

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2014

課題番号：21121006

研究課題名(和文) In situ計測による脂質、膜受容体の活性化機構の解明

研究課題名(英文) Analyses of the activation mechanisms of receptors of fatty acids and membrane receptors by in situ measurement

研究代表者

白川 昌宏(Shirakawa, Masahiro)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00202119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 164,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内や細胞表層で形成される過渡的な蛋白質複合体のその場(in situ)観察・解析を行うための手法として、in-cell NMR及びダイヤモンド粒子の磁気共鳴の光検出法(optically detected magnetic resonance; ODMR)を利用した手法の開発を行った。In-cell NMRの開発の上で、免疫系のシグナル伝達蛋白質であるFKBP12と脂肪酸シャペロン蛋白質FABP4を用い、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N相関スペクトルや<sup>19</sup>F-NMRスペクトルを得た。またODMRについてはダイヤモンド粒子の選択的蛍光観察法や、粒子の方向決定手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we were engaged to develop the methods for in-cell NMR of proteins and optically detected magnetic resonance (ODMR), aiming to create experimental techniques to provide structural and dynamics information of protein complexes formed transiently in cells or at cell membranes. For in-cell NMR, we used the signal transduction factor in immunological system FKBP12 and a chaperon protein for fatty acids, FABP4. We could measure in-cell <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N correlation and <sup>19</sup>F-NMR spectra of them, respectively. For ODMR, we have built methods to selectively detect fluorescence of diamond particles and to determine the directions of particles.

研究分野：構造生物学、分子生物学

キーワード：NMR 脂質シャペロン 脂肪酸結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

リガンド結合などにより活性化された細胞内タンパク質が形成するシグナル複合体は、しばしば過渡的で不安定なため *in vitro* での再現が困難である。シグナル発火・伝達機構を明らかにするには、受容体複合体を *in situ* で観察する手法が必要である。我々はヒト細胞内のタンパク質の高分解 2 次元 NMR スペクトル測定である *in-cell* NMR の手法を確立した (*Nature*, 2009)。これは哺乳動物細胞内のタンパク質の立体構造情報を原子レベルで与える手法であるという特徴を持つ。この *in-cell* NMR により生細胞においてタンパク質の相互作用、プロセッシング、運動性・安定性の解析の可能性が出てきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この *in-cell* NMR に加えて、*in-cell* ESR の手法、または磁気共鳴の光検出(ODMR)などを用い細胞内や細胞表層で形成されるタンパク質複合体の立体構造や運動をその場 (*in situ*) 観察・解析のための手法を開発することである。

*In-cell* NMR 法による開発におけるモデルとして、(1)脂肪酸シャペロン (FABP) による細胞質における lipokine の認識と複合体の機能、(2)細胞内で鎖状連結体を形成するユビキチン、(3)免疫応答に重要な働きを示し、免疫抑制剤の重要な標的である FKBP12 等を取り上げる。

細胞は分子複合体やオルガネラといったナノ-マイクロメートルオーダーの構成要素からなる複雑な集合体であり、それぞれの構成要素はその機能に応じて固有の物理的な性質を有する。しかし、このような微小領域の運動性を論じようとするとき、蛍光計測で一般に用いられる並進拡散計測は十分な精度を発揮できない。そこで本研究では、磁気共鳴法でしばしば用いられる回転拡散計測から着想し、ODMR 顕微鏡を用いてナノダイヤモンド粒子の回転運動を精密計測する技術を開発した。ODMR 手法の開発は、(1)細胞膜に存在する EGF 受容体、(2)自然免疫に関与する、インターロイキン (IL) -18 とその膜受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  を *in situ*, *in vitro* における立体構造や機能、運動性解析をターゲットに設定して進めた。

3. 研究の方法

$^{15}\text{N}$  標識したタンパク質の 2 次元相関スペクトル測定を行う、これまでの *in-cell* NMR 法では、高分子量タンパク質や複合体のシグナル検出は磁気緩和のため困難であった。本研究では、タンパク質の  $^{19}\text{F}$ 、メチル基選択的同位体標識等を行い、TROSY 法を始めとする横緩和最適化測定法を駆使して、高分子量タンパク質複合体が観察可能となる *in-cell* NMR 計測手法の開発を進めた。

(1)脂肪酸シャペロン(FABP)の細胞質にお

ける構造

FABP4 は細胞内における脂肪酸輸送に関与する蛋白質で、遊離脂肪酸や類縁体と結合するが、細胞内での機能の詳細は明確ではない。*in-cell* NMR 測定により、脂質との結合状態や、構造変化、ダイナミクスの解析を目指した。

$^{15}\text{N}$  標識 FABP4 を調製し、これを TAT 配列を用いて哺乳動物細胞へ導入し (*Inomata et al., Nature, 2009*)、その *in-cell*  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC スペクトルの取得を行なった。FABP4 の結晶構造は既知で、脂質結合部位も解明されており、試験管内での NMR スペクトルも報告されている (*JACS, 124, 11874, 2002*)。それらを参照に *in-cell* スペクトルを解析し、その結果から FABP4 が細胞内でアポ体であるのか、複合体形成しているのかについて知見を得ることを目的とした。なお、FABP4 は動脈硬化や 2 型糖尿病などの慢性代謝疾患と深く関わることから、将来的には、この手法を拡張すると疾患のモデル細胞を用いて実験を行ない、FABP4-脂質-核内受容体の分子間相互作用と細胞の状態の相関へと解析することで疾患機構の探索を進める事が期待される。

またFABP4は分子の中心部近傍に脂質性の分子を抱え込む形で結合する。そのためアポ体と脂質結合型分子では、運動性、特にマイクロミリ秒オーダーの状態間での化学交換の項に違いが見られる可能性がある。そのためアポ体の  $^{15}\text{N}$  R1,R2,  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  異種核 NOE を測定し、スペクトル密度関数を求めた。

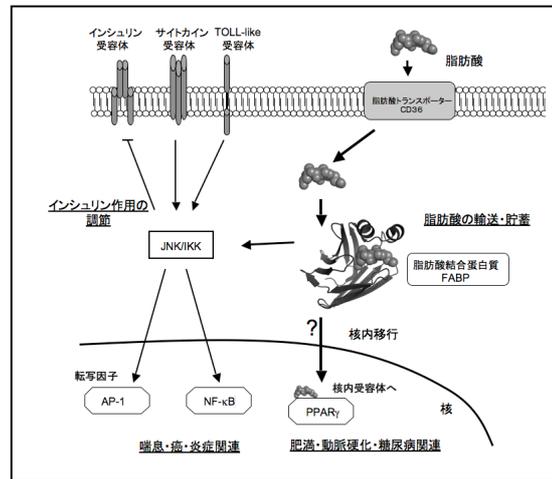


図1 FABPによる脂肪酸認識と運搬

(2)細胞内で鎖状連結体を形成するユビキチン

本研究に先立って開発した *in-cell* NMR に関連した手法により我々はユビキチンが精製された *in vitro* の状態よりも、*in cell* では見かけのフォールディング安定性が 10 倍以上低下していることを、主鎖アミド水素の交換速度より示している (*Nature*, 2009)。我々はこの細胞内のユビキチンの挙

動に興味を持ち、ユビキチン、ユビキチン鎖の *in vitro* における DSC による熱安定性、フォールディングの可逆性などの検討と *in cell* における凝集体形性とその除去機構を調べた。

さらに 2 量体ユビキチンについては常磁性金属タグを付加してその pseudo-contact shift を使った長距離構造情報の取得を試みた。

### (3) 免疫応答を担う FKBP12 の $^{19}\text{F}$ -NMR

これまで行っていた *in-cell* NMR は  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関 2 次元 NMR を使ったものであるが、この手法は分子全体のフォールディング、相互作用などの情報を与えるという長所がある一方、測定時間が長いという欠点を持つ。この欠点を克服する手法として注目したのが、タンパク質のアミノ酸特異的  $^{19}\text{F}$  ラベル体を使った *in-cell*  $^{19}\text{F}$  NMR である。

我々はフェニルアラニンを 4- $^{19}\text{F}$ -フェニルアラニンに置換した FKBP12 を調製し、それを生細胞に導入し、 $^{19}\text{F}$  NMR を測定した。さらに細胞に FK506 や rapamycin を投与して、細胞内での FKBP12 との相互作用をスペクトル測定によって観察した。

### (4) ODMR 検出システムの開発

さらに、ナノダイヤモンド粒子から発せられる ODMR を用い、生細胞において分子の回転運動を定量的に検出する方法の開発を行った。ODMR 信号は外部磁場と鋭敏に相互作用することから、磁場方向に対するナノダイヤモンド粒子の角度を高い精度で決定することができる。すなわち、ナノダイヤモンド粒子を観察対象に標識し、連続的な角度変化を追跡する事によって観察対象分子の回転運動計測が可能となる。我々はまず、ODMR 顕微鏡の作成、ODMR アクティブなナノダイヤモンド粒子の調製及びその表面修飾法の確立を行った。その後 A431 細胞膜に発現している EGF 受容体をナノダイヤモンド粒子で標識し、細胞骨格密度に依存する細胞膜の流動性、具体的には自由揺動の回転拡散を ODMR システムによって定量的に評価した。

### (5) ポリユビキチン鎖の凝集体形成

ユビキチンは強固な立体構造を形成し、非常に高い物理化学的安定性を有する。一方で、アルツハイマー病やパーキンソン病患者の脳内にはユビキチン陽性の凝集体が発見されている。我々はユビキチンの凝集体形成能、特にユビキチンの重合体(ポリユビキチン鎖)に着目し、示差走査熱量測定や免疫染色法を用いて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 脂肪酸シャペロン(FABP)の細胞質における構造

まず、 $^{15}\text{N}$  標識した FABP4 を HeLa 細胞内に導入して、*in-cell* NMR スペクトルを取得した。

なお、本実験には、TAT 配列を融合蛋白質として FABP4 に繋ぐのではなく、別途合成した TAT ペプチドをジスルフィド結合を介して FABP4 に繋ぐという方法をとった。同法の融合蛋白質を用いることに対する利点としては、TAT 部位が同位体標識されない、という点が挙げられる。そのため、TAT 部位の NMR シグナルは全く観測されず、クリーンな NMR スペクトルが得られる。

また  $^{15}\text{N}$  標識された FABP4 を調製し、*in vitro* における NMR 緩和時間測定 (T1T2( $^1\text{H}$ )- $^{15}\text{N}$  ヘテロ核 NOE) を行った。

### (2) 免疫応答を担う FKBP12 の $^{19}\text{F}$ -NMR

より簡便・高感度な *in-cell* NMR 法を目指し、 $^{19}\text{F}$ -NMR の適用を試みた。免疫抑制剤 FK506 結合タンパク質 (FKBP12) のフェニルアラニンを  $^{19}\text{F}$  標識し、*in-cell*  $^{19}\text{F}$ -NMR 測定を行ったところ、HeLa 細胞内で良好なスペクトルを得る事ができ、外部投与の FK506 や ラパマイシンとの結合も容易に検出できることが実証された。また、A02 計画班の浜地格博士と共同で、ヒト赤血球内の内在性 CA (carbonic anhydrase) を  $^{19}\text{F}$  標識し、その *in-cell*  $^{19}\text{F}$ -EXSY を測定することにより、CA の構造変換の速度論的解析を行なった (Takaoka Y. et al., Chem Commun, 2013)。

### (3) ODMR 検出システムの開発

#### ① ダイヤモンド NVC を用いた光検出磁気共鳴顕微鏡の開発

単一細胞、単一分子での動態計測を実現するため、ダイヤモンド窒素-空孔中心 (以下、NVC) を用いた光検出磁気共鳴 (ODMR) 顕微鏡を開発した (Igarashi R. et al., Nano Lett., 2012)。NVC の持つ蛍光性三重項電子スピンは、蛍光遷移の確率と電子スピン遷移の確率が密接に関連しており、単一スピンレベルの磁気共鳴状態を蛍光信号の変化として超高感度検出が可能である。この蛍光-磁気共鳴の相関現象は ODMR と呼ばれる。NVC の ODMR は蛍光顕微鏡の空間分解能でイメージング可能であることから、*in situ* 生体計測への広汎な応用が期待できる。その検証のため細胞内、線虫腸管内に導入したナノダイヤモンド (粒径 200nm) の計測を行った。その結果、いずれの場合にも良好な ODMR イメージおよびスペクトルを得ることができた。

#### ② 細胞膜・骨格を対象とした *in situ* 動態計測

本研究で開発した ODMR 顕微鏡は、外部磁場と NVC との相互作用を介して、ダイヤモンドナノ粒子の回転運動を精密に計測することもできる。そこでこの技術を単一細胞の細胞膜を対象とした *in situ* 動態計測に応用した。上皮成長因子受容体 (EGFR) を高レベルに発現する A431 細胞の表面を、EGFR に特異的な抗体で修飾したナノダイヤを用いて標識

した。このナノダイヤの自由揺動の回転拡散係数を、NVCのODMRによって計測したところ、平均  $3.1 \text{ mrad}^2/\text{s}$  という値が得られた。これは粘度換算ではおよそ  $32 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  に相当し、脂質二重膜の粘度として予想される値よりも2桁大きい値であった。従って細胞膜の運動性は脂質二重膜ではなく細胞骨格の運動性に大きく依存しているものと予想される。これを確認するために、EGF 添加およびラトランキュリン A (アクチン細胞骨格を破壊する薬剤) を添加した細胞で同様の計測を行ったところ、それぞれ回転拡散係数は  $1.2 \text{ mrad}^2/\text{s}$  および  $4.9 \text{ mrad}^2/\text{s}$  となり、アクチン細胞骨格の密度と細胞膜運動性との間に負の相関が得られた。

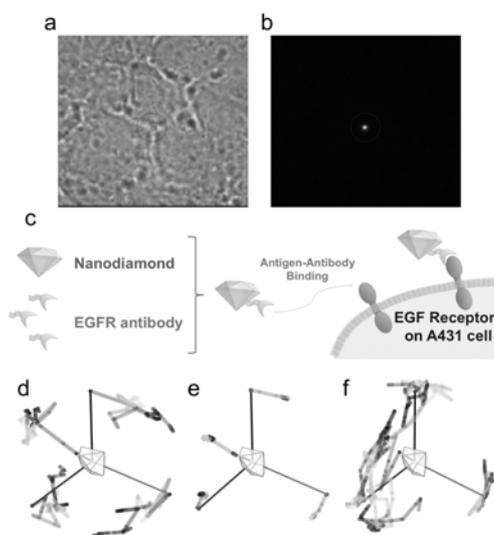


図 2. a,b, A431 細胞の明視野像(a)および蛍光像(b). c, ナノダイヤモンドによる EGFR ターゲティングの概略. d,e,f, 定常状態(d), EGF 添加時(e)およびラトランキュリン A 添加時(f)の A431 細胞膜上ナノダイヤモンドの回転運動軌跡。

#### (4)ポリユビキチン鎖の凝集体形成

示差走査熱量測定より、ポリユビキチン鎖は重合度が増加するに従い熱力学的安定性が低下することが分かった。また、ポリユビキチン鎖はユビキチン単量体とは異なり熱変性や微弱な攪拌により、アミロイド様線維を形成することを明らかにした。これらの重合度依存的な物理化学的性質は細胞内でも確認することができ、さらに興味深いことに細胞内ユビキチン陽性凝集体は選択的オートファジーにより分解されることも見出した。これらの知見は、新たな細胞内タンパク質分解経路を提唱するだけでなく、神経変性疾患におけるユビキチン陽性凝集体形成の機構解明の一助となる。

#### (5)当該学問分野、関連学問分野への貢献

In-cell NMR は、原理的には細胞内のタンパク質の構造やダイナミクスを原子レベル

で計測しうるため、将来が期待されている技術ではあるものの、NMR の検出感度が低いことから、広汎な生物学的問題に適用するのは容易ではない。将来には、ケミカルバイオロジー技術と組み合わせることによって、細胞内タンパク質のダイナミクスを定量的に研究可能であることを示すことができると思われる。

ダイヤモンド NVC を用いた ODMR 顕微鏡の技術は、既存の技術では両立不可能であった磁気共鳴法の詳細な動態情報と蛍光計測の一細胞・一分子感度を兼ね備えた計測技術である。タンパク質の不安定な動的複合体状態は細胞内においてしばしば均一に存在しないため、過渡的状态の経時的な計測を行うためには一分子レベルでの計測が必要となる。しかし、細胞機能を分子レベルで定量的に論じようとするならば、詳細な構造情報も必要となる。本技術は潜在的にこれらの要件を高いレベルで満たす計測法を提案するものであり、分子生物学、細胞生物学、一分子計測学などの学問分野に幅広く学術的な波及効果が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 35 件)

(1) Morimoto D, Walinda E, Fukada H, Sou YS, Kageyama S, Hoshino M, Fujii T, Tsuchiya H, Saeki Y, Arita K, Ariyoshi M, Tochio H, Iwai K, Namba K, Komatsu M, Tanaka K, Shirakawa M. "The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates." *Nat Commun*, 2015 20(6)pp.6116, doi: 10.1038/ncomms7116.

(2) Hembram DS, Haremaki T, Hamatsu J, Inoue J, Kamoshida H, Ikeya T, Mishima M, Mikawa T, Hayashi N, Shirakawa M, Ito Y. "An in-cell NMR study of monitoring stress-induced increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in HeLa cells." *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 438(4), pp. 653-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.127.

(3) Danielsson J, Inomata K, Murayama S, Tochio H, Lang L, Shirakawa M, Oliveberg M. "Pruning the ALS-associated protein SOD1 for in-cell NMR." *J Am Chem Soc*. 2013 135(28), pp. 10266-9, doi:10.1021/ja404425r.

(4) Takaoka Y, Kioi Y, Morito A, Otani J, Arita K, Ashihara E, Ariyoshi M, Tochio H, Shirakawa M, Hamachi I. "Quantitative comparison of protein dynamics in live cells and in vitro by in-cell (19)F-NMR." *Chem Commun* 2013 49(27), pp. 2801-3. doi: 10.1039/c3cc39205h.

(5) Hamatsu J, O'Donovan D, Tanaka T,

Shirai T, Hourai Y, Mikawa T, Ikeya T, Mishima M, Boucher W, Smith BO, Laue ED, Shirakawa M, Ito Y. "High-resolution heteronuclear multidimensional NMR of proteins in living insect cells using a baculovirus protein expression system." J Am Chem Soc. 2013 135(5):pp.1688-91. doi: 10.1021/ja310928u. Epub 2013 Jan 27.

(6) Igarashi R, Yoshinari Y, Yokota H, Sugi T, Sugihara F, Ikeda K, Sumiya H, Tsuji S, Mori I, Tochio H, Harada Y, Shirakawa M. "Real-time background-free selective imaging of fluorescent nanodiamonds in vivo." Nano Lett. 2012 12(11), pp. 5726-32, doi: 10.1021/nl302979d.

(7) Igarashi R, Sakai T, Hara H, Tenno T, Tanaka T, Tochio H, Shirakawa M. "Distance determination in proteins inside *Xenopus laevis* oocytes by double electron-electron resonance experiments." J Am Chem Soc. 2010, 132(24):pp. 8228-9. doi: 10.1021/ja906104e.

(8) Takaoka Y, Sakamoto T, Tsukiji S, Narazaki M, Matsuda T, Tochio H, Shirakawa M, Hamachi I. "Self-assembling nanoprobe that display off/on <sup>19</sup>F nuclear magnetic resonance signals for protein detection and imaging." Nat Chem. 2009, 1(7), pp. 557-61. doi: 10.1038/nchem.365.

[学会発表] (計 6 件)

(1) 白川昌宏 「DNA メチル化の構造生物学と in-cell NMR による細胞内でのタンパク質と薬剤の相互採用の観察」、日本薬学会医薬化学部会第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム、神戸、2014 年 11 月 27 日

(2) Masahiro Shirakawa, "In-cell NMR Spectroscopy of protein Inside Living Cells", Keystone Symposium of NMR in Biology, U. S. A., Jan. 15, 2013

(3) Masahiro Shirakawa, "Magnetic Resonance for Investigation of structure and dynamics of proteins and membranes in live cells." The 25 th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems." France, Aug. 20, 2012

(4) Masahiro Shirakawa, "Magnetic resonance for cell biology: Mechanisms of intra-cellular proteins and cells", 2011 LAOST chemical biology symposium, Korea, June 22, 2011

(5) Masahiro Shirakawa, "Magnetic resonance techniques for observation of structure and dynamics of biomolecules in cells." The 11 th Annual Meeting of the Protein Science of Japan, Osaka, June 7-9, 2011.

(6) Masahiro Shirakawa, "Mechanics of cells and intracellular macromolecules

measured by magnetic resonance." Gordon Research Conference on Computational Aspects of Biomolecular NMR, Italy, May 22-27, 2011

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白川 昌宏 (SHIRAKAWA, Masahiro)  
京都大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 00202119

### (2) 研究分担者

森川 耿右 (MORIKAWA, Kohsuke)  
財団法人国際高等研究所・チーフリサーチ  
フェロー  
研究者番号: 50135513

### (3) 連携研究者

朽尾 豪人 (TOCHIO, Hidehito)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 70336593

### (4) 連携研究者

有吉 真理子 (ARIYOSI, Mariko)  
京都大学・大学院工学研究科・博士研究員  
研究者番号: 8043724