

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：22604

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05773

研究課題名(和文)生命金属動態解析を可能とするin-cell NMRによる金属タンパク質研究

研究課題名(英文)In-cell NMR studies of metalloproteins

研究代表者

伊藤 隆(Ito, Yutaka)

東京都立大学・理学研究科・教授

研究者番号：80261147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 60,100,000円

研究成果の概要(和文)：(1) In-cell NMRの手法開発と高度化，(2) NMRを用いた金属動態に関わる蛋白質の解析，(3) In-cell NMRを用いた応用研究，の研究を行った。

(1)では、「植物培養細胞を用いたin-cell NMR解析法」，「常磁性NMR情報を用いたマルチドメイン蛋白質の立体構造解析法」などの開発を行った。(2)では，ダイズ根粒菌二成分情報伝達系FixJ/FixLなどについて解析を行い，FixJについては，溶液状態の立体構造決定，FixLとの相互作用やリン酸化の影響の解析を行った。(3)では，ヒト培養細胞内で不安定な蛋白質のin-cell NMR解析法などで成果が出た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In-cellおよび溶液NMR測定・解析技術の高度化と汎用化を行うことで，これまで解析が困難であった様々な金属結合蛋白質の溶液状態の動態，細胞内の動態を詳細に解析することができるようになった。細胞内でのマルチドメイン蛋白質のドメイン間相対配置の解析も可能になりつつある。特にFixJの溶液構造解析や，FixLとの相互作用やリン酸化の解析では生物学的に興味深い結果を得ることができた。In-cell NMRは，細胞内の標的蛋白質と低分子の相互作用を指標にした阻害剤探索にも応用可能である。基礎科学のみならず，先端医療や創薬科学などの産業にも波及的効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have studied on (1) development of in-cell NMR methods, (2) analysis of biometal-related proteins using solution and in-cell NMR spectroscopy, and (3) potential applications of in-cell NMR.

In (1), we developed an in-cell NMR method using cultured plant cells and a method for 3D structural analysis of multi-domain proteins using paramagnetic NMR information. In (2), we analysed the rhizobial two-component signal transduction system FixJ/FixL system. For FixJ, we determined the detailed solution structures as well as analysing the interaction with FixL and the effect of phosphorylation. In (3), results were obtained for in-cell NMR analysis of unstable proteins in human cultured cells.

研究分野：構造生物化学

キーワード：In-cell NMR 溶液NMR 金属結合蛋白質 立体構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内は多種多様な分子が高密度で存在する「分子クラウディング」状態である。分子クラウディングがもたらす酵素活性に対する効果や、立体構造変化、フォールディング安定性など、蛋白質は、試験管内の希薄溶液中とは異なる構造や振る舞いをする事が明らかになりつつあった。細胞試料を直接 NMR 測定する in-cell NMR は、生細胞中蛋白質の動態を原子分解能で解析可能な現存する唯一の手法として注目されていた。金属結合蛋白質の動態についても、細胞内では、クラウディング環境特有の相互作用（排除体積効果・非特異的相互作用）に加え、様々な「生命金属」イオンとの結合や、機能発現に関わる他の因子との特異的相互作用により強い影響を受けていると予想され、これら金属イオンと蛋白質の結合を生きた細胞内で観測することには大きな意義が認められていた。

ヒトをはじめとする哺乳類由来の培養細胞を用いた in-cell NMR 解析が近年大きく発展している一方で、例えば植物培養細胞中では未だに NMR 測定の成功例はほとんどない。そこで、in-cell NMR の適用範囲を大きく広げ、外界の刺激に対する植物由来蛋白質の応答の構造的基盤を解明するために、方法的な開発研究を行うことを着想した。

2. 研究の目的

In-cell NMR 測定技術の高度化・汎用化とその実証、様々な培養細胞への適用を行い、多種多様な金属結合蛋白質の細胞内動態の詳細な解析を可能にすることで「生命金属科学研究基盤の構築」に寄与することを目的とした。さらに、最先端の溶液 NMR 測定・解析手法、情報科学を用いた蛋白質の立体構造解析法を領域内の他の研究者に鋭意提供し、さらにニーズに合わせて測定・解析技術のさらなる高度化・最適化を行うことによって、研究領域に参画する他の研究者の研究目的の達成にも貢献することを目指した。

3. 研究の方法

《生命金属科学基盤構築》のために、NMR による金属結合蛋白質が関与する生命現象の in situ 解析を目指し、以下の研究を行うこととした。

(1) 『In-cell NMR の手法開発と高度化』では、金属結合蛋白質の細胞内環境における立体構造、ドメイン間相対配置、金属イオンの蛋白質フォールディングに対する影響、ダイナミクスの解析を可能にする技術を確立し、汎用的で信頼性の高い in-cell NMR 解析基盤を構築することとした。具体的には、植物培養細胞の in-cell NMR 解析系の確立を試みた他、常磁性 in-cell NMR 手法の開発も行った。常磁性ランタノイドイオン (Ln^{3+}) が誘起する常磁性 NMR 効果は、従来法よりも広い距離範囲の立体構造情報を感度よく与えるため、in-cell NMR に有用である。

(2) 『In-cell NMR を用いた金属動態に関わる蛋白質の解析 (実証研究)』では、ヘム結合蛋白質、金属結合酵素、金属輸送体などの動態の in-cell NMR 解析を試み、金属動態に関わる疾病機序の構造的基盤解析に貢献することとした。具体的には、領域内研究者が取り組んでいる生物学的に重要な金属結合蛋白質の細胞内動態解析を進め、生物機能発現の細胞内環境を加味した構造的基盤を明らかにしていく計画であった。それぞれの蛋白質について、安定同位体 (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F など) 標識試料の調製を試み、レファレンスである希薄溶液中の NMR 測定と、in-cell NMR 測定を行い、比較することによって、標的蛋白質の細胞内動態の解明を目指した。

(3) 『In-cell NMR を用いた応用研究』では、細胞内蛋白質と低分子化合物との相互作用を指標とした、スクリーニング技術の開発を試みる。In-cell NMR を用いることで、薬剤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簡便に解析できる可能性があった。金属結合蛋白質や金属動態に関与する蛋白質試料 (特に疾病と関連がある試料) について研究を行う計画であった。

4. 研究成果

(1) 『In-cell NMR の手法開発と高度化』では、まず、植物培養細胞を用いた in-cell NMR 解析法の開発を行った。In-cell NMR は、生細胞中の蛋白質を原子分解能で解析可能な現存する唯一の手法であるが、様々な困難さから、高等植物細胞を用いた例は未だ報告がなく、植物由来の蛋白質の植物細胞中での解析ができないでいた。そこで本研究では、植物培養細胞 *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2 を用いて、植物細胞の in-cell NMR の確立を目指した。植物細胞の細胞壁は、in-cell NMR で通常用いられる、電気穿孔による蛋白質導入の障害になると考えられた。そこで、細胞壁を酵素処理してプロトプラストを調製し、これに電気穿孔を用いてモデル蛋白質試料を導入する方法を検討した。モデル蛋白質としては、ヒト由来のコピキチン変異体 (hUB3A) を用いた。BY-2 のプロトプラストに対して電気穿孔で ^{15}N 標識 hUB3A を導入し、 ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC スペクトルの測定を試みた。プロトプラストに効率よく蛋白質を導入するには、浸透圧を高く維持することによって細胞径を均一にすることが重要と考えられたが、結果としてやや広い分布 (10~30 μm) となり、かつ電気穿孔後の細胞の生存率が不良であった。しかし、必要な生細胞数を確保し、in-cell NMR を行った結果、予想以上に良好なスペクト

ルを得ることができた（現在投稿準備中）。さらに、プロトプラスト形成や電気穿孔の最適化を行うことで、様々な植物由来蛋白質の in-cell NMR 研究に安定して使用できるような手法にすることを目指している。

続いて、情報科学を駆使した、自動 NMR データ解析と高精度自動立体構造解析法の開発も行った。生細胞試料の NMR スペクトルは、分離、S/N 比ともに著しく不良なため、再現性・客観性の確保が大きな問題となる。私たちは、Güntert らが自動解析のために開発してきた FLYA プログラムを用いて、大腸菌内で約 200 μ M 程度の濃度で発現している蛋白質の立体構造解析に成功したが、一方で昆虫培養細胞 Sf9 内の解析では、FLYA の有用性を確認することはできなかった。そこで、より難しい試料への適応を可能とするための FLYA の改良と最適化を進めた。私たちはこれまで、ベイズ推定法を用いてその情報量の範囲内で可能な構造の広がり事を事後分布の形で表現する新しい立体構造解析手法を用いて、昆虫培養細胞 Sf9 内の 3 種の蛋白質の高分解立体構造決定に成功してきた。これを受けて、ベイズ推定を用いた方法を細胞内環境下の様々な蛋白質へ応用し、汎用的システムに拡張することを目指した。具体的には、従来の CYANA 構造計算ソフトウェアが持つ NOE 情報の自動帰属のアルゴリズムを、ベイズ推定を用いた計算のステップにも導入し、より客観的で正確性の高い立体構造を得るようなシステムの構築を行った（図 1）。

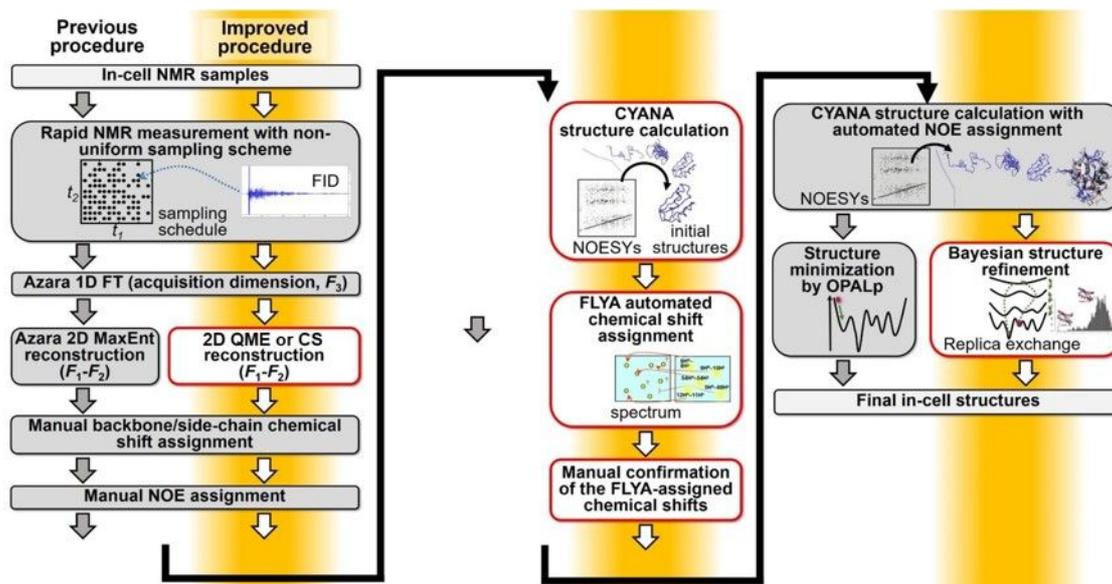


図 1. 生きた細胞内の比較的生理的濃度に近い蛋白質の立体構造計算のための、新しい解析スキーム。新しい信号再構成法、CYANA による自動 NOE 解析、FLYA による自動シグナル帰属、ベイズ推定を用いた新しい構造算出法から構成されている。

さらに、常磁性 NMR 情報を用いたマルチドメイン蛋白質の立体構造解析法の確立を目指し、ヒト GRB2 をモデル試料として解析を行った。ヒト GRB2 は 217 アミノ酸残基からなるアダプター蛋白質であり、RAS が関与するシグナル伝達経路において、レセプター蛋白質からのシグナルを、RAS の活性化因子である SOS1 に繋ぐ役割を担う。GRB2 は、N 末端と C 末端の 2 つの SH3 ドメインと、これらに挟まれた SH2 ドメインがリンカーで繋がれたマルチドメイン蛋白質である。全長 GRB2 の X 線結晶構造は既に報告されていたが、SAXS 解析は溶液状態で結晶構造と異なるドメイン間相対配置を取る可能性を示唆していた。本研究では、GRB2 に常磁性タグを導入し、PRE 由来の長距離構造情報に従来の NOE 由来の距離情報を加え、構造多形を考慮に入れた multi-state 立体構造計算を行った。その結果、結晶構造とは明らかに異なるドメイン間相対配置を持つ立体構造が得られた（図 2）。

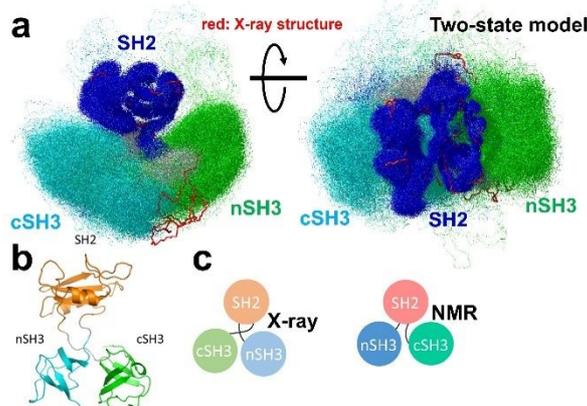


図 2. (a) multi-state 構造計算法を用いて決定した GRB2 の溶液構造。 (b) GRB2 の結晶構造 (PDB ID: 1GRI)。 (c) GRB2 の結晶構造と溶液構造におけるドメイン間相対配置の差異の模式図。

(2) 『In-cell NMR を用いた金属動態に関わる蛋白質の解析（実証研究）』では、ダイズ根粒菌の酸素センサーシステムを構成する二成分情報伝達系 FixJ/FixL システムなどをターゲットと

して解析を行った。FixL はヘムを持ち酸素センサーとして働く。FixJ は FixL もしくは DNA と相互作用する 2 つのドメインを持ち、FixL によってリン酸化されることで活性化し、ニトロゲナーゼ遺伝子の転写を促進する。本研究では、希薄溶液中での FixJ 単独ならびに FixL-FixJ 複合体中の FixJ の溶液構造の決定、および生細胞中での FixJ の動態解析を目指した。FixJ の 2 つのドメイン (FixJN および FixJC) はフレキシブルなリンカーで結ばれており、X 線結晶解析からは相対配置の異なる複数の構造が報告されていた。私たちはこれまで、4 種の Cys 変異体を作成し、Cys 残基側鎖に常磁性標識を行うことによって、2 種の常磁性 NMR 情報、すなわち PRE (paramagnetic relaxation enhancement) および PCS (pseudocontact shift) の取得を行ってきた。溶液状態であっても、ドメイン構造は結晶構造とほぼ同一であり、NMR 解析から推定された 118-134 残基をリンカーとして仮定して、PRE および PCS 由来のドメイン間構造情報を基に立体構造計算を行った結果、図 3a,b に示すような構造が得られた。ドメイン間の界面には E108, R111 (以上 FixJN) や R165, E166 (以上 FixJC) が近接して存在しており (図 3c)、これらの残基間の静電的な相互作用が、今回算出されたドメイン間配置を過渡的に安定化している可能性が示唆された (現在投稿準備中)。現在、立体構造情報のさらなる精密化を試みている。また、蛋白質性クラウディング剤存在下での解析や、in-cell NMR を用いた生細胞内環境での解析も進めており、今回得られたドメイン配置に対するクラウディング環境の影響の同定も行っている。

さらに、FixL-FixJ 相互作用による FixJ 活性化の構造基盤を明らかにするために、FixL-FixJ 複合体、さらにそこへ ATP を加えた状態での NMR 解析を行った。¹⁵N 標識 FixJ に対する FixL の滴定によって、FixJN で ¹H-¹⁵N 相関クロスピーク強度の減少が観測されたことから、FixJN が FixL との相互作用部位であることが裏付けられた。一方で FixJC 表面の一部も FixL との相互作用に寄与している可能性が示唆された。

¹⁵N-FixJ に FixL と ATP を添加した実験では、FixJ のリン酸化部位 (D55) と構造上の近傍領域に顕著な化学シフトが認められた (図 4)。これらの結果についても投稿論文作成中である。現在アセチルリン酸を用いた FixJ のリン酸化も試みており、リン酸化 FixJ の詳細な構造解析や、DNA との相互作用、さらにこれらの生物活性発現に対する細胞内クラウディング効果の影響の解析を進めていく。

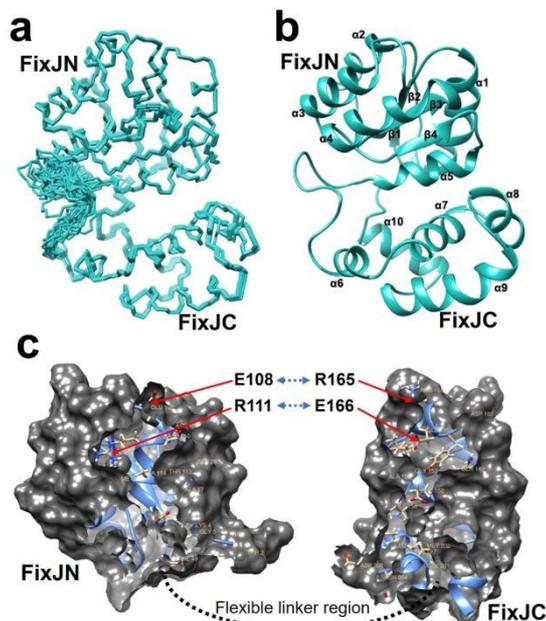


図 3. (a) CYANA プログラムを用いた計算で得られた最終構造 (20 構造) の重ね合わせ。構造計算は、結晶構造より算出したドメイン内距離拘束、NMR 解析から得られた主鎖 2 面角の角度拘束、実験的に得られた PRE (730 個) PCS (62 個) 由来の構造情報を用いて行った。(b) 代表構造のリボンモデル。(c) 代表構造における FixJN と FixJC の相互作用界面。

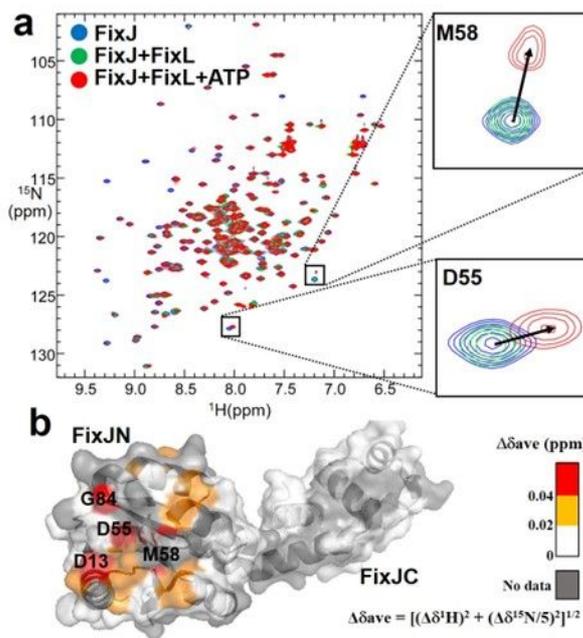


図 4. (a) FixJ, FixJ+FixL, FixJ+FixL+ATP 試料の 2D ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル。(b) ATP 添加によって顕著な化学シフト変化が起きた残基を FixJ の結晶構造上にマッピングしたもの。

(3) 『In-cell NMR を用いた応用研究』では、ヒト培養細胞内で不安定な蛋白質の in-cell NMR 解析法について研究を進めた。Intrinsically disordered protein (IDP) や Intrinsically disordered region (IDR) は in-cell NMR 解析の重要な標的であるが、細胞内で速やかに分解されるために解析が困難になる場合がある。そこで、様々な IDP/IDR 試料の良好な in-cell NMR スペクトルの取得のための方法論的研究を行った。モデル試料として、Keap1 (Kelch-like ECH-associated-protein1) と転写因子 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) からなる

システムを用いた。Nrf2は酸化還元ストレスに対応して、抗酸化酵素、金属結合蛋白質、薬物代謝酵素などの遺伝子の発現を制御している。Nrf2のKeap1結合領域(Nrf2-Neh2)はIDRであり、Keap1存在下でユビキチン化されてプロテアソームで分解されるため、in-cell NMR解析が不可能であった(図5a,b)。

プロテアソーム阻害剤MG-132存在下でHeLa細胞を用いたNrf2-Neh2のin-cell NMR測定を行った結果、良好なスペクトルが得られた(図5c)。MG-132は細胞内で不安定な他の蛋白質のin-cell NMR測定でも有効であった。一方で、Neh2の中のKeap1結合領域に由来するシグナルは著しくブロードニング

していた。これに対して、Keap1を欠失した細胞(MEF-KKO)では、Neh2の中のKeap1結合領域に由来するシグナルが観測された(図5d)。これらin-cell NMR解析からHeLa細胞中でのNrf2-Neh2とKeap1との相互作用を同定できたと考えられる。

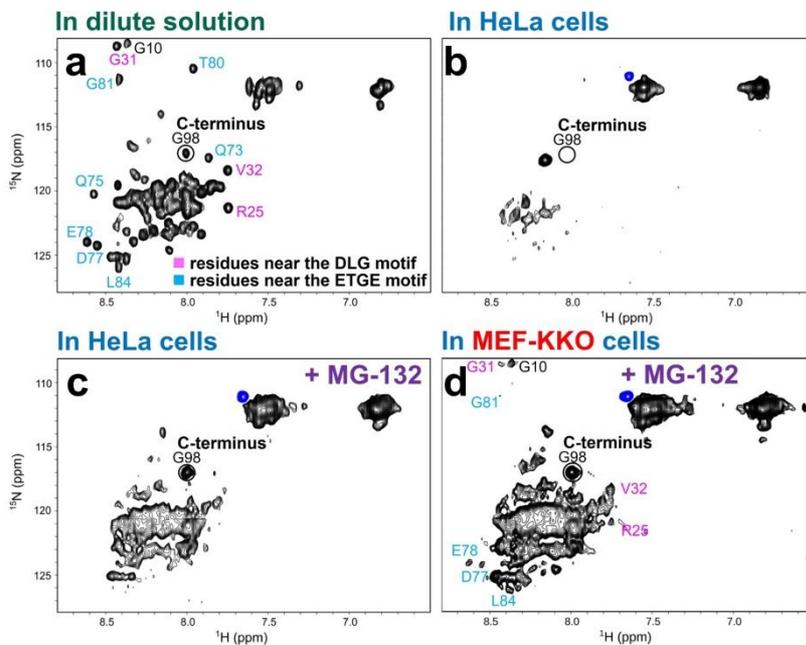


図5. Nrf2-Neh2の希薄溶液中(a), HeLa細胞中(b), MG-132存在下のHeLa細胞中(c), MG-132存在下のMEF-KKO (Keap1 knock out)細胞中(d)の2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC スペクトル。Neh2上の2つのKeap1結合モチーフDLG, ETGE由来のシグナルを色分けして示してある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sayeesh P.M., Tepei Ikeya, Haruka Sugawara, Riki Watanabe, Masaki Mishima, Kohsuke Inomata, Yutaka Ito	4. 巻 625
2. 論文標題 Insight into the C-terminal SH3 domain mediated binding of Drosophila Drk to Sos and Dos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 87-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mishal Tariq, Tepei Ikeya, Naoyuki Togashi, Louise Fairall, Carlos Bueno-Alejo, Syun Kamei, Beatriz Romartinez-Alonso, Miguel Angel Muro Campillo, Andrew J. Hudson, Yutaka Ito, John W.R. Schwabe, Cyril Dominguez, Kayoko Tanaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural and biochemical insights into heterotetramer formation of oncogenic K-Ras4BG12V and Rgl2, a RalA/B activator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.10.10.511529	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagae Takayuki, Unno Masashi, Koizumi Taiki, Miyanoiri Yohei, Fujisawa Tomotsumi, Masui Kento, Kamo Takanari, Wada Kei, Eki Toshihiko, Ito Yutaka, Hirose Yuu, Mishima Masaki	4. 巻 118
2. 論文標題 Structural basis of the protochromic green/red photocycle of the chromatic acclimation sensor RcaE	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2024583118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2024583118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okada Mayu, Tateishi Yutaka, Nojiri Eri, Mikawa Tsutomu, Rajesh Sundaresan, Ogasa Hiroki, Ueda Takumi, Yagi Hiromasa, Kohno Toshiyuki, Kigawa Takanori, Shimada Ichio, Guentert Peter, Ito Yutaka, Ikeya Tepei	4. 巻 -
2. 論文標題 Multi-state structure determination and dynamics analysis reveals a new ubiquitin-recognition mechanism in yeast ubiquitin C-terminal hydrolase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.04.22.440356	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 伊藤 隆	4. 巻 36
2. 論文標題 SARS-CoV-2感染機序についての構造生物学的研究の現状	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 エアロゾル研究	6. 最初と最後の頁 237 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11203/jar.36.237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 池谷鉄兵, 伊藤 隆	4. 巻 53
2. 論文標題 溶液NMR法を用いた蛋白質立体構造計算の最近の動向	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 48-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 池谷鉄兵, 伊藤 隆	4. 巻 5
2. 論文標題 溶液NMR法を用いた蛋白質立体構造計算の最近の動向	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 980-986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagae Takayuki, Unno Masashi, Koizumi Taiki, Miyanoiri Yohei, Fujisawa Tomotsumi, Masui Kento, Kano Takanari, Wada Kei, Eki Toshihiko, Ito Yutaka, Hirose Yuu, Mishima Masaki	4. 巻 118
2. 論文標題 Structural basis of the protochromic green/red photocycle of the chromatic acclimation sensor RcaE	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2024583118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Takashi, Ikeya Teppei, Kamoshida Hajime, Suemoto Yusuke, Mishima Masaki, Shirakawa Masahiro, Guentert Peter, Ito Yutaka	4. 巻 58
2. 論文標題 High Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 7284 ~ 7288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201900840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Aizu Takahiro, Suzuki Takumi, Kido Akihiro, Nagai Kan, Kobayashi Ayaho, Sugiura Reiko, Ito Yutaka, Mishima Masaki	4. 巻 1864
2. 論文標題 Domain selective labeling for NMR studies of multidomain proteins by domain ligation using highly active sortase A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129419 ~ 129419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.129419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiki Toshihiko, Yamaguchi Yoshihiro, Fujiwara Toshimichi, Inouye Masayori, Ito Yutaka, Kojima Chojiro	4. 巻 10
2. 論文標題 In-cell NMR as a sensitive tool to monitor physiological condition of Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59076-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikeya Teppei, Guentert Peter, Ito Yutaka	4. 巻 20
2. 論文標題 Protein Structure Determination in Living Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2442 ~ 2442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20102442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishida Noritaka, Ito Yutaka, Shimada Ichio	4. 巻 1864
2. 論文標題 In situ structural biology using in-cell NMR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129364 ~ 129364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikari Masaomi, Yagi Hiromasa, Kasai Takuma, Inomata Kohsuke, Ito Masahiro, Higuchi Kae, Matsuda Natsuko, Ito Yutaka, Kigawa Takanori	4. 巻 3
2. 論文標題 Direct Observation of Membrane-Associated H-Ras in the Native Cellular Environment by In-Cell 19F-NMR Spectroscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 1658 ~ 1669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacsau.3c00108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tariq Mishal, Ikeya Teppei, Togashi Naoyuki, Fairall Louise, Kamei Shun, Mayooramurugan Sannojah, Abbott Lauren R, Hasan Anab, Bueno-Alejo Carlos, Sukegawa Sakura, Romartinez-Alonso Beatriz, Muro Campillo Miguel Angel, Hudson Andrew J, Ito Yutaka, Schwabe John WR, Dominguez Cyril, Tanaka Kayoko	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural insights into the complex of oncogenic KRas4BG12V and Rgl2, a RalA/B activator	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202302080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202302080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sayeesh Pooppadi Maxin, Iguchi Mayumi, Suemoto Yusuke, Inoue Jin, Inomata Kohsuke, Ikeya Teppei, Ito Yutaka	4. 巻 24
2. 論文標題 Interactions of the N- and C-Terminal SH3 Domains of Drosophila Drk with the Proline-Rich Peptides from Sos and Dos	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 14135 ~ 14135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241814135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計49件（うち招待講演 19件 / うち国際学会 14件）

1. 発表者名 Yutaka Ito
2. 発表標題 Protein structure determination by NMR: conformational multiplicity and the effects of macromolecular crowding
3. 学会等名 The 7th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaka Ito
2. 発表標題 Solution NMR approaches to 3D structure determination of proteins in living cells
3. 学会等名 The Protein Society Webinar "Exploring Proteins in Living Cells" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 隆
2. 発表標題 常磁性ランタノイド金属を用いた蛋白質の溶液NMRおよびin-cell NMR解析
3. 学会等名 第1回生命金属科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaka Ito
2. 発表標題 Protein behaviours under intracellular crowding environments
3. 学会等名 TMU Workshop on Protein NMR (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永江 峰幸, 飯塚 佑介, 青山 洋史, 宮ノ入 洋平, 神野 智司, 伊藤 隆, 広瀬 侑, 三島 正規
2. 発表標題 シアノバクテリアの光センサーにおける脱プロトン化した塩基性アミノ酸の観測
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八木 宏昌, 葛西 卓磨, Elisa Rioual, 池谷 鉄兵, 木川 隆則
2. 発表標題 NMR解析を用いた解糖系酵素PGKの環境適応的活性制御による解糖系調節機構
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sayeesh, PM, Teppei Ikeya, Haruka Sugasawa, Riki Watanabe, Yutaka Ito
2. 発表標題 NMR studies of a Drosophila adapter protein, Drk
3. 学会等名 第1回生命金属科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 屋部 祥大, 田岸 亮馬, 鴨志田 一, 美川 務, 猪股 晃介, 池谷 鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 In-cell NMRによるlinear diubiquitinのin-situ立体構造解析
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊田 芽生, 猪股 晃介, 末広 志織, 島 海翔, 池谷 鉄兵, 鈴木 隆史, 山本 雅之, 伊藤 隆
2. 発表標題 In-cell NMR によるKeap1/Nrf2系の研究
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保 里佳, 池谷 鉄兵, 渡邊 吏輝, 菱倉 直樹, 三島 正規, 猪股 晃介, 小手石 泰康, 澤井 仁美, 城 宣嗣, 伊藤 隆
2. 発表標題 常磁性 NMR を用いた根粒菌マルチドメイン蛋白質FixJの立体構造解析
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 館野 桂太, 菅澤 はるか, 安藤 考史, 田端 真彩子, 美川 務, 猪股 晃介, 甲斐荘 正恒, 三島 正規, 杉田 有治, 池谷 鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 マルチドメイン蛋白質GRB2とSOS1-PRM領域の相互作用解析
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤 考史, 菅澤 はるか, 館野 桂太, 田端 真彩子, 美川 務, 宮野入 洋平, 川端 庸平, Hisham Dokainish, Weitong Ren, 大出 真央, 寺内 勉, 猪股 晃介, 三島 正規, 甲斐荘 正恒, 杉田 有治, 池谷 鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 常磁性NMRを用いたマルチドメイン蛋白質GRB2の立体構造解析
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富樫 直之, 宮田 裕貴, 亀井 駿, 菅澤 はるか, 美川 務, 猪股 晃介, 田仲 加代子, 伊藤 隆, 池谷 鉄兵
2. 発表標題 GMPPNP結合型K-RasG12VとRgl2RBDの相互作用解析
3. 学会等名 第61回NMR討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaka Ito, Kohsuke Inomata, Teppei Ikeya
2. 発表標題 Solution NMR approaches to 3D structure determination of proteins in living eukaryotic cells
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference (ISMAR) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池谷 鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 複数の異なる NMR データの統合解析によるタンパク質 multi-state 立体構造解析
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teppei Ikeya, Mayu Okada, Yutaka Tateishi, Eri Nojiri, Tsutomu Mikawa, Sundaresan Rajesh, Hiroki Ogasa, Takumi Ueda, Hiromasa Yagi, Toshiyuki Kohno, Takanori Kigawa, Ichio Shimada, Peter G?ntert, Yutaka Ito
2. 発表標題 Multi-state structure determination and dynamics analysis reveals a new ubiquitin-recognition mechanism in yeast ubiquitin C-terminal hydrolase
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference (ISMAR) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sayeesh. P. M., Teppei Ikeya, Haruka Sugasawa, Riki Watanabe, Yutaka Ito
2. 発表標題 Insight into the C-terminal SH3 mediated binding of Drosophila Drk towards Sos and Dos
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference (ISMAR) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sayeesh. P. M., Teppei Ikeya, Haruka Sugasawa, Riki Watanabe, Yutaka Ito
2. 発表標題 Insight into the C-terminal SH3 mediated binding of Drosophila Drk towards Sos and Dos
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富樫直之, 亀井駿, 菅澤はるか, 猪股晃介, 伊藤隆, 田仲加代子, 池谷鉄兵
2. 発表標題 NMRによるKRASとRGL2の相互作用解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 屋部 祥大, 田岸亮馬, 鴨志田一, 美川務, 猪股晃介, 池谷鉄兵, 伊藤隆
2. 発表標題 直鎖状ユビキチン二量体の溶液構造解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末広志織, 猪股晃介, 豊田芽生, 池谷鉄兵, 鈴木隆史, 山本 雅之, 伊藤隆
2. 発表標題 In-cell NMRを用いたKeap1-Nrf2制御系の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yutaka Ito
2. 発表標題 Solution NMR approaches to investigating protein behaviours under intracellular crowding environments
3. 学会等名 29th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutaka Ito, Teppei Ikeya
2. 発表標題 Solution NMR approaches to investigating protein behaviours under intracellular crowding environments
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yutaka Ito, Kohsuke Inomata, Teppei Ikeya
2. 発表標題 Solution NMR Approaches to Investigating Protein Behaviours under Intracellular Crowding Environments
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference, the 9th Asia-Pacific NMR Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池谷 鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 複数の異なるNMR データの統合解析によるタンパク質multi-state 立体構造解析
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ito Yutaka, Ikeya Teppei
2. 発表標題 Solution NMR approaches to 3D structure determination of proteins in living eukaryotic cells
3. 学会等名 33rd Annual Symposium of the Protein Society, Seattle, USA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito Yutaka, Ikeya Teppei
2. 発表標題 High resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells
3. 学会等名 The 8th Asia Pacific NMR Symposium, Singapore (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka Takashi, Ikeya Teppei, Mishima Masaki, Ito Yutaka
2. 発表標題 High-resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells
3. 学会等名 The 12th Australian and New Zealand Society for Magnetic Resonance Conference (ANZMAG conference 2019), Cape Naturaliste, Australia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 隆, 池谷鉄兵
2. 発表標題 溶液NMRを用いたin situ構造生物学
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 隆, 池谷鉄兵
2. 発表標題 Solution NMR approaches to 3D structure determination of proteins in living eukaryotic cells
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 シンポジウム「In-cell protein scienceのフロンティア」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Ito, Mei Toyoda, Shiori Suehiro, Kaito Shima, Teppei Ikeya, Takafumi Suzuki, Masayuki Yamamoto, Kohsuke Inomata
2. 発表標題 In-cell NMR studies of the Keap1-Nrf2 system
3. 学会等名 Asia-Pacific Nuclear Magnetic Resonance (APNMR) 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yutaka Ito, Teppei Ikeya, Sayeesh P.M., Mao Oide, Yuji Sugita, Hiroshima
2. 発表標題 NMR studies of multi-domain adaptor proteins in signal transduction pathways
3. 学会等名 TJ2024 (Taiwan-Japan NMR Symposium 2024) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伊藤 隆
2. 発表標題 In-cell NMRを用いたKeap1-Nrf2系の解析
3. 学会等名 NMRシンポジウム 環境応答の構造生物学 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伊藤 隆
2. 発表標題 多次元NMRの原理
3. 学会等名 2023年度日本分光学会主催秋期セミナー「NMR分光法の基礎と応用」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Teppeï Ikeya, Mao Oide, W. Ren, Keita Tateno, Takami Ando, Haruka Sugasawa, Yuji Sugita, Yutaka Ito
2. 発表標題 Analysis of the mechanism underlying multivalent interactions between GRB2 and SOS1 and their LLPS using solution NMR
3. 学会等名 日本生物物理学会第61回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池谷鉄兵, 菅澤はるか, 富樫直之, 林 俊文, 美川 務, 杉田有治, 伊藤 隆
2. 発表標題 GRB2とSOS1による多価相互作用と液液相分離の溶液NMR解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 猪股晃介, 豊田芽生, 島 海翔, 長峰萌華, 末広志織, 池谷鉄兵, 鈴木隆史, 山本雅之, 伊藤 隆
2. 発表標題 In-cell NMRにおける細胞試料管理
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sayeesh PM, Mayuki Iguchi, Haruka Sugasawa, Kaksuke Inomata, Teppei Ikeya, Yutaka Ito
2. 発表標題 Interaction of N-and C-terminal SH3 domains of Drosophila adapter protein Drk with Sos and Dos
3. 学会等名 The 19th European Magnetic Resonance Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 屋部祥大, 田岸亮馬, 鴨志田一, 美川 務, 猪股晃介, 池谷鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 In-cell NMRを用いたlinear diubiquitinの細胞内での立体構造解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大久保里佳, 堀川皓央, 伊藤かおり, 菱倉直樹, 渡邊吏輝, 三島正規, 猪股晃介, 小手石泰康, 澤井仁美, 城 宣嗣, 池谷鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 異種核多次元NMRによる根粒菌マルチドメイン蛋白質FixJの立体構造解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sayeesh PM, Mayumi Iguchi, Teppei Ikeya, Yutaka Ito
2. 発表標題 Structural and dynamic studies on the Drosophila adapter Protein Drk
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊田芽生, 猪股晃介, 末広志織, 島 海翔, 長峰萌華, 池谷鉄兵, 鈴木隆史, 山本雅之, 伊藤 隆
2. 発表標題 ストレス応答型の転写制御に関するKeap1-Nrf2複合体のIn-cell NMR解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 助川咲良, 富樫直之, P.M. Sayeesh, 菅澤はるか, 猪股晃介, 田仲加代子, 伊藤 隆, 池谷鉄兵
2. 発表標題 溶液NMRによるKRASとRGL2の相互作用の解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富樫直之, 助川咲良, 菅澤はるか, 美川 務, 猪股晃介, 田仲加代子, 伊藤 隆, 池谷鉄兵
2. 発表標題 NMRピークの線形解析を用いたKRAS/RGL2RBD滴定データの定量化
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井口真由美, P.M. Sayeesh, 池谷鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 Drk蛋白質のN末端およびC末端SH3ドメインとSos/Dos由来ペプチドとの相互作用解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田裕貴, 菅澤はるか, 猪股晃介, 伊藤 隆, 池谷鉄兵
2. 発表標題 溶液NMRによるUbiquitin C-terminal Hydrolase L3 (UCHL3)の構造・ダイナミクス解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 俊文, 館野桂太, 菅澤はるか, 池谷鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 GRB2とSOS1による多価相互作用の溶液NMR解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤聖人, Sayeesh PM, 池谷鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 蛋白質の立体構造に対する分子クラウディングの影響の解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菱倉直樹, 渡邊史輝, 大久保里佳, 堀川皓央, 伊藤かおり, 三島正規, 猪股晃介, 小手石泰康, 澤井仁美, 城 宣嗣, 池谷鉄兵, 伊藤 隆
2. 発表標題 NMRによるFixL-FixJ二成分シグナル伝達系の機能解析
3. 学会等名 第62回NMR討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 津本浩平, 城宣嗣, 他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 511
3. 書名 生命金属ダイナミクス 生体内における金属の挙動と制御	

1. 著者名 Ito Yutaka, Doetsch Volker, Shirakawa Masahiro	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 305
3. 書名 In-cell NMR Spectroscopy: From Molecular Sciences to Cell Biology	

1. 著者名 Y. Ito, T. Ikeya, K. Inomata	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 404
3. 書名 Integrated Structural Biology - Chapter 5: In-cell Structural Biology Through the Integration of Solution NMR Spectroscopy and Computational Science	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Cambridge	University of Leicester		
ドイツ	Goethe University Frankfurt			
スイス	ETH Zurich			