

2024 年度年次報告書

細胞内現象の時空間ダイナミクス

2021 年度採択研究代表者

西田 紀貴

千葉大学 大学院薬学研究院
教授

インセル NMR 計測による細胞内蛋白質の構造・動態・機能解明

主たる共同研究者:

池谷 鉄兵 (東京都立大学 大学院理学研究科 准教授)

研究成果の概要

本課題では、①細胞内タンパク質の構造ダイナミクス情報の取得、②細胞内制御因子の影響の定量、③細胞内局所環境における観測、を可能とする新規 in-cell NMR 計測技術を開発し、④ LLPS などの細胞内高次構造体の解析に適用し、in vitro では再構成が困難な細胞内環境依存的に起こる生命現象の解明を目指している。今年度の主な成果を以下にまとめる。

①がん関連タンパク質 HDM2 の multi-state 構造平衡に対し、分子混雑環境が与える影響を NMR により定量した結果、排除体積効果によって閉じた構造 (closed 1) の存在比が上昇し p53 との結合能が抑制されることを示した。

②RAS 変異体に対する新たな GTP 加水分解促進因子 (non-RAS GAP) を無細胞発現系で探索する系を確立し、既存の RASGAP が作用しない変異体 RAS に対しても活性を持つ因子を同定する道が拓かれた。

③¹⁹F プローブを利用した in-cell NMR 手法を確立し、KRAS の GDP/GTP 結合状態を高感度かつ特異的に観測する技術を開発した。これにより、細胞内での活性化状態の定量が容易となり、動的構造解析も可能となった。

④FUS の LLPS 形成機構を細胞内で観測し、分子混雑環境が液滴形成を大幅に促進すること、また液滴が時間と共に rigid な状態に成熟する様子を in-cell NMR により経時追跡することに成功した。さらに、Protein Trans-Splicing を用いた区分標識法により、これまで困難だった低複雑性配列タンパク質の残基分解能の向上を実現し、FUS の相互作用部位同定への道を拓いた。加えて、GRB2 と SOS1 の多価相互作用に基づく LLPS 形成の分子機構を解明し、新たな結合モードとその影響を提案した。

【代表的な原著論文情報】

- 1) Zhao Q., Shimada I., Nishida N., “Real-Time Monitoring of RAS Activity Using In Vitro and In-Cell NMR Spectroscopy” *Methods Mol Biol.* 2797:237-252 (2024).
- 2) Tateno, K., Ando, T., Tabata, M., Sugawara, H., Hayashi, T., Yu, S., Sayeesh, P.M., Inomata, K., Mikawa, T., Ito, Y. and Ikeya, T., “Different molecular recognition by three domains of the full-length GRB2 to SOS1 proline-rich motifs and EGFR phosphorylated sites”, *Chem. Sci.* **15**, 15858-15872 (2024).