

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 8 日現在

機関番号：74408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650056

研究課題名(和文)超高速in-cell NMR動的構造解析法によるSox2の細胞内動態解明

研究課題名(英文)Ultra-fast NMR measurement to analyze dynamics of Sox2 in cells

## 研究代表者

菅瀬 謙治 (Sugase, Kenji)

公益財団法人サントリー生命科学財団・その他部局等・主席研究員

研究者番号：00300822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内における転写因子Sox2の揺らぎをNMRで高速に解析するために、NMR測定のための試料調製法、NMR測定法、データ解析法の開発を行った。試料調製法では、2% DMSOで細胞を処理することによって蛋白質をより効率よく細胞内に導入できた。NMR測定法では、水シグナルを選択的に励起させて水と交換しやすい柔らかい構造領域を同定する測定法が高速揺らぎ測定に有効であることがわかった。また間引いて2次元NMR測定を行う非線形サンプリング法を導入し、かつ間引かれたデータを計算的に復活させるSIFT法の改良を行った。その結果、従来の1/3程度の時間でNMR測定を完了できるようになった。

研究成果の概要(英文)：We developed methods that enable rapid measurement of protein dynamics in cells using NMR. Specifically, we found that (i) a 2%-DMSO treatment of cells drastically enhanced the efficiency of protein incorporation into cells using the cell-penetrating peptide, (ii) presaturation of the water signal is useful for rapid NMR measurements to detect flexible regions in a protein, and (iii) the non-uniform sampling (NUS) method was utilized to reduce the total amount of experimental time and the SIFT algorithm, which we have been developing a computer program to reconstruct NUS data, was further developed. As a result, these newly developed methods enabled us to measure an NMR spectrum more rapidly by approximately one-third than the conventional measurement.

研究分野：構造生物学

キーワード：in-cell NMR タンパク質 揺らぎ 高速測定

### 1. 研究開始当初の背景

国を挙げて進められている iPS 細胞研究の現在の主流は、導入する遺伝子の組み合わせで細胞がどのように変化するのかといったものであるが、リプログラミングや分化のメカニズムを詳細に解き明かすためには、それら遺伝子の翻訳産物(機能の担い手)であるタンパク質の研究が必須である。この点において、申請者は NMR を用いて山中因子 Sox2 の作用機序の解明に取り組んでいる。最近、興味深いことに、Sox2 の DNA 結合ドメイン(HMG)が、37 で天然変性状態にある(室温では折畳まれている)ことを明らかにした。一般に天然変性タンパク質の作用機序は、構造を持ったタンパク質のものとは大きく異なる。したがって、もはや細胞内における Sox2 の動態を明らかにしないことには、往々にして室温以下で実施されている Sox2 の *in vitro* 実験がどこまで妥当なのか不明なままである。このことは、ひいては *in vivo* 実験の結果の解釈にも影響する。

### 2. 研究の目的

本研究では *in-cell* NMR 法と申請者が得意とする動的構造解析法を組み合わせ、細胞内の Sox2 の動態を明らかにする。とくに細胞内で折り畳まれているか否か、および他の分子との相互作用が観測できるか否かについて解析する。ただし、現在の *in-cell* NMR 法では、細胞の寿命が 3 時間程度であるが、*in vitro* での動的構造解析では細胞内タンパク質よりもずっと濃い試料を用いて 24 時間ほど NMR 測定を行う。そのため細胞内タンパク質の動態解析を可能にすること自体が非常にチャレンジングである。最近、申請者は、動的構造解析の測定時間を 1/10 まで短縮する方法論を開発しているため、本研究では、この方法論をさらに発展させて、*in-cell* NMR 用の超高速動的構造解析法を開発することから着手する。

### 3. 研究の方法

本研究には 3 つの研究要素が含まれる。効率的に細胞内に測定対象とするタンパク質を導入する方法論を開発する。とくに細胞の前処理方法の見直しと、*in-cell* NMR 測定対象のタンパク質に連結させて細胞膜を透過させるためのペプチド性タグ(細胞透過タグ)を改良する。高速にタンパク質の揺らぎを解析するための NMR 測定法の開発。とくに、間引いて NMR データ測定を測定することによって測定に要する時間を短縮する非線形サンプリング法を用いる。で間引いて測定した NMR データを計算的に再構築するコンピュータプログラムである SIFT 法の改良。

### 4. 研究成果

研究要素では、元々、細胞透過が困難である GB1 タンパク質をテストサンプルとして、まずは種々の細胞の前処理方法を検討

した。その結果、2% DMSO で細胞を前処理することによって、タンパク質が細胞質内でほぼ均一に拡散することが分かった(図 1)。

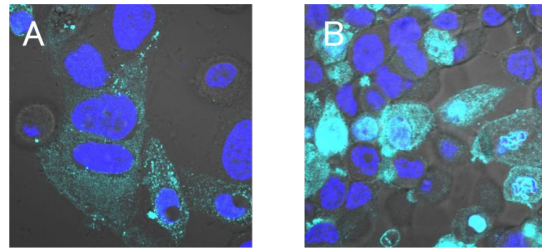


図 1 .DMSO 処理によるタンパク質の細胞内導入効率の向上。TAT タグを用いて GB1 を HeLa 細胞に導入した。A)DMSO なし、B)DMSO なし

さらに、従来用いている細胞膜透過タグである TAT (C(Npys)-YGRKKRRQRRR-NH<sub>2</sub>)に加えて、N-E5L-TAT (GLLEALAEELLEYGRKKRRQRRR-C(Npys)-NH<sub>2</sub>)と CM<sub>18</sub>-TAT (KWKLFKKIGAVLKVLTGGYGRKKRRQRRR-C(Npys)-NH<sub>2</sub>)を試したところ、CM<sub>18</sub>-TAT が極めて効率的に GB1 を細胞内に透過させることが分かった(図 2)。

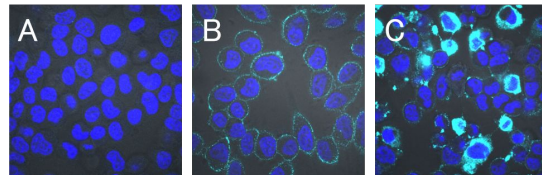
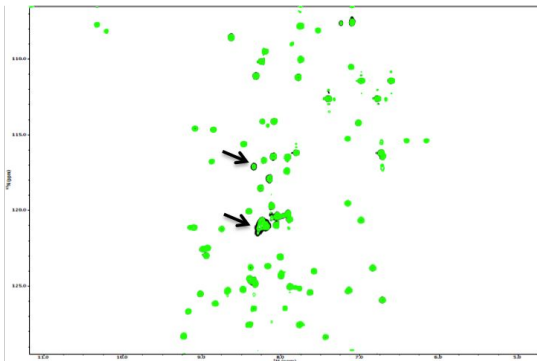


図 2 .細胞透過タグの改良 GB1 に各種の細胞膜透過タグを連結し HeLa 細胞に導入した。A)TAT、B)N-E5L、C)CM<sub>18</sub>-TAT

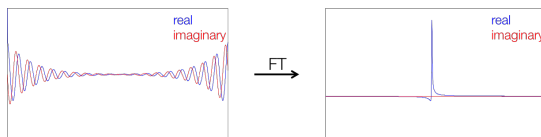
研究要素では、水とアミドプロトンの交換速度の違いからタンパク質中の柔らかい領域を決定することを計画した。まずは、そのための測定法である CLEANEX-PM 法が有望であると期待したが、この測定法はあまり感度が高くないため *in-cell* NMR 測定には不向きであることが分かった。そこで、次に presaturation 法を試した。この手法では水のシグナルを選択的に飽和(シグナル強度を減少)させる。水と交換しやすいアミドプロトンのシグナルも減少するため、その減少量を解析することによって構造的に柔らかい領域を同定する。この手法であれば感度良くかつ高速に NMR 測定を行えることが分かった。図 3 のほとんどのシグナルにおいて presaturation なし(黒)と presaturation あり(緑)のスペクトルで強度が一致したが、矢印で示す残基においてシグナル強度が異なった。このことは、これらの残基は水と交換しやすい構造的に柔らかい領域に存在することを示す。



**図2 . presaturation 法による水と交換しやすい残基の同定**  $^{15}\text{N}$  標識 GB1 に対して presaturation なし(黒)と presaturation あり(緑)の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関スペクトルを測定した。

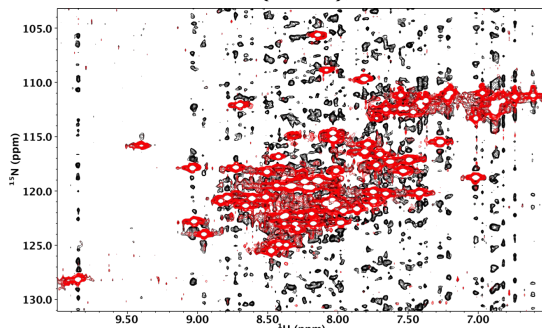
さらにこの測定法に非線形サンプリング法を適用して、測定のさらなる高速化を測った。

研究要素 では非線形サンプリング法で取得したNMRデータを計算的に復活させるSIFT法の改良を行った。従来のSIFT法ではNMRスペクトルの虚部データにアーティファクトを発生させることが問題であった。そして、この問題のために、多くデータを間引くと綺麗にNMRスペクトルが再構築されなかった。そこで、今回は虚部スペクトルが全て0になるバーチャルエコー法を導入した。バーチャルエコーとは、NMRの時間ドメインデータ(FID)を時間反転したものをFIDの先に連結したものである。ただし、虚部データは強度の正負を反転させる(図4)。



**図4 . バーチャルエコー法** 左にバーチャルエコーを右にフーリエ変換後のスペクトルを示す。実部データを青、虚部データを赤で示す。

このバーチャルエコー法を導入することによって従来法よりもさらに半分のデータポイント数でも綺麗にスペクトルを再構築できることが分かった(図5)。



**図5 .SIFT 法による NMR スペクトルの再構築**

70%のデータポイントを間引いて測定したNMRデータに対して旧SIFT法(黒)と新SIFT法(赤)を適用した。

<引用文献>

- Sugase *et al.* (2007) *Nature* **447**, 1021.  
 Matsuki *et al.* (2011) *J. Phys. Chem. B* **115**, 13740.  
 Mayzel *et al.* (2014) *Chem. Commun.* **50**, 8947.

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1件)

Kenji Sugase, Structural dynamics of Sox2 upon binding to DNA, ICMRBS XXVI(招待講演), 2014年8月24日~2014年8月29日, Texas USA

[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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅瀬 謙治 (SUGASE, Kenji)  
 公益財団法人サントリー生命科学財団・その他部局等・主席研究員  
 研究者番号: 00300822

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：