて、*in vivo* NMR や高分解能マジック角回転スペクトルといった非侵襲計測時における物質同定も前年度に比べて遥かに効率化された。

３．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分子工学専攻、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

「首都大学東京」グループ

① 研究分担グループ長：伊藤　隆（首都大学東京都市教養学部理工学系化学コース、教授）

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

「理化学研究所」グループ

① 研究分担グループ長：菊地　淳（理化学研究所植物科学研究センター先端 NMR メタボミクス研究ユニット、ユニットリーダー）

② 研究項目：

- 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）開発本部第２グループ、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

４．主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（１）　論文（原著論文）発表

○ Baba, D., Maita; N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H, and Shirakawa, M. “Crystal structure of SUMO-3-modified thymine-DNA glycosylase.” *J. Mol. Biol.*, *in press* (2006).

○ Ichiyama, S., Oka, Y., Haga, K., Kojima, S., Tateishi, Y., Shirakawa, M., and Haga, T. “The structure of the third intracellular loop of the muscarinic acetylcholine receptor M2 subtype.” *FEBS Lett.* 580, 23-26 (2006).

○ Baba, D., Maita, N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H. and Shirakawa, M. “Crystal Structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1.” *Nature* 435, 979-982 (2005).

○ Hara, T., Kamura, T., Kotoshiba, S., Fujiwara, K., Onoyama, I., Shirakawa, M. and Nakayama, K.-I. “Role of the UBL-UBA protein KPC2 in degradation of p27 at G1 phase of the cell cycle.” *Mol. Cell. Biol.* 25, 9292-9303 (2005).

○ Hashimoto, K., Kato, Z., Nagase, T., Shimozawa, N., Kuwata, K., Omoya, K., Li, A., Matsukuma, E., Yamamoto, Y., Ohnishi, H., Tochio, H., Shirakawa, M., Suzuki, Y., Wanders, R. J. A. and Kondo, N. “Molecular mechanism of a temperature-sensitive phenotype in peroxisomal biogenesis disorder.” *Pediatr. Res.* 58, 263-269 (2005).

○ Takasu, H., Jee, J. G., Ohno, A., Goda, N., Fujiwara, K., Tochio, H., Shirakawa, M. and Hiroaki, H. “Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 460-465 (2005).

○ Auesukaree, C., Tochio, H., Shirakawa, M., Kaneko, Y., and Harashima, S. “Plc1p, Arg82p, and Kcs1p, enzymes involved in inositol pyrophosphate synthesis are essential for phosphate regulation and polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*.” *J. Biol. Chem.* 280, 25127-25133 (2005).

○ Ohno, A., Jee, J-G, Fujiwara, K., Tenno, T., Goda, N., Tochio, H., Kobayashi, H., Hiroaki, H. and Shirakawa, M. “Structure of the UBA domain of Dsk2p in complex with Ubiquitin: Molecular Determinants for Ubiquitin Recognition.” *Structure* 13, 521-532 (2005).

○ Ki, S., Sugihara, F., Kasahara, K., Tochio, H., Okada-Marubayashi, A., Tomita, S., Morita, M., Ikeguchi, M., Shirakawa, M. and Kokubo, T. “ A novel magnetic resonance-based method to measure gene expression in living cells.” *Nucleic Acids Res.* 34, e51 (2006).

○ Kurashima-Ito, K., Ikeya, T., Senbongi, H., Tochio, H., Mikawa, T., Shibata, T. and Ito, Y. “Heteronuclear multidimensional NMR and homology modelling

studies of the C-terminal nucleotide-binding domain of the human mitochondrial ABC transporter ABCB6" *J. Biomol. NMR, in press* (2006).

○ Isogai, Y., Ito, Y., Ikeya, T., Shiro, Y. & Ota, M. "Design of ・ Cro fold: solution structure of a monomeric variant of the de novo protein" *J. Mol. Biol.* **354**, 801-814 (2005).

○ Kurashima-Ito, K., Kasai, Y., Hosono, K., Tamura, K., Oue, S., Isogai, M., Ito, Y., Nakamura, H and Shiro, Y. "Solution structure of the C-terminal transcriptional activator domain of FixJ from Sinorhizobium meliloti and its recognition of the fixK promoter" *Biochemistry* **44**, 14835-14844 (2005).

○ Rajesh, S., Heddle, J. G., Kurashima-Ito, K., Nietlispach, D., Shirakawa, M., Tame, J. R. and Ito Y. "Backbone ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N assignments of a 56 kDa *E. coli* nickel binding protein NikA." *J. Biomol. NMR* **32**, 177 (2005)

○ Kikuchi, J. and Hirayama, T. "Practical aspects of stable isotope labeling of higher plants for a hetero-nuclear multi-dimentional NMR-based metabolomics". *Method Mol. Biol.*, in press (2006).

○ Elmi, M. M., Aminiasaab, M., Hondo, T., Kikuchi, J., Kuroda, Y., Naderi-Manesh, H. and Sarbolouki, M. M. "Structural and functional characterization of a mutant of Pseudocerastes persicus natriutic peptide" *Prot. Pept. Lett.* **13**, 295-300 (2006).

○ Kikuchi, J. and Hirayama, T. "Hetero-nuclear NMR-based metabolomics" *Biotech. Agri. Forest.* **57**, 93-101 (2006).

○ Horiuchi, T., Takahashi, M., Kikuchi, J., Yokoyama, S. and Maeda, H. "Effect of dielectric properties of solvents on the quality factor for a beyond 900 MHz cryogenic probe model" *J. Magn. Reson.* **174**, 33-41 (2005).

（２） 特許出願

平成 17 年度特許出願件数：１件（CREST 研究期間累積件数：３件）