

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 (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(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 情報を練り込んだ構造探索
- 分子クラウドイ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。

具体的な研究内容は、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。

H29 の主要な研究実施概要は以下の通りである。

上記①の研究内容のうち、「真核細胞内蛋白質の構造生物学的解析」では、 ^{19}F -標識 HRas を培養細胞 HeLa に導入し、細胞膜局在状態での in-cell NMR 解析を行ってきた。活性型 (GTP 結合型) および非活性型 (GDP 結合型) が支配的になる変異体を細胞内に導入することで、膜に局在した HRas の活性型と非活性型に由来する ^{19}F -NMR 信号を観測することに成功した。

「細胞内蛋白質の効率的な構造情報取得法と構造決定法」では、迅速な NMR 測定法を生きた昆虫培養細胞 Sf9 内の 5 種の蛋白質に適用し、良好な 3D NMR スペクトルの取得に成功した。さらに、ベイズ統計を利用した立体構造計算法により、3 種の蛋白質について詳細な立体構造が決定された。また、希薄溶液中と明らかに異なるコンフォメーションの同定にも成功した(図)。一方で、細胞試料作成の再現性に優れた測定装置を考案し、これ

を用いて解析を行った結果、細胞の健康状態が内在蛋白質の立体構造に大きな影響を与えることを見出した。

上記②の研究のうち、「分子クラウディング系への拡張アンサンブル法の導入」については、蛋白質ダイナミクスへの分子クラウディングの影響を解明するために、修正した分子力場関数を用いた分子動力学シミュレーションを行った。その結果、分子クラウディング環境下では均一な溶液というよりは、様々なサイズの過渡的な蛋白質クラスターを形成している可能性が高いことを示した。

「細胞環境を含む系への拡張アンサンブル法の導入」については、細胞環境を含む系への拡張アンサンブル法の導入を容易にするため、分子クラウディング環境の系や細胞環境系において、蛋白質濃度や蛋白質の種類を簡単に変更可能にできるようなアルゴリズムの開発を行った。

上記③の研究については、細胞内環境に依存していると考えられる蛋白質の立体構造変化を理解するために、計算と実験の両面からの解析を行った他、細胞内蛋白質のフォールディング解析や相互作用解析、阻害剤等のスクリーニング手法の研究を進めた。

代表的原著論文

[1] Ikeya, T. et al. “Solution NMR views of dynamical ordering of biomacromolecules” *Biochim. Biophys. Acta.* **1862**, 287-306 (2018).

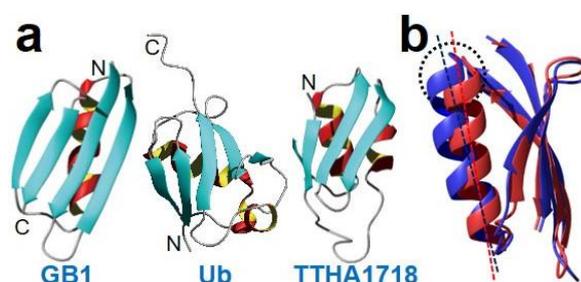


図. a. 生きた昆虫培養細胞 Sf9 内の 3 種の蛋白質, GB1, Ub, TTHA1718 の立体構造. b. Sf9 内の GB1 の立体構造 (青) と希薄溶液中の GB1 の立体構造 (赤) の比較.

[2] Inomata, K. et al. "Impact of cellular health condition on protein folding state in mammalian cells" *Chem. Comm.* **53**, 11245-11248 (2017).

[3] Nawrocki, G. et al. "Slow-Down in Diffusion in Crowded Protein Solutions Correlates with Transient Cluster Formation" *J. Phys. Chem. B* **121**, 11072-11084 (2017).