

「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、遺伝子発現量を反映したポリリン酸量を T1 強調画像で見積もる新規手法について、測定法・データ処理法・細胞チップの作成法等を工夫することで定量性の改善に成功した。動物個体への適用を図るべく、小脳特異的または肝臓特異的に大腸菌 PPK 遺伝子を発現する遺伝子改変マウスを作成した。また基本転写因子 TFIID の機能解析でも複数の興味深い結果を得た。

「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、in-cell NMR 法として、ヒト由来培養細胞に安定同位体標識をした蛋白質を導入し、2 次元 NMR を測定する手法の開発を進めた。また生きた大腸菌内の蛋白質の立体構造決定にも成功した。In-cell ESR 法としては、*Xenopus laevis* 卵母細胞にスピン標識した蛋白質を導入し、凍結した状態で電子-電子二重共鳴スペクトルの測定も行った。また in-cell NMR を短時間で感度良く測定する要素技術の導入や、新規の蛋白質細胞移行シグナル活性を有するペプチド配列の探索とその実用化、蛋白質の細胞導入におけるセンダイウイルスエンベロープベクターを利用した手法の検討も行った。

「蛋白質の細胞内局在の解析手法の開発」については、極低温環境で稼動する磁気共鳴力顕微鏡(MRFM)の研究を進めてきた。各種制御ユニットを統合・高度化した結果、温度 14K にて画像取得に成功した。また、同環境下でも MRFM3次元画像と試料表面の凹凸画像の重畳計測が実現可能になった。生体試料調製用グローブボックスも製作した。今後は冷却法を基礎とする調

整作業を検証し、生体試料に対する画像取得実験を実施する。

「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、多検体試料の比較解析をスムーズに行うために、未標識試料の統計解析を推進した。加えて、植物への安定同位体標識技術、動物や共生微生物への摂食効果・タイミングの検討などにも進展があった。また、代謝フラックス解析により、動植物個体内での物質動態を追跡できる可能性も示した。

## 2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

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、出芽酵母が液胞内に著量蓄積するポリリン酸を  $^{32}\text{P}$ -MRI 法を用いて画像化することにより、非侵襲的にプロモーター活性を測定し得る新規アッセイ系を確立した。また T1 強調画像と  $^1\text{H}$ -MRI 画像を取得し、両者を比較することによってさらなる高感度化・ハイスループット化を目指したが、この方法では予想以上にコロニーごとのバラツキが大きく、定量性に乏しいという結果を得た。そこで H19 年度は、測定法・データ処理法・細胞チップの作成法等を全面的に見直し、種々の改良を加えることにより、定量性を大幅に改善すること成功した。また昨年度に引き続き、基本転写因子 TFIID の機能解析を目的として、TATA-dependent, TATA-independent プロモーターの解析を進め、以下の成果を得た。

出芽酵母のリボソーム蛋白質遺伝子群を統合的に制御する転写因子 RAP1-FHL1-IFH1-HMO1 について解析を行い、FHL1, HMO1 が TFIID と協働し、転写開始点の決定に関与することを示した[1,2]。また *RPS5* 遺伝子の TATA-independent コアプロモーター上に存在する 3 種類の TFIID 認識エレメント(コアプロモーターエレメント; CE) を見出した。また、*AGP1* 遺伝子の TATA 配列から約 50bp 下流の配列 X (-60~-51bp) が転写開始エレメント(イニシエーションエレメント; IE) として機能することも見出した。

その他、動物個体に対しても本法の適用を図るべく、小脳特異的または肝臓特異的に大腸菌 PPK 遺伝子を発現する遺伝子改変マウスを作成した。

「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 の研究を進めた。

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた *in-cell* NMR 法の開発では、 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  標識された蛋白質を注入し多重共鳴三次元 NMR スペクトルを測定した。その結果、幾つかのクロスピークを観測する事ができたが、解析対象とするには更なる感度の改善を要すると考えている。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた *in-cell* ESR 測定については、特定の二カ所にスピラベルを導入したユビキチン誘導体を注入後凍結し、スピラベル間の距離をパルス ESR 法によって測定することに成功した。

哺乳動物細胞の *in-cell* NMR に関しては、①安定同位体標識された蛋白質の細胞導入の高効率化、②細胞内蛋白質の NMR 測定と解析手法の改良、を進め、多くの成果を挙げる事ができた。①については、哺乳動物培養細胞に対する蛋白質細胞移行シグナルの更なる検討を行い、ヒト血中に存在する IGFBP-3 および IGFBP-5 の配列に含まれるヘパリン結合領域配列を含むペプチドが、外

来の蛋白質に融合させた状態であっても細胞内に移行する活性が存在することを見出した(図 1)。この発見は、蛋白質動態非侵襲計測の分野に新たな方向性を示す発見であるばかりでなく、IGFBP の有する IGF 非依存的生理活性の発揮メカニズムを解明するうえで、生理学的にも、大きな発見である。また、*in-cell* ESR ないし MRFM 測定試料調製法の基盤技術として、センダイウイルスエンベロープベクターを利用した蛋白質の細胞内導入法の条件検討を行った。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新規手法を開発した[3]。

②については、迅速な多次元これまで開発を行ってきた迅速な多次元 NMR 測定法を適用することによって、生きた大腸菌の中の高度好熱菌 TTHA1718 蛋白質の立体構造決定に成功した。

アポトーシスを起した細胞の可視化を目的として、金属の常磁性効果と  $^{19}\text{F}$ -NMR を結び付けた新しいコンセプトに基づいた、分子プローブを考案した。これは、図 2 に示すように常磁性効果を示すガドリニウムを含有するエフェクター部分とシグナルを与える  $^{19}\text{F}$  を含むプローブ部分が、酵素によって切断可能なペプチド(センサー部分)によって繋がれた構造を持つ。*In vitro* のファントム実験によって、*caspase-3* によってセンサー部分が切断される事で高コントラストのスィッチングが可能であることが示され、このコンセプトが有効であると実証した[4]。

「蛋白質の細胞内局在の解析手法の開発」については、飛躍的な高感度かつ空間分解能

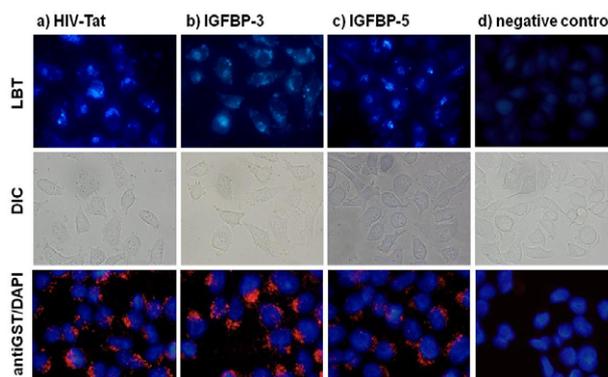


図1. HeLa 細胞に取り込まれた IGFBP-3/5 ペプチド融合蛋白質の蛍光顕微鏡像

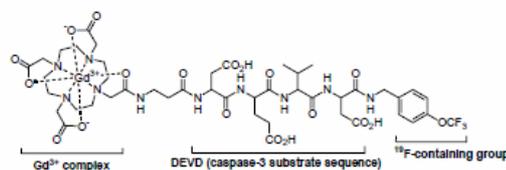


図 2. 新規 NMR、MRI 分子プローブの分子構造

で3次元画像が観測できる極低温 MRFM 装置を開発している。現在までに同環境下で稼動する3次元ステージと、レーザー（フォトン）の輻射圧効果または光熱変換効果）を使ったカンチレバー振動ノイズ除振システムを開発した。H19年度では、これらの制御ユニットやMRFM装置ソフトを統合・高度化した結果、温度14KでMRFM画像の取得に成功した。右図はT=14Kにて観測したMRFM画像と、同じ方向から撮影したSEM写真とを比較表示している。装置性能などを評価するために、安定したラジカルを含む有機化合物DPPHをカンチレバーに一粒固定した。左側はSEM写真(下段:カンチレバーを正面方向から見た写真、上段:上方向からみた写真)、右側は同じ方向から見たMRFM二次元画像を示しカラー表示の色調はスピン密度を示す。検出感度は室温に比べ154倍改善されたことを確認し、感度から評価される到達可能な空間分解能は約160nmと見積もられた。

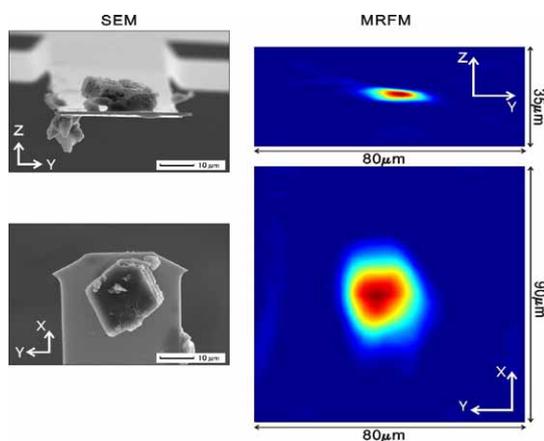


図 3. SEM 画像と T=14K にて観測した MRFM 画像

一方、MRFM 測定による三次元画像と試料表面の凹凸画像を同視野内で重畳する手法を考案し、実証に至った[5]。更に、上述した各種制御ユニットの統合によって、極低温環境でも本手法の実現が可能になった。

「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」では、植物個体の均一安定同位体標識、動物や微生物の標識などについて研究を行っており、具体的には、前者については、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、後者については、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ている。さらに、標準試料を用いたデータベース・ソフトウェア開発や、抽出試料を用いて正確な物質同定法の開発を中心に行ってきた。今年度は、NMR代謝物解析の基盤作りを掲げ、未標識試料の多検体プロファイリング解析技術、植物、動物の安定同位体標識技術、代謝物抽出技術、物質同定を含むNMR解析技術、データベース構築、メタボローム公共Webサイト(PRIME)の開発、を主に進めてきた。これらの基盤技術を用い、植物変異体リソースの代謝プロファイリング解析に関しては、JBC誌に掲載する事ができた[6]。加えて、安定同位体標識の代謝フラックス解析という、新しい方向性を開拓する事も可能となった[7]。このように、抽出物を用いた代謝産物群解析の基盤技術開発に関しては順調に進んでいるため、非侵襲計測の系を早く開拓し、生物学的にインパクトのあるデータを得たいと考えている。

### 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、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、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、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(理化学研究所、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(日本電子株式会社、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

#### (6)「神戸大学」グループ

① 研究分担グループ長: 廣明 秀一(神戸大学大学院、特命教授)

② 研究項目

・細胞内蛋白質動態の非侵襲計測のための基礎技術の開発

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

1. Kasahara, K., Ohtsuki, K., Ki, S., Aoyama, K., Takahashi, H., Kobayashi, T., Shirahige, K. and Kokubo T. "Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6686-6705 (2007).
2. Kasahara, K., Ki, S., Aoyama, K., Takahashi, H. and Kokubo, T. "*Saccharomyces cerevisiae* HMO1 interacts with TFIID and participates in start site selection by RNA polymerase II." *Nucleic Acids Res.* **36**, 1343-1357 (2008).
3. Sakai, T., Inomata, K., Sasaki, Y., Tenno, T., Tanaka, T., Kokubo, T., Tochio, H., Hiroaki, H. and Shirakawa, M. "Fluoroscopic assessment of protein leakage during *Xenopus* oocytes in-cell NMR experiment by co-injected EGFP." *Anal. Biochem.* **371** 247-249. (2007).
4. Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Hori, Y., Tochio, H., Waelchli, M., Shirakawa, M. and Kikuchi, K. "Paramagnetic Relaxation-Based <sup>19</sup>F MRI Probe to Detect Protease Activity" *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 794-795 (2008)
5. Tsuji, S., Yoshinari, Y., Kawai, E., Nakajima, K., Park, H.S. and Shindo, D. "Magnetic Resonance Force Microscopy Combined with Surface Topography" *J. Magn. Reson.* **188**, 380-386 (2007).
6. 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.* **282**, 18532-18541 (2007).
7. Sekiyama, Y. and Kikuchi, J. "Towards dynamic metabolic network measurement by multi-dimensional NMR-based fluxomics" *Phytochemistry* **68**, 2320-2329 (2007).

##### (2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:2 件(CREST 研究期間累積件数:3件)