

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26119005

研究課題名(和文) 生細胞内の生命反応をリアルタイムで捉える in-cell NMR法の開発と応用

研究課題名(英文) Real-time observation of the biological events within living cells using in-cell NMR

研究代表者

西田 紀貴(Nishida, Noritaka)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：50456183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 139,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオリアクター型 in-cell NMR法を高度化し、細胞内生命現象のリアルタイム観測へ応用した。細胞内の主な抗酸化分子グルタチオンとTrxの両方を安定同位体標識した細胞の調製法を確立し、酸化ストレス添加に伴う酸化還元電位とTrxの酸化還元状態の変化のリアルタイム観測を行い、細胞内における活性制御機構を明らかにした。また、低分子量GTPaseであるRasの活性型(GTP結合型割合)の in-cell NMR観測を行い、野生型および発癌性変異体のいずれにおいても細胞内のGTP型割合は in vitroよりも低く抑えられており、細胞内因子の寄与を定量的に解明することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内は多種多様なタンパク質が複雑なネットワークを形成する分子混雑環境であり、細胞内のタンパク質は in vitroとは異なる構造や活性を示す。本研究では in-cell NMR法を高度化し、細胞内タンパク質の構造や活性変化をリアルタイム観測する手法を確立して、細胞内酸化ストレスやシグナル伝達タンパク質の活性評価に適用した。本研究成果は、細胞内生命現象の可視化のみならず、細胞内で創薬標的のタンパク質に対する候補化合物の薬効を直接評価するツールとしての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have established the in-cell NMR methodology that enables the observation of the intracellular biological events in real-time manner. To observe the intracellular molecular response against oxidative stresses, we prepared the HeLa cells, in which both thioredoxin and glutathione were isotopically labeled, and monitored the redox status of Trx and glutathione by alternate in-cell NMR measurements. This study demonstrated the redox status of Trx is regulated not only by the intracellular redox potential but also by various endogenous regulatory molecules, such as Trx reductases. We also performed the in-cell NMR observation of small GTPase Ras and its oncogenic variants. We demonstrated that the GTP-bound ratio of Ras in the steady state is decreased in the cell for all Ras constructs, due to the increase of k<sub>hy</sub> and the decrease of k<sub>ex</sub>. We also succeeded in quantifying the contribution of the specific regulatory proteins by in-cell NMR experiments using the knockout cells.

研究分野：構造生物学

キーワード：核磁気共鳴法 in-cell NMR 酸化ストレス シグナル伝達

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内はタンパク質などの多種多様な生体高分子が混雑して存在する夾雑系であり、通常の生化学的・構造生物学的解析が行われる希薄溶液中 (*in vitro*) とは大きく異なる。細胞内では特定の制御タンパク質による活性調節に加え、さまざまな内在性タンパク質やメタボライトとの非特異的相互作用、多数の高分子が空間を占有することによって生じる体積排除効果により、細胞内タンパクの構造や活性が影響を受けることが示されている。そこで近年、生きた細胞内にあるタンパク質の NMR シグナルを直接観測する *in-cell* NMR 法が注目されている。*in-cell* NMR 法を用いることにより、細胞内タンパク質の構造やダイナミクスを原子レベルで観測することができるだけでなく、内在性タンパク質や低分子化合物との相互作用や、細胞内の酵素による翻訳後修飾反応といった *in vitro* では再現すること困難な細胞内生命現象の観測が期待される。

*in-cell* NMR 法は 2001 年に大腸菌内で大量発現させた金属結合タンパク質 MerA の観測例が最初に報告された。その後 *in-cell* NMR 法は真核細胞にも適用されるようになり、アフリカツメガエルの卵母細胞にマイクロインジェクション法により導入する方法や、哺乳細胞に対して膜透過性ペプチド、ポア形成タンパク質、エレクトロポレーションを用いて導入する方法が相次いで開発され、多様な細胞系において *in-cell* NMR 観測が可能となってきた。

一方、*in-cell* NMR 法では細胞を高密度に NMR サンプル管に懸濁して測定を行うため、NMR 測定中に栄養源が枯渇して細胞内環境が経時的に劣化し、細胞死や観測タンパク質の漏出が起こる。そのため従来の *in-cell* NMR 観測では、このような経時変化が起こる前に測定を終了する必要があり (通常 2 時間程度)、細胞内のタンパク質の NMR シグナルを長時間測定し続けることは困難であった。この問題を解決するため我々は、細胞を温度可塑性のポリマーである Mebiol gel に包埋したうえで NMR サンプル管内の細胞に培地を供給するバイオリアクター装置を開発した。本装置を用いることにより、細胞内の環境を生理的に保持して細胞死を抑制することが出来るため、長時間 (24 時間以上) にわたって細胞内のタンパク質を *in-cell* NMR 観測することが可能となった。

### 2. 研究の目的

NMR 法の最大の特徴は細胞を丸ごとそのまま使った非侵襲的な観測が可能点であり、細胞液の抽出を伴う従来の生化学的な解析と比べて大きな利点である。*in-cell* NMR 法を用いれば、例えばリガンド刺激に伴う細胞内に生じるさまざまな生命現象を、抽出過程を経ることなくそのまま観測することが原理的には可能だが、これまでにそのような研究は存在しない。これは、細胞を高密度で懸濁した状態で測定を行う *in-cell* NMR 法では、測定中に栄養源の枯渇に伴う細胞死や観測タンパク質の漏出が生じ、細胞内環境を保持したまま長時間の NMR 測定を行うことが困難であったことに起因する。我々は、上述のように、細胞を生理的条件下に保ったまま *in-cell* NMR 測定を行うことが可能なバイオリアクター技術を確立した (Angew Chem Int Ed, 2013)。本装置を用いることで単に長時間の *in-cell* NMR 測定を行うだけでなく、細胞内標的タンパク質の *in-cell* NMR シグナルを時分割測定してその経時変化を追跡することが可能となる。加えて、還流する培地に薬剤などを添加して細胞に刺激を与えることにより、その結果細胞内で誘起される分子応答を直接観測することも期待できる。そこで本研究では、自身が開発したバイオリアクター装置をさらに高度化し、細胞内での生命現象をリアルタイムに捉える新たな NMR 手法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

細胞内タンパク質の構造や活性の経時変化のリアルタイム観測を達成するためには、短時間で NMR スペクトルを連続的に取得する必要がある。そのために、高感度で観測可能なプローブの探索と安定同位体標識タンパク質の細胞内導入効率の向上を行った。また、さまざまな種類の細胞へと適用を可能にするために、細胞接着性のゲル素材を検討した。

また細胞内のリアルタイム観測の適用例として、抗酸化タンパク質 Trx と細胞内シグナル伝達タンパク質 Ras を観測対象とした。Trx については活性中心の 2 つの Cys 残基の酸化還元状態を、Ras については GTP 結合型 (活性型) と GDP 結合型 (不活性型) の存在割合を検出するための適切なプローブシグナルを探索した。Trx については Ala29 の側鎖メチル基を、Ras については Ile21 の側鎖 1 メチル基が活性状態の変化を鋭敏に反映したことから、これらのシグナルを  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  SOFAST HMQC スペクトルを 1 測定約 30 分で連続的に取得することにより、細胞内の活性状態の経時変化を追跡した。

*in-cell* NMR によって観測されたタンパク質の活性が *in vitro* と異なる要因として、内在性の細胞内因子による活性調節の存在が考えられる。そこで、特定の細胞内因子の寄与を見積もるため、候補因子を CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集によりノックアウトした細胞を調製し、その寄与を見積もる手法を確立した。

### 4. 研究成果

#### バイオリアクター型 *in-cell* NMR 法の高度化

細胞内タンパク質の NMR シグナルは細胞内の高い粘性や内在性分子との非特異的相互作用のため顕著に広幅化する。そのため、 $^{15}\text{N}$  標識タンパク質を細胞内のタンパク質は困難なケー

スが多く新たなプローブの開発が必要である。これまでの予備的検討から、高分子量タンパク質の検出に用いられる ILV 側鎖メチル基をプローブとした Methyl-TROSY 法が有効であることを示した。そこで新たに、Ala の  $\beta$  位プロトンを重水素化した上で側鎖メチル基を  $^1\text{H}^{13}\text{C}$  標識したタンパク質について in-cell NMR 観測を行った結果、Ala 残基のシグナルを感度よく検出できることが明らかとなった。また、分担研究者の甲斐荘は立体整列安定同位体標識法を利用して、Phe, Tyr の  $\beta$  位を選択標識したタンパク質を用いることで、芳香環の回転運動を指標にタンパク質の内部運動を評価する手法を確立した (Biochemistry, 2015)。細胞内においても SAIL-Phe 標識タンパク質の NMR シグナルが有効なプローブとなりうることも示された。

細胞内への標的タンパク質においては、これまでにポリア形成タンパク質 SLO を用いた可逆的な膜透過処理による導入法を確立していた。A02 公募班の村田昌之教授 (東大) との共同研究のもと導入効率の改良を行った。導入時のバッファーを HBSS から細胞内のイオン組成に近い Transport buffer に変更することにより、従来よりも高い効率で細胞内に標的タンパク質を導入できることが明らかとなった。細胞包埋に Matrigel を用いることで接着細胞にも適用可能なバイオリアクターシステムを構築した。また、灌流培地にプロテアソーム阻害剤 MG132 を添加することで細胞内タンパク質分解の抑制による測定感度の向上を達成した。

#### 細胞内酸化ストレスに対する応答の観測

開発したバイオリアクター型 in-cell NMR 法を細胞内分子応答のリアルタイム観測に応用した。まず、細胞内酸化ストレスに対する分子応答を酸化還元タンパク質であるチオレドキシンの酸化還元状態を指標に調べた。チオレドキシ (Trx) は細胞内の代表的な酸化還元タンパク質であり、活性中心に 2 つの Cys 残基 (C32 と C35) を持つ。Trx は細胞内で酸化された基質タンパク質を還元したり、酸化還元電位に応答してシグナル伝達を誘起したりする機能を有している。一方、細胞内の酸化還元状態は細胞内に高濃度で存在するグルタチオンの酸化型および還元型の量比によって規定され、ネルンストの式によって記述できる。細胞内の Trx が酸化還元電位の変化に対してどのように応答するかを調べるため、Trx とグルタチオンの両方が安定同位体標識された細胞を用いて酸化ストレスを添加しながら in-cell NMR による観測を行った。

酸化還元状態を観測するプローブとして、Trx は活性中心近傍に存在する Ala29 の側鎖メチル基を、グルタチオンについては Cys の  $\beta$  位メチレン基のシグナルを用いた。Trx の Ala 側鎖メチル基を選択的に  $^{13}\text{C}$  標識し、SLO を用いた可逆的な膜透過処理により HeLa S3 細胞内に導入した後、Trx 導入細胞を  $^{13}\text{C}$  標識 Cys 含有培地中で一晩培養し細胞内で  $^{13}\text{C}$  標識グルタチオンを *in vivo* 合成した。調製した細胞をバイオリアクター装置による培地還流下で Trx とグルタチオンの in-cell NMR スペクトルを交互に取得した。酸化ストレス非存在下では Trx、グルタチオンともに還元状態として観測されたが、酸化剤として TBH (tert-butyl hydroperoxide) を添加すると酸化型グルタチオンの増加と細胞内 Trx の酸化型への移行が観測された。細胞内酸化還元電位の上昇に対する Trx の酸化還元状態の変化を *in vitro* の測定結果と比較した結果、細胞内のほうが酸化環境において Trx が還元的に保持されていることが明らかとなった。また、還流する培地に Trx 還元酵素の阻害剤である ATG (aurothioglucose) を添加して同様の in-cell NMR 実験を行うと、細胞内 Trx の酸化型の割合が顕著に増大することも分かった。以上より、細胞内 Trx の酸化還元状態は細胞内酸化還元電位の上昇と細胞内 Trx 還元酵素のバランスの上に成り立っていることが明らかとなった (J Am Chem Soc, 2018)。

#### Ras 発癌性変異体の活性評価

Ras は低分子量 GTPase ファミリーに属する代表的なシグナル伝達タンパク質であり、EGF 受容体などの下流のシグナル伝達系における分子スイッチとして機能している。Ras は不活性型である GDP 結合型から GTP 結合型へ交換が促進されることで活性型へと構造変化し、Raf や PI3K など様々なエフェクター分子と相互作用することによって下流のシグナル伝達経路が活性化し、細胞内の増殖・分化・運動などを制御している。また、Ras は癌原遺伝子としても知られており、大腸がんをはじめ多くのがんで 30% 以上、膵臓がんに至っては 60-90% の高確率で Ras への変異が認められる。特に、G12V や Q61L などの変異は Ras の恒常的な活性化を引き起こし、受容体刺激非依存的にシグナル伝達経路を活性化させる。したがって、Ras は抗がん剤をはじめとする創薬ターゲットとしても重要である。

これまでに、*in vitro* における Ras の活性化に関する詳細な解析が行われてきた。共同研究者である Toronto 大学 伊倉光彦 教授らのグループでは、均一  $^{15}\text{N}$  標識を施した Ras の GDP 結合型と GTP 結合型の NMR シグナル強度の経時変化から GTP 加水分解速度 ( $k_{\text{hy}}$ ) や GDP-GTP 交換速度 ( $k_{\text{ex}}$ ) が算出されている [Smith J et al., PNAS (2013)]。得られた  $k_{\text{hy}}$  や  $k_{\text{ex}}$  値に基づいて Ras の定常状態における GTP 型割合を算出すると、野生型 Ras において 30% 程度が活性型である GTP 型として存在すると見積もられた。野生型 Ras の一部が基底状態において恒常的に活性型として存在するという結果は、Ras の分子スイッチとしての役割と矛盾する。そのため実際の細胞内における Ras の活性状態は内在性制御因子の影響を受けることにより、*in vitro* と大きく異なることが想定される。細胞内因子による影響を評価するため、Ras に細胞破砕液を添加した実験が行われた報告があるが [Marshall C et al., Methods (2012)]、破砕液を用いた実験では、制御タンパク質やエフェクター分子などの細胞内分子の濃度や局在、および遊離の GTP などの細胞内生理物質の恒常性を再現することは困難である。よって細胞内での Ras の活性状態の正確

な評価するために、in-cell NMR 法を用いて実際の細胞内環境下における Ras の活性を直接観測することを試みた。

Ile 側鎖メチル基を選択的に  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  標識した Ras (野生型および発ガン性変異体) を HeLaS3 細胞に導入し、1 測定 30 分間の NMR スペクトルを連続的に取得した。Ile21 の NMR シグナル強度を指標として活性型である GTP 結合型の存在割合の経時変化を観測した。観測の結果、Ras の発ガン性変異体 G12V の活性割合は 20% 程度で定常状態に達し、*in vitro* で算出された活性割合 (約 80%) よりも顕著に低いことが判明した。また、GTP 結合型割合の時間変化を理論式に対して非線形近似を行い GTP 加水分解速度( $k_{\text{hy}}$ )と GTP 交換速度( $k_{\text{ex}}$ )を算出した。その結果、細胞内では Ras の GTP 加水分解速度( $k_{\text{hy}}$ )が *in vitro* よりも 2.5 倍上昇し、GTP 交換速度が *in vitro* よりも 5.2 倍低下していた。同様の結果が野生型および他の発ガン性変異体でも観測されたことから、細胞内では活性型 Ras の存在割合が *in vitro* よりも顕著に減少しており、特に野生型では細胞内で完全に不活性型に保たれていることが明らかになった

細胞内における Ras の活性割合が低く抑えられている原因として、さまざまな Ras の活性制御因子の存在が考えられる。具体的には Ras の GTP 加水分解を促進する GTPase 活性化タンパク質(GAPs)や、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)に加え、下流のエフェクター分子も Ras の  $k_{\text{hy}}$  や  $k_{\text{ex}}$  に影響を与えることが知られている。そこでまず、内在性 GAP の寄与を定量するため、代表的な GAP である p120 および NF1 をそれぞれノックアウトした細胞をゲノム編集法により作製し、in-cell NMR により KO 細胞中における Ras の GTP 結合型割合の変化を解析した。その結果、野生型 Ras の GTP 型割合はいずれの KO 細胞中においても有意な差は観測されなかったものの、T35S 変異体では NF1-KO 細胞中でコントロール細胞よりも顕著な GTP 結合型割合の増大が観測された。したがって、細胞内 Ras の加水分解亢進における NF1 の寄与を選択的かつ定量的に評価できることが明らかになった。

また、細胞内は高濃度のタンパク質や生体分子が存在する分子混雑環境であり、内在性分子との非特異的な相互作用や、体積排除効果、粘性の増大などの溶液環境の変化が Ras の活性に影響を及ぼしている可能性がある。これを検証するため、様々な分子クラウド を添加して、細胞内分子混雑環境を模倣した条件下における  $k_{\text{hy}}$  ならびに  $k_{\text{ex}}$  の測定を行った。その結果、グリセロール存在下では  $k_{\text{ex}}$  が野生型および全ての変異体で顕著に低下したことから、粘性の増大によって細胞内 Ras の  $k_{\text{ex}}$  の低下が引き起こされていることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 19 件 )

1. Nishida N, Ito Y, Shimada I "in situ structural biology by in-cell NMR" *Biochem Biophys Acta (General subject)* in press doi: 10.1016/j.bbagen.2019.05.007
2. 西田紀貴, 嶋田一夫 「夾雑系の構造生物学」 *化学と工業* 72 404-406 (2019)
3. Mochizuki A, Saso A, Zhao Q, Kubo S, \*Nishida N, \*Shimada I. Balanced Regulation of Redox Status of Intracellular Thioredoxin Revealed by in-Cell NMR. *J Am Chem Soc.* **140**:3784-3790 (2018) doi: 10.1021/jacs.8b00426
4. Yoshida H, Tanimoto E, Hirai T, Miyanoiri Y, Mitani R, Kawamura M, Takeda M, Takehara S, Hirano K, Kainosho M, Akagi T, Matsuoka M, \*Ueguchi-Tanaka M. Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor GID1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **115**:E7844-E7853 (2018) doi: 10.1073/pnas.1806040115.
5. \*Kainosho M, Miyanoiri Y, Terauchi T, Takeda M. Perspective: next generation isotope-aided methods for protein NMR spectroscopy. *J Biomol NMR.* **71**:119-127 (2018) doi: 10.1007/s10858-018-0198-x.
6. Colaluca IN, Basile A, Freiburger L, D'Uva V, Disalvatore D, Vecchi M, Confalonieri S, Tosoni D, Cecatiello V, Malabarba MG, Yang CJ, Kainosho M, Sattler M, Mapelli M, Pece S, \*Di Fiore PP. A Numb-Mdm2 fuzzy complex reveals an isoform-specific involvement of Numb in breast cancer. *J Cell Biol.* 217:745-762 (2018) doi: 10.1083/jcb.201709092
7. Miyanoiri Y, Hijikata A, Nishino Y, Gohara M, Onoue Y, Kojima S, Kojima C, Shirai T, Kainosho M, \*Homma M. Structural and Functional Analysis of the C-Terminal Region of FliG, an Essential Motor Component of Vibrio Na<sup>+</sup>-Driven Flagella. *Structure.* 25:1540-1548 (2017) doi: 10.1016/j.str.2017.08.010.
8. Beck Erlach M, Koehler J, Crusca E Jr, Munte CE, Kainosho M, Kremer W, \*Kalbitzer HR Pressure dependence of side chain  $^{13}\text{C}$  chemical shifts in model peptides Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH<sub>2</sub>. *J Biomol NMR.* **69**:53-67 (2017) doi: 10.1007/s10858-017-0134-5.
9. Huang S, Umemoto R, Tamura Y, Kofuku Y, Uyeda TQP, Nishida N, \*Shimada I. Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for structural analysis of actin-binding proteins in complex with actin. *Sci Rep* **6**:33690 (2016) doi: 10.1038/srep33690.
10. Takeda M, Miyanoiri Y, Terauchi T, \*Kainosho M.  $^{13}\text{C}$ -NMR studies on disulfide bond isomerization in bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *J Biomol NMR.* **66**: 37-53 (2016) doi: 10.1007/s10858-016-0055-8.
11. Miyanoiri Y, Ishida Y, Takeda M, Terauchi T, Inouye M, \*Kainosho M. Highly efficient residue-selective

labeling with isotope-labeled Ile, Leu, and Val using a new auxotrophic E. coli strain. *J Biomol NMR*. 65: 109-19 (2016) doi: 10.1007/s10858-016-0042-0.

12. Suzuki T, Suzuki S, Umemoto R, Ogino S, Nishida N, \*Shimada I. Mechanical force effect on the two-state equilibrium of the hyaluronan-binding domain of CD44 in cell rolling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 6991-6 (2015) 10.1073/pnas.1423520112.
13. Yang CJ, Takeda M, Terauchi T, Jee J, \*Kainosho M. Differential Large-Amplitude Breathing Motions in the Interface of FKBP12-Drug Complexes. *Biochemistry* **54**: 6983-95 (2015) doi: 10.1021/acs.biochem.5b00820.
14. Wang S, Parthasarathy S, Xiao Y, Nishiyama Y, Long F, Matsuda I, Endo Y, Nemoto T, Yamauchi K, Asakura T, Takeda M, Terauchi T, Kainosho M, \*Ishii Y. Nano-mole scale sequential signal assignment by <sup>1</sup>H-detected protein solid-state NMR. *Chem Commun (Camb)* **51**:15055-8 (2015) doi: 10.1039/c5cc04618a.
15. Wang S, Parthasarathy S, Nishiyama Y, Endo Y, Nemoto T, Yamauchi K, Asakura T, Takeda M, Terauchi T, Kainosho M, \*Ishii Y. Nano-mole scale side-chain signal assignment by <sup>1</sup>H-detected protein solid-state NMR by ultra-fast magic-angle spinning and stereo-array isotope labeling. *PLoS One* **10**: e0122714 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0122714
16. Takarada O, Nishida N, Kikkawa M, \*Shimada I. Backbone and side-chain <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C resonance assignments of the microtubule-binding domain of yeast cytoplasmic dynein in the high and low-affinity states. *Biomol NMR assign* **8**: 379-82 (2014) doi: 10.1007/s12104-013-9522-2
17. Nishida N, Osawa M, Takeuchi K, Imai S, Stampoulis P, Kofuku Y, Ueda T, Shimada I, “Functional dynamics of cell surface membrane proteins” *J Magn Reson*, 241, 86-96 (2014) doi: 10.1016/j.jmr.2013.11.007.
18. Ueda T, Takeuchi K, Nishida N, Stampoulis P, Kofuku Y, Osawa M, Shimada I. “Cross-saturation and transferred cross-saturation experiments” *Q Rev Biophys*, 47, 143-87 (2014) doi: 10.1017/S0033583514000043.
19. Schmidt E, Ikeya T, Takeda M, Löhr F, Buchner L, Ito Y, Kainosho M, \*Güntert P. Automated resonance assignment of the 21kDa stereo-array isotope labeled thioldisulfide oxidoreductase DsbA. *J Magn Reson*. **249C**: 88-93 (2014) doi: 10.1016/j.jmr.2014.10.005.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Noritaka Nishida, Ichio Shimada in-cell NMR 法を用いた細胞内生命反応のリアルタイム観測  
よこはま NMR 研究会第 62 回ワークショップ 横浜 理研鶴見キャンパス (2019 年 3 月)
2. Noritaka Nishida, Ichio Shimada in-cell NMR 法を用いた細胞内生命現象のリアルタイム観測  
第 41 回分子生物学会年会 横浜 パシフィコ横浜 (2018 年 12 月)
3. Noritaka Nishida, Ichio Shimada In-cell NMR observation of the biological events within living cells  
JST-Mirai project キックオフシンポジウム 横浜 理化学研究所鶴見キャンパス(2018 年 3 月)
4. Noritaka Nishida, Ichio Shimada Real-time observation of the biological events within living cells u  
sing in-cell NMR ConBio2017 神戸 神戸国際会議場 (2017 年 12 月)
5. Noritaka Nishida, Ichio Shimada Real-time observation of the biological events within living cells  
using in-cell NMR  
蛋白質科学会 第 17 回年会 仙台 仙台国際センター (2017 年 6 月)
6. Noritaka Nishida, Ichio Shimada “NMR observation of the biological events inside living cells“ The  
27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Aug, 22,  
Kyoto, Japan
7. Noritaka Nishida, Ichio Shimada “NMR observation of the biological events within living cells“ The  
12th European Magnetic Resonance (EUROMAR) 2016, July 4th, Aarhus, Denmark
8. Noritaka Nishida, Ichio Shimada 第 38 回 分子生物学会 (BMB2015) 神戸国際会議場 (2015  
年 12 月) Bioreactor system for in-cell NMR observation of the biological events inside living cells
9. Noritaka Nishida, Ichio Shimada In-cell NMR observation of the biological events within living  
cells The 25th Hot Spring Harbor International Symposium 九州大学 (2015 年 11 月)
10. Noritaka Nishida, Ichio Shimada 生細胞内の生命現象を活写する in-cell NMR 法の開発と応用  
蛋白質科学会 第 15 回年会 徳島 あわぎんホール (2015 年 6 月)
11. Noritaka Nishida, Ichio Shimada 生細胞内の生命現象を観測するバイオリアクター型 in-cell  
NMR 法の開発と応用 よこはま NMR 研究会 第 52 回 ワークショップ 横浜 理研鶴見キ

キャンパス (2015 年 3 月)

12. Noritaka Nishida, Ichio Shimada A bioreactor for NMR observation of biological events inside living cells 第 53 回 NMR 討論会 大阪大学 (2014 年 11 月)

13. Noritaka Nishida, Ichio Shimada A bioreactor system for observing biological event inside mammalian cells In-cell NMR シンポジウム 首都大学東京 (2014 年 9 月)

14. Noritaka Nishida, Ichio Shimada 生細胞内の生命反応をリアルタイムに捉える in-cell NMR 法の開発と応用 新学術領域「動的構造生命」第 1 回領域キックオフシンポジウム 九州大学 (2014 年 10 月)

15. Noritaka Nishida, Ichio Shimada バイオリアクターを用いた生細胞内タンパク質間相互作用の NMR 観測 蛋白質科学会第 14 回年会 横浜 パシフィコ横浜 (2014 年 6 月)

〔図書〕(計 1 件)

1. Noritaka Nishida, Ichio Shimada. Springer, Discoidin domain receptor in health and disease 2016 (57-67)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：甲斐荘 正恒

ローマ字氏名： Kainosho Masatsune

所属研究機関名：首都大学東京

部局名：理学研究科

職名：客員教授

研究者番号 (8 桁)：20137029

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：嶋田 一夫

ローマ字氏名：Shimada Ichio

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。