

「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 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

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、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動態を非侵襲的に計測する手法の開発を目的とする。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ならびに動物培養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い、前者を用いて基本転写因子 TFIIID の機能を解析する実験に着手した。H18 年度は、主に RPS5 遺伝子と AGP1 遺伝子のプロモーターをモデルとしてコアプロモーターエレメントの解析を試み、その過程において、それまでに予期していなかった複数の問題点を明らかにした。

「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、NMR を生きた細胞に適用し、細胞内において実際に機能している蛋白質の構造・機能情報を取得する In-Cell NMR 法の開発として、アフリカツメカエル卵母細胞へのマイクロインジェクションによる手法の開発を進めた。その過程で、試料注入後の蛋白質の漏れを簡便に調べる方法について検討した。更に、In-Cell NMR を短時間で感度良く測定する要素技術の確立も行った。このテーマに関連して、哺乳動物培養細胞に対する蛋白質細胞移行シグナルを融合した蛋白質ベクターを効率的に生産するシステムの実用化に成功した。

「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)の研究開発を進め、装置のコアとなる低温用 3 次元クローズループステージ開発とカンチレバー振動ノイズ除振システムの開発が完了した。今後は低温下での 3 次元走査実験の実施と生体試料導入に関する手法開発を実践すると共に、AFM 画像との重畳に関連した測定手法を高度化する。

「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、前年度に引き続き動物個体、ならびにその共生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非侵襲的に、分離良く経時的に観測する手法の開発を行った。

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、酵母細胞のみならず (*Nucleic Acids Research*, vol.34, No.6, e51, 2006)、動物培養細胞においても、ポリリン酸の合成・蓄積量に影響を与える遺伝子をレポーター遺伝子として利用することにより、プロモーター活性を高効率かつ非侵襲的にモニタリングできる手法を開発することに成功した (*Biotechniques*, vol.42, No.2, 209-215, 2007)。また H18 年度は、酵母細胞を用いた基本転写因子 TFIID の機能解析に着手し、以下の問題点を明らかにした。

1. リボソーム蛋白質遺伝子群 (*RPS*, *RPL*) を統合的に制御する転写因子の活性化シグナルを TFIID がどのように解読しているかを明らかにするために、*RPS5* 遺伝子のコアプロモーター上に存在すると考えられる TFIID 認識エレメントの同定を試みた。その結果、*RPS5* コアプロモーターの転写開始点は上流配列とイニシエーター配列の各々に依存する二重の制御システムによって決定されている可能性が示唆され、今後は両者を分離した上で解析を進めなければならないことが明らかとなった。

2. 本研究において開発した手法を、アミノ酸パーミアーズをコードする *AGP1* 遺伝子に適用することにより、TATA 配列とその約 50bp 下流に転写に必要なコアプロモーターエレメントが存在することを明らかにした。その解析過程において、微妙な転写活性の差を検出する場合には、細胞チップ上にスポットしたコロニーの位置が無視できないレベルの影響を与えることを見出した。

「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、主として In-Cell NMR と In-Cell ESR の研究を進めている。

アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた In-Cell NMR 法の開発では、¹⁵N で標識した種々の蛋白質を卵母細胞に注入し In-Cell HSQC スペクトルを測定し蛋白質の状態を観察した。特に、ユビキチン誘導体 (L8A, I44A, V70A-D77 Ub) を使った実験では、細胞内在性の脱ユビキチン化酵素の活性を検出した。さらに、酵素阻害剤の処理下で経時的に In-Cell HSQC スペクトルを測定することにより、細胞内で起こっているこのペプチド結合の切断を追跡することに成功した (*J Biomol NMR*, **36**, 179-188 (2006))。In-Cell NMR を使って真核細胞内の蛋白質に対するプロセッシングを追跡した例はこれまでになく、重要な成果であると考えている。

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた In-Cell (in situ) ESR による蛋白質の構造解析法の開発も手がけた。ユビキチン誘導体の特定の二カ所にスピンラベルを行い、これをアフリカツメガエル卵母細胞に注入後、凍結し ESR 測定に供したところ、パルス ESR 法によりシグナルを得る事に成功

した。当該手法により、細胞内での蛋白質のコンフォメーション変化をモニターできる可能性が示された。

また、*Xenopus* 卵母細胞における In-Cell NMR 法の開発の一環として、マイクロインジェクション直後の卵母細胞からの注入した蛋白質試料の漏れを容易に検出するための手法を開発した。すなわち、目的とする NMR 試料(^{15}N 標識試料)の 1/10~1/20 量の GFP をあらかじめ注入試料に混ぜておき、それを注入することで、卵母細胞の外液の蛍光強度から、目的試料の漏れを見積もる"dual-microinjection"法である。

哺乳類培養細胞における In-Cell NMR 法の開発の一環として、前年度に引き続き蛋白質トランスダクション(PTD)技術の実用化研究を行った結果、PTD活性を有するペプチドとして HIV-Tat を、細胞内導入をモニターする蛍光標識としてランタニド結合タグを、有する

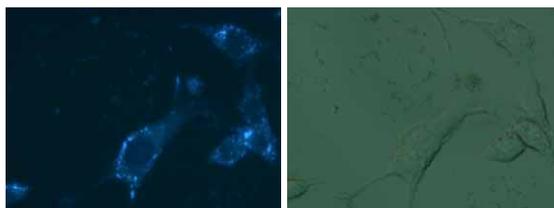


図 1

LBT/PTD-dual tagged ベクターを開発した。この発現システムを用いて両者のタグを融合した蛋白質は、簡単なアフィニティークロマト精製を行うだけで、非常に簡便に高純度に精製できる。細胞内に移行した外来蛋白質は Tb^{3+} の蛍光により蛍光顕微鏡下でモニターできる(図 1)。また、この方法で細胞外から導入された蛋白質の一部がユビキチン化されていることから、一部は細胞質にまで移行していることを実証した(*BBA-Mol Cell Res.* **1773**, 141-146, 2007)。

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。昨年度に引き続き、多次元 NMR 測定に際して非線形サンプリングと最大エントロピー法を用いた手法の改良を行うことで、従来法の 10%程度の測定時間で十分な感度の NMR スペクトルの測定が可能になった。この手法を用いることで、大腸菌内の CaM-EF1 ドメイン(8kDa) 試料について約 7 割の主鎖 NMR シグナルの帰属を行うことができた。また、この手法を試験管内の解析にも適用することで、不安定でかつ溶解度が低い蛋白質や高分子量蛋白質の主鎖 NMR シグナルの帰属にも成功した。

「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。

MRFM 観測は低温環境下で飛躍的な感度向上が見込まれるが、低温環境下且つサブ μm の空間分解能で試料の立体画像を観察するには、低温対応の 3 次元ステージ開発、ならびに、分解能と同等またはそれ以上の位置精度で制御できるステージ位置制御システムが不可欠であった。デジタル処理を含む静電容量式 3 軸同時位置計測センサーを開発した結果、約 15K の低温環境下でステージがセンサーから、それぞれ

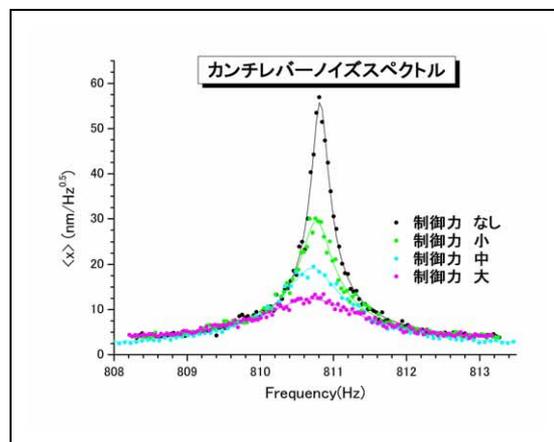


図 2

200 μ m、100 μ m、50 μ m移動したときに約60nm、約30nm、約5nmの位置制御安定度を持つ3次元ステージが完成した。更に、同温度にて走査実験を行いMRFM信号の確認も完了した。

一方、上記ステージの移動は信号を観測するために用いるカンチレバーにノイズを発生させた。また、熱エネルギーによるカンチレバー振動ノイズも信号測定状態を悪化させる原因となる。これらノイズをナノメートル精度でリアルタイム制御するために、フォトン圧力を使った高速デジタル式アクティブ除振システムの開発を実施した。その結果、 μ Wレベルの制御力でカンチレバー振動を抑制できることが定量的に実証できた。カンチレバーを振動させるために従来から用いられているピエゾ素子などのアクチュエータ設置が不必要になり、MRFMプローブ本体の構成を単純化することにも貢献した。

これら2つの要素技術は、原子間力に比べ6桁も小さなMRFMの信号を感度良く安定して測定するために重要であり、今回の成果は高感度・高分解能化に向けたMRFM装置開発における一つの指標をほぼクリアーしたと言える。

「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、昨年度は、多検体試料の比較解析をスムーズに行う系を確立するために、未標識試料の統計解析を推進した。これにより、動植物の様々な変異体資源、ならびに刺激応答に対する初期スクリーニングを行う系を開発した。さらに、多次元NMRメタボミクス物質同定システムSpinAssignの開発、 $^{13}\text{CO}_2$ を用いた植物光合成系の安定同位体標識技術を、特にモデル樹木のポプラや種々の有用作物について行った。加えて、ヒトのモデル動物であるマウスについて、種々の栄養源(糖、脂質、アミノ酸)とそのバランスを変化させた摂食効果・タイミングを検討した。今年度は、また非侵襲計測が可能なマジック角回転法(hr-MAS、固体MAS)を効果的に導入し、不均一試料に特有な解析手段として位置づけていく事とした。

3. 研究実施体制

(1)「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 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

(2)「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(横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 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

(3)「首都大学東京」グループ

①研究分担グループ長：伊藤 隆(首都大学東京大学院理工学研究科 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

(4)「理化学研究所」グループ

- ①研究分担グループ長：菊地 淳((独)理化学研究所植物科学研究センター 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

(5)「日本電子」グループ

- ①研究分担グループ長：吉成 洋祐(日本電子㈱開発本部 副主幹研究員)

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Ki, S., Sugihara, F., Kasahara, K., Tochio, H., Shirakawa, M. and Kokubo, T. “Magnetic resonance-based visualization of gene expression in mammalian cells using a bacterial polyphosphate kinase reporter gene.” *Biotechniques*. **42**, 209-215 (2007).
- Goda, N., Tenno, T., Inomata, K., Iwaya, N., Sasaki, Y., Shirakawa, M. and Hiroaki, H. “LBT/PTD dual tagged vector for purification, intracellular protein delivery and visualization in living cells.” *BBA-Mol. Cell. Res.* **1773** 141-146 (2007).
- Sakai, T., Tochio, H., Tenno, T., Ito, Y., Kokubo, T., Hiroaki, H. and Shirakawa, M. “In-cell NMR spectroscopy of proteins inside *Xenopus laevis* oocytes.” *J Biomol NMR*, **36**, 179-188 (2006).
- 天野剛志・合田名都子・廣明 秀一 「クローズアップ実験法・高効率かつ高速な融合タンパク質発現ベクターの構築法」 *実験医学* **24**, 1675-1680 (2006)
- Kurashima-Ito, K., Moromisato, K., Nishimura, K., Wälchli, M., Tame, J.R.H. and Ito, Y. “Backbone ¹H, ¹³C and ¹⁵N assignments of a 59 kDa *Salmonella typhimurium* periplasmic oligopeptide binding protein, OppA” *Biomolecular NMR Assignments*, *in press*.
- 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* **35**, 53-71, (2006)

- Tian C.J. Chikayama, E., Tsuboi, Y., Kuromori, T., Shinozaki, K., Kikuchi, J. and Hirayama, T. “Top-down phenomics of *Arabidopsis thaliana* –One and two-dimensional NMR metabolic profiling and transcriptome analysis of albino mutants”. *J. Biol. Chem.* (provisionally accepted).
- Sekiyama, Y and Kikuchi, J. “Toward dynamic metabolic network measurement by multi-dimensional NMR-based fluxomics” *Phytochemistry* (in press)
- Sasaki, R., Sasaki, H., Fukuzawa, S., Kikuchi, J., Hirota, H. and Tachibana, K. “Thermal analyses of phospholipid mixtures by differential scanning calorimetry and effect of doping with a bolaform amphiphile” *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (in press).
- Kikuchi, J. and Hirayama, T. “Practical aspects of stable isotope labeling of higher plants for a hetero-nuclear multi-dimensional NMR-based metabolomics”. *Method Mol. Biol.*, 358, 273-286 (2007).

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:1 件)