

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名:磁気共鳴法による生体内分子動態の非侵襲計測

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者 白川 昌宏(京都大学大学院工学研究科 教授)

主たる共同研究者

伊藤 隆(首都大学東京大学院理工学研究科 教授)

廣明 秀一(神戸大学大学院医学研究科 特命教授)

古久保 哲朗(横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授)

吉成 洋祐(日本電子株式会社開発本部 副主幹研究員)

菊地 淳(理化学研究所植物科学研究センター ユニットリーダー)

3. 研究実施概要

本研究課題は、細胞・生体内のタンパク質の立体構造、機能、局在や動態・安定性を非侵襲的に計測するための、核磁気共鳴法(NMR)、電子スピン共鳴法(ESR)、及び磁気共鳴画像法(MRI)を使った新しい研究手法を開発し、実際に働いている(at work)タンパク質の実像を捉えることを目的とした。特に極度な混在系・複雑系である細胞・生体内において、特定分子の挙動や機能を選択的に観察するために特異的安定同位体標識の手法や分子プローブの開発に重点を置いた。また高感度、高分解能 MRI のための測定機器、手法の開発も並行して進めた。具体的には、①細胞内タンパク質の分子間相互作用、立体構造の解析手法の開発、②細胞内遺伝子発現の分子イメージング、③タンパク質の細胞内局在の超高分解能イメージング機器・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 つの項目について研究を推進した。これらの研究の成果は、*Nature* 紙に掲載された 2 報を含む多くの論文として公表された。

「細胞内タンパク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、細胞内タンパク質の選択的多次元 NMR 測定である In-Cell NMR の開発に関して、目覚ましい成果を上げることができた。その一つは生きた大腸菌内のタンパク質の高分解能立体構造決定である。細胞の寿命等から、測定時間や感度が限られるという制約を、測定手法、データ処理や立体構造計算手法を開発・最適化することで、実現した。これは細胞内のタンパク質について世界で初めての立体構造決定である。もう一つの成果はヒト細胞内のタンパク質の高分解能 2 次元 NMR の測定手法の開発である。これも世界で初めての業績である。このヒト細胞における In-Cell NMR により、哺乳動物細胞内でのタンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質のプロセッシング、タンパク質-薬剤相互作用の構造生物学的解析が可能となった。また In-Cell NMR に関連して、細胞内のタンパク質の安定性を残基レベルで計測する手法を開発し、ユビキチンが試験管内よりも細胞内で 20 倍前後不安定化している事が示唆するデータが得られた。これは通説を覆し、新たなタンパク質像を提示しうる知見である。これらの一連の手法開発は細胞内タンパク質に構造生物学の手法が適用できることを示したとして、国際的にも極めて高い評価を得ている。また In-Cell NMR の開発の過程で、任意のタンパク質を効率良く機能的な形で細胞に導入する方法を見出した。これは遺伝子の代わりに、タンパク質の導入による細胞工学・操作を可能にする期待される。これと関連して、医療などへの応用に適した、ヒト血中に豊富にあるタンパク質である IGFBP-3 および IGFBP-5 から、細胞内取り込み活性を有するペプチドを新規に単離同定した。

「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 ^1H -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。また測定法・データ処理法・細胞チップ作成法等細部を工夫することにより定量性の改善を図るとともに、*vtc1-1* アレルを新規レポーター遺伝子として単離・同定し、バックグラウンドの大幅な低減を達成することにも成功した。一方、動物培養細胞においては、大腸菌由来の *PPK1* 遺伝子が極めて有効なレポーター遺伝子である可能性が示されたので、形質転換技術を用いて動植物個体への応用を試みた。形質転換個体において蓄積するポリリン酸を *in vivo* ^{31}P -MRS/MRI により可視化することはできなかったが、十分量のポリリン酸が MRI 検出には適さない状態で貯蔵されていることを明らかにした。その一方、ランタニド金属の常磁性効果と ^{19}F -NMR を結び付けるという新しいコンセプトに基づく分子プローブを考案した。これは、アポトーシス、癌、遺伝子発現など、多様な生命現象の検出と可視化に適用できると期待される。

「タンパク質の細胞内局在の超高分解能イメージング機器・手法の開発」については、極低温環境で稼動す

る磁気共鳴力顕微鏡(MRFM)の研究を進め、目標であった数十 nm 分解能に迫る約 100nm 分解能を持つ装置開発に成功した。また同環境下で MRFM・AFM 像の重畳計測のための技術開発も行った。

「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、未精製の代謝混合物を NMR 計測し、分離能よく、代謝動態を追跡するメタボロミクス解析において、多次元 NMR を利用する手法の開発を行った。植物個体については、光合成による $^{13}\text{CO}_2$ 固定、あるいは根圏からの安定同位体有機物吸収を、また動物や微生物の標識については、従来の $^{13}\text{C}_6\text{-Glc}$ 等の単純有機化合物からの吸収以外に、安定同位体標識植物を摂食源とする方法を検討し NMR メタボロミクス基盤技術を構築した。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

実際に働いている(at work)タンパク質の実像を捉えることを目指し、細胞・生体内でタンパク質の立体構造、機能、局在や動態・安定性を非侵襲的に計測する磁気共鳴法を使ったさまざまな新しい研究手法を開発した。研究チームは多様なテーマを多彩なグループで追求、研究の進展に伴って、新たな開発目標を設定するなど適宜方向性を見極めながら意欲的に研究を進捗させた。その結果、様々な工夫と努力により、細胞内タンパク質の立体構造、構造の安定性や分子間相互作用の解析技術の開発に世界に先駆け成功した。細胞内のタンパク質の構造は単離精製した溶液中に比べ、これまでの常識を打ち破り不安定であることが示され、新たな細胞内タンパク質の構造生物学の誕生を予告させるものであった。まさに快挙であり、特筆に値する。この結果は、チーム内の2つのグループから同時に2報 *nature* 誌に掲載された。

また、新しいコンセプトに基づく細胞内遺伝子発現の分子イメージングや、タンパク質の細胞内局在の超高分解能イメージングなど、汎用的な手法として生命科学研究の重要な基盤ツールとなりうる計測技術や装置の開発に着手し、その実現に対してよい感触を得ている。また、光検出磁気顕微鏡を新たな開発目標として追加し、研究を進捗させ、その有望性が示されている。新しい高分解能蛍光・磁気イメージング機器になる可能性を有するもので今後の研究の進展が期待される。

Nature 誌をはじめとして、質の高い雑誌に多くの論文が発表され、原著論文 67 報、総説等 30 報、国内外の招待講演 70 件、口頭発表 53 件、ポスター発表 135 件、マスコミ報道 31 件等、外部発表のレベルは極めて高く評価できる。また、装置開発にかかわる知財が出願されている

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

これまでの構造生物学的研究はほぼすべて細胞から単離精製した生体高分子を対象としたものであり、実際にタンパク質が機能する細胞内での立体構造や分子間相互作用をこれほどの高分解能で直接観察した例はない。極めて生理的な環境下での生体高分子の立体構造や相互作用についての情報は、今後の生命科学に本質的な変革をもたらすであろうことを示した。細胞内のタンパク質の構造生物学やタンパク質—薬剤相互作用の解明などへ新たな1ページを切り開いている。

このように、本研究では新しい計測法を開発するだけでなく、取得したデータから計測装置の有効性を示すことが出来た。生きた細胞内の分子挙動について、具体的測定を行うメドがついたので、今後細胞内の機能発現機構、外部から刺激(電気、高圧、イオン)や薬剤の導入に対処する機構解明など広い範囲で使われることになるだろう。このように新しい手法を確立することにより、生命現象解明の計測技術として戦略目標に大きな貢献をした。また磁気共鳴力顕微鏡(MRFM)や光検出磁気顕微鏡なども新たな計測法として期待される。今後の研究の進捗、展開が大いに期待される。

国内に類似研究は無く、世界的にも先駆的な成果が得られ、世界中から注目を集めている。本研究で開発した様々な技術を組み合わせ、今後さらに多面的に研究が進められ、細胞内タンパク質の構造生物学が展開さ

れることが強く期待される。

4-3. 総合的評価

本研究課題で提案された種々の研究課題は堅実に達成され、磁気共鳴法が細胞生物の研究に威力を発揮することを示した。当初は「出来たらいい」と思われていた「細胞内 NMR」の成功は画期的なものである。この手法により、天然変成領域を含むタンパク質の構造解明の道も開けた。また、細胞中のタンパク質の構造生物学への一歩を踏み出すこととなった。さらに、当初計画されていなかった光検出磁気顕微鏡も現実味を帯びてきた。このように様々なツールが揃ってきているので、今後のさらに大きな展開への期待が膨らんでいる。

細胞内のタンパク質の構造の安定性は単離生成された試料に比べ低いことが初めて実験的に示された。細胞内でタンパク質の機能を理解するのに非常に重要な知見であり、今後様々なタンパク質で確認をして一般性を調べたい。また、機能との関係で不安定性の意味を明らかにしたい。細胞内タンパク質の構造生物学の幕開けである。