

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14494

研究課題名(和文) In-organelle NMRによるミトコンドリア内蛋白質の動態解析

研究課題名(英文) Investigating protein behaviours in mitochondria by in-organelle NMR

研究代表者

伊藤 隆 (ITO, Yutaka)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：80261147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞のオルガネラにおける蛋白質動態は解析すべき重要な生命現象の一つである。本研究では、in-cell NMRを、オルガネラ(特にミトコンドリア)内にある蛋白質に応用することで解析を試みた。

ミトコンドリア移行シグナルを付加したモデル蛋白質を、電気穿孔法でヒト培養細胞に導入し、その後ミトコンドリアを単離することで、良好なin-mitochondria NMRの観測に成功した。希薄溶液状態と同様の立体構造が形成されていたが、細胞質内のスペクトルとの有意な差も観測され、ミトコンドリア・マトリックスが蛋白質動態に与える影響を反映している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Protein behaviours in eukaryotic organelles were investigated by extending the in-cell NMR approaches to be available for the analysis of proteins localised in organelles, particularly mitochondria.

A model protein with a mitochondrial targeting signal was incorporated into cultured human HeLa.S3 cells by electroporation, and then the mitochondria fraction was isolated for NMR experiments. Well-resolved in-mitochondria NMR spectra showed that the proper 3D structure was formed, while different effects of the mitochondria matrix environment to the conformation and dynamics of proteins was suggested from the observed spectral differences when compared with the samples in cytosol or in diluted solution suggested.

研究分野：構造生物学

キーワード：In-cell NMR In-organelle NMR ミトコンドリア 蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

In-cell NMR は細胞内蛋白質の原子分解能の *in situ* 解析が可能な唯一の手法である。研究代表者らは、世界に先駆けて生きた大腸菌内の蛋白質の立体構造決定に成功し *Nature* 誌に報告した。また、ヒト培養細胞や培養昆虫細胞 Sf9 の系においても、細胞内蛋白質の立体構造解析に結びつく詳細な NMR 解析が可能であることを示した。しかし、従来の in-cell NMR 解析は、「細胞質」内の解析であり、細胞質で合成されてオルガネラに運ばれ、そこで機能する蛋白質の解析は全く視野に入っていなかった。研究開始の直前にイタリアのグループが、ミトコンドリア内の蛋白質の 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関スペクトルの測定に成功したが、詳細な解析を可能にするような技術開発はまだ達成されていなかった。一方で、各オルガネラは細胞質とは異なる環境を持ち、蛋白質に対する影響も細胞質とは異なることが予想された。そこで、様々な技術開発を行いつつ、世界初のオルガネラ内の蛋白質の「詳細な」NMR 解析を行うことを着想した(図1に本研究の概要を示した)。

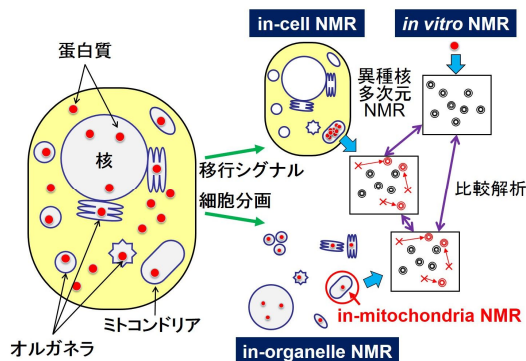


図1. 本研究の概要

真核細胞の in-cell NMR の最も困難な点は、安定同位体標識された標的蛋白質の細胞質内濃度が低いことに起因する「感度の問題」である。本研究では細胞内に合成された蛋白質がさらにミトコンドリア・マトリックスに運ばれた後を見ようとしているため、感度の問題は一層チャレンジングなものとなっていた。研究代表者らはこれまで、nonlinear sampling を用いた迅速な多次元 NMR 測定法と quantitative maximum entropy 法を用いた新しいデータ解析技術を用いて in-cell NMR の感度の問題に挑んできたが、本研究ではこのアプローチをさらに進めていくこととした。一方で、ミトコンドリアは分画・単離方法が確立しているため、単離したミトコンドリアを用いた in-mitochondria NMR 測定は(新規なものと考えられるが)充分実施可能であると考えられた。また、単離したミトコンドリアを、活性を保持した状態である程度維持することも可能なため、in-mitochondria NMR 測定を行うことで、生物学的に有意義な情報を抽出できる可能性が高い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内の蛋白質の解析に対して潜在的なポテンシャルを持つ in-cell NMR 法を、真核細胞のオルガネラ内にある蛋白質の解析法として発展させることである。対象となるオルガネラとしては、細胞質と特に異なる環境を保持し、その単離方法も確立されているミトコンドリアを用いる。ミトコンドリア・マトリックスに存在する低分子量の蛋白質を中心に解析を行い、ミトコンドリア内環境が蛋白質の立体構造や動態(フォールディング安定性や高分子複合体との相互作用など)に与える影響を解析する。蛋白質のオルガネラにおける機能発現のメカニズムは解析すべき重要な生命現象の一つである。一方で各オルガネラ内の物理化学的環境は十分に解明されていない。したがって、本研究の成果は、オルガネラにおける蛋白質の構造・活性相関を解析するためのブレイクスルーになる可能性がある。

### 3. 研究の方法

本研究では、オルガネラの中で細胞質と特に異なる環境を保持し、単離方法も確立されているミトコンドリアを第一の対象とした。また、研究開始後、核に局在する蛋白質の動態解析にも着手した。

対象となる真核細胞としては、昆虫培養細胞 sf9/baculovirus の系と、ヒト培養細胞 HeLa.S3 の系を併用し、対象となる蛋白質によってうまくいく方を選択した。

研究はまず、モデル試料を用いて in-organelle NMR の手法の確立と、測定・解析上の要素技術の改良・最適化を行い、次に、実際にミトコンドリア・マトリックスに存在する蛋白質について解析を試みることにした。

### 4. 研究成果

本研究ではミトコンドリア・マトリックスに存在する蛋白質の解析が最終目標であるが、in-mitochondria NMR の方法論を確立するためのモデル試料として、既に in-cell NMR 解析で実績がある連鎖球菌 protein G B1 ドメイン (GB1) および高度好熱菌 *T.thermophilus* HB8 TTHA1718 にミトコンドリア移行シグナル (MTS) を付加したもの(以後、それぞれ MTS-GB1, MTS-TTHA1718 と略記)を用いた。使用する in-cell NMR の系としては昆虫培養細胞 sf9/baculovirus の系と、ヒト培養細胞 HeLa.S3 の系を用いた。

このうち sf9/baculovirus の系では、MTS-GB1 および MTS-TTHA1718 の発現系を作成し、大量発現を試みたが、良好な in-cell NMR および in-mitochondria NMR スペクトルの観測に十分と考えられる程度の発現量が得られなかった。この系については、細胞内の発現量の最適化を継続して試みている。

HeLa.S3 細胞の系については、MTS-GB1 と MTS-TTHA1718 の大腸菌内の大量発現系を構築し、かつ NMR 観測のための安定同位体  $^{15}\text{N}$  標識試料の大量調製を行った。標的蛋白質を HeLa.S3 細胞内に導入する方法としては、膜貫通ペプチドを用いる方法、電気穿孔法を用いるもの、膜破壊毒素 streptolysin O を用いるものなどが提案されているが、試行錯誤の結果、電気穿孔法を用いてこれらの蛋白質を細胞質に導入することに成功した。また、細胞質への導入後に移行シグナルが切断されミトコンドリア内に輸送されていることも確認した。

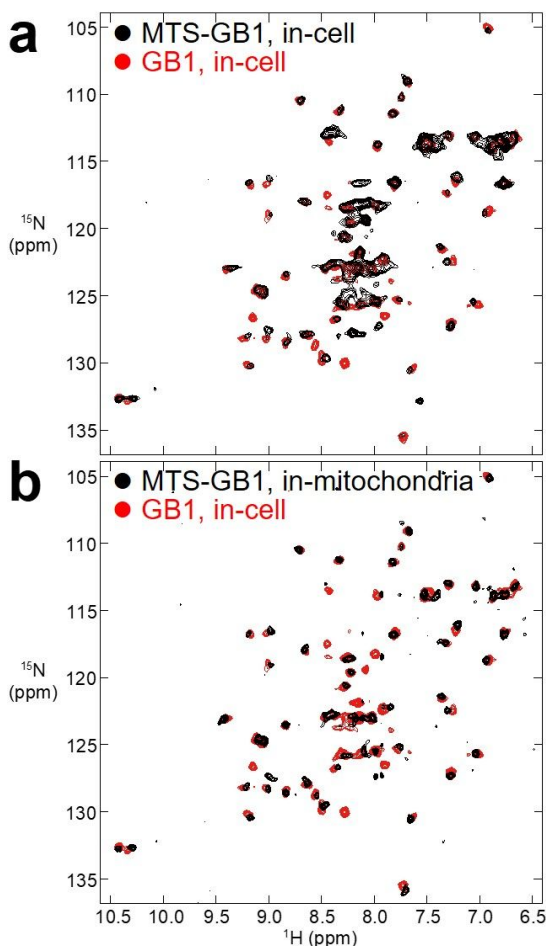


図 2. a. HeLa.S3 細胞に導入した  $^{15}\text{N}$  標識 MTS-GB1 の 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC スペクトル (黒) と、同様に HeLa.S3 細胞に導入した MTS を付加していない  $^{15}\text{N}$  標識 GB1 の 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC スペクトル (赤) の比較. b. ミトコンドリア画分中の  $^{15}\text{N}$  標識 MTS-GB1 (MTS は切断されている) の 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC スペクトル (黒) と、HeLa.S3 細胞に導入した MTS を付加していない  $^{15}\text{N}$  標識 GB1 の 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC スペクトル (赤) の比較。

これらの結果を受けて、 $^{15}\text{N}$  標識 MTS-GB1 を用いて、in-cell NMR 測定および in-mitochondria NMR 測定を行った。実験は以下のステップで行った。まず、電気穿孔法で HeLa.S3 細胞に導入し、細胞の回復のための培養の後、NMR 試料管に封入し 2D

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC スペクトルの測定を行った (図 2a)。SOFAST-HMQC は迅速な  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関 NMR スペクトルの取得のために開発された方法であり、in-cell NMR 測定に非常に有効である。その後、細胞試料を回収し、破碎・ホモジナイズ後遠心を行うことによって、ミトコンドリアを分画・回収した。これを、再び NMR 試料管に封入して  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC スペクトルの測定を行った (図 2b)。

細胞全体を試料とした際には、立体構造を保持した状態と部分変性が推定される状態が混在したスペクトルが観測された。これは細胞質内に存在する MTS-GB1 由来のシグナル、ミトコンドリア・マトリックス内に存在する (MTS が切断された) GB1 由来のシグナル、ミトコンドリアへの移行過程にある GB1 のシグナルが混在して現れているものを推定される。一方で、今回初めて良好なスペクトルとして観測された in-mitochondria NMR スペクトルからは、部分変性状態ではなく正しい立体構造の形成が示唆されている反面、希薄溶液状態や細胞質内の GB1 スペクトルと有意な差が得られた。この結果は非常に興味深く、細胞質とは環境が異なるミトコンドリア・マトリックスが蛋白質のコンフォメーション、ダイナミクス、フォールディング安定性などに与える影響を観測している可能性があり、さらなる解析が大いに期待される。

モデル蛋白質を用いた方法論的開発に加えて、実際にミトコンドリア・マトリックス内に存在する蛋白質の解析の検討も行った。その際にはマルチステップな選考基準を設け、解析に適した試料を絞り込んだ。今後は、in-mitochondria NMR およびマトリックス環境をミミックした in vitro 解析を組み合わせ、ミトコンドリア・マトリックスが蛋白質動態に及ぼす影響について解析を行っていく計画である。

以上の in-mitochondria NMR 解析に加えて、核内蛋白質の NMR 観測を目指した研究も行った。核に局在する、RNA 結合活性を持つマルチドメイン蛋白質をモデル試料とし、各ドメインに C 末端の核局在シグナル (NLS) を結合させたフラグメントをデザインして、大腸菌を用いた発現系の作成を行った。現在までに各フラグメントの大量調製・安定同位体標識を完了しており、in-mitochondria NMR と同様のプロトコルで、核を分画し NMR 解析を行っていく予定である。以上のように、本研究で目的とした in-organelle NMR の手法的基盤の確立ができつつあることで、様々な応用研究が進展することも期待される。

さらに、詳細な in-cell, in-organelle NMR のための NMR 測定・解析手法の開発も並行して行った。具体的には、バイオリアクターを用いて NMR 試料管内の細胞の延命を図る方法、常磁性効果を用いた蛋白質ドメ

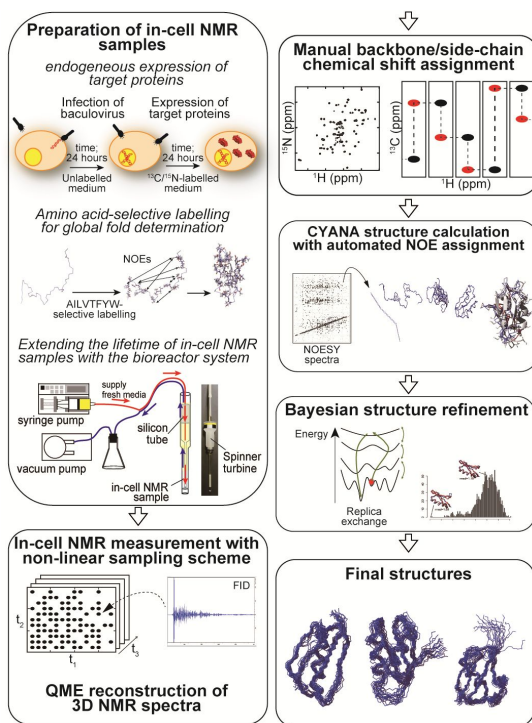


図3. 詳細な in-cell, in-organelle NMR のための、迅速な多次元 NMR 測定法・データ処理法、多次元 NMR スペクトルの自動帰属法、多次元 NMR スペクトルの自動帰属法、ベイズ推定を用いた蛋白質の立体構造計算法の模式図。

イン間の相対配置・蛋白質間相互作用の解析手法、迅速な多次元 NMR 測定法・データ処理法の開発、多次元 NMR スペクトルの自動帰属法の開発、ベイズ推定を用いた蛋白質の立体構造計算法の確立、ミトコンドリア内蛋白質の動態解析を視野に入れたアミノ酸選択的  $^{15}\text{N}$  標識法、蛋白質の安定性や相互作用解析のための  $^{15}\text{N}$  緩和解析や  $^{15}\text{N}$ -DEST 測定法、などである（～については図3に模式的に示した。またのベイズ推定によって決定された生きた Sf9 細胞内の蛋白質の立体構造を図4に示した）。これら NMR 手法の整備によって、生物学的に重要な様々な蛋白質の in-cell, in-organelle NMR 解析が進むことを期待している。

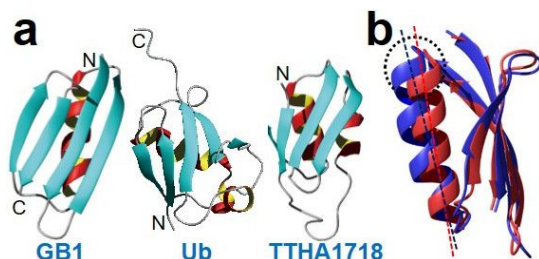


図4 a. 図3の解析スキームによって決定された、生きた Sf9 細胞内の GB1, Ub, TTHA1718 蛋白質の立体構造. b. GB1 において発見された希薄溶液中（赤）と Sf9 細胞中（青）の立体構造の差異。

## 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 7 件)

Ikeya, T. & Ito, Y. “Protein NMR structure refinement based on Bayesian Inference for dynamical ordering of biomacromolecules” *J. Comput. Chem. Jpn.*, accepted. 査読有

Ikeya, T., Ban, D., Lee, D., Ito, Y., Kato, K. & Griesinger, C. “Solution NMR views of dynamical ordering of biomacromolecules” *Biochem. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1862**, 287-306 (2018). 査読有 doi: 10.1016/j.bbagen.2017.08.020.

Inomata, K., Kamoshida, H., Ito, Y. & Kigawa, K. “Impact of cellular health condition on protein folding state in mammalian cells” *Chem. Comm.* **53**, 11245-11248 (2017). 査読有 doi: 10.1039/c7cc06004a.

Matsuda, N., Kimura, M., Queliconi, B.B., Kojima, W., Mishima, M., Takagi, K., Koyano, F., Yamano, K., Mizushima, T., Ito, Y., & Tanaka, K. “Parkinson's disease-related DJ-1 functions in thiol quality control against aldehyde attack in vitro.” *Sci. Rep.* **7**, 12816 (2017). 査読有 doi: 10.1038/s41598-017-13146-0

Ikeya, T., Hanashima, T., Hosoya, S., Shimazaki, M., Ikeda, S., Mishima, M., Güntert, P. & Ito, Y. “Improved in-cell structure determination of proteins at near-physiological concentration” *Sci. Rep.* **6**, 38312, (2016). 査読有 doi: 10.1038/srep38312

Hikone, Y., Hirai, G., Mishima, M., Inomata, K., Ikeya, T., Arai, S., Shirakawa, M., Sodeoka, M. & Ito, Y. “A new carbamidemethyl-linked lanthanide chelating tag for PCS NMR spectroscopy of proteins in living HeLa cells” *J. Biomol. NMR* **66**, 99-110 (2016). 査読有 doi: 10.1007/s10858-016-0059-4

伊藤 隆, 「In-cell NMR と nonlinear sampling - there is no other way」 *分光研究* **64**, 413-426 (2015). 査読有

## 〔学会発表〕(計 12 件)

伊藤 隆, 「常磁性金属を利用した NMR による生細胞内蛋白質の立体構造解析」, 日本化学会第 98 春季年会, 日本大学理工学部, 千葉, 2018 年。

伊藤 隆, “NMR approaches to investigate protein folding and dynamics in the crowded intracellular environment”, 第 55 回生物物理学会年会, 熊本大学, 熊本, 2017 年。

伊藤 隆, “In situ structural biology by NMR”, 分子研研究会「生体金属動態」, 分子研, 岡崎, 2017 年

伊藤 隆, 「NMR による生細胞内蛋白質の立体構造・ダイナミクスの解析」, 日

本薬学会第137年会, 仙台国際センター, 仙台, 2017年.

伊藤 隆, “Protein structure determination in living eukaryotic cells by in-cell NMR spectroscopy”, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, 2016年.

Ito, Y., “In situ structural biology by NMR”, The 42nd Naito Conference “In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences”, Sapporo, Japan (2016).

Ito, Y., “In situ structural biology by NMR”, 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems 2016, Kyoto, Japan (2016).

Ito, Y., “NMR to probe *in vivo* protein conformation”, UK/RoI-Japan Symposium on frontier technologies: from single molecules to cells and tissues, Leicester, UK, (2016).

伊藤 隆, 「NMR を用いた生細胞中の蛋白質の立体構造解析」, シンポジウム「細胞環境における蛋白質の動態解析のための NMR および計算科学的アプローチ」, 京都大学吉田キャンパス, 京都, 2016年.

Ito, Y., “In situ structural biology by NMR”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem) 2015, Hawaii, USA (2015).

伊藤 隆, “In situ structural biology by NMR”, BMB2015, 神戸ポートアイランド, 神戸, 2015年.

伊藤 隆, 「細胞内クラウディング環境における蛋白質のフォールディングとダイナミクスを NMR で観察する」, 第53回日本生物物理学会年会, 金沢大学角間キャンパス, 金沢, 2015年.

#### 〔図書〕(計 1 件)

Ito, Y. & Ikeya, T. “Chapter 3, Advances in NMR data acquisition and processing for protein structure determination” Experimental approaches of NMR spectroscopy -Methodology and application to life science and materials science-, Springer (2017). 総ページ数: 636

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 隆 (ITO, Yutaka)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号: 80261147

##### (2) 研究分担者

美川 務 (MIKAWA, Tsutomu)

独立行政法人理化学研究所・生命システム情報センター・専任研究員

研究者番号: 20321820