

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号	22604
研究種目	研究活動スタート支援
研究期間	2010 ~ 2011
課題番号	22870026
研究課題名（和文）	In-Cell NMR 立体構造解析に向けた高速・高精度な自動解析システムの開発
研究課題名（英文）	Towards generalized structure determination of in-cell NMR using the fully automated structure analysis
研究代表者	池谷 鉄兵 (IKEYA TEPPEI) 首都大学東京・理工学研究科・助教 研究者番号： 30457840

研究成果の概要（和文）：

近年研究が活発化している in-cell NMR 法は、細胞内蛋白質を構造解析できる手法として多くの注目を集めている。一方で、in-cell NMR のデータは、非常に複雑なものとなるため、従来の手動解析では適用し難いものが多い。本課題では、こうした in-cell 試料に対して、安定して構造解析可能な全自動構造決定システム NOESY-FLYA 法を開発し、本手法が様々な未知蛋白質に適用可能であることを実証した。

研究成果の概要（英文）：

Investigating proteins “at work” in a living environment is a major goal of molecular biology. New NMR methodology has enabled the measurement of multi-dimensional NMR spectra of proteins in living cells. Compared to in vitro spectra of purified proteins in-cell NMR spectra typically show a significant number of background signals, low signal-noise ratio, and broadened signals that lead to a much higher assignment ambiguity, which makes it difficult and cumbersome to check all possibilities manually. In this project, we developed a fully automated structure determination algorithm, NOESY-FLYA method, and optimized it to the in-cell NMR data.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：in-cell NMR, 蛋白質, 自動構造解析

1. 研究開始当初の背景

| ヒトの様々な生命機能や疾病のメカニズム

の分子レベルでの理解、およびこれを基にした創薬開発においては、それぞれの生命過程、或いは疾患に関与するタンパク質の立体構造研究が不可欠である。NMR法は溶液中におけるタンパク質の3次元構造を決定できる唯一の手法として、構造生物学の発展に重要な役割を果たしてきた。特に、近年研究開発が活発化している in-cell NMR 法は、非侵襲的に細胞内のタンパク質を、原子解像度で構造解析できる手法として多くの注目を集めている。最近の大きな進歩として、申請者および首都大学東京の伊藤隆教授らの共同研究チームが、世界初の「生きた細胞」中での蛋白質立体構造決定に成功し、Nature 誌に発表した。この成果は、アメリカ化学会誌 Chemical & Engineering News の「2009年9月の重要な進歩」の1つとして取り上げられるなど、世界的に大きな反響をよんだ。タンパク質機能をより深く理解する上で、今後はそれらが本来機能を発現する環境に近い状態における立体構造、相互作用、分子運動の解析が求められ、これに理想的手法である NMR 法がますます活躍の場を広げることは明らかである。一方で、NMR 法の有用性は、雑音に埋もれた幅広い多数の重なり合ったスペクトルを手動解析しなくてはならないという、多大な労力と高い専門性を要する作業により著しく損なわれている。特に、In-cell NMR や生命活動の理解において重要と考えられるタンパク質群（膜タンパク質等）のスペクトルデータは、一般的に非常に複雑となり、従来の NMR による手動解析を適用し難いものが多い。事実、世界初の in-cell NMR 構造解析の発表以後、生体内での立体構造解析に成功した蛋白質の例は世界的に未だなく、理由の1つにスペクトル解析の複雑さが挙げられている。したがって、こうした問題を克服し、この技術を様々な分子に適用できる汎用的な方法へ発展させることは急務となっていた。

2. 研究の目的

近年研究が活発化している in-cell NMR 法は、非侵襲的に細胞内の蛋白質を構造解析できる手法として多くの注目を集めている。蛋白質機能をより深く理解する上で、それらが本来機能する環境に近い状態における解析が可能なこの手法が、ますます活躍の場を広げることは明らかである。一方で、in-cell NMR 法のデータ解析は、非常に複雑なスペクトル処理を必要とするため、従来の手動解析では適用し難いものが多い。手動解析では、スペクトルの複雑化に伴う帰属候補数の増大により、すべての可能性の検討が難しい一方で、計算機による自動解析では、あらゆる可能性を総当りに判定でき、解析者の技量差も最小限に抑えられるため、高速、客観的

な解析が可能となる。本課題では、こうした in-cell 試料に対して、安定して構造解析可能な全自動構造決定システムを開発し、様々な未知蛋白質への適用可能性を実証する。

3. 研究の方法

以下の2点について重点的に研究開発を進める。(1) NOESY-FLYA 全自動解析システムの in-cell GB1 タンパク質への適用、(2) Quantitative Maximum Entropy (QME)法の in-cell NMR への最適化。

(1)の本全自動構造解析システムの開発では、従来の NMR 法において手動で行われてきた ① ピーク認識、②雑音ピークの除去、③化学シフトの帰属、④NOESY 交差シグナルの帰属、⑤構造計算、⑥構造最適化計算のすべてのステップを NOESY スペクトルを入力とするだけで完全自動で行う。このシステムを、従来法で調製したモデルタンパク質に適用させるとともに、細胞内試料にも適用し、その性能評価を行う。In-cell GB1 試料では、アミノ酸側鎖帰属に必要な三重共鳴スペクトルだけでは、早い横緩和のために十分なシグナルが得られない点が問題であった。一方、NOESY スペクトルではすでにピーク数も十分な良好なデータが得られているため、側鎖由来の追加の化学シフト情報が得られると期待される。従来の手動解析では、組み合わせ数が膨大となるため NOESY からの側鎖帰属は現実的でなかったが、NOESY-FLYA 法は計算機によって総当りに帰属候補を検証できるため、これにより in-cell NMR の化学シフトの帰属の増加に大きく寄与できると期待される。

(2)の QME 法の in-cell NMR 法への最適化では、共同研究を進めているケンブリッジ大学のグループが開発した QME アルゴリズムを、in-cell NMR スペクトルの信号処理に採用し、その効果を様々な側面から検証することでこの方法を拡張させる。QME は、スペクトルの全領域を考慮して最適な雑音閾値を自動で設定するため、in-cell NMR スペクトルのようなスペクトルの領域によってノイズに大きな差があるデータには非常に有効に機能すると期待できる。これを具体的なスペクトルを用いて検証し、QME を in-cell スペクトルおよび非線形データサンプリングに最適化させるようパラメータ、アルゴリズムの改良を進める。

4. 研究成果

本研究課題により進めていた NOESY-FLYA 法の開発に成功し、NOESY スペクトルのみを入力データとして、蛋白質立体構造の全自動構造解析アルゴリズムの実証実験に初めて成功した。ここでは、モデル試料としてクロレラ由来のコピキチン(76 a. a. : SAIL 標識)、及び高度好熱菌 HB8 由来の TTHA1718 (66 a. a. : 二重

標識)の完全自動構造解析を行った。実証実験の結果、従来の手動解析による構造計算と同程度の精度で立体構造解析が全自動的に可能となることを示すことができた (J.

Biomol. NMR. 50, 137-146 (2011)). 本法を用いれば、NOESY以外のスペクトル・構造情報を全く必要とせず、化学シフト帰属から立体構造決定に至るまで全ての解析過程を自動化することができる。また、従来の安定同位体 2 重標識試料に加えて、SAIL標識した試料においても、アルゴリズムの大きな変更を必要とせずに適用でき、高精度の構造解析を達成できたことから、本手法の高い汎用性を示すことができた。

In-cell NMR法の応用例としては、本年度、GB1蛋白質の構造決定に新たに成功した。2009年研究代表者らは世界で初めて生きた細胞中での立体構造解析に成功したが、それ以後2年経た現在まで、未だ世界第2例目の立体構造解析に成功した例はなかった。今回、本研究課題により世界第2例目の構造決定も本研究グループによって達成されたことから、in-cell NMR 立体構造決定技術の拡張、および汎用化に向けて大きく前進した成果となった。

信号処理法の改良では、これまで in-cellデータの信号解析に用いてきた最大エントロピー法(MaxEnt)に加え、共同研究先であるケンブリッジ大学のグループによって開発されたQuantitative MaxEnt (QME)法を基に、新たにin-cellデータに最適化させた。細胞内GB1蛋白質の立体構造解析にNOESY-FLYA法とQMEの両方を適用させたところ、従来法と比較して、新たに185個のNOEシグナル検出と88個の化学シフト帰属に成功し、主鎖RMSDで0.2Å程度収束した立体構造を決定できた。

構造計算手法の開発では、CYANAの2面角系分子動力学計算にデカルト座標系の分子力場の導入に成功し、構造の最適化計算をCYANAの自動NOE解析とを組み合わせることで再帰的に計算可能なアルゴリズムを開発した。従来のCYANAは、計算の高速化のために極端に単純化した目的関数で立体構造を評価していたが、本法を利用することにより、これまで以上に高精度の立体構造計算と自動NOE解析が可能になると期待できる。現在、複数の具体的なNMRデータに適用させ、構造の精度と計算速度の両面での実証実験を進めている。

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 4 件)

1. Ikeya, T., Sasaki, A., Sakakibara, D., Shigemitsu, Y., Hamatsu, J., Hanashima, T., Mishima, M., Yoshimasu, M., Hayashi, N., Mikawa, T., Nietlisbach, D., Wälchli, M., Smith, B. O., Shirakawa, M., Güntert, P. & Ito, Y. NMR protein structure determination in living E. coli cells using nonlinear sampling. Nature Protocols 5, 1051-1060 (2010)
2. Sobhanifar, S., Schneider, B., Löhr, F., Gottstein, D., Ikeya, T., Filipek, S., Güntert, P., Bernhard, F. & Dötsch, V. Structural investigation of the C-terminal catalytic fragment of presenilin-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 9644-9649 (2010)
3. Ikeya, T., Jee, J. G., Shigemitsu, Y., Hamatsu, J., Mishima, M., Ito, Y., Kainosho, M. & Güntert, P. Automated NMR chemical shift assignment and protein structure determination using exclusively NOESY spectra. J. Biomol. NMR., published online ahead of print (2011)
4. 池谷鉄兵, 伊藤隆, 「高度好熱菌Thermus thermophilus HB8 TTHA1718 遺伝子産物」, eProS, http://www.pdbj.org/eprints/index_ja.cgi?PDB%3a2roe, (2011)

[学会発表] (計 21 件)

1. Ito, J. Hamatsu, T. Hanashima, M. Mishima, T. Mikawa, M. Waelchli, B. O. Smith, M. Shirakawa, T. Ikeya, P. Guentert "Structure and dynamics of proteins at work inside cells", The 24th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, (Cairns, Commonwealth in Australia, 2010年8月22日 ~ 27日)
2. J. E. Jakus, Y. Tsuchie, T. Ikeya, M. Mishima, D. Nietlispach, J. R.H. Tame, Y. Ito, "NMR studies of 56 kDa E. coli periplasmic nickel binding protein NikA" The 24th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (Cairns, Commonwealth in Australia, 2010年8月22日~27日)
3. Y. Shigemitsu, Y. Tsuchie, T. Ikeya, M. Mishima, D. Nietlispach, M. Waelchli, P. Guentert, B. O. Smith, Y. Ito, "Applications of nonlinear sampling scheme to 4D NOESY experiment."

The 24th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (Cairns, Commonwealth in Australia, 2010年8月22日~27日)

4. D. Coutandin, H. D. Ou, F. Löhr, T. Ikeya, J. Heering, G. Deutsch, T. Weber, P. Güntert, V. Dötsch, "Structural evolution of oligomerization domains within the p53 family", The 24th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems

(Cairns, Commonwealth in Australia, 2010年8月22日~27日)

5. 池谷鉄兵, 池峻求, 重光佳基, 濱津順平, 三島正規, 伊藤隆, 甲斐荘正恒, Peter Guentert, 「FLYAによる最少スペクトルデータセットを用いた自動構造解析」第49回NMR討論会(船堀 2010年11月15~17日)

6. 重光佳基, 池谷鉄兵, 土江祐介, 三島正規, Daniel Nietlispach, Markus Waelchli, Peter Guentert, Brian O. Smith, 伊藤隆 「Nonlinear samplingと3D MaxEntを用いた迅速な4D NOESY測定の有用性の検証」, 第49回NMR討論会(船堀 2010年11月15~17日)

7. 花島知美, 濱津順平, 池谷鉄兵, 三島正規, Peter Guentert, 白川昌宏, 伊藤隆 「In-cell NMR法を用いた生細胞内におけるプロテインG B1ドメインの高次構造解析」第49回NMR討論会(船堀 2010年11月15~17日)

8. 大西香穂里, 重光佳基, 土江祐介, Daniel Nietlispach, 三島正規, 池谷鉄兵, 伊藤隆 「NMRを用いた蛋白質の立体構造解析における非線形サンプリングの有用性の検証」, 第49回NMR討論会(船堀 2010年11月15~17日)

9. 濱津順平, Daniel Nietlispach, 花島知美, 池谷鉄兵, 細谷沙織, 三島正規, 白川昌宏, 伊藤隆, 「In-cell NMRによる高度好熱菌TTHA1718蛋白質の生細胞動態解析」, 第49回NMR討論会(船堀 2010年11月15~17日)

10. Joanna Jakus, Yuusuke Tsuchie, Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Daniel Nietlispach, Jeremy R. H. Tame, Yutaka Ito 「NMR studies of 56 kDa E. coli nickel binding protein NikA」, 第49回NMR討論会(船堀 2010年11月15~17日)

11. 大西香穂里, 重光佳基, 土江祐介, Daniel Nietlispach, 三島正規, 池谷鉄兵, 伊藤隆 「NMRを用いた蛋白質の立体構造解析における非線形サンプリングの有用性の検証」第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会(神戸ポートアイランド, 兵庫県, 2010年12月7日~10日)

12. 濱津順平, 花島知美, 池谷鉄兵, 細谷沙

織, 三島正規, Daniel Nietlispach, 白川昌宏, 伊藤隆 「In-cell NMRによるTTHA1718蛋白質の生細胞内分子動態解析」

第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会(神戸ポートアイランド, 兵庫県, 2010年12月7日~10日)

13. 花島知美, 濱津順平, 赤羽正寿, 白川昌宏, 三島正規, 池谷鉄兵, Peter Guentert, 伊藤隆 「In-cell NMRを用いた生細胞内におけるプロテインG B1ドメインの高次構造解析」第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会, (神戸ポートアイランド, 兵庫県, 2010年12月7日~10日)

14. 池谷鉄兵 「NMR法による生きた細胞内での蛋白質の立体構造決定とダイナミクス解析」, 統計数理研究所研究会 マルコフ連鎖モンテカルロ法とその周辺(東京, 2011年3月10~12日)

15. Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Yutaka Ito and Peter Guentert, "NMR structure refinement by torsion angle molecular dynamics simulation using a physical force field in CYANA", ISNMR 2011, Yokohama, 2011/11/15-18

16. Junpei Hamatsu, Takahiro Shirai, Daniel Nietlispach, Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Masahiro Shirakawa and Yutaka Ito, "Structural and dynamics studies of proteins in living cells by in-cell NMR spectroscopy", ISNMR 2011, Yokohama, 2011/11/15-18

17. Saori Hosoya, Tomomi Hanashima, Junpei Hamatsu, Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Peter Guentert, Masahiro Shirakawa and Yutaka Ito, "Structure determination of the protein G B1 domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy", ISNMR 2011, Yokohama, 2011/11/15-18

18. Kaori Onishi, Junpei Hamatsu, Dambarudhar Shiba Sanker Hembram, Takehiro Haremaki, Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Masahiro Shirakawa and Yutaka Ito, "Heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy of proteins in human cultured cells", ISNMR 2011, Yokohama, 2011/11/15-18

19. 濱津順平, Daniel Nietlispach, 池谷鉄兵, 三島正規, 白川昌宏, 伊藤隆, 「In-cell NMRによる細胞内蛋白質の分子動態解析」, 日本分子生物学会年会, 横浜, 2012年12月13-16日

20. Saori Hosoya, Tomomi Hanashima, Junpei Hamatsu, Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Peter Guentert, Masahiro Shirakawa and Yutaka Ito, "Structure determination of the protein G B1 domain

in living cells yb in-cell NMR spectroscopy”, 日本分子生物学会年会, 横浜, 2012年12月13-16日

21. 池谷鉄兵, “細胞内蛋白質構造の精密化”, In cell NMR workshop 2012, Osaka, 2012/3/27-28

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ:

研究室紹介および, CYANA プログラムの実践的応用を紹介したページを作成.

http://www.comp.tmu.ac.jp/osbc/Group_It_o/index.html

http://www.cyana.org/wiki/index.php/Main_Page

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池谷 鉄兵 (IKEYA TEPPEI)

首都大学東京・理工学研究科・助教

研究者番号: 30457840

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者