

「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

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

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、遺伝子発現量をポリリン酸量により見積もる新規手法を出芽酵母のプロモーター解析に適用する過程において、従来の考え方とは異なる新規の分子機構により転写開始点が決定されていることを見出した。また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、MRI 測定に着手した。各々数系統のトランスジェニックラインを作製したが、いずれについてもポリリン酸を検出することは出来なかった。今後は測定系の感度を向上させる必要があるものと考えられる。

「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、H19 年度までに基礎となる技術を確立していた、ヒト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 in-cell NMR 法の手法開発をさらに進めた。また、応用研究として、細胞内蛋白質の蛋白質-蛋白質、蛋白質-薬剤相互作用や細胞内での蛋白質の安定性の解析に In-cell NMR が有効である事を示した。また NMR 測定手法や構造計算手法の工夫により、生きた大腸菌内の蛋白質の立体構造を世界に先駆けて決定した。In-cell ESR 法として、凍結した *Xenopus laevis* 卵母細胞内の蛋白質のスピン標識間の距離分布がパルス ESR 測定によって計測できる事を示した。これらと並行して、哺乳動物細胞を利用した In-cell NMR の基盤技術として昨年度に開発した「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 IGFBP-3/5」について精査し、IGFBP-3/5 由来 PTD ペプチドの細胞内移行メカニズムが、ヘパリン依存的エンドサイトーシス経路であることを明らかにした。更に、HIV-Tat 由来の PTD との細胞内移行速度の違い(3~6倍遅い)の原因をしらべるために、ヘパリン結合状態での IGFBP-3/5 由来 PTD ペプチドの NMR 立体構造決定の着手を始めた。

「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頭

微鏡(MRFM)の研究を進め、同環境下で MRFM 三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。平成 20 年度では、生体試料を MRFM プローブに輸送し低温環境に導入するための手法検証がほぼ完了し、タマネギ表皮細胞の二次元画像が低温環境で観測できる状況になった。また、カンチレバーに微小磁石を設置する技術開発も完了し、その磁石搭載カンチレバーを使った信号検出技術の検証を新規 MRFM プローブを用いて実施している。

「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、開始当初から行ってきた植物個体への安定同位体標識技術を高度化し、植物生理学の教科書を塗り替えるステロール合成経路の解明に至ることができた。植物に加えて動物への安定同位体標識技術と多次元 NMR 解析を駆使し、代謝経路全体を鳥瞰する新手法を開発するに至った。

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、基本転写因子 TFIID と密接に連携して働くメディエーター複合体の活性制御サブユニット Med9p の機能解析を進めるとともに、遺伝子発現量をポリリン酸量により見積もる新規手法を確立し、複数の出芽酵母遺伝子由来のプロモーターへの適用を試みた。その結果、プロモーターごとに測定に適した培養時間は異なることが明らかとなり、少なくとも *AGPI*(アミノ酸パーミアーズ)については、ランダム配列のプールから TATA 配列を転写活性により選抜可能であることが示された。一方、*ENO2*(エノラーゼ)、*RPS5*(リボソーム蛋白質)については本法により TFIID 認識配列を決定することが出来なかったが、その原因は転写開始点がこれまで考えられていた以上に複雑な分子機構により選択されているためであることが明らかとなった。また小脳プルキンエ細胞特異的(L7 プロモーター)または肝臓特異的(アルブミンプロモーター+Cre-loxP)に大腸菌 *PPK* 遺伝子を発現する遺伝子改変マウスを数系統ずつ作成し、MRS/MRI 測定に着手した。PPK 蛋白質の発現を免疫染色により確認することは出来たものの、いずれのマウスについても MRS/MRI によりポリリン酸を検出することは出来なかった。今後は測定系の感度の向上を図るとともに、hydrodynamic pressure による遺伝子導入を試みる予定である。

「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。

哺乳動物細胞の in-cell NMR に関しては、H19 年度までに基本的な手法開発をさらに推し進めて、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、③導入された蛋白質の細胞内局在の解析、を行った。その結果、良好な

in-cell NMR スペクトルの観測には、①Cell permeating peptide (CPP)が結合した目的蛋白質が、pyrenebutyrate 処理する事で細胞質に導入される事、②細胞内で CPP が目的蛋白質から切り離される事、が必要である事が判った¹⁾。本手法により、3種類の蛋白質をヒト HeLa 細胞に導入し、良好な in-cell NMR スペクトルを測定することに成功した。またサル Cos-7 細胞においても in-cell NMR スペクトルが得られる事を確認し、本手法が幅広い細胞に使用できる可能性を示した¹⁾。in-cell ESR 測定については、アフリカツメガエル卵母細胞内の、特定の二カ所にスピントラベルを導入した 2 種類のユビキチン誘導体について凍結細胞試料の二重電子・電子共鳴 (DEER) を測定した。その結果、細胞内蛋白質の長距離構造情報をパルス ESR 法によって収集可能である事を示した。

また、細胞内蛋白質の NMR 測定と解析手法の改良も引き続いて行った。H19 年度は、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が²⁾、H20 年度はより高分子量の蛋白質の高次構造解析を可能にする手法の確立を模索するとともに、生きた大腸菌細胞中の ¹⁵N 核の緩和時間の解析を行うことで、細胞内環境における蛋白質の動的性質の解明を試みた。解析の結果、細胞内の粘度に対応する回転相関時間の増大に加えて、何らかの原因による ¹⁵N 核の T_2 緩和時間の著しい短縮が観測された。この知見は、細胞内環境における蛋白質の安定性と関係している可能性があり非常に興味深い²⁾、今後さらに詳細な解析を行っていく必要がある。

また、昨年度から継続して、我々が新規に発見した IGFBP-3/5 由来 CPP ペプチドの細胞内移行メカニズムについて検討した。解析の結果、(1)HIV-Tat と IGFBP-3/5 の細胞内移行経路が、少なくともその初期段階において共通していること、(2)その初期段階とはヘパリン依存的エンドサイトーシス(マクロピノサイトーシス)経路であることが示唆された(図 1)。IGFBP-3/5 ならびに CPP の細胞内移行過程

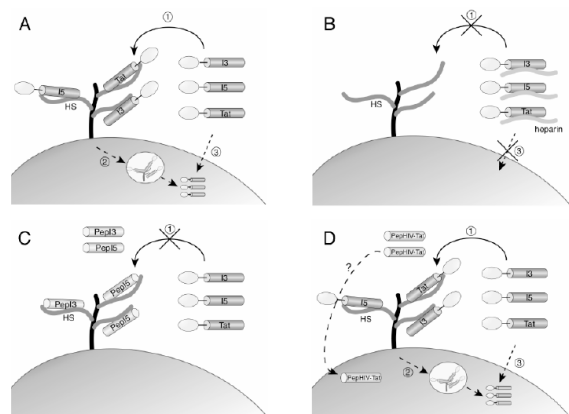


図 1: PTD 細胞内取り込み経路の模式図。A:ヘパリン依存的エンドサイトーシス(①②)と細胞膜透過(③)の経路の両方が考えられる。B:ヘパリンの添加は経路①と③を阻害する。C:IGFBP-3/5 ペプチドの添加は、①を阻害するが、D:Tat ペプチドはそれ自身が膜透過をしてしまうため①の経路を阻害できない。

に関する知見は、京大グループで進められている CPP を用いた哺乳動物細胞での細胞内 NMR 法の開発に関連し、実験結果解釈に活用できた。また、CPP が一次受容体であるヘ

パリンに結合した際の立体構造や物理的テンションが、マクロピノサイトーシス開始のシグナルになっているのではないかと考え、ヘパリンに結合状態の PTD ペプチドの NMR による解析を行った。具体的には、IGFBP-3, IGFBP-5, HIV-Tat それぞれの大腸菌での発現・精製系の構築と、安定同位体標識、NMR 滴定実験を行い、さらに IGFBP-5 ペプチドの主鎖・側鎖シグナルの帰属を完了した。Transferred NOE による IGFBP-5 のヘパリン結合状態の解析から、IGFBP-5 はヘパリン上で均一な特定の立体構造をとっていないことがわかった。CD スペクトルによる解析でも、ヘパリン存在下、IGFBP-5 ペプチドに有意な二次構造の誘起が見られなかったのに反し、HIV-Tat ではヘリックスの誘導が見られた。ヘパリン結合状態での CPP の構造と、細胞内にとりこ

まれる速度(HIV-Tat は速く IGFBP-5 は遅い)の差について、構造活性相関の見地からの研究が重要であることが示唆された。

「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で三次元画像が観測できる極低温 MRFM 装置を開発している。昨年度までに、MRFM 装置の制御ソフトウェア最適化と極低温実験環境の構築を完了し、数ミクロンの大きさを持つファントム (DPPH) に対する三次元立体画像の観測に成功した。極低温・真空といった環境は二桁以上の感度向上を図るために必須である一方、生体試料の測定には工夫が必要である。H20 年度では、製作した試料準備グローブボックスを用いて生体試料を MRFM プロブに輸送し低温環境に導入するための手法確立に注力した。その結果、凍結手法と冷凍試料の輸送工程について検証がほぼ完了し、タマネギ表皮細胞の二次元画像が低温環境

下で観測できる状況になった。また、ミクロンサイズの球形磁石をカンチレバーに搭載する技術開発も完了し、現在、磁石搭載カンチレバーと新たに製作した MRFM プロブを使って、信号検出技術の検証ならびに表面画像と MRFM 画像の取得実験を実施している。これらの作業の確認を持って、他グループが調製した生体試料に対する MRFM 測定を実施していく予定である。

「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」では、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代謝物質同定法の開発を中心に行ってきた。今年度は、データベース構築、メタボローム公共 Web サイト (PRIME) の開発について、バイオインフォマティクスの専門誌に受理させることができた。

こうした NMR メタボロームの基盤技術開発に加えて、開始当初から行ってきた植物個体への安定同位体標識技術を高度化し、植物生理学の教科書を塗り替えるステロール合成経路の解明に至ることができた。さらに、動物への安定同位体標識も行い、マウス腸内での有用腸内細

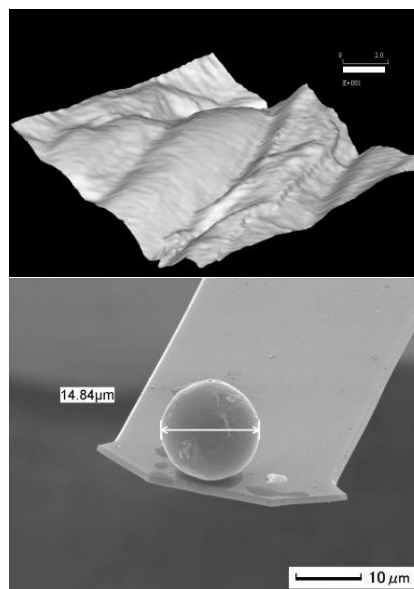


図 2 (上) T=80K で取得したタマネギ薄皮の二次元表面画像(図中スケールは 20 μm)、(下) 球形微小磁石を固定したカンチレバーの SEM 像

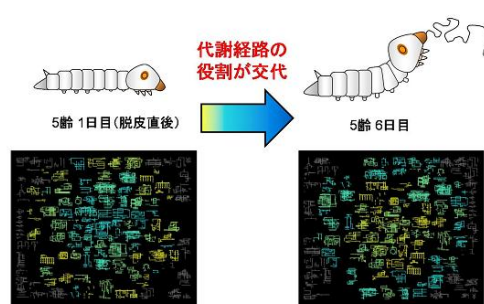


図 3 安定同位体 ^{13}C の代謝過程を追跡し、代謝経路全体を網羅的に観察する

菌(プロバイオティクス候補) *B.reuteri* による抗菌物質の *in vivo* 検出、さらにはカイク脱皮前後における代謝動態全体を鳥瞰する新手法の開発(図 3)を達成することができた。

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、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((独)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)、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、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. Inomata, K., Ohno, A., Tochio, H., Isogai, S., Tenno, T., Nakase, I., Takeuchi, T., Futaki, S.,

- Ito, Y., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature* 458, 106-109 (2009)
2. Sakakibara, D., Sasaki, A., Ikeya, T., Hamatsu, J., Hanashima, T., Mishima, M., Yoshimasu, M., Hayashi, N., Mikawa, T., Wälchli, M., Smith, B.O., Shirakawa, M., Güntert, P. & Ito, Y. "Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy." *Nature* 458, 102-105 (2009)
 3. Tateishi, Y., Ariyoshi, M., Igarashi, R., Hara, H., Mizuguchi, K., Seto, A., Nakai, A., Kokubo, T., Tochio, H. & Shirakawa, M. "Molecular basis for SUMOylation-dependent regulation of DNA binding activity of Heat Shock Factor 2." *Journal of Biological Chemistry* 284, 2435-2447 (2009)
 4. Inomata, K., Tsuji, S., Yoshinari, Y., Park, S. H., Shindo, D., "Substantial Contribution to a Cantilever Resonance Frequency Shift in Magnetic Resonance Force Microscopy", *J. Phys. Soc. Jpn.*, 78, 033602-1-3 (2009).
 5. Sekiyama, N., Ikegami, T., Yamane, T., Ikeguchi, M., Uchimura, Y., Baba, D., Ariyoshi, M., Tochio, H., Saitoh, H. & Shirakawa, M. "Structure of the SUMO-interacting motif of MBD1-containing chromatin associated factor 1 (MCAF1) bound to SUMO-3." *Journal of Biological Chemistry* 283, 35966-35975 (2008)
 6. Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Nakamura, Y. & Shirakawa, M. "Hemi-methylated DNA recognition by the SRA protein Np95 via a base flipping mechanism." *Nature* 455, 818-821 (2008)
 7. Kuwahara, Y., Ohno, A., Morii, T., Yokoyama, H., Matsui, I., Tochio, H., Shirakawa, M., & Hiroaki, H. "The solution structure of the C-terminal domain of NfeD reveals a novel membrane-anchored OB-fold." *Protein Science* 17, 1915-1924 (2008)
 8. Kimura, T., Kato, Z., Ohnishi, H., Tochio, H., Shirakawa, M. & Kondo, N. "Expression, purification, and a structural analysis of human IL-18 binding protein: A potent therapeutic molecule for allergy." *Allergology International* 57:367-376 (2008)
 9. Goda, N., Tenno, T., Inomata, K., Shirakawa, M., Tanaka, T. & Hiroaki, H. "Intracellular protein delivery activity of peptides derived from insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5." *Experimental Cell Research* 314, 2352-2361 (2008)
 10. Takahashi, H., Kasahara, K. & Kokubo, T. "*Saccharomyces cerevisiae* Med9 comprises two functionally distinct domains that play different roles in transcriptional regulation." *Genes Cells*. 14, 53-67 (2009)
 11. Terada, T., Satoh, D., Mikawa, T., Ito, Y. & Shimizu, K. "Understanding the roles of amino acid residues in tertiary structure formation of chignolin by using molecular dynamics simulation." *Proteins* 73, 621-631 (2008)
 12. Chikayama, E., Suto, M., Nishihara, T., Shinozaki, K., Hirayama, T. and Kikuchi, J.

“Systematic NMR analysis of stable isotope labeled metabolite mixtures in plant and animal systems: Coarse grained views of metabolic pathways” *PLoS ONE* 3, e3805 (2008).

13. Ohyama, K., Suzuki, M., Kikuchi, J., Saito, K. and Muranaka, T. “Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in Arabidopsis” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 725-730 (2009).
14. Akiyama, K., Chikayama, E., Yuasa, H., Shimada, Y., Tohge, T., Shinozaki, K., Hirai-Yokota, M., Sakurai, T., Kikuchi, J. and Saito, K. “PRIME: a web site that assembles tools for metabolomics and transcriptomics” *In Silico Biology* 8, e27 (2008).
15. Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Ohshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Ito, K., O’Sullivan, D. J., McKay, L. L., Ohno, H., Kikuchi, J., Masaoka, T. and Hattori, M. “Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production” *DNA Res.* 15, 151-161 (2008).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：4 件）