

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06160

研究課題名(和文) 低感度・低解像のNMRデータにも適用可能な新規信号処理と蛋白質構造解析法の開発

研究課題名(英文) Development of signal processing and protein structure determination methods for low quality NMR data

研究代表者

池谷 鉄兵 (IKEYA, Teppei)

東京都立大学・理学研究科・助教

研究者番号：30457840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：世界初の真核細胞(昆虫培養細胞)中での蛋白質立体構造決定に成功した。CYANAプログラムに新規に実装した新機能(分子力場による構造評価、レプリカ交換法、ベイズ推定)を実際の昆虫細胞のin-cell NMRデータに応用し、3種類の蛋白質の高精度立体構造決定を達成した。また、CYANAに常磁性NMRのデータ解析法とmulti-state立体構造計算アルゴリズムの実装にも成功した。本手法をYUH1蛋白質の立体構造計算に適用したところ、活性部位周辺の大きな運動性と機能を明らかにすることができ、YUH1の分子認識機構に関する新規モデルを提案できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬研究分野では、蛋白質立体構造情報を利用した構造基盤薬物設計(Structural Based-Drug Discovery; SBDD)が、効率的な薬剤設計法として確立している。本課題のアンサンブル構造解析が確立できれば、生体分子の揺らぎを含めた形で、蛋白質-低分子化合物、蛋白質間相互作用等を解析可能となり、こうした情報の蓄積によりSBDD研究にも全く新しい知見を提供できる。また、ここで開発した統計解析のソフトウェアの世界への普及、全世界の生体系NMRのグループが本技術を共有できるよう世界に還元していく。

研究成果の概要(英文)：We achieved the first de novo protein structure determinations in eukaryotes with the sf9 cell that are based exclusively on NMR data from living cells. As model systems, we applied this method to three proteins and determined well-converged 3D structures. A new method for structure determination with Bayesian inference was particularly effective for determining 3D structures with sufficient precision to detect conformational differences between the structures in sf9 cells and in diluted solution. We also developed another new NMR protein structure determination method for the inference of multi-state conformations using multiple types of NMR data. Applying the method to the protein YUH1, we find large dynamics of two loops surrounding the active site for ubiquitin-recognition and proteolysis. Our results, including those from biochemical analysis, showed that large motion surrounding the active site contributes strongly to the efficiency of the enzymatic activity.

研究分野：生物物理

キーワード：NMR 蛋白質 立体構造計算

1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴スペクトル(NMR)法は、生体高分子を原子分解能で解析可能な有力な手法の1つとして発展し、構造生命科学に大きな役割を果たしてきた。この計測法は、特に非侵襲性に優れ、系に殆どダメージを与えることなく、生理的条件下に近い環境での分子の立体構造や運動性の情報を得られる点に際立った特徴を持つ。また、目的分子を安定同位体標識することにより、細胞内のような多様な分子が混在する環境下においても系に摂動を与えることなく、標的試料のみに焦点を当てた計測が可能である。このように NMR 法は、他の手法では代用困難な優れた利点を持つ一方で、原理的に低感度であるために高濃度試料を必要とする点や、高分子量蛋白質への適用が難しい(図1)などの問題があり、解析可能な分子が限定されることが課題とされる。NMR の適用範囲を拡大し、様々な試料をより自然な条件下で原子分解能の解析が可能となれば、構造生命科学の一層の発展に寄与することができる。

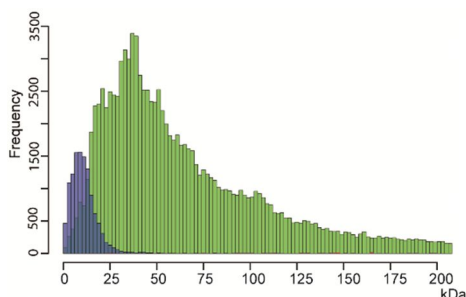


図1 PDB 登録数の分布。横軸は生体分子の分子量を表す X線結晶構造解析(緑)に対し NMR(青)の登録数は、25kDa を付近から急激に減少しており、高分子量分子の構造解析の困難さを暗に示している。

2. 研究の目的

蛋白質などの生体高分子の多くは、その機能活性に最適な立体構造を保持している。またこの構造は、一定の静的状態にとどまらず、高い自由度を持った動的性質(ダイナミクス)も備えることで、驚くほど多様な機能を生み出している。近年、マルチドメイン蛋白質や天然変性蛋白質のような明確な立体構造を保持しない柔らかな領域を持つ蛋白質の動態と多様な機能にも注目が集まっている(図2)。こうした高い自由度を持つ蛋白質は、蛋白質立体構造解析で最も用いられる X線結晶構造解析では結晶化の困難さから適用が難しく、また、周辺環境にも極めて敏感なため、構造・運動性の詳細な解析には、それらが本来機能している環境に近い条件下での計測が求められる。また、目的分子を安定同位体標識することにより、細胞内のような多様な分子が混在する環境下

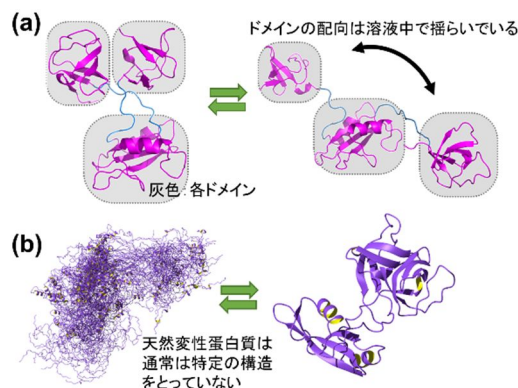


図2 (a) マルチドメイン蛋白質。複数の機能ドメインが柔らかなリンカーによってつながっている。(b) 天然変性蛋白質(IDP)。構造の柔軟性が多様な機能を生み出す。

においても系に摂動を与えることなく、標的試料のみに焦点を当てた計測が可能である。このように NMR 法は、他の手法では代用困難な優れた利点を持つ一方で、原理的に低感度であるために高濃度試料を必要とする点や、高分子量蛋白質への適用が難しいなどの問題があり、解析可能な分子が限定されることが課題とされる。NMR の適用範囲を拡大し、様々な試料をより自然な条件下で原子分解能の解析が可能となれば、構造生命科学の一層の発展に寄与することができる

3. 研究の方法

本提案課題では、NMR 常磁性効果を活用した in-cell NMR 計測と、NMR データ解析に関する計算手法を用いて、従来法では解析困難であった複数の蛋白質の細胞内構造の構造変化や熱安定性、相互作用を解析する。

(1) 細胞内蛋白質の常磁性 NMR 計測: In-cell NMR 計測の問題の1つは、試料管内での短い細胞寿命による NMR 測定時間の制約と、低試料濃度と細胞由来のノイズシグナルによる S/N 比の著しい低下である。我々は、この問題を解決するために、少ない測定時間でも高感度で、細胞内でも安定して遠距離の構造情報を得ることのできる常磁性効果を利用した手法を確立した。常磁性ランタノイド金属を用いることで、Pseudo Contact Shift (PCS)と Paramagnetic Relaxation Enhancement (PRE)という2つの新たな NMR データを得ることができ、金属から任意の原子への距離および角度情報を得ることができる。常磁性効果は、従来法の10倍近い遠距離の分子構造情報を得られるため、高分子量蛋白質構造解析に非常に有効である。最近我々は、細胞内で新規常磁性タグの設計に取り組み、新たなタグの化学合成と PCS の計測にも成功した。本課題では、この手法を NMR 計測法と試料調製法の観点からさらに最適化し、真核細胞内での蛋白質の構造情報の習得を試みる。

(2) 常磁性効果からの構造情報の抽出: NMR 計測データは、原子核共鳴由来のスペクトルに過ぎないため、最終的に立体構造を推定するには、分子構造情報をここから正確に見積もる物理的

知見, 解析技術が必須となる. 本提案では, 特に常磁性 NMR データから, 構造情報の関わる潜在変数を推定するため, Markov Chain Monte Carlo (MCMC) を用いたベイズ推定を応用し, 常磁性金属からの遠距離の構造情報を正確に見積もる統計解析手法の開発を行う. 我々はすでに, ベイズ推定を応用した蛋白質立体構造決定法を開発し, 従来法よりもはるかに高精度に構造解析が可能なることを示している. 本提案では, 常磁性 NMR データを新規手法に応用する. これにより, これまで解析困難だった高分子量・不安定蛋白質の構造を決定する.

4. 研究成果

1. 生きた真核細胞内での蛋白質立体構造決定法の開発

我々はこれまで, in-cell NMR の要素技術を開発し, 原核生物である大腸菌を宿主細胞として用いて, 世界に先駆けた細胞内の蛋白質の立体構造解析を行ってきた. 一方, 真核細胞中での蛋白質立体構造解析には, 複数の問題が未解決だった. 大腸菌の系に比べて目的蛋白質の濃度が低く, 試料管内での細胞寿命の短さのために, NMR 信号の感度低さと測定時間の短さが特に問題であった. ここでは, 限られた情報から効率的に蛋白質の立体構造を決定する新しい方法論を開発し, 昆虫培養細胞 Sf9/バキュロウイルスの系を用いて, 真核細胞では世界初となる, 蛋白質の詳細な立体構造解析に成功した. Sf9/バキュロウイルスを用いた蛋白質の発現系は, 高等真核生物特有の翻訳後修飾がなされるため, 天然の生物学的活性と構造を保持した組換え蛋白質を調製する系として広く用いられている.

主に以下の 3 点の技術開発・改良を行った. (1) NMR 試料管中での Sf9 細胞の寿命を延ばすために, 新鮮な培地を常に供給するバイオリクターシステムを導入した. この結果, 従来法では 6 時間程度であった測定時間を 24 時間以上に伸ばすことができた. (2) 測定データから多次元 NMR スペクトルを再構成するため Quantitative Maximum Entropy (QME) を開発した. これにより, 従来法に比べて強度の再現性が飛躍的に向上した. (3) 限られた距離情報から効率良く正確に立体構造を算出するためのベイズ推定を用いた新しい立体構造計算法を開発した. この結果, 従来法に比べ構造の精度が大きく向上した.

これらを組み合わせた新しい手法を適用することで, モデル試料として用いた 5 種の蛋白質のうち分子量 1 万未満の 3 種について, 試験管内での解析精度に迫る「正確で高分解能」立体構造を得ることに世界で初めて成功した. モデル試料の 1 つ目として, プロテイン G の B1 ドメイン (GB1; 7 kDa) の立体構造決定を行った (図 3).

Sf9 細胞内の GB1 の濃度は約 129 μM と予測された. 細菌やヒト細胞における蛋白質の最大の濃度が数十から数百 μM であることを考えると, 今回の Sf9 中の GB1 の濃度は, 生理学的に自然な状態にかなり近い環境を模倣できている. 我々の以前の報告では, GB1 の主鎖原子の NMR 共鳴シグナルの約 80% の帰属に成功していたが, 側鎖原子の帰属や 3D NOESY スペクトルの測定では, 短い細胞寿命のために, 十分な感度の信号が得られなかった. NMR 試料管内で 28 約 8 時間の測定を行ったところ, 細胞の生存率は 90% を下回った. そこで, 新鮮な培地を

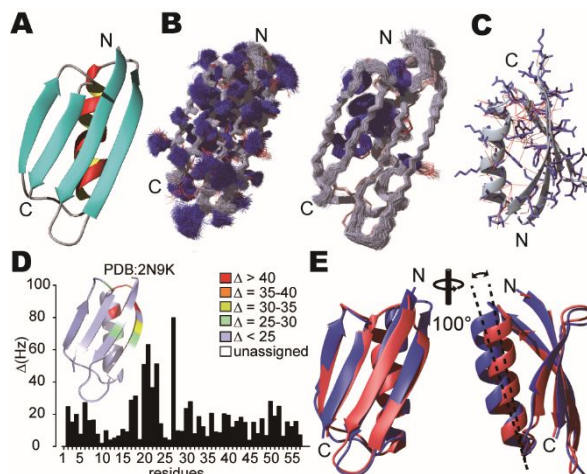


図 3 Sf9 細胞内の GB1 構造. A, ベイズ推定計算で最も事後確率の高い GB1 構造. B, Sf9 細胞内の GB1 の構造アンサンブル. 側鎖原子 (左) と芳香族側鎖 (右) は青で強調している. C, 計算で用いられた距離拘束 (赤). D, Sf9 細胞と希釈溶液中の GB1 の化学シフト差. E, 希釈溶液中の構造 (最低エネルギー; 赤) と Sf9 の構造 (最高後; 青) の重ね合わせ.

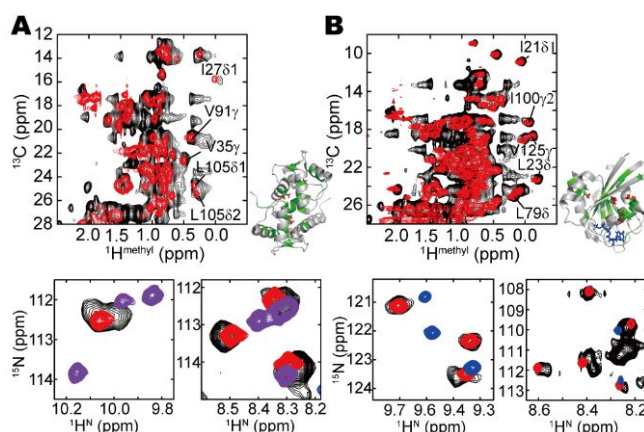


図 4 Sf9 細胞内の CaM と HRas の NMR スペクトル. A, Sf9 細胞中の CaM (黒), 希釈溶液中の Mg²⁺ 結合型 (赤) およびアポ型 (青) の ¹H-¹³C HSQC (上) および ¹H-¹⁵N HSQC (下) スペクトルの重ね合わせ. CaM のリボンモデル (PDBID 1CKK) では, Val, Leu, Ile の各残基 (緑色) が強調されている. B, Sf9 細胞の HRas (黒) と, 希釈溶液中の GDP 結合型 HRas (赤) の ¹H-¹³C HSQC (上) および ¹H-¹⁵N HSQC (下) スペクトルの重ね合わせ. HRas のリボンモデル (PDBID 1AA9) では, Val, Leu, Ile の各残基 (緑色) が強調表示されている.

連続的に試料管に供給するバイオリアクターシステムを導入した。これにより、試料管内の細胞の寿命は、培養フラスコ内の「最適」な状態とほぼ同等に延長され、90%以上の細胞生存率と蛋白質の安定性が少なくとも24時間維持された。すべての3D NMRデータは、測定時間短縮のためにスパースサンプリングされ、QME法により再構成した。これにより、スペクトルの感度を大きく向上させることができた。得られた実験データをベイズ推定を用いた立体構造計算より構造決定を行った。

細胞内と試験管内のGB1の化学シフトと立体構造を比較したところ、蛋白質の一部が他の部分に対して相対的位置を変えていることを見出した(図3D & E)。この構造の違いは、細胞内の他の分子との相互作用の結果と考えられる。同様に、TTHA1718蛋白質とユビキチン蛋白質についても高精度の細胞内蛋白質構造決定に成功した。

分子量1-2万程度の大きさになるカルモジュリン(CaM)とHRas蛋白質については、正確な立体構造決定には至らなかったものの、立体構造を議論するに十分な構造情報の取得に成功した。CaMとHRasの細胞内2D ^1H - ^{15}N HSQCおよび ^1H - ^{13}C HSQCスペクトルを図4に示す。細胞内と希釈溶液中のCaMのNMRスペクトルを比較したところ、Sf9細胞内のCaMは、 Mg^{2+} 結合型の状態で存在していることが示唆された。このデータは、バイオリアクターシステムが、我々の過去の研究で報告されている、ストレスによって誘発される Ca^{2+} 放出をうまく抑制したことを示している。またHRasはSf9細胞内でGDP結合型の状態で存在していることが示唆された。これは、このHRasがC末端の膜結合部位を除いた変異体であるために、細胞膜でのGDPからGTPへの交換が抑制されていること、GTPはHRasに内在するGTPase活性によって加水分解されることを考えると妥当な結果であった。

2. Multi-state 蛋白質立体構造決定法の開発

溶液NMRのデータには、アンサンブル平均として蛋白質の揺らぎやダイナミクスに関する情報が含まれているため、スペクトルデータからこれらの情報を抽出するための様々な解析手法が提案されている。一方、こうした構造の揺らぎを構造分布として可視化するには、単一状態ではなく、複数状態を仮定した構造解析が必要となる。ここでは、蛋白質の構造とダイナミクスを可視化する新たな手法として、複数状態を仮定して立体構造計算を行うmulti-state立体構造計算法の開発を行った。モデル試料には、分子量26.4kDaの酵母ユビキチンヒドロラーゼ1(YUH1)を選択した。YUH1は、ユビキチンC末端ヒドロラーゼ(UCHs)ファミリーに属し、ユビキチン蛋白質(Ub)のC末端から低分子ペプチドや付加物を切り離す機能を持つ。Ubは、そのアミノ酸配列が酵母からヒトに至る真核生物で高度に保存されており、UCHによるUb化と脱Ub化の酵素過程も類似しているはずであるが、このユビキチン認識の分子機構は未だ不明の

点も多い。ここではmulti-state立体構造計算法をfree YUH1に適用することで、YUH1の新たな分子認識機構の理解につなげることを目標とした。

YUH1とユビキチンアルデヒド(Uba1)との複合体の結晶構造は、すでに決定されている(図5)。YUH1の活性部位の周囲は、crossover loopと呼ばれるループとYUH1のN末端があり活性部位周辺を取り囲んで深い穴を形成している。Uba1のC末端はこの穴に深く埋め込まれている。ここでは、UbのC末端とYUH1のN末端が並行してcrossover loopを通過することで、穴がしっかりと塞がれている。これは、おそらく柔軟なUba1のC末端の運動性を抑え、確実な酵素反応を起こすために役立っていると考えられる。一方で、この複合体構造は、UbのC末端をどのようにして効率的に深い穴に取り込み、最適位置で加水分解を触媒し、次の反応サイクルのために解放するのかという新たな疑問を提起している。

この活性部位の配置は、UCHファミリーの間でよく保存されており、このユニークな構造的特徴が酵素活性に不可欠であることを示している。さらに、crossover loopがUbの付加体の大きさを制限しているというモデルも提案されている。X線結晶構造解析によるUCH-L3のfreeおよび複合体の構造研究では、crossover loopの原子座標が複合体では明確に決定されたが、freeでは決定されなかったことから、crossover loopはfree状態ではかなり柔軟であることが示唆されている。この柔軟性が、UbのC末端を活性部位の深い穴に効率よく挿入することを可能にしていると考えられる。一方、YUH1-Uba1複合体の結晶構造では、この領域の温度因子は比較

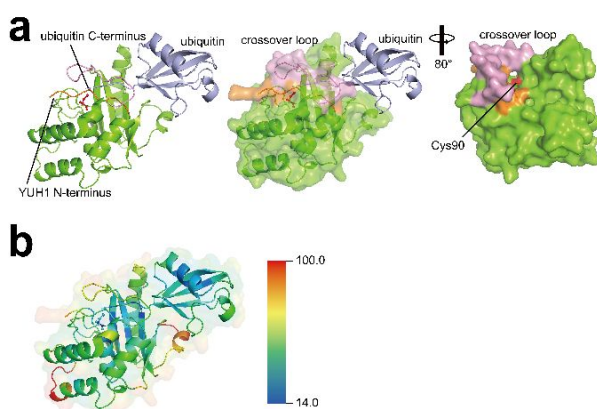


図5 YUH1とユビキチンアルデヒドの複合体の結晶構造 a, Uba1-YUH1複合体の結晶構造(PDBID 1CMX)。N末端, crossover loop, Uba1はそれぞれオレンジ, ピンク, 水色で色分けした。触媒中心のCys90は, ball & stick model (赤)で示した。Uba1のC末端が活性部位の穴に深く入り込んでいる。 b, 結晶構造の温度因子。

的低く, Ub との相互作用によって crossover loop の運動性が抑えられていることを示唆している. 以上のように, YUH1 の柔軟性は周囲の環境の影響を受けやすいと考えられることから, 溶液 NMR を用いて, より生理的条件下に近い環境下でのダイナミクスや構造分布を解明することは YUH1 の Ub 認識機構を理解するために必須であると考えた.

解析には, 核オーバーハウザー効果, 化学シフト, 常磁性効果, および残余双極子カップリングなどの複数の NMR データを用いた. これらのデータを新規に開発した multi-state 立体構造計算により統合解析することで, free YUH1 のアンサンブル構造の可視化に成功した(図 6)

Free YUH1 の立体構造は, N 末端, crossover loop, YUH1-Ubal 結晶構造中で見えない領域を除いた全体構造が, 主鎖原子の RMSD が 2.02Å と, 複合体とよく類似していた. 一方, N 末端と crossover loop の構造は, 広い範囲に広がっているが, それは完全にランダムではないことが分かった (図 6b & c). これらの構造を分類するために, 主成分分析と k-means クラスタリングを行った (図 6d). 最大のクラスタは, 第 1 と第 2 主成分の平面上で最もコンパクトな分布であった. 第 1 クラスタの構造は, N 末端が crossover loop をくぐった構造であり, そのループが活性中心側に傾いている closed 型であった (図 6e, 左図). 第 5 クラスタを除く他のクラスタは, N 末端が crossover loop をくぐっておらず, crossover loop に対して異なる方向に向いていた (open 型). 2 番目に大きなクラスタは, YUH1 の N 末端が Ub 球状ドメインの結合部位に主に位置していた (図 6e, 右図). この結合部位は大きな溝を形成しており, N 末端はそこに収まった構造をしていた.

ユビキチン球状ドメインとの結合面は, free YUH1 のすべてのアンサンブル構造でよく収束しており, 2 つの α -ヘリックスが比較的大きな溝を構成していた (図 7).

一方, free の構造では, 片方の α -ヘリックスが溝の開く方向にわずかに傾いている. このヘリックスは, NMR 緩和解析により求め S^2 が相対的に低いことから, free 構造は Ub がアクセスしやすいように, 柔軟な構造を保ちながら複合体よりも広い溝を保持していると考えられる.

今回, 新規に開発した複数の NMR データの統合解析と multi-state 立体構造計算法により, YUH1 活性部位付近の大きなダイナミクスが明らかになった. 特に, N 末端の非常に大きな運動性の機能的意義を明らかにするために, 次に YUH1 変異体を用いた酵素活性実験, 相互作用実験, ダイナミクス解析を行った. 実験の結果, N 末端の大きな運動性は YUH1 の酵素活性に大きな役割を担っていることが示唆された. これらの実験を元に, 我々は, YUH1 の N 末端は遊離したユビキチンを捕獲して, 結合部位や酵素活性部位に導くという N 末端のユニークな機能を提案することができた.

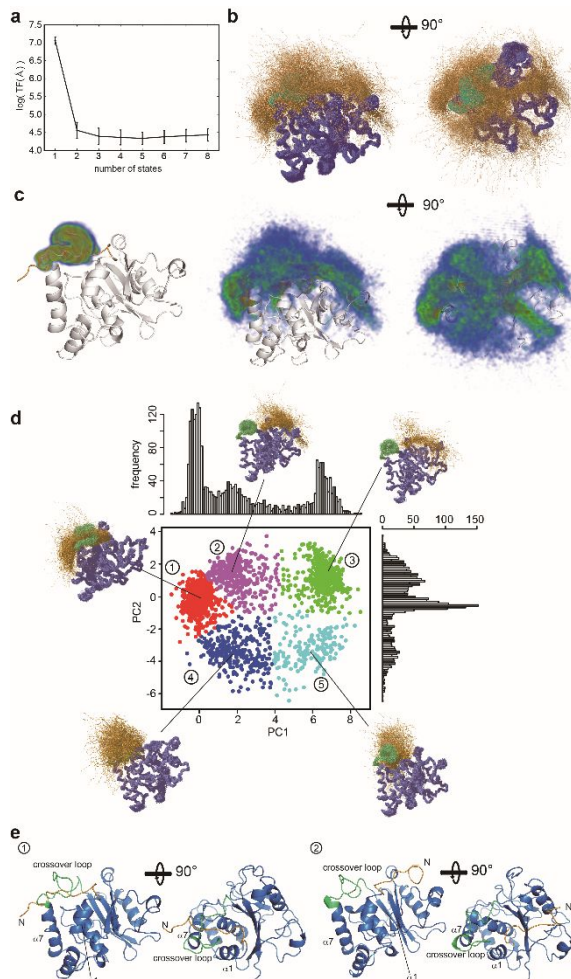


図 6 Free YUH1 のアンサンブル構造 a, 交差検定により 5 状態モデルが実験データを最も再現していることが分かった. b, 5 状態モデルを仮定した multi-state 立体構造計算で得られた 2500 個のアンサンブル構造. c, crossover loop (左) と N-末端 (中央と右) についての確率密度マップ. d, 主成分分析で分析した構造分布. 横軸と縦軸は, 第 1 と第 2 主成分を示している. k-means クラスタリングによって分類されたクラスタを色分けした. クラスタには, その大きさの順に番号をつけた. e, d の最大および 2 番目に大きいクラスタ中心にある代表構造.

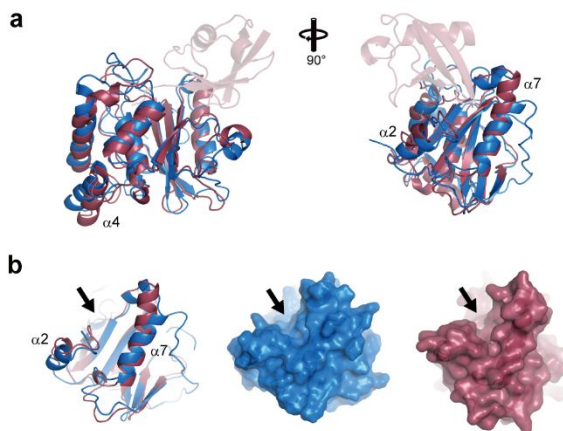


図 7 YUH とユビキチンの結合部位 a, Free YUH1 構造 (青) と複合体 (赤) の重ね合わせ. b, Free YUH1 (青) と複合体 (赤) のユビキチンとの相互作用面. 矢印はユビキチン結合の方向を示す.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takuro Wakamoto, Teppei Ikeya, Soichiro Kitazawa, Nicola J. Baxter, Mike P. Williamson, Ryo Kitahara	4. 巻 28
2. 論文標題 Paramagnetic relaxation enhancement-assisted structural determination of a partially disordered conformation of ubiquitin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1993-2003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3734	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 該当する
1. 著者名 Teppei Ikeya, Peter Guentert, Yutaka Ito	4. 巻 20
2. 論文標題 Protein Structure Determination in Living Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 international journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 E2442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20102442	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 池谷鉄兵	4. 巻 10
2. 論文標題 NMRによる生体高分子立体構造計算の基礎と最近の進展	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本核磁気共鳴学会学会誌	6. 最初と最後の頁 82-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Teppei Ikeya, David Ban, Donghan Lee, Yutaka Ito, Koichi Kato, Christian Griesinger	4. 巻 1862
2. 論文標題 Solution NMR views of dynamical ordering of biomacromolecules.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects	6. 最初と最後の頁 287-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2017.08.020	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 Teppei Ikeya, Yutaka Ito	4. 巻 17
2. 論文標題 Protein NMR structure refinement based on Bayesian Inference for dynamical ordering of biomacromolecules.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Computer Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 65-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2477/jccj.2018-0009	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 Takashi Tanaka, Teppei Ikeya, Hajime Kamoshida, Masaki Mishima, Masahiro Shirakawa, Peter Guentert, Yutaka Ito	4. 巻 58
2. 論文標題 High resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201900840	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 該当する

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, Guentert Peter, Ito Yutaka, Ikeya Teppei	4. 巻 April 22, 2021
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 1-39
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20件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Yutaka Ito, 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 33rd Annual Symposium of the Protein Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teppei Ikeya, Yutaka Ito
2. 発表標題 High resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells
3. 学会等名 the 8th Asia Pacific NMR Symposium, Singapore (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池谷鉄兵
2. 発表標題 MDシミュレーション vs NMR立体構造計算(multi-state 立体構造計算)
3. 学会等名 第20回若手NMR研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤隆, 池谷鉄兵
2. 発表標題 溶液NMRを用いたin situ構造生物学
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisham Dokainish, Yusuke Suemoto, Teppei Ikeya, Takuma Kasai, Takanori Kigawa, Yutaka Ito, Yuji Sugita
2. 発表標題 Dynamics and interdomain interactions in a Drosophila adapter protein (Drk) and their correlation to the unfolding of the N-SH3 domain
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池谷鉄兵
2. 発表標題 磁性効果による遠距離構造情報を利用したタンパク質multi-state立体構造解析
3. 学会等名 第58回NMR討論会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田岸亮馬, 田中孝, 三島正規, 池谷鉄兵, 伊藤隆
2. 発表標題 分子クラウディング環境下の蛋白質の緩和解析
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田端真彩子, 池谷鉄兵, 彦根佑哉, 岡田真由, 田岸亮馬, 八木宏昌, 木川隆則, 三島正規, 伊藤隆
2. 発表標題 PRE, PCSを用いた蛋白質立体構造解析のための常磁性金属タグの性能評価
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 亀井駿, 池谷鉄兵, 田仲加代子, 伊藤隆
2. 発表標題 分子混雑環境下のRas蛋白質の動態解析
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立石泰, 池谷鉄兵, 岡田真由, 三島正規, 美川務, 八木宏昌, 河野俊之, 木川隆則, 伊藤隆
2. 発表標題 常磁性NMRを用いたYeast Ubiquitin hydrolase 1 (YUH1) の構造決定及びダイナミクス解析
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teppei Ikeya
2. 発表標題 Multi-state protein structure determination by integrated analysis of several NMR data sets
3. 学会等名 IPR seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Tanaka, Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Peter Guentert, Yutaka Ito
2. 発表標題 High-resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells
3. 学会等名 The 12th Australian and New Zealand Society for Magnetic Resonance (ANZMAG) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Ito, 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 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池谷鉄兵, 田中孝, 立石泰, 岡田真由, Peter Guentert, 伊藤隆
2. 発表標題 生細胞内のタンパク質立体構造解析
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Teppei Ikeya, Yusuke Suemoto, Takashi Tanaka, Hajime Kamoshida, Masaki Mishima, Masahiro Shirakawa, Peter Guentert, Yutaka Ito
2. 発表標題 High resolution protein 3D structure determination in living eukaryotic cells
3. 学会等名 XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mayu Okada, Teppei Ikeya, Sundaresan Rajesh, Eri Nojir, Tsutomu Mikawa Yutaka Ito
2. 発表標題 Structural and Dynamics Analysis of Yeast Ubiquitin Hydrolase 1 (YUH1) Using Paramagnetic NMR Spectroscopy
3. 学会等名 XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田真由, 池谷鉄兵, Rajesh Sundaresan, 野尻英里, 美川務, 伊藤隆
2. 発表標題 常磁性効果を用いたYeast Ubiquitin hydrolase 1 (YUH1) の構造決定及びダイナミクス解析
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水涼香, 美川務, 福島瑞穂, 池谷鉄兵, 鴨志田一, 木川隆則, 三島正規, 伊藤隆
2. 発表標題 NMRによるタンパク質のミトコンドリア内動態の解析
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池谷鉄兵, 田中孝, 鴨志田一, 三島正規, 白川昌宏, Peter Guentert, 伊藤隆
2. 発表標題 生きた真核細胞中での蛋白質立体構造決定
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤隆, 池谷鉄兵
2. 発表標題 生きた真核細胞内の蛋白質の高分解能立体構造解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Teppei Ikeya, Peter Guentert and Yutaka Ito	4. 発行年 2019年
2. 出版社 The Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 305
3. 書名 In-cell NMR Spectroscopy: From Molecular Sciences to Cell Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

生きた真核細胞内でたんぱく質の立体構造を詳細に観測 ～構造変化を0.05ナノメートルの精度で捉える～
<https://www.tmu.ac.jp/news/topics/19272.html>
 生きた真核細胞内でたんぱく質の立体構造を詳細に観測 ～構造変化を0.05ナノメートルの精度で捉える～
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20190426/index.html>

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
研究協 力者	伊藤 隆	東京都立大学・理学研究科・教授	
	(Ito Yutaka)		
	(80261147)	(22604)	

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			
ドイツ	フランクフルトゲーテ大学			
スイス	スイス連邦工科大学			
英国	レスター大学			