

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 (独立行政法人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(独立行政法人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 情報を繰り込んだ構造探索
- ・分子クラウディ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。これにより、蛋白質が実際に機能している場における真の姿に迫る「*in situ* 構造生物学」の創設を目指す。

具体的な研究内容としては、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。

上記①の研究内容については、以下の 5 つのサブテーマについて研究を行った。

まず、「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」については、木川グループが開発中の「符号化標識法」にベイジアンスペクトル分解の手法の適用を行うことで重複シグナルの解析が著しく改善されたことから、実際の in-cell NMR の系における主鎖 NMR シグナルの帰属の技術基盤が確立された。

「迅速な多次元 NMR 測定、および高精度データ処理技術の開発」においては、開発中の次世代データ処理法にさらに改良を加え、より品質の高い再構成 NMR スペクトルを得ることを可能にした[1]。

真核細胞内蛋白質の構造情報取得のための「in-cell 常磁性 NMR 測定法の確立」については、ランタノイドと高い親和性を持ち、細胞内の還元的環境でも安定な新規分子プローブの合成を行い、このプローブを結合した蛋白質を HeLa 細胞内に導入して、非常に良好な in-cell 常磁性 NMR スペクトルを取得することに成功した。

「In-cell NMR に最適化した部位特異的安定同位体標識法」の開発では、SAIL アミノ酸を用いたメチル基選択的標識と、無細胞蛋白質合成系を用いた ^{19}F 標識について良好な結果を得た。

さらに、「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」については、昨年度開発したベイズ統計を用いた立体構造計算法を sf9 内蛋白質の立体構造解析に適用し、限られた NOE 情報から「真の立体構造」に近い立体構造のアンサンブルを得ることに成功した(図)。

上記②の研究内容については 2 つのサブテーマで研究を行った。

「新しい拡張アンサンブル法の開発による NMR 情報を繰り込んだ構造探索」では、分子動力学シミュレーションと NMR 情報を組み合わせるために、回転緩和に注目して実験データとシミュレーションの比較を進めた。シミュレーションから回転緩和の時定数を計算する手法は十分に確立して

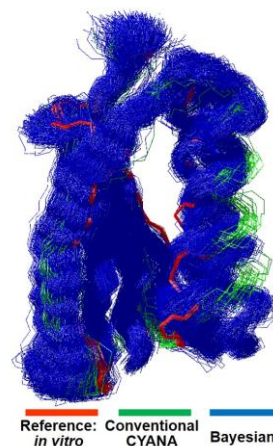


図. sf9 細胞内の protein G B1 ドメインについて、限られた距離情報からベイズ統計を用いた新しい手法で計算した立体構造(b, 青). レファレンス(赤), 従来法(緑)と比較して示した。

いないため、現在複数の手法を試して最も安定に時定数を計算できる方法を探索している。

「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、水や Crowder も含めた巨大な分子系のシミュレーションを効率よく行うための手法開発を行った。具体的には効率的なサンプリングのためのメタダイナミクスという計算手法の開発に取り組み、さらにこの手法を杉田グループが開発中のプログラム GENESIS に組み込みことで、良好な結果を得た。

上記③の研究については、薬剤スクリーニングの効率化のために、化合物の膜透過性と標的蛋白質上のデザインされた部位への結合を細胞内で簡便に解析するための in-cell NMR 手法の開発を開始した。

[1] Shigemitsu, Y. et al. “Evaluation of the reliability of the maximum entropy method for reconstructing 3D and 4D NOESY-type NMR spectra of proteins”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 200-205 (2015)