

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：22604
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2021～2023
課題番号：21H02419
研究課題名(和文)迅速で高感度なNMR解析によるin situ構造生命科学

研究課題名(英文)In-situ structural biology by NMR spectroscopy

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：(1)細胞内蛋白質の立体構造・ダイナミクスの解析，(2)細胞内マルチドメイン蛋白質のドメイン間相互作用の解析，(3)細胞内蛋白質間相互作用の解析，について研究を行った．
(1)については，「迅速で高感度な多次元NMR測定法」，「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」，「細胞試料を長時間測定するためのマイクロ培養技術」などの要素技術の開発を行った．
(2)については，常磁性NMR情報を用いることで，linear-polyUbなどの試料についてドメイン間相対配置の決定を行った．(3)については，Nrf2とKeap1の相互作用のヒト細胞内での解析などで成果が出た．

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって，これまで困難であった，「細胞内環境が，様々な生命現象に関与する蛋白質群の立体構造やダイナミクスに与える影響」の詳細な解析が，in-cell NMRの手法を用いて可能になりつつある．細胞内クローディング環境は生体高分子が内在的に持つ生物活性上重要な性質を顕在化させている可能性があり，単離精製された状態に加えて，細胞内での蛋白質動態の研究が加速すれば，蛋白質の生物活性発現のより良い理解につながる．また，本研究の成果は，例えばヒト培養細胞内の原子分解能でのドラッグスクリーニングなど，医療や創薬への波及効果も大いに期待される．

研究成果の概要(英文)：We have studied on (1) analysis of three-dimensional structures and dynamics of proteins in live cells, (2) analysis of inter-domain interactions of multi-domain proteins in live cells, and (3) analysis of intracellular protein-protein interactions.
For (1), we developed key elemental technologies such as "methods for rapid multidimensional NMR measurements and efficient reconstruction of spectra", "automated NMR data analysis and high-precision 3D structure determination of proteins using information science" and "Bioreactor microculture techniques for long-term NMR measurement of cell samples". For (2), the relative domain orientations were determined for proteins such as linear-polyUb by using PCS/PRE paramagnetic NMR data. For (3), results were obtained in the analysis of the interaction between Nrf2 and Keap1, etc. in human cells.

研究分野：構造生物化学

キーワード：In-cell NMR 蛋白質 立体構造 ダイナミクス 相互作用 液液相分離

1. 研究開始当初の背景

細胞内環境は非常に混雑した状態(分子クラウディング)にあり、蛋白質の生物活性に著しい効果を与えるほか、立体構造やダイナミクスにも顕著な影響を与え、「排他的な」排除体積効果と「親和的な」非特異的結合の絶妙なバランスが存在する場を提供している。

このような細胞内分子クラウディング環境の影響が、細胞内で機能する蛋白質の運動性や動的平衡に影響を与えて、当該蛋白質が内在的に持つ生物活性上重要な性質を顕在化させる可能性は十分にある。また細胞内環境の影響は、**IDP**(真核生物で全蛋白質の**20~30%**)や、天然変性領域を持つ蛋白質、フレキシブルなリンカーで結ばれたマルチドメイン蛋白質(真核生物で全蛋白質の約**75%**)に対してより大きく現れると推定される。蛋白質間相互作用も、他の分子との非特異的な相互作用によって影響を受けると考えられる。したがって、真核細胞内で蛋白質が寄与する様々な生命現象を原子分解能レベルで明らかにするためには、細胞内環境がこれらの生命現象に關与する蛋白質群の立体構造やダイナミクスに与える影響を詳細に解析する必要があると考えられた。

In-cell NMRは、細胞内蛋白質動態を原子分解能で解析できる唯一の手段として大きな期待が寄せられてきた。しかし、研究開始当初の**in-cell NMR**測定は、観測・解析可能な生体分子が安定で低分子量のものに限定されるという問題があった。また、細胞由来の様々なノイズにより、**NMR**データに含まれている蛋白質の運動性などの繊細な情報が埋もれてしまっているか、もしくはデータ解析の過程で切り捨てられてしまっているという問題が提起されていた。そこで**in-cell NMR**測定技術を多様な分子に適用可能な汎用手法へ拡張し、**NMR**データが本来持つ時空間情報を最大限抽出する手法の開発を行う必要があると考えた。本研究では、以上述べたような背景のもとに、**in-cell NMR**によって得られた立体構造、ダイナミクス、フォールディング安定性、蛋白質間相互作用の変化を詳細に解析することで、細胞内分子クラウディング環境の普遍的な理解に挑戦した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、巨視的な細胞動態と、それを構成する生体分子の微細なふるまい、の**2**つの異なる階層を結びつけ、生体高分子の動的な細胞制御の機構を原子レベルで理解することにあつた。

近年、**in-cell NMR**を用いた研究は国内外で増加傾向にあつた。しかし細胞内蛋白質の立体構造・ダイナミクスを詳細に解析した研究は研究代表者らのグループ以外からはごく限られた報告しかなかった。本研究で提案する、「真核細胞の**in-cell NMR**による、細胞内蛋白質動態の原子分解能での解析」は、ユニークな解析技術に裏付けされ、かつ非常に独自性に富んでおり、創造性のあるものと考えられた。本研究の成果は、基礎科学のみならず、医療や創薬への波及効果も大いに期待された。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、**3**種の細胞内生命現象の解析に挑戦することとした。すなわち、真核細胞内での、**(1)**蛋白質の立体構造・ダイナミクス、**(2)**マルチドメイン蛋白質のドメイン間相互作用、**(3)**蛋白質間相互作用、の解析である。

解析対象としては、まず**in-cell NMR**のモデル試料としてよく用いられている、ヒトユビキチン変異体(**Ub3A**)、および**Ub3A**タンデム二量体を想定した。その後、実在の系への応用として、細胞内シグナル伝達**MAPK**経路に關与する蛋白質群を用いることとした。また、細胞試料調製に当たっては、主として、ヒト**HeLa**もしくは**HeLa.S3**細胞を用い、単離・精製された安定同位体標識蛋白質を細胞内に導入する方法を用いることとした。

それぞれの具体的な研究計画・方法は以下の通りであった。

(1) 細胞内蛋白質の立体構造・ダイナミクスの解析

まず、本研究の遂行に必要な要素技術の開発・高度化を行うこととした。

「迅速で高感度な多次元**NMR**測定法」については、データをランダムに間引いた**NMR**データの再構成のために、圧縮センシングを用いた新しい信号再構成法について研究を行った。「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」については、ベイズ推定を用いた新しい構造計算法の汎用化を目指した。「細胞試料を長時間測定するためのマイクロ培養技術」については、連続的に新鮮な培地を**NMR**試料管に供給するバイオリアクター装置を採用し、より簡便で堅牢なシステムの構築を目指した。

(2) 細胞内マルチドメイン蛋白質のドメイン間相互作用の解析

ヒト培養細胞を用いた**in-cell NMR**実験では、(試料の制約による)低い測定感度という問題が避けられない。この状況では通常の**NOE**情報を用いた立体構造解析は困難なため、常磁性のランタノイド(**Ln³⁺**)結合タグ(**LBT**)で化学修飾し、感度の良い**2**次元**NMR**スペクトルで観測される擬コンタクトシフト(**PCS**)や常磁性緩和促進(**PRE**)の情報を距離情報として用いる

方法が期待されている。これらの **in-cell PCS/PRE** データを立体構造情報として利用するための手法的な整備を行った。

そのうち、モデル試料を用いて、真核細胞内で **in-cell NMR** 測定を行い、細胞内分子クラウディング下でのドメイン間相対配置の決定を行うこととした。

(3) 細胞内蛋白質間相互作用の解析

分子クラウディング環境下で非特異的相互作用と競合した状態での、特異的な相互作用の描像を明らかにすることは非常に重要である。細胞内蛋白質間相互作用を解析するための手法的基盤の確立を行うこととした。特に **LBT** を用いた **in-cell NMR** 解析は、細胞内の蛋白質間相互作用解析にも有用である。一方に **Ln³⁺** 標識を行い、他方に安定同位体標識を行うことで、細胞内の蛋白質間相互作用と、複合体中でのそれぞれの蛋白質の相対的配置を特異的に、詳細に観測することが可能と考えられたため **LBT** を用いた手法の有用性の検討も行うこととした。

4. 研究成果

(1) 細胞内蛋白質の立体構造・ダイナミクスの解析

「迅速で高感度な多次元 **NMR** 測定法」については、従来用いていたの最大エントロピー法に加えて、圧縮センシングを用いることで、良好な **4D NMR** データが数時間で再構成できることを確認した(図 1)。「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」については、客観的な指標に基づく、複数構造を仮定した **multi-state** 立体構造計算法の確立を行った。モデル試料(酵母 **YUH1** 蛋白質)に対して、新手法を適用した結果、局所的に特に広い構造分布を持つアンサンブル構造を得ることに成功した。**YUH1** の基質であるユビキチン(**Ub**)との結合活性に関わる変異体の解析や、蛋白質主鎖 ¹⁵N 核の **NMR** 緩和測定によるダイナミクス解析を行うことによって、革新的な **YUH1** の **Ub** 認識メカニズムを提唱するに至った(図 2, 現在投稿準備中)。「細胞試料を長時間測定するためのマイクロ培養技術」については、改良したバイオリアクター装置を用いたより簡便で堅牢なシステムの構築を行った。

(2) 細胞内マルチドメイン蛋白質のドメイン間相互作用の解析

ヒト **ubiquitin** 蛋白質(**Ub**, 76 アミノ酸残基)が直鎖状に複数個連なった **linear polyubiquitin (linear-polyUb)** は、炎症や免疫制御に重要な **NF-κB** 経路の制御に特異的に寄与している。広範な **NF-κB** シグナル制御に関わる **linear polyUb** の分子認識機構には、その立体構造やダイナミクスが寄与していることが示唆される。動的な性質が予想される **linear-polyUb** については、この分子が実際に働いている細胞内での「その場解析」が期待される。本研究では、**in-cell NMR** を用いて、細胞内環境での **linear-diUb** のドメイン間相対配置を解析することを目指した。まず、希薄溶液中の **linear-diUb** について、**PRE/PCS** 由来の距離・角度情報に加えて、**NOE** 由来の近距離情報、化学シフト値から推定された主鎖二面角拘束情報を用い、**CYANA** プログラムによる計算を行うことで、ま

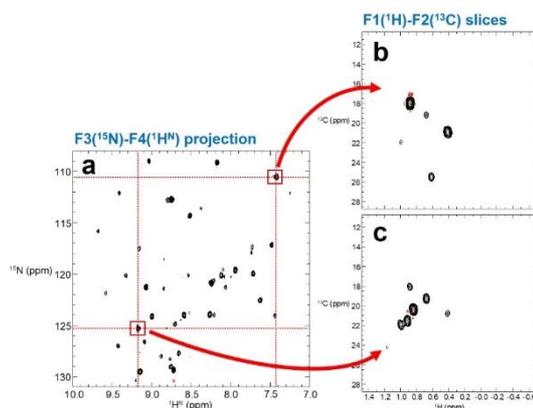


図 1. 圧縮センシングを用いた **4D NMR** スペクトルの再構成。メチル基選択的 ¹H/¹³C 標識 **GRB2** の **4D ¹³C/¹⁵N-separated NOESY**、**4D** スペクトルの **F3(¹⁵N)-F4(¹H)** プロジェクション(a)上の2つのシグナルからの **F1(¹H)-F2(¹³C)** スライス(b,c)。Cambridge_CS ソフトウェアを適用することで、良好なスペクトルが得られた。

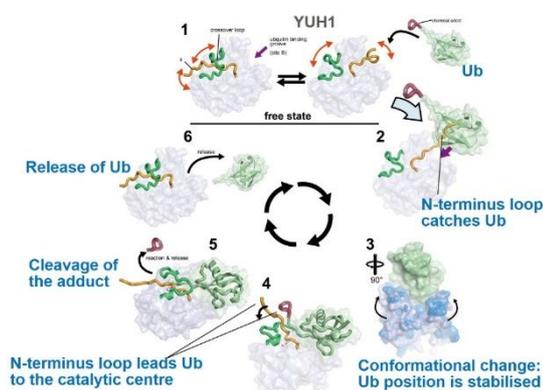


図 2. **Multi-state** 立体構造解析, **NMR** によるダイナミクス解析, および生化学的解析から得られた, **YUH1** の **Ub** 認識メカニズム。

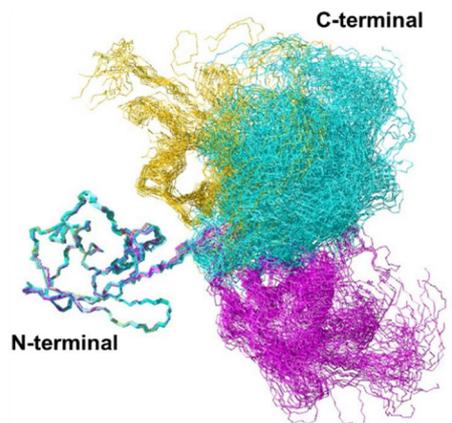


図 3. 希薄溶液中の **linear-diUb** の溶液構造。Open 型に近い構造を水色, semi-close 型に近い構造を黄色, その他の構造をマゼンタで色分けした。

ず希薄溶液中の **linear-diUb** のより詳細な立体構造を決定した (図 3). 得られた構造の多くは, 既報の **open** 型と **semi-close** 型に近いものであったが, 一部の構造は反対側に折れ曲がったような構造を持つなど, 多様なドメイン間相対配置が示唆された. 次に, **HeLa.S3** 細胞中での **PCS** 情報の取得を試みた. **linear-diUb** に化学修飾で Ln^{3+} 金属結合タグ **4PhSO₂-PyMTA** を導入して常磁性型試料を得た. これを **HeLa.S3** 細胞へ導入し, **2D ¹H-¹⁵N SOFAST-HMQC** スペクトル, およびメチル基領域の **2D ¹H-¹³C HSQC** スペクトルを解析することで, **PCS** 情報を得た. **HeLa.S3** 細胞内で観測されたドメイン内 **PCS** 値は, いくつかの領域で希薄溶液中での値と大きく異なっていた (図 4). 現在, **HeLa.S3** 中の **linear-diUb** の詳細な立体構造決定を進めており, 細胞内でのドメイン間相対配置の多様な構造の可視化を試みる. 細胞内環境での **linear-diUb** の構造とダイナミクスを明らかにすることで, 細胞内の **liniar-polyUb** の分子動態の理解を目指す.

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は, ヒト **GRB2** 蛋白質にも適用した. **GRB2** は, ヒト細胞の増殖や分化の制御に重要な役割を果たしている **RAS** 蛋白質のシグナル伝達経路に存在しており, 細胞膜上のレセプター分子からのシグナルを **RAS** の活性化因子である **SOS1** に伝達する役割を持つ. 図 1 でも述べた **4D NOESY** 実験などを駆使して収集した **¹H** 間の **nuclear Overhauser effect (NOE)** 由来の距離情報, および **PRE** 由来の長距離の構造情報 (約 **10 ~ 40 Å**) を用いて, 立体構造解析を行った結果, 既に報告されている結晶構造とドメイン間相対配置において有意な差がある立体構造が得られた (図 5 a). さらに, **GRB2** に関しては, **SOS1** の **GRB2** 結合領域を調製して混合したところ, 液液相分離 (**liquid-liquid phase separation, LLPS**) が起こることが判明した (図 5 b). **GRB2** には, **SOS1** と結合する **SH3** ドメインが 2 つあり, **SOS1** には, **GRB2** と結合する **proline rich motif (PRM)** が最大 **10** カ所程度存在するが (図 5 c), このような「多価の」蛋白質同士の相互作用は **LLPS** を引き起こすことが知られている. **GRB2** と **SOS1** も細胞内で **LLPS** を形成しつつ活性制御がなされている可能性があり, **RAS** の活性化制御の理解において今後新たな展開が期待される. **GRB2** の溶液構造および **GRB2** と **SOS1** の **LLPS** 形成については, 現在投稿論文作成中である. 同様の解析は, **GRB2** のショウジョウバエホモログである **Drk** と **Sos** および **Dos** との相互作用の相互作用の系についても行い, **Drk** の各ドメインの立体構造やダイナミクス, 相互作用について知見が得られている. また **LLPS** 形成に伴う酵素活性上昇のメカニズムについても研究を行った.

細胞内の分子クラウディング環境が蛋白質の立体構造に与える影響についても新たな知見が得られた. **2019** 年に研究代表者らは, 生きた真核細胞内の蛋白質の詳細な立体構造を世界に先駆けて報告した. この中で, **GB1** 蛋白質の立体構造が, 昆虫培養細胞 **Sf9** 内と希薄溶液中では異なり, **Sf9** 内では β -シート構造に対して α -ヘリックスの位置が

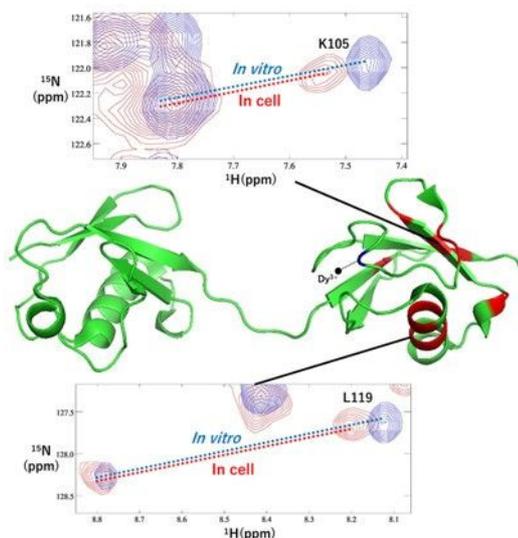


図 4. 希薄溶液中と **HeLa.S3** 細胞内で **PCS** 値が大きく異なる残基. **linear-diUb** の結晶構造 (**2W9N**) 上に示した (赤). **K105** と **L119** については, 希薄溶液中 (青) および **HeLa.S3** 細胞中 (赤) の **2D ¹H-¹⁵N SOFAST-HMQC** スペクトルを重ね合わせて示してある.

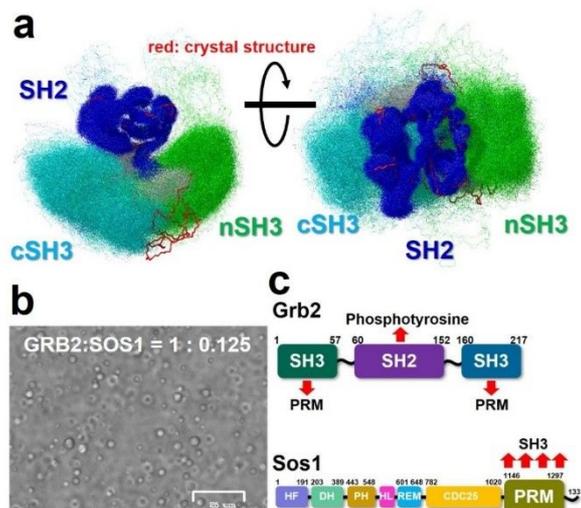


図 5 (a) ヒト **GRB2** の溶液中の立体構造. (b) **GRB2** と **SOS1-PRM** の混合の結果生じた液液相分離. (c) **GRB2** および **SOS1** のドメイン構造の模式図.

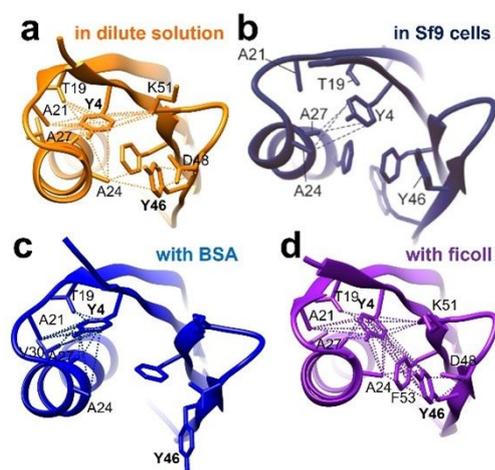


図 6. 希薄溶液中 (a), **Sf9** 細胞内 (b), 試験管内 **BSA** (**300mg/mL**) 存在下 (c), 試験管内 **Ficoll** (**300mg/mL**) 存在下 (d) の **GB1** 蛋白質の立体構造.

蛋白質表面にやや「開いている」ことを示唆した(図 6a,b). 今回 **GB1** に対して, ウシ血清アルブミン (**BSA**), もしくは高度に分岐した高質量の親水性多糖類である **Ficoll** を高濃度に加えた人為的な分子クラウディング環境で詳細な立体構造解析を行った結果, **BSA** 存在下で, **Sf9** 細胞内で起こった立体構造変化を再現させることに成功した(図 6c). **Transferred cross-saturation** 実験からは, **BSA** も **Ficoll** も **GB1** 蛋白質上の同様な領域と接触していることが示されたが, 立体構造に対しては相反する効果が現れ, **Ficoll** はむしろ立体構造を安定化していたことは非常に興味深い. この成果は, 細胞内分子クラウディングが蛋白質の立体構造に及ぼす影響についての定量的な解析への道を開くものであると言える.

(3) 細胞内蛋白質間相互作用の解析

細胞内蛋白質間相互作用解析のモデル系としては, 原がん遺伝子産物 **KRAS** と **RGL2** などのエフェクター分子との相互作用の系, 上記 **GRB2** と **SOS1** の相互作用の系, **Drk** と **Sos** の相互作用の系についても **in-cell NMR** を用いた解析を鋭意行った.

これらの系に加えて, 酸化ストレス防御機構に重要な環境応答型転写因子 **Nrf2** (**nuclear factor erythroid 2-related factor 2**) とその制御因子 **Keap1** (**Kelch-like ECH-associated-protein1**) からなるシステムを取り上げた. **Nrf2** は酸化還元ストレスに対応して, 抗酸化酵素, 金属結合タンパク質, 薬物代謝酵素などの遺伝子の発現を制御している. **Nrf2** は 2 つのモチーフ (**DLG** と **ETGE**) を介して **Keap1** に結合するが, 片側の相互作用のみが乖離する「門と蝶番モデル」が提唱されている. 2 つのモチーフの結合状態を独立かつ詳細に解析するには **in-cell NMR** が最適と考えられた. **Nrf2** による抗炎症作用が注目されているマクロファージや単球の系, がん悪性化に寄与する **Nrf2-Keap1** 結合部位の体細胞変異を有する肺がん細胞株の系や **Nrf2-Keap1** 結合を阻害する **p62** が蓄積した肝がん細胞の系などが確立されていること. また, また, 新規の **Nrf2** 活性化剤として期待される **Nrf2-Keap1** 結合阻害剤も存在していることから, **in-cell NMR** の創薬科学への展開を考えるうえでも重要であると判断された.

Nrf2 の **Keap1** 結合領域 (**Nrf2-Neh2**) は, **HeLa** 細胞導入後速やかに分解されるため, プロテアソーム阻害剤 **MG-132** 存在下で **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 7a). 一方で, **Nrf2-Neh2** 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, **Nrf2** 結合活性が大きく減じた **Keap1** 変異体 (**G333C**) を発現している **A549** 細胞や, **Keap1** を欠失した細胞 (**MEF-KKO**) では, **Neh2** 中の **Keap1** 結合領域に由来するシグナルが観測された(図 7b,c). 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(現在投稿論文作成中). 現在 **Nrf2** と **Keap1** の結合を阻害する薬剤を用いた **in-cell NMR** 解析を行っており, **in-cell NMR** を用いた薬剤スクリーニングの有用性を実証することを目指している.

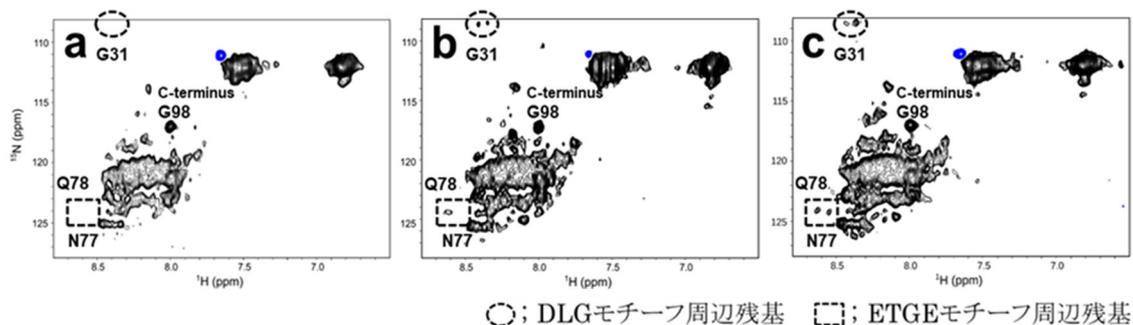


図 7 . **MG132** 処理した細胞内における **Nrf2-Neh2-WT** の 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC スペクトル. (a) **HeLa** 細胞内, (b) **A549** 細胞内, (c) **MEF** 細胞内 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 11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 Tomoto Ura, Ako Kagawa, Nanako Sakakibara, Hiromasa Yagi, Naoya Tochio, Takanori Kigawa, Kentaro Shiraki, Tsutomu Mikawa	4. 巻 13
2. 論文標題 Activation of L-lactate oxidase by the formation of enzyme assemblies through liquid-liquid phase separation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 1435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28040-1	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 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 e2112986118
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, G?ntert Peter, Ito Yutaka, Ikeya Teppei	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 Zhang Bowen, Zheng Dinuo, Yiming Shi, Oyama Kazuhiro, Ito Masahiro, Ikari Masaomi, Kigawa Takanori, Mikawa Tsutomu, Miyake Takeo	4. 巻 1
2. 論文標題 High Efficient and Dosage Controllable Intracellular Cargo Delivery through Electrochemical Metal-Organic Hybrid Nanogates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Small Science	6. 最初と最後の頁 2100069 ~ 2100069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smssc.202100069	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 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 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 KRas4B G12V 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 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 -

1. 著者名 Pooppadi Maxin Sayeesh, Mayumi Iguchi, Kohsuke Inomata, Teppei Ikeya, Yutaka Ito	4. 巻 25
2. 論文標題 Structure and Dynamics of Drk-SH2 Domain and Its Site-Specific Interaction with Sev Receptor Tyrosine Kinase	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms25126386	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 Sakakibara Nanako, Ura Tomoto, Mikawa Tsutomu, Sugai Hiroka, Shiraki Kentaro	4. 巻 19
2. 論文標題 Transient formation of multi-phase droplets caused by the addition of a folded protein into complex coacervates with an oppositely charged surface relative to the protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 4642 ~ 4650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2sm01422j	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 -

〔学会発表〕 計42件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 8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, 伊藤隆第44回日本分子生物学会2021202100
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, 伊藤隆第44回日本分子生物学会2021202100
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 美川 務
2. 発表標題 液-液相分離による酵素活性の制御機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 美川 務
2. 発表標題 液-液相分離による酵素反応の活性化とその応用展開
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
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 Teppei 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, Katsuke 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1件

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
研究 分担者	美川 務 (Mikawa Tsutomu) (20321820)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・専任研究員 (82401)	

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			