

2021 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：児嶋 長次郎

所属機関名・部局名・職名：横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

(3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

超高感度 NMR を用いた生細胞内蛋白質の構造・機能解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：藤原敏道 (研究室名：機能構造計測学)

(5) 研究成果の概要 (公開)

(背景) 代謝産物など生細胞内の物質を NMR で検出する手法(in vivo NMR)は半世紀以上前から利用されているが、生細胞内の蛋白質を NMR で直接検出する技術(in cell NMR)はこの 20 年ほどで開発されてきた比較的新しい手法である。大腸菌では 2001 年にゲーテ大 Dötsch らが、アフリカツメガエル卵母細胞では 2006 年にハーバード大 Wagner らと京大白川ら、昆虫細胞では 2013 年に首都大伊藤ら、それぞれ細胞内蛋白質の NMR 検出に成功している。ヒト細胞での生細胞内 NMR 法は、2009 年に京大白川らによって HeLa 細胞で開発され、2013 年にフィレンツェ大 Banci らが HEK293T 細胞で、2016 年にイスラエル Weizmann 研究所 Selenko らが A2780 細胞・SK-N-SH 細胞で成功している。生細胞内蛋白質の立体構造決定技術は 2009 年に首都大伊藤らによって開発された。伊藤らは 2019 年に昆虫細胞中での立体構造決定にも成功しているが、再現性や感度不足などに起因する構造情報の不足により、成功例は大腸菌と昆虫細胞の 2 例に限られる。ヒト生細胞内蛋白質の立体構造決定はまだ報告されていない。

(目的) 本研究の目的は、ヒト生細胞内での蛋白質の静的な高分解能構造と動的な構造変化を解析する 2 つの生細胞内 NMR 技術を開発し、「ヒトの細胞内で働いている蛋白質の姿は我々の知る蛋白質構造と同じなのか？」という問いに答えることにある。具体的には、独自技術で超高感度化に成功した生細胞内 NMR 法を用いたヒト生細胞内蛋白質の高分解能構造解析技術を開発するとともに、ヒト生細胞内蛋白質の立体構造変化やリン酸代謝のリアルタイム計測技術を開発し、バッファー中での結果と比較する。蛋白質研究所の超高感度 NMR 装置群の利用は本研究の主軸をなす生細胞内 NMR の高感度検出に必須である。

(方法) ①時間分解能の高い 2D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルと 1D ^{31}P スペクトルを用い、ヒト生細胞内の蛋白質の立体構造変化やリン酸代謝を分単位精度でリアルタイム検出する技術を確立し、細胞内の経時変化を解析する。また、②バッファー中とヒト細胞中での立体構造や運動性の違いを明らかにするとともに、蛋白質間相互作用や蛋白質薬剤相互作用など分子間相互作用の違いについても解析を進める。

(結果) 項目①では、ヒト生細胞内蛋白質の時間分解能の高い 2D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの測定を行い、

【2021 研究成果報告書（共同研究員・NMR・クライオ・客員フェロー）】

ヒト生細胞内での立体構造変化や細胞内環境変化を高い次回分解能でのリアルタイム検出に成功し、細胞内小胞の酸性化過程を原子分解能、かつ、高時間分解能で明らかにした。項目②では、バッファー中とヒト細胞中での立体構造や運動性を比較し、立体構造に大きな違いがないこと、運動性に大きな違いがあることを明らかにした。また、蛋白質薬剤相互作用はバッファー中とヒト細胞中で類似しているものの明確な違いがあることを明らかにした。