

伊藤 隆

首都大学東京 大学院理工学研究科  
教授

NMR と計算科学の融合による *in situ* 構造生物学の確立と  
真核細胞内蛋白質の動態研究への応用

§ 1. 研究実施体制

(1)「伊藤」グループ

- ① 研究代表者:伊藤 隆 (首都大学東京大学院理工学研究科, 教授)
- ② 研究項目
  - ・NMR 測定法とデータ処理法の開発・最適化
  - ・In-cell NMR のための常磁性 NMR 測定法の確立
  - ・In-cell NMR に最適化した部位特異的安定同位体標識蛋白質の調製
  - ・細胞内蛋白質の効率的な構造情報取得法と構造決定法の開発

(2)「木川」グループ

- ① 主たる共同研究者:木川 隆則 (国立研究開発法人理化学研究所生命システム研究センター、チームリーダー)
- ② 研究項目
  - ・選択的アミノ酸標識と3重共鳴 2D NMR を用いた、蛋白質主鎖・側鎖シグナル帰属法の開発
  - ・迅速な多次元 NMR 測定, および精度の高いデータ処理技術の開発
  - ・In-cell NMR に最適化した部位特異的安定同位体標識蛋白質の調製

(3)「杉田」グループ

- ① 主たる共同研究者:杉田 有治(国立研究開発法人理化学研究所杉田理論分子科学研究室、主任研究員)
- ② 研究項目

- 分子動力学シミュレーションを用いた細胞内蛋白質の動態の解析
- 新しい拡張アンサンブル法の開発による NMR 情報を繰り込んだ構造探索
- 分子クラウディング系への拡張アンサンブル法の導入

## § 2. 研究実施の概要

本研究では、真核細胞内における蛋白質の立体構造、ダイナミクス、相互作用等を高分解能で解析することができる、NMR および計算科学を融合した研究開発を推進する。これにより、蛋白質が実際に機能している場における真の姿に迫る「*in situ* 構造生物学」の創設を目指す。

具体的な研究内容としては、①in-cell NMR を用いた真核細胞内蛋白質の立体構造解析法の確立とその応用、②計算科学的手法を用いた細胞内蛋白質の動態解析、および、①と②を総合した、③細胞内蛋白質の動態の普遍的な理解とその応用研究、の3つに大別される。

上記①の研究内容のうち、「選択的アミノ酸標識と3重共鳴2D NMRを用いた、蛋白質主鎖・側鎖シグナル帰属法の開発」については、木川グループの「符号化標識法」[1]を継続して開発を行った。シグナルの重なりが激しいスペクトル領域についても解析が可能となったことから、in-cell NMR 研究に符号化標識法を適用する技術基盤が整った。

「迅速な多次元 NMR 測定、および高精度データ処理技術の開発」では、これまでに確立した技術を用いて、ヒト培養細胞中では世界初の蛋白質主鎖 NMR シグナルの帰属に成功した。

真核細胞内蛋白質の構造情報取得のための「in-cell 常磁性 NMR 測定法の確立」では、新規ランタノイド結合タグ[Ln(M8-CAM-I)]を用いた in-cell NMR 測定を行い、立体構造上妥当な pseudo contact shift (PCS)情報が得られていることを確認した(図)。この方法は、ヒト細胞中の蛋白質の高次構造情報を取得する有用な手法となる。

「In-cell NMR に最適化した安定同位体標識法」の開発では、無細胞蛋白質発現系を用いた部位特異的  $^{19}\text{F}$  標識技術の開発を進めた。 $^{19}\text{F}$  は細胞内のバックグラウンドがほぼゼロであり、生理的濃度に近い状態での in-cell NMR において有用性を発揮する。

さらに、「細胞内蛋白質の効率的な構造情報取得法と構造決定法の開発」については、ベイズ統計を利用した方法に加えて、効率的なスペクトル再構成、自動解析を組み合わせたアプローチを確立し、Sf9内の蛋白質の立体構造解析に適用した結果、H26年度に得られていたものから著しく分解能が向上した立体構造の算出に成功した。

上記②の研究内容については、「新しい拡張アンサンブル法の開発による NMR 情報を繰り返した構造探索」と、「分子クラウディング系への拡張アンサンブル法の導入」について鋭意研究を行った。特に、細胞内の分子クラウディング環境における蛋白質の運動について、NMR で得られたデータを生かした計算機シミュレーションを行い、分子運動を可視化することを試みた。そのために必要な効率の良いシミュレーション手法として Replica State Exchange Metadynamics Method を開発した[2]。真空中での Poly-alanine や水中での糖鎖などの分子系において計算効率の向上を示すことができたため、細胞環境をあらわに考慮した蛋白質動態のシミュレーションに向けた準備が整ったと考えられる。

上記③の研究については、細胞内蛋白質のフォールディング解析、細胞内蛋白質の相互作用

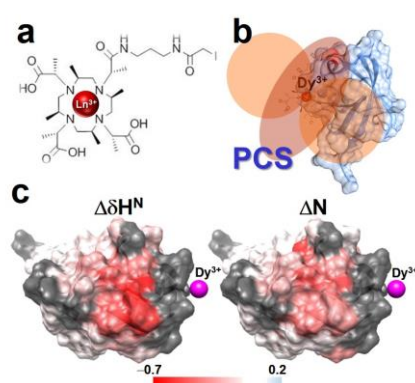


図. a. [Ln(M8-CAM-I)]の化学構造. b. PCSの模式図. c. HeLa細胞に導入した Ln<sup>3+</sup>標識ユビキチンで観測された in-cell PCS.

解析, HeLa 細胞の in-cell NMR を用いた薬剤スクリーニング法の開発の 3 つのサブテーマについて研究を進めた.

[1] Kasai, T. et al. "Stable isotope labeling strategy based on coding theory", *J. Biomol. NMR* **63**, 213-221 (2015).

[2] Raimondas Galvelis, R. & Sugita, Y. "Replica State Exchange Metadynamics for Improving the Convergence of Free Energy Estimates", *J. Comp. Chem* **36**, 1446-1455 (2015).