

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291029

研究課題名(和文)原子分解能で細胞を解析する部位選択高感度固体核磁気共鳴法

研究課題名(英文)Site selective cellular analysis by solid-state NMR

研究代表者

藤原 敏道 (Fujiwara, Toshimichi)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：20242381

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)：細胞内において運動性の高い球状蛋白質などの機能、構造、相互作用、安定性を原子分解能で解析できるのがIn-cell NMR分光法である。この方法を発展させて運動性の低い生体膜の蛋白質構造や細胞質の蛋白質集合体構造を定量的高感度でNMR解析可能にした。NMRで細胞内での位置情報を得られるようにする。応用としてモデル膜蛋白質についてNMRで得られた蛋白質構造や細胞内位置情報、電子顕微鏡像を組み合わせ、0.1nmから1 $\mu$ mの分解能で細胞モデル構造を提示した。このために、多次元固体NMR定量測定法、DNP固体NMR法、位置情報を与える常磁性造影剤・分極剤の細胞局在法、スピン拡散距離測定法を実施した。

研究成果の概要(英文)：The thermal equilibrium NMR signal intensities give the quantitative information for all the cellular molecules at low temperatures where molecular motions are suppressed. The molecules for a single cell were counted by combined use of optical and electron microscope analyses, which enabled us to trace the biosynthetic processes by using the  $^{13}\text{C}$  labeled media without the purification. Applications of our magic-angle-spinning DNP NMR spectrometer with a closed-cycle He-gas system at low temperature 30 K and 16.4 T are also shown.

研究分野：生物物理学

キーワード：核磁気共鳴 細胞生物学 構造生物学

### 1. 研究開始当初の背景

細胞を対象にして 0.1nm の分解能で構造解析を行えると、多種の生体分子が共存するため蛋白質分子が揺らぎながらリガンド分子等と会合し構造変化して、機能を担う様子を原子分解能で明らかにできる。このような細胞内では構造安定性や反応速度が vitro 環境と異なり、クロストークする相互作用も働く。これらも考慮してはじめて、細胞として統合して働く生命の活動を構造から明らかにできる。このような能力を持ち得る有望で実績のある方法が In-cell NMR 法である。これまでこの方法で、細胞内でリガンドと蛋白質の相互作用・構造変化など原子分解能情報が得られている。また、細胞内で蛋白質構造が決定されている。これらの点では、X 線結晶回折法、染色を要する電子顕微鏡法、表面の情報を得る高速 AFM 法、標識した蛍光分子から情報を得るプローブ法など他の方法より、優れていると言えるだろう。

優れた In-cell NMR 法であるが、不十分な点は、i) 対象が可溶性小型蛋白質であり細胞内でも運動性の高い分子のみが対象であり、存在量計測など定量性に欠ける点、ii) 低感度であり測定に数百ナノモル(細胞当たり数十万個)の分子数を必要とする点、iii) 細胞内での対象分子位置情報を得られないことである。さらに、iv) 対象の蛋白質を同位体標識して細胞に導入することも容易ではない。これらを克服することにより、細胞内分子数が少ない蛋白質でも、機能を細胞・蛋白質構造から明らかにする等、広い構造階層から定量に生命過程を調べられる。

そこで上記の問題点を克服するために「細胞を対象にして 0.1nm の分解能で構造解析」を行うことを目標に「細胞部位選択的高感度固体 NMR 法」の開発とその応用実証を行う。この課題で重要なのは、最先端の NMR 測定法とその応用に最適な細胞試料調製法を組み合わせることで解析を行うことである。

### 2. 研究の目的

細胞内において運動性の高い球状蛋白質などの機能、構造、相互作用、安定性を原子分解能で解析できるのが In-cell NMR 分光法である。本課題では、この方法を発展させて運動性の低い生体膜の蛋白質構造や細胞質の蛋白質集合体構造を定量的高感度で NMR 解析可能にする。同時に NMR で細胞内での位置情報を得られるようにする。応用としてモデル膜蛋白質について NMR で得られた蛋白質構造や細胞内位置情報、電子顕微鏡像を組み合わせ、0.1nm から 1 $\mu$ m の分解能で細胞モデル構造を提示する。このために、1) 多次元固体 NMR 定量測定法、2) NMR 感度を 1000 倍向上させた DNP 固体 NMR 法、3) 位置情報を与える常

磁性造影剤・分極剤の細胞局在法、4) スピン拡散距離測定法、5) 対象蛋白質選択的な安定同位体  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識法を実施する。

### 3. 研究の方法

細胞部位選択的高感度固体 NMR 法の確立するために、初めに次の要素技術を高度化する。1) 多次元固体 NMR 定量解析法、2) DNP-NMR 感度向上法、3) 細胞に局在する常磁性造影剤・分極剤利用法、4) スピン拡散距離測定法、5) 細胞内の特定蛋白質選択的な同位体標識法。例えば、2) では感度向上 DNP 用分極剤の細胞内局在の実証、4) では細胞表面に局在する造影剤との距離を求めるための磁気緩和速度解析である。これらを標識蛋白質を含む細胞系に適用可能にして統合する。各要素技術は既に部分的に開発を進めている。これらを統合して、膜蛋白質と水溶性蛋白質ユビキチンについて、細胞内での蛋白質構造など状態、蛋白質数、細胞内での存在分布を明らかにする。これに基づいて、対象蛋白質にフォーカスした細胞モデル構造を提示する。

### 4. 研究成果

#### 1) 多次元固体 NMR 定量解析法

##### 1-1) NMR 定量法

1 細胞当たりについて、標識蛋白質数、共鳴周波数で区別できる他の蛋白質、核酸、糖、脂質を定量できるようにする。ここでは NMR のシグナル面積強度は、試料内の核スピン数に比例することを利用する。定量性を損なう分子運動に依存した信号強度変動を除去し、実験中の溶菌を防ぐために、実験は 250 K 以下の低温で行う。装置に依存した感度の影響を除くために、内部基準を加える。細胞数については、透過型電子顕微鏡での細胞の形状測定、光学顕微鏡による細胞数計測も組み合わせることにより、NMR で求める。

##### 1-2) 蛋白質立体構造解析

標識した蛋白質については、 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  について一連の多次元マジック角回転固体 NMR スペクトルを測定して、残基分解能での高次構造を明らかにする。このスペクトル解析には、我々が開発した NMR 蛋白質情報学に基づく自動構造解析法 RESPLS を用いる。また、シグナルの線幅から構造の揺らぎ情報を得る。膜蛋白質とユビキチンについて、この解析を行う。

##### 2) DNP-NMR 感度向上法

In-cell 固体 NMR スペクトルは、大量発現させた菌体であっても、通常固体 NMR スペクトルに比べて約 2 割程度の感度になり、測定には数日の積算を要した。DNP 法で 500 倍以上高感度化させることで、1 時間以下での測定や発現量の低い蛋白質の解析が可能になる。

DNP 実験では、ラジカル化合物テンポールなどを用いる。親水性の異なるラジカル

化合物や基剤を試して、NMR 感度が最大になるよう条件を最適化する。

DNP による感度向上を行うプロトタイプ装置は、 $^1\text{H}$  共鳴周波数 600MHz の磁場強度で 2011 年に完成させ、2013 年からは  $^{13}\text{C}$ -高分解能固体 NMR の測定をできるようにした。2013 年度末には、ジオルレゾナンス社と開発した磁場強度 700MHz の装置を蛋白研に設置して、感度と分解能向上を計った。この装置についてもマシントームの一部を本課題に供した。

#### 2) DNP-NMR 感度向上法

磁場強度 700MHz の DNP-NMR 装置では、He ガスで 30K の極低温下で 1000 倍近い感度向上を予定している。この世界的にも最高の感度で、1 細胞当たり分子数 100 の蛋白質まで解析できる。この感度で、同位体標識化合物の代謝過程が検出できることを確認する。また、標識蛋白質と他の細胞成分、例えば膜蛋白質 pHtrII では脂質膜、ペプチドグリカン、リポ多糖との相互作用の検出を核双極子結合を利用して行った。

#### 3) 細胞に局在する常磁性造影剤・分極剤利用法

常磁性造影剤は、これまで核磁化緩和促進度が最も大きい  $\text{Gd}^{3+}$  イオンを調べた。 $\text{Gd}^{3+}$  については弱いながらも、大腸菌の内膜に対する透過性を示す結果を得ている。この解析では、細胞内の水の核磁化緩和速度から常磁性種濃度を見積もった。望ましい毒性の低いキレート錯体  $\text{Gd}^{3+}$ -DOTA についても細胞での局在を調べて応用する。

また、DNP 用のラジカル分極剤についても、ニトロキシド・ラジカルのテンポール以外に寿命の長い炭素ラジカル X63 等も利用を試みた。DNP で分極（超偏極）するのに要する時間に依存した NMR スペクトルを測定して細胞での局在性を評価した。

#### 4) スピン拡散距離測定法

150K 以下の低温では、磁気緩和はほぼ常磁性化合物から由来する。 $^1\text{H}$  スピン拡散速度は、 $1\text{nm}^2/\text{ms}$  程度なので、100 秒程度でサブ  $\mu\text{m}$  の範囲の核分極に影響を与える。この原理で NMR 信号の緩和時間より造影剤・分極剤からの距離を求める。これにより、常磁性種から同位体標識蛋白質までの距離を測定した。細胞内での距離を、モデル細胞として表示する。モデル細胞を球近似してスピン拡散をシミュレーションすることで距離を求める。磁気緩和を定量的に解析するため多指数関数的に変化する信号強度をラプラス変換して緩和時間の分布を求める。これとシミュレーション結果を組み合わせて、標識蛋白質、核酸、脂質、糖など共鳴周波数で区別できる分子について、細胞中心からの動径分布関数として位置を表す。

#### 5) 細胞内の特定蛋白質選択的な同位体標識法

細胞内で特定の蛋白質を同位体標識する。IPTG 誘導による大量発現法を用いる。すでに

膜蛋白質と水溶性蛋白質ユビキチンについては試料調製できることを確認している。

この標識方法で、対象蛋白質を標識して細胞内での蛋白質標識の選択性、蛋白質構造と細胞での局在を調べる。標識選択性が高く、代謝によるリークが少ないとする結果を得た。なお、蛋白質構造が天然状態と同一であることが実証できれば、この方法で蛋白精製を行わずに NMR で容易に蛋白質を構造解析できるようになる。

最終年度では、上記で得たデータにより細胞モデルを作成した。

蛋白質分子では、原子分解能構造が得られる。蛋白質精製した後 vitro で決めた NMR および X 線構造と比較する。細胞内では、分子間環境が不均一であるため構造は揺らぎが大きいと予測された。細胞については、電子顕微鏡像を参考にして、上記で求めた分布関数に基づいて、蛋白質の形状や体積を考慮して、蛋白質を細胞モデルの中に埋め込む。また、プロテオミクスなどで得られた既知の蛋白質を大腸菌の中に配置する。今後このモデルをさらに精密化することにより、大量発現させた蛋白質が存在する密度、膜蛋白質なら蛋白質密度、細胞骨格との位置関係、蛋白質間相互作用、リボソームとの位置および量的な関係、発現量の上限などを評価できるようになる。さらに、以降にはシステム生物学者と協力してこのモデル細胞を時間依存的に動かすことにより、細胞機能を定量的に評価できるようになるだろう。これは、細胞機能の改良に役立てられる。

#### 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9件)

Bikash Sahoo, Kenta Maruyama, Jyotheeswar Edula, Takahiro Tougan, Yuxi Lin, Young-Ho Lee, Toshihiro Horii, and Toshimichi Fujiwara, Mechanistic and structural basis of bioengineered bovine Cathelicidin-5 with optimized therapeutic activity. *Scientific Reports*, 7, Article number: 44781, 1-16 (2017). doi:10.1038/srep44781

Yoshikazu Hattori, David Heidenreich, Yuki Ono, Toshihiko Sugiki, Kei-ichi Yokoyama, Ei-ichiro Suzuki, Toshimichi Fujiwara, Chojiro Kojima, Protein  $^{19}\text{F}$ -labeling using transglutaminase for the NMR study of intermolecular interactions, *J. Biomol. NMR*, 68(4), 271-279, (2017). doi:10.1007/s10858-017-0125-6

Bikash Ranjan Sahoo and Toshimichi Fujiwara, Conformational states of HAMP domains interacting with sensory 1 rhodopsin membrane 2 systems: An integrated all-atom and coarse-grained molecular dynamics simulation

approach, *Mol. BioSyst.*, **13**, 193-207 (2017). DOI: 10.1039/C6MB00730A

Bikash Ranjan Sahoo, Toshimichi Fujiwara, Membrane Mediated Antimicrobial and Antitumor Activity of Cathelicidin 6: Structural Insights from Molecular Dynamics Simulation on Multi-microsecond Scale, *PLOS ONE*, 11(7): e0158702 (2016). DOI:10.1371/journal.pone.0158702

Yoh Matsuki, Toshitaka Idehara, Jun Fukazawa, and Toshimichi Fujiwara. Advanced instrumentation for DNP-enhanced MAS NMR for higher magnetic fields and lower temperatures, *J. Magn. Reson.*, **264**, 107-115 (2016).

<https://doi.org/10.1016/j.jmr.2016.01.022>

Hajime Tamaki, Ayako Egawa, Kouki Kido, Tomoshi Kameda, Masakatsu Kamiya, Takashi Kikukawa, Tomoyasu Aizawa, Toshimichi Fujiwara and Makoto Demura, Structure determination of uniformly  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  labeled protein using qualitative distance restraints from MAS solid-state  $^{13}\text{C}$ -NMR observed paramagnetic relaxation enhancement, *J. Biomol. NMR*, **64**, 87-101 (2016). doi: 10.1007/s10858-015-0010-0

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). doi: 10.1007/s10858-014-9882-7

Yoh Matsuki, Shinji Nakamura, Shigeo Fukui, Hiroto Suematsu and Toshimichi Fujiwara. Closed-cycle cold helium magic-angle spinning for sensitivity-enhanced multi-dimensional solid-state NMR, *J. Magn. Reson.* **259**, 76-81 (2015) doi: 10.1016/j.jmr.2015.08.003

Su-Jin Kang, Yasuto Todokoro, Ikuko Yumen, Bo Shen, Iku Iwasaki, Toshiharu Suzuki, Atsushi Miyagi, Masasuke Yoshida, Toshimichi Fujiwara, and Hideo Akutsu, "Active-Site Structure of Thermophilic  $F_{oc}$  Subunit Ring in Membranes Elucidated by Solid-State NMR", *Biophysical J.*, **106**, 390-398 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.005>

〔学会発表〕(計4件)

High-Field DNP and Quantitative Cellular Solid-State NMR under Low Temperatures, Toshimichi Fujiwara, The 20th International Society of Magnetic Resonance, ISMAR 2017, Québec City Convention Centre, Québec City, Canada, July 23-28, 2017.

High-Field DNP and Cellular Solid-State NMR Using Paramagnetism under Low

Temperatures, Toshimichi Fujiwara, International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems 2016 Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan August 21-26, 2016.

In-cell Solid-state NMR Spectroscopy for Probing Site Specificity of Macromolecules in Escherichia coli Cells, Chalermpon Khampa, Ayako Egawa, Chojiro Kojima, Yoh Matsuki and Toshimichi Fujiwara, International Society of Magnetic Resonance 2015, CELAP, Shanghai, China, August 16-21, 2015

Quantitative Solid-state NMR Method for Counting the Number of Molecules Synthesized under the Overexpression in an Escherichia coli Cell, Kazuya Yamada, Ayako Egawa, Toshimichi Fujiwara, International Society of Magnetic Resonance 2015, CELAP, Shanghai, China August 16-21, 2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: NMRプローブ

発明者: 中村新治, 松木陽, 藤原敏道

権利者: 大阪大学, 日本電子株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2015-016082

出願年月日: 2015年1月29日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/biophy>

s/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原敏道 (FUJIWARA, Toshimichi)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号: 20242381

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

児嶋長次郎 (KOJIMA Chojiro)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号: 50333563

松木陽 (MATSUKI, Yoh)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号: 70551498

(4) 研究協力者