

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24770108  
研究課題名(和文) In-Cell NMR法を用いたVRK1キナーゼタンパク質の動的構造の解明  
  
研究課題名(英文) Dynamic behavior of human VRK1 kinase in living cells  
  
研究代表者  
小柴 生造 (Koshiba, Seizo)  
  
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授  
  
研究者番号：70332301  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内における特定のタンパク質のふるまいを、核磁気共鳴(NMR)法とフッ素( $^{19}\text{F}$ )標識法を組み合わせることで選択的に観測するための技術を開発した。またこの技術を用いて生体内で重要な役割を果たしているタンパク質の細胞内におけるNMR信号の観測に成功した。これは、これまで試験管内で解析されてきたタンパク質の構造変化を、実際に機能している生きた細胞内環境下で解明するために必要な重要な技術である。

研究成果の概要(英文)：I developed a new method to analyze dynamic behavior of proteins in living cells using In-Cell NMR and fluorine-labeling methods. High-resolution  $^{19}\text{F}$ -NMR spectra of VRK1 kinase protein were obtained. This method is useful for understanding the dynamic regulation of proteins under physiological conditions.

研究分野：NMR法を用いた生体高分子の構造機能解析

キーワード：酵素 キナーゼ NMR In-cell

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの構造生物学における高次構造レベルでの機能メカニズムの解析は、精製・単離したタンパク質を使い、NMR 法や結晶構造解析などの実験手法を用いて *in vitro* で研究されてきた。しかし、実際の生体内においては何万種類というタンパク質が存在し、特に細胞内においては多数の分子が存在している。このため、生体内における各種タンパク質の機能メカニズムが、基質以外の分子との非特異的な相互作用によって干渉を受け、*in vitro* とは異なる振る舞いをする可能性が指摘されている。また、細胞の種類や置かれた環境、さらには刺激の種類に応じて、様々な翻訳後修飾やサブユニット構成の変化が起こり、複雑かつダイナミックな構造、機能の変化が起こる。このような変化を観測するため、*in vivo* で高次構造を解析する技術が近年必要とされており、生きた細胞内に安定同位体標識したタンパク質を導入し、NMR 法を用いて細胞内のタンパク質の構造や相互作用を調べる In-Cell NMR 法が相次いで報告された (Inomata, et al. Nature 2009; Sakakibara, et al. Nature 2009)。

しかし、これらの技術は通常の *in vitro* での NMR 構造解析に使用している安定同位体標識技術を使用しており、*in vivo* における観測においては、感度や分解能、そして測定に要する時間という点で十分ではない。また生体内の他の分子由来の NMR シグナルも同時に観測されるため、濃度が低いと解析が困難な場合が多い。本研究では、これらの問題を克服するため、従来の標識法を改良するとともに、生体内の他の分子には存在せず、高感度で且つタンパク質の高次構造にほとんど影響を与えない  $^{19}\text{F}$  核を用いてタンパク質を標識し、In-Cell NMR 法に応用することを目的とした。そして、細胞内におけるタンパク質の構造変化、特に外部からの刺激に応じた動的な構造変化を観測し、生体内におけるタンパク質の高次構造レベルでの機能メカニズムや分子認識機構をより詳細に解析する技術を開発することを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず In-Cell NMR 法に適した安定同位体標識技術を検討する。特に、高感度 NMR 測定核である  $^{19}\text{F}$  核で標識した各種タンパク質を作成し、*in vivo* での測定に最適な条件を検討する。我々は既にいくつかの  $^{19}\text{F}$  標識アミノ酸を導入したタンパク質を作成し、良好な NMR スペクトルを得ている。本研究では、標識するタンパク質として、細胞周期の制御に関わるヒトの Ser/Thr キナーゼである vaccinia related kinase-1 (VRK1) を考えている。このタンパク質は生体内において様々なリン酸化や低分子量 G タンパク質などによる制御を受けていることが報告されているが、具体的な活性化のメカニズムは明らかになっていなかった。我々は

以前、シンガポールのナンヤン大学の Yoon 教授との共同研究により、キナーゼドメインの溶液構造を NMR 法を用いて構造決定した (Shin, et al. J. Biol. Chem. 2011)。さらに我々は本研究開始前に、新しい安定同位体標識技術を開発し、全長の VRK1 タンパク質の立体構造を決定することに成功した。本研究では、この VRK1 タンパク質を各種安定同位体標識し、培養細胞に導入して、*in vivo* で高感度 NMR スペクトルを測定する技術を確立することを第 1 の目的とする。

次に、外部刺激に応じて引き起こされる情報伝達経路の活性化に伴って、VRK1 タンパク質の立体構造がどのように変化するか解析する。最初に、刺激に伴うリン酸化部位を同定し、修飾に伴う構造変化を明らかにする。VRK1 タンパク質は、主にタンパク質の C 末端領域に存在するセリヤスレオニンが自身および他のキナーゼによりリン酸化されることで制御されると考えられている。このことは、これらリン酸化に伴い何らかの構造変化が起こっていることを示唆しているが、生体内において実際にどの部位が細胞周期のどの段階でリン酸化されているか詳しくはわかっていない。本研究では、まず安定同位体標識した試料を細胞内に導入し、*in vivo* でセリンやスレオニン残基の化学シフトの変化を観測することにより、刺激に伴うリン酸化部位を同定し、さらに生体内で高感度に測定することができる  $^{19}\text{F}$  標識を組み合わせることで、リン酸化や相互作用に伴う高次構造変化を時系列で明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) In-Cell NMR 法に適した安定同位体標識技術の検討。

まず、各種安定同位体標識した VRK1 タンパク質を作成する。本研究では標識タンパク質の作成に、無細胞蛋白質合成系を用いる。この方法は各種安定同位体標識したタンパク質を大量に合成するという点で非常に実績のある手法であり、標識率の高いアミノ酸選択標識試料の作成に関しても優れている (Kigawa, Methods Mol. Biol. 2010)。また、 $^{19}\text{F}$  標識アミノ酸のタンパク質への導入も既に複数のタンパク質で実現しており、その標識率も非常に高い。VRK1 タンパク質の無細胞蛋白質合成系による発現系は構造決定の際に既に確立している。

In-Cell NMR 法では通常  $^{15}\text{N}$  標識体を用いるが、本研究では感度の向上のために  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識体を作成する。これはタンパク質の炭素に結合した水素を重水素化することにより、通常の  $^{15}\text{N}$  標識体に比べてより高感度に NMR シグナルを観測することができるためである。以前の研究で VRK1 タンパク質の NMR シグナルの帰属は終わっている。また各種  $^{19}\text{F}$  標識アミノ酸を用いて、 $^{19}\text{F}$  標識タンパク質を作成する。具体的には、主に側鎖の芳香環やメチル基等を  $^{19}\text{F}$  標識した

タンパク質を作成する予定である。19F の各シグナルは各残基の変異体を作成して帰属を行う。

#### (2) 標識タンパク質の細胞への導入。

(1) で標識したタンパク質を細胞に導入する。使用する動物細胞としては、In-Cell NMR 法で既に使用例がある HeLa 細胞などをまず使用するが、導入効率や VRK1 の情報伝達系も考慮して様々な培養細胞を検討する。細胞内へのタンパク質の導入に関しては、以前の報告で使用された、ウイルス由来の膜貫通ペプチドを目的タンパク質の N 末端側に融合させたタンパク質を作成して導入する方法をまず検討する (Inomata, et al. Nature 2009)。また、これまで報告されている他の導入方法 (別の種類の膜貫通ペプチドやリポソームを用いた導入、さらには膜傷害毒素を用いて細胞膜に部分的に膜透過性を持たせる方法 (Ogino, et al. J. Am.Chem. Soc. 2009) など) も検討する。標識タンパク質導入後、速やかに細胞を回収し、NMR 測定溶媒に置換後、NMR 測定を行う。得られたスペクトルを *in vitro* での結果と比較し、導入タンパク質が高次構造を維持していることを確認する。

#### (3) 細胞内に導入した VRK1 タンパク質のリン酸化に伴う構造変化の解析。

(2) で確立した系を用いて、実際に生きた細胞内における VRK1 タンパク質の動的な構造変化を観測する。VRK1 タンパク質は細胞周期の制御に関わっており、その各段階で様々な制御がされていると考えられている。

本研究では時間変化を観測するため、できるだけ短時間で測定する必要があり、BEST/SOFAST 法や nonlinear sampling 法などの高速測定法を組み合わせることで、測定の最適化を行う (Schanda, Prog. NMR Spectrosc.2009)。次に化学シフトが変化した残基に変異を入れた VRK1 タンパク質を同様に細胞に導入し、NMR 測定を行い化学シフト変化の有無を観測する。また、細胞内の他の分子由来のシグナルの影響を排除し、より構造変化に敏感に反応する 19F 核でメチル基や芳香環を標識した VRK1 タンパク質を同様に細胞内に導入し、リン酸化に伴う化学シフト変化をさらに高速且つ高感度に測定する方法を開発する。以上の結果から、VRK1 タンパク質が細胞周期の過程において、どのような構造変化を起こすのか解明することで、生きた細胞内における VRK1 タンパク質の機能メカニズムを明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) In-Cell NMR 法に必要な、培養細胞へのタンパク質の導入法を確立するため、これまで報告されている様々な細胞導入法を検討した。具体的には、各種の膜透過性ペプチドや

膜傷害毒素等の導入法を用いて、HeLa 細胞や 293F 細胞などの培養細胞に対し蛍光標識タンパク質の導入を試みた。結果、複数の方法で細胞内にタンパク質を導入することに成功した。

次に 2H,15N 安定同位体標識タンパク質をそれぞれの細胞導入技術を用いて各種動物細胞に導入し NMR スペクトルを測定して最も効率的な細胞導入条件を検討した。その結果、膜傷害毒素を用いた導入法が最も効率的に標識タンパク質を導入することが出来ることが判明した。またこの方法は NMR 測定後の細胞生存率も高く、安定して細胞内の標識タンパク質の NMR スペクトルを測定することが出来た。一方他の手法では細胞内への導入率が相対的に低かった。現在さらに条件を検討しながらより効率的な細胞内導入法を検討している。

(2) In-Cell NMR 法に適した安定同位体標識技術を開発するため、様々な 19F 標識アミノ酸のタンパク質への導入効率の検討を行った。具体的には、無細胞タンパク質合成法を用いて各種 19F 標識芳香族アミノ酸やメチル基を 19F 標識したアミノ酸をタンパク質に導入し、NMR 測定や質量分析によりタンパク質への導入効率と NMR スペクトルの測定感度を検討した。その結果、19F 標識メチル基を持つアミノ酸が高感度な測定に最適であると判断したが、市販のトリフルオロメチル化アミノ酸のタンパク質への導入効率が悪い。新たに高感度に測定可能でかつタンパク質に高効率に導入可能なトリフルオロメチル化アミノ酸を合成した。これはメチオニンのメチル基の 3 個の水素原子をフッ素に置換したトリフルオロメチオニンで、感度や分解能の点で最も In-Cell NMR 法に適している。

また、新たに導入された 19F 核を高感度に測定できる新規クライオプローブの調整を行うと共に、各種 19F 観測法の検討を行って、In-Cell NMR 法に最適な測定条件を検討した。その結果、トリフルオロメチオニン標識タンパク質の 19F-NMR スペクトルを高感度に測定する方法を確立した。

(3) (2) で開発したトリフルオロメチオニンを、無細胞タンパク質合成系を用いて様々なタンパク質に導入することを試みた。結果効率よくタンパク質に導入する条件を確立した。次にこの 19F 標識タンパク質を培養細胞に導入して、19F-NMR スペクトルの測定を行った。その結果、細胞内に導入されたトリフルオロメチオニン標識タンパク質の 19F のシグナルを非常に高感度に測定することが出来た (図 1)。一方、細胞内に存在する膨大な数のタンパク質は 19F 標識されていないため全く観測されなかった。これにより、生きた細胞内において特定のタンパク質の NMR シグナルを選択的にかつ高感度に測定することが可

能な実験系を確立することに成功した。現在、より効率的な  $^{19}\text{F}$  標識タンパク質の導入及び測定条件を検討している。

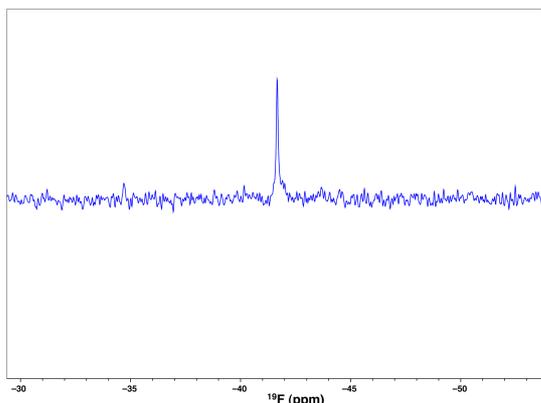


図1：細胞に導入したトリフルオロメチオン標識タンパク質の一次元  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトル

(4) 本研究の目標である生きた細胞内における VRK1 キナーゼタンパク質の動的解析を目指して、まずトリフルオロメチオン標識 VRK1 タンパク質の合成を検討した。その結果、トリフルオロメチオンで標識された VRK1 の大量合成に成功した。発現量は非標識の場合と大きな違いはなく、In-Cell NMR 法に必要な十分な量の標識タンパク質を得ることが出来た。精製した標識 VRK1 タンパク質の  $^{19}\text{F}$ -NMR 法による測定を行い、各メチオン残基のシグナルが分離した高感度高分解能  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトルの測定に成功した(図2)。

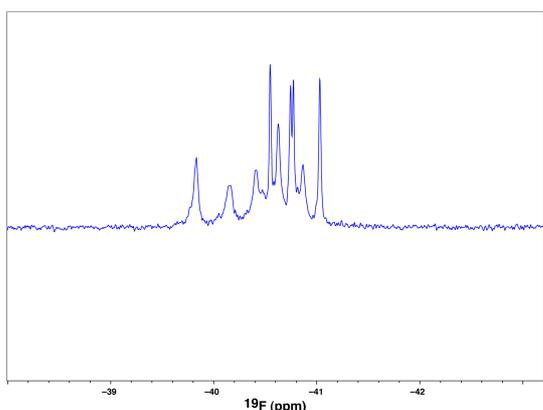


図2：トリフルオロメチオン標識 VRK1 の一次元  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトル

(5) 得られたトリフルオロメチオン標識 VRK1 キナーゼタンパク質を培養細胞に導入する実験を行った。その結果、少量ながら細胞内に標識タンパク質を導入することに成功し、生きた細胞内におけるトリフルオロメチオン標識 VRK1 タンパク質の NMR スペクトルを測定した。ただ導入効率が低く感度が悪いため、現在導入条件の最適化を行っており、より高感度なスペクトルを得るための

努力を続けている。

以上が、本研究の成果である。トリフルオロメチオンで標識したタンパク質の無細胞タンパク質合成法による高効率合成法の確立や、In-Cell NMR 法によるトリフルオロメチオン標識タンパク質の生きた細胞内における  $^{19}\text{F}$  シグナルの観測はいずれも世界で初めてである。本研究の成果は、生きた細胞内におけるタンパク質の動的構造の解析のために非常に強力な手法を提供すると共に、VRK1 キナーゼの細胞内における制御機構の解明に非常に貢献するものである。

#### <引用文献>

- (1) Inomata, K. et al. Nature, 458, 106-109, 2009
- (2) Sakakibara, D. et al. Nature, 458, 102-105, 2009
- (3) Shin, et al. J. Biol. Chem., 286,22131-22138, 1997
- (4) Kigawa, T. Methods Mol. Biol., 607, 1-10, 53-62, 2010
- (5) Inomata, K. et al. Nature, 458, 106-109, 2009
- (6) Ogino, S. et al. J. Am. Chem. Soc. 131, 10834-10835, 2009
- (7) Selenko, P. et al. Nat. Struct. Mol. Biol., 15, 321-329, 2008
- (8) Schanda, Prog. NMR Spectrosc., 55, 238-265, 2009

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし。

6．研究組織

(1)研究代表者

小柴 生造 (Koshiba, Seizo)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク機  
構 准教授  
研究者番号：70332301