2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　２７　日現在

機関番号：　１２７０１

研究種目：　基盤研究(B)（一般）

研究期間：　2014～2017

課題番号：　２６２９１０１３

研究課題名（和文）In situ 蛋白質 NMR 構造解析技術

研究課題名（英文）In situ Protein NMR Structure Analysis

研究代表者

児嶋　長次郎（Kojima, Chojiro）

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：５０３３３５６３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　12,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では生きている細胞で働いている蛋白質を、そのままの状態で立体構造決定するためのNMR技術を開発した。具体的には、目的蛋白質の領域選択的かつアミノ酸選択的な安定同位体標識技術、還元耐性スピンラベル試薬およびキレート試薬を用いたNMR測定解析技術、生細胞内の蛋白質のNMR測定技術、全自動NMR構造解析システム、効率的なメチル基間NOEの取得技術、などの開発に成功し、細胞内で働いている蛋白質の立体構造を決定するための基盤を整えた。

研究成果の概要（英文）：For in situ protein NMR structure analysis, we have developed the following NMR techniques. Amino acid selective 13C-labeling and 13C-scrambling profile analysis of protein alpha and side-chain carbons in E. coli utilized for protein NMR. Protein 19F-labeling using transglutaminase for the NMR study of intermolecular interactions. Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for high-resolution NMR structure determination of a soluble loop-rich protein with sparse NOE distance restraints.

研究分野：　構造生命科学

キーワード：　NMR　蛋白質　立体構造　in situ

1. 研究開始当初の背景

(1) 代謝産物など細胞内の物質をNMRで検出する手法は古くから知られているが、生きている細胞内の「可溶性」蛋白質を原子レベル分解能でNMR検出する技術（In-cell NMR法）はこの１０年ほどで開発された新しい手法である。大腸菌では2001年にDötschらが、アフリカツメガエル卵母細胞では2006年にWagnerらとShirakawaらが、昆虫細胞では2013年にItoらが、ヒト細胞では2009年にShirakawaらが細胞内蛋白質のNMR検出に成功している（ref. 1）。細胞膜上の「膜」蛋白質を原子レベル分解能でNMR検出する技術は、我々のグループを含め世界的に激しい開発競争下にあるが、2012年にBaldusらが大腸菌の系で最初の報告を行っている（ref. 2）。

(2) 上記のように、In-cell NMR法により生きている細胞内で蛋白質のNMR検出が可能になりつつあるが、立体構造決定は未だに極めて困難である。2009年にItoらが生きている大腸菌内で可溶性蛋白質の立体構造決定に成功しているものの（ref. 3）、未だに他の成功例は報告されていない。さらに、真核生物の細胞の系や「膜」蛋白質ではNMR信号の帰属すら困難であり、これらの問題を解決する新規NMR手法の開発が待ち望まれている。

(3) 研究代表者は、細胞内で安定な還元耐性スピンラベル試薬や化学修飾キレートを用いたNMR構造解析技術の開発に成功しつつある。また、ラトガース大のInouye教授と共同で、生きている細胞のままで観測したい蛋白質のみをアミノ酸選択的に安定同位体標識する技術の開発に成功しつつある。藤原教授（研究分担者）と松木助教（連携研究者）は高磁場DNP法の開発に成功しており、従来法に比べて600倍のNMR感度向上を達成している。さらに、蛋白質研究所の950 MHz NMR装置は世界最高感度を保持している。そこで研究者代表者は、これら世界最先端のNMR技術・装置をIn-cell NMR法と組み合わせることで、生きている細胞のままで蛋白質の立体構造を決定する新規NMR手法の開発を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、従来のIn-cell NMR法を改良しつつ高磁場DNP法など世界最先端のNMR技術・装置と組み合わせることで、生きている細胞のままで蛋白質の立体構造を決定するNMR技術を開発する。構造解析対象はIn-cell NMRと精製蛋白質で異なる化学シフト値を持つ蛋白質とし、今まで構造決定例がない真核生物の細胞の系での「可溶性」蛋白質の構造決定、および、大腸菌の系での「膜」蛋白質の構造決定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 目的蛋白質の領域選択的かつアミノ酸選択的な安定同位体標識技術の開発

生きている細胞で蛋白質をそのまま検出するには、目的蛋白質のみを安定同位体標識する技術が不可欠である。通常のIn-cell NMR法では目的蛋白質を安定同位体である$^{13}C^{15}N$で均一に標識しているが、大腸菌の系では目的「外」蛋白質も一部標識されてしまう。そこで、目的「外」蛋白質の翻訳を完全に阻害できるSPPシステム（配列特異的なRNA切断酵素を共発現させる低温発現系、ref.4）を用い、目的「外」蛋白質の標識を完全に抑制する技術を開発する。

In-cell NMR法ではNMR信号の線幅が広がるため、３重共鳴実験では感度不足から満足な信号が得られなくなる。一般に線幅の広い系における帰属では、アミノ酸選択的な標識が有効であることが知られている。そこで、SPPシステムとアミノ酸要求性株とを組み合わせ、大腸菌の系でアミノ酸選択的な標識技術を開発する。アミノ酸選択的な標識では、比較的安価かつ立体構造情報の取得が容易なLeu、Ile、Val、Ala、Phe、Tyr、Thr、Metを用いる。さらに、SPPシステムと複数のアミノ酸要求性株とを組み合わせ、領域選択的かつアミノ酸選択的な標識技術を開発する。

(2) 還元耐性スピンラベル試薬およびキレート試薬を用いたNMR測定解析技術の開発

NMR構造決定に必要なデータを収集するには、数日～数週間の測定時間を要する。主要な立体構造情報を与える３次元NOESYの測定には１週間程度必要であるが、測定中に無酸素状態となり細胞死に至るため、In-cell NMR法で構造情報を得るのは極めて難しい。そこで、比較的短時間で立体構造情報が得られる、スピンラベル試薬を用いた常磁性緩和促進（PRE）法、キレート試薬とランタニド金属を用いた偽コンタクトシフト（PCS）法を利用する。生きている細胞は還元条件下にあるため、通常のスピンラベル試薬は使用できない。またシステインとのジスルフィド結合も用いることができない。そこで、PRE法では細胞内で利用可能な還元耐性を持つスピンラベル試薬を用い、マレイミド基を介して不可逆的にスピンラベルをシステインに導入し、立体構造情報を得る。また、PCS法では目的蛋白質のN末端選択的に還元耐性を持つキレート試薬を導入し、立体構造情報を得る。

(3) 生きている細胞のままでNMR信号を帰属する技術の開発

生きている細胞の系でのNMR信号帰属には、(1)において開発する領域選択的かつアミノ酸選択的な標識技術を用いる。様々な選択標識サンプルについて、^{1}H-^{15}N HSQCと２次元HNCOを組み合わせて主鎖帰属を、

$^{1}H-^{13}C/^{1}H-^{15}N$ HSQC と２次元 HCCH-TOCSY を組み合わせて側鎖帰属を行う。

(4) 生きている細胞のままでの立体構造情報収集技術の開発
生きている細胞の系での立体構造情報の収集には、(3)で得られる NMR 信号の帰属情報と(2)において開発する還元耐性スピンラベル試薬およびキレート試薬を用いた PRE 法と PCS 法を組み合わせて用いる。

(5) 高磁場 DNP 法などを駆使した、生きている細胞での蛋白質の構造決定
(3)(4)で得られた立体構造情報を用い、真核生物の細胞の系において「可溶性」蛋白質の立体構造決定を行う。
大腸菌の系での「膜」蛋白質の NMR 信号帰属や立体構造情報の収集では、感度の悪い固体 NMR を用いるため、感度不足が予想される。研究分担者の藤原らが開発している高磁場 DNP 法では NMR の感度が 600 倍向上する。そこで、大腸菌の系での「膜」蛋白質の立体構造解析には高磁場 DNP 法を適用する。サンプルとしては大腸菌 SPP システムで良好な結果を得ている pHtrII を用いる。

４．研究成果

(1) 目的蛋白質の領域選択的かつアミノ酸選択的な安定同位体標識技術の開発では、目的「外」蛋白質の翻訳を完全に阻害できる SPP システムを用いた目的「外」蛋白質の標識を完全に抑制する技術、大腸菌でアミノ酸選択的かつ高効率な 13C 標識が可能な技術、および、無細胞蛋白質合成系で立体構造解析のための重水素標識と 13C 標識を組み合わせるアミノ酸選択標識技術を開発した。

(2) 還元耐性スピンラベル試薬およびキレート試薬を用いた NMR 測定解析技術の開発では、PRE 法では細胞内で利用可能な還元耐性を持つスピンラベル試薬を用い、マレイミド基を介して不可逆的にスピンラベルをシステインに導入し、立体構造情報を得た。また、PCS 法では目的蛋白質の N 末端選択的に還元耐性を持つキレート試薬を導入し、立体構造情報を得た。最終的に、細胞内での立体構造解析に適用可能な PRE や PCS を用いた精密構造解析法の開発に成功した。

(3) 生きている細胞のままで NMR 信号を帰属する技術の開発、および、(4) 生きている細胞のままでの立体構造情報収集技術の開発では、電気穿孔法を用いる蛋白質導入技術によって技術的な問題点が解消され、従来法の約２倍の感度で NMR 測定を行うことが可能になった。さらに、生きている細胞の系での NMR 信号帰属には、(1)において開発したアミノ酸選択的な標識技術を用いた。また、生きている細胞の系での立体構造情報の収集には、(3)で得た NMR 信号の帰属情報と(2)において開発した還元耐性スピンラベル試薬およびキレート試薬を用いた PRE 法と PCS 法を組み合わせて用いた。

(5) 高磁場 DNP 法などを駆使した生きている細胞での蛋白質の構造決定では、全自動 NMR 構造解析システムの開発、効率的なメチル基間 NOE の取得、その全自動 NMR 構造解析システムへの組み込みに成功し、細胞内での蛋白質の構造決定に目処を付けた。

＜引用文献＞

1. Serber Z and Dötsch V. In-cell NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 40, 14317-14323 (2001); Selenko P *et al.* and Wagner G. Quantitative NMR analysis of the protein G B1 domain in *Xenopus laevis* egg extracts and intact oocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103, 11904-11909 (2006); Sakai T *et al.* and Shirakawa M. In-cell NMR spectroscopy of proteins inside *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biomol. NMR*, 36, 179-188 (2006); Inomata K *et al.* and Shirakawa M. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature*, 458, 106-109 (2009); Hamatsu J *et al.* and Ito Y. High-resolution heteronuclear multidimensional NMR of proteins in living insect cells using a baculovirus protein expression system. *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 1688-1691 (2013).
2. Renault M *et al.* and Baldus M. Cellular solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 109, 4863-4868 (2012).
3. Sakakibara D *et al.* and Ito Y. Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nature*, 458, 102-105 (2009).
4. Suzuki M, Zhang J, Liu M, Woychik N A and Inouye M. Single Protein Production Technique in Living Cells Facilitated by an mRNA Interferase. *Mol. Cell*, 18, 253-261 (2005).

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 24 件)

(1) Miho Kaneko-Suzuki, Rie Ishikawa, Chiaki Terakawa, Chojiro Kojima, Misa Fujiwara, Izuru Ohki, Hiroyuki Tsuji, Ko Shimamoto, and Ken-ichiro Taoka*. TFL1-like proteins in rice antagonize rice FT-like protein in inflorescence development by competition for complex

formation with 14-3-3 and FD. _Plant Cell Physiol._, 59, 458-468 (2018). 査読有.
doi: 10.1093/pcp/pcy021.

(2) Toshihiko Sugiki, Kyoko Furuita, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima*. Current NMR Techniques for Structure-Based Drug Discovery. _Molecules_, 23, 148 (2018). 査読有.
doi: 10.3390/molecules23010148.

(3) Natsuki Fukuda, Kentaro Noi, Lidong Weng, Yoshihiro Kobashigawa, Hiromi Miyazaki, Yukari Wakeyama, Michiyo Takaki, Yusuke Nakahara, Yuka Tatsuno, Makiyo Uchida-Kamekura, Yoshiaki Suwa, Takashi Sato, Naoki Ichikawa-Tomikawa, Motoyoshi Nomizu, Yukio Fujiwara, Fumina Ohsaka, Takashi Saito, Katsumi Maenaka, Hiroyuki Kumeta, Shoko Shinya, Chojiro Kojima, Teru Ogura, and Hiroshi Morioka*. Production of Single-Chain Fv Antibodies Specific for GA-Pyridine, an Advanced Glycation End-Product (AGE), with Reduced Inter-Domain Motion. _Molecules_, 22, 1695 (2017). 査読有.
doi: 10.3390/molecules22101695.

(4) Yohei Miyanoiri, Atsushi Hijikata, Yuuki Nishino, Mizuki Gohara, Yasuhiro Onoue, Seiji Kojima, Chojiro Kojima, Tsuyoshi Shirai, Masatsune Kainosho, and Michio Homma*. Structural and functional analysis of the C-terminal region of FliG, an essential motor component of Vibrio Na+-driven flagella. _Structure_, 25, 1540-1548 (2017). 査読有.
doi: 10.1016/j.str.2017.08.010. Epub 2017 Sep 14.

(5) Yoshikazu Hattori, David Heidenreich, Yuki Ono, Toshihiko Sugiki, Kei-ichi Yokoyama, Ei-ichiro Suzuki, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima*. Protein ^{19}F-labeling using transglutaminase for the NMR study of intermolecular interactions. _J Biomol NMR_, 68, 271-279 (2017). 査読有.
doi: 10.1007/s10858-017-0125-6.

(6) Jakub Sebera, Yoshikazu Hattori, Daichi Sato, David Reha, Radim Nencka, Takashi Kohno, Chojiro Kojima*, Yoshiyuki Tanaka*, and Vladimir Sychrovsky*. The Mechanism of the Glycosylase Reaction with hOGG1 Base-Excision Repair Enzyme: Concerted Effect of Lys249 and Asp268 During Excision of 8-Oxoguanine. _Nucleic Acids Res._, 45, 5231-5242 (2017). 査読有.
doi: 10.1093/nar/gkx157

(7) Shoko Shinya, Mariana G. Ghinet, Ryszard Brzezinski, Kyoko Furuita, Chojiro Kojima, Sneha Shah, Evgenii L. Kovrigin*, and Tamo Fukamizo*. NMR Line Shape Analysis of a Multi-State Ligand Binding Mechanism in Chitosanase. _J Biomol NMR_, 64, 309-319 (2017). 査読有.
doi: 10.1007/s10858-017-0109-6.

(8) Hisashi Tatebe*, Shinichi Murayama, Toshiya Yonekura, Tomoyuki Hatano, David Richter, Tomomi Furuya, Saori Kataoka, Kyoko Furuita, Chojiro Kojima, and Kazuhiro Shiozaki*. Substrate specificity of TOR complex 2 is determined by a ubiquitin-fold domain of the Sin1 subunit. _eLife_, 6, e19594 (2017). 査読有.
doi: 10.7554/eLife.19594.

(9) Toshihiko Sugiki, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima*. Cold-Shock Expression System in E. coli for Protein NMR Studies. _Methods Mol. Biol._, 1586, 345-357 (2017). 査読有.
doi: 10.1007/978-1-4939-6887-9_23.

(10) Ju Yaen Kim, Misaki Kinoshita, Satoshi Kume, Guy T. Hanke, Toshihiko Sugiki, John E. Ladbury, Chojiro Kojima, Takahisa Ikegami, Genji Kurisu, Yuji Goto, Toshiharu Hase, and Young-Ho Lee*. Noncovalent forces tune the electron transfer complex between ferredoxin and sulfite reductase to optimize enzymatic activity. _Biochem. J._, 473, 3837-3854 (2016). 査読有.
doi: 10.1042/BCJ20160658

(11) Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Jakub Šebera, Katsuyuki Nakashima, Jiro Kondo, Daichi Yamanaka, Yoshinori Kondo, Itaru Okamoto, Akira Ono, Vladimír Sychrovský*, Chojiro Kojima*, and Yoshiyuki Tanaka*. The Structure Determination of AgI-mediated Cytosine-Cytosine Base Pair within DNA Duplex in Solution with ^{1}H/^{15}N/^{109}Ag NMR Spectroscopy. _Chemistry_, 22, 13028-13031 (2016). 査読有.
doi: 10.1002/chem.201603048.

(12) Nesreen Alsanousi, Toshihiko Sugiki, Kyoko Furuita, Masatomo So, Young-Ho Lee, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima*. Solution NMR structure and inhibitory effect against amyloid-β fibrillation of Humanin containing a D-isomerized

serine residue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 477, 647-653 (2016). 査読有.
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.114.

(13) Kenichi Harada, Eiki Yamashita, Kento Inoue, Koji Yamaguchi, Toshimichi Fujiwara, Atsushi Nakagawa, Tsutomu Kawasaki, and Chojiro Kojima*. Expression, purification, and crystallization of a plant-specific DUF1110 protein from *Oryza sativa*. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, 72, 480-484 (2016). 査読有.
doi: 10.1107/S2053230X16007573.

(14) Masashi Yokochi, Naohiro Kobayashi, Eldon L. Ulrich, Akira R. Kinjo, Takeshi Iwata, Yannis E. Ioannidis, Miron Livny, John L. Markley, Haruki Nakamura, Chojiro Kojima, and Toshimichi Fujiwara*. Publication of nuclear magnetic resonance experimental data with semantic web technology and the application thereof to biomedical research of proteins. *J. Biomed. Sem.*, 7, 16 (2016). 査読有.
2016 May 5;7(1):16.
doi: 10.1186/s13326-016-0057-1

(15) Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Jakub Šebera, Katsuyuki Nakashima, Akira Ono, Vladimír Sychrovský, Chojiro Kojima, and Yoshiyuki Tanaka*. HgII/AgI-mediated base pairs and their NMR spectroscopic studies. *Inorg. Chim. Acta*, 452, 34-42 (2016). 査読有.
doi: 10.1016/j.ica.2016.03.018.

(16) Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Yoshinori Kondo, Chojiro Kojima, Akira Ono and Yoshiyuki Tanaka*. Exploring a DNA sequence for 3-dimensional structure determination of a silver(I)-mediated C-C base pair in a DNA duplex with ^{1}H NMR spectroscopy. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 34, 877-900 (2015). 査読有.
doi: 10.1080/15257770.2015.1088160.

(17) Misaki Kinoshita, Ju yaen Kim, Satoshi Kume, Yukiko Sakakibara, Toshihiko Sugiki, Chojiro Kojima, Genji Kurisu, Takahisa Ikegami, Toshiharu Hase, Yoko Kimata-Ariga, and Young-Ho Lee*. Physicochemical natures of interfaces control activity of ferredoxin NADP+ reductase through its interprotein interactions with ferredoxin. *BBA - Bioenergetics*, 1847, 1200-1211 (2015). 査読有.
doi: 10.1016/j.bbabio.2015.05.023.

(18) Takenori Dairaku, Kyoko Furuita, Hajime Sato, Jakub Šebera, Daichi Yamanaka, Hiroyuki Otaki, Shoko Kikkawa, Yoshinori Kondo, Ritsuko Katahira, F. Matthias Bickelhaupt, Célia Fonseca Guerra, Akira Ono, Vladimír Sychrovský*, Chojiro Kojima* and Yoshiyuki Tanaka*. Direct Detection of the Mercury-Nitrogen Bond in the Thymine-Hg^{II}-Thymine Base-pair with ^{199}Hg NMR Spectroscopy. *Chem. Commun.*, 51, 8488-8491 (2015). 査読有.
doi: 10.1039/c5cc02423d.

(19) Saori Kataoka, Kyoko Furuita*, Yoshikazu Hattori, Naohiro Kobayashi, Takahisa Ikegami, Kazuhiro Shiozaki, Toshimichi Fujiwara and Chojiro Kojima*. ^{1}H, ^{15}N and ^{13}C resonance assignments of the conserved region in the middle domain of S. pombe Sin1 protein. *Biomol. NMR Assign.*, 9, 89-92 (2015). 査読有.
doi: 10.1007/s12104-014-9550-6.

(20) Kyoko Furuita, Saori Kataoka, Toshihiko Sugiki, Yoshikazu Hattori, Naohiro Kobayashi, Takahisa Ikegami, Kazuhiro Shiozaki, Toshimichi Fujiwara and Chojiro Kojima*. Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for high-resolution NMR structure determination of a soluble loop-rich protein with sparse NOE distance restraints. *J. Biomol. NMR*, 61, 55-64 (2015). 査読有.
doi: 10.1007/s10858-014-9882-7.

(21) Kazuya Ishikawa, Koji Yamaguchi, Kazuaki Sakamoto, Satomi Yoshimura, Kento Inoue, Seiji Tsuge, Chojiro Kojima and Tsutomu Kawasaki*. Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. *Nature Commun.*, 5, 5430 (2014). 査読有.
doi: 10.1038/ncomms6430.

(22) Ken-ichi Kosami, Izuru Ohki*, Minoru Nagano, Kyoko Furuita, Toshihiko Sugiki, Yoji Kawano, Tsutomu Kawasaki, Toshimichi Fujiwara, Atsushi Nakagawa, Ko Shimamoto and Chojiro Kojima*. The crystal structure of the plant small GTPase OsRac1 reveals its mode of binding to NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 289, 28569-28578 (2014). 査読有.

doi: 10.1074/jbc.M114.603282.

(23) Hiroshi Yamaguchi, Jakub Šebera, Jiro Kondo, Shuji Oda, Tomoyuki Komuro, Takuya Kawamura, Takenori Dairaku, Yoshinori Kondo, Itaru Okamoto, Akira Ono, Jaroslav V. Burda, Chojiro Kojima, Vladimír Sychrovský*, and Yoshiyuki Tanaka*. The structure of metallo-DNA with consecutive T-Hg^{II}-T base-pairs explains positive entropy for the metallo-base-pair formation. *Nucleic Acids Res.*, 42, 4094-4099 (2014). 査読有.
doi: 10.1093/nar/gkt1344.

(24) Toshihiko Sugiki, Toshimichi Fujiwara and Chojiro Kojima*. Latest approaches for efficient protein production in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, 9, 1189-1204 (2014). 査読有.
doi: 10.1517/17460441.2014.941801.

６．研究組織

(1)研究代表者

児嶋　長次郎 (KOJIMA, Chojiro)
横浜国立大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：50333563

(2)研究分担者

藤原　敏道 (FUJIWARA, Toshimichi)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：20242381

(3)連携研究者

松木　陽 (MATSUKI, Yoh)
大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号：70551498

杉木　俊彦 (SUGIKI, Toshihiko)
大阪大学・蛋白質研究所・特任助教
研究者番号：70635698

古板　恭子 (FURUITA, Kyoko)
大阪大学・蛋白質研究所・特任助教
研究者番号：30727665