

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440018

研究課題名(和文) 19F-NMR法を用いた細胞内環境下におけるタンパク質の動的構造の解明

研究課題名(英文) Protein 19F Labeling Strategy for In-Cell NMR and Functional Analyses

研究代表者

小柴 生造 (Koshiba, Seizo)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：70332301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：人の体の中で様々な機能を果たすタンパク質はそれぞれ特徴的な立体構造を持っており、機能に際して構造が変化することが知られている。しかし従来の研究では単離したタンパク質を試験管内で解析しており、細胞内のように多種類の分子が存在する環境下でのタンパク質の構造変化を調べる研究は技術的に難しかった。本研究では、細胞内においてタンパク質を特異的に且つ高感度に測定できるフッ素をタンパク質に導入し、核磁気共鳴法で測定するための実験系を確立した。またこの方法を活用してタンパク質と基質との相互作用を観測することにも成功した。本成果は今後のタンパク質科学や細胞生物学の発展に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Fluorine 19 (19F) is a widely used nucleus for NMR because of its high sensitivity and large chemical shift dispersion. In particular, 19F-labeling is useful for In-Cell NMR, because most of biological systems contain no fluorine, resulting that 19F-labeled molecules in living cells can be selectively analyzed. In this study, I developed several 19F-labeling methods for proteins and effectively incorporated trifluoromethyl-labeled amino acids into proteins. I expressed several kinds of trifluoromethyl-labeled proteins and could observe highly sensitive 19F NMR signals both in vitro and in vivo. I also investigated the interactions of ligands with large molecular weight proteins by 19F-NMR and could identify binding sites of the ligands in a short time. These results show that my methods are particularly useful for investigating behavior of intracellular proteins or ligand-interactions. I expect that this labeling strategy is useful for wide variety of biological sciences.

研究分野：NMRによるタンパク質の構造生物学

キーワード：フッ素 タンパク質 NMR 細胞内環境 相互作用 動的構造変化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究開始当初、構造生物学における高次構造レベルでの機能メカニズムの解析は、精製・単離したタンパク質を使い、NMR法や結晶構造解析などの実験手法を用いて *in vitro* で研究されてきた。しかし、実際の生体内においては何万種類というタンパク質が存在し、特に細胞内においては多数の分子が高密度に存在している。このため、生体内における各種タンパク質の機能メカニズムが、基質以外の分子との非特異的な相互作用によって干渉を受け、*in vitro* とは異なる振る舞いをする可能性が指摘されていた。また、細胞の種類や置かれた環境、さらには刺激の種類に応じて、様々な翻訳後修飾やサブユニット構成の変化が起こり、複雑かつダイナミックな構造、機能の変化が起こることが想定されている。

(2) このような変化を観測するため、生きた細胞内に安定同位体標識したタンパク質を導入し、NMR法を用いて細胞内のタンパク質の構造や相互作用を調べる In-Cell NMR法が報告された (Inomata, et al. Nature 2009; Sakakibara, et al. Nature 2009)。しかし、非特異的な相互作用によって干渉を受ける細胞内環境においては、通常の *in vitro* での NMR 構造解析に使用している  $^{13}\text{C}$  や  $^{15}\text{N}$  等の安定同位体標識技術は、感度や分解能、そして測定に要する時間という点で十分ではない。また生体内の他の分子由来の NMR シグナルも同時に観測されるため、濃度が低いと解析が困難な場合が多い。これらの問題を克服するため、 $^{19}\text{F}$ -NMR法を利用した In-Cell NMR法が報告されたが、特殊な発現系とアミノ酸が必要なため、普及していなかった (Li, et al. J. Am. Chem. Soc. 2010)。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、これらの問題を克服するため、研究代表者が In-Cell NMR 用に関与した効率的なトリフルオロメチル標識タンパク質合成技術を活用することをめざした。 $^{19}\text{F}$ 核は生体内の他の分子には存在せず、高感度で且つタンパク質の高次構造にほとんど影響を与えないため、細胞内におけるタンパク質の振る舞いを観測するには最適の標識法である。特に、運動性の高いメチル基の3つの水素原子をフッ素原子に置換したトリフルオロメチル基は細胞内の高密度な環境下においても高感度にタンパク質を観測することができる利点がある。また  $^{19}\text{F}$ 核は周りの環境に非常に敏感に反応しシグナルが変化する性質があるため、細胞内におけるタンパク質の構造変化や相互作用の解析に適している。この技術により、細胞内にお

けるタンパク質の構造情報、特に外部からの刺激に応じた動的な構造変化を観測し、生体内におけるタンパク質の高次構造レベルでの機能メカニズムや分子認識機構を詳細に解析する技術を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究の目標は、 $^{19}\text{F}$  標識タンパク質を用いて、細胞内の高密度状態 (クラウド環境) における目的タンパク質の様々な相互作用を観測する方法を開発する。そして細胞内に導入した各種標識タンパク質の  $^{19}\text{F}$  シグナルを観測し、*in vitro* での実験結果と比較することにより、これまで報告されてきた相互作用が実際に細胞内でも起こっているか、また相互作用様式に違いがあるのか明らかにすることをめざす。一方、 $^{19}\text{F}$  標識法も含めた新しい標識アミノ酸を開発し、より詳細に且つ多様な条件下で構造情報を得るための解析方法を開発する。さらに細胞内における非特異的な相互作用の影響を観測するため、 $^{19}\text{F}$  標識体を用いた解析法を検討する。

(2) 外部刺激に応じて引き起こされる情報伝達経路の活性化に伴って、細胞内のタンパク質の高次構造がどのように変化するのが解析する。解析するタンパク質の対象は、申請者が以前 NMR を用いて *in vitro* 環境での高次構造を決定したヒトのセリンスレオニンキナーゼ VRK1 の他、酸化ストレス応答タンパク質 Keap1 や代謝酵素など、マルチドメインから構成され基質結合に伴い高次構造が変化することが推測されているタンパク質を対象とする。本研究では、生体内で高感度に測定することができる  $^{19}\text{F}$  標識を利用して、細胞内におけるタンパク質の修飾や相互作用に伴う高次構造変化を観測する方法を開発することをめざす。

## 4. 研究成果

(1) 細胞内タンパク質の In-Cell NMR 法による測定に際しては、高感度な NMR 測定が可能な  $^{19}\text{F}$  核を高効率にタンパク質に導入できる発現系が必要である。このため、まず高感度  $^{19}\text{F}$  標識アミノ酸であるトリフルオロメチオニンによるタンパク質標識技術の最適化を行った。その結果、VRK1 キナーゼタンパク質にトリフルオロメチオニンを高効率に導入する標識法を開発した。次にトリフルオロメチオニン標識 VRK1 タンパク質の大量合成・精製に成功し、得られた試料を用いて超高感度  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトルの測定にも成功した (図 1)。このことは、分子量が4万を超えるタンパク質でも  $^{19}\text{F}$  標識法で高感度に構造情報が得られることを明らかにした成果である (投稿中)。

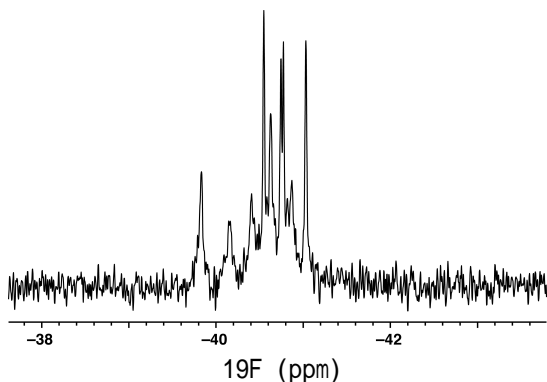


図1：トリフルオロメチオン標識 VRK1 の一次元 19F-NMR スペクトル

(2)(1)で得られたトリフルオロメチオン標識 VRK1 タンパク質を培養細胞に導入する実験を行った。その結果、少量ながら細胞内に標識タンパク質を導入することに成功し、生きた細胞内におけるトリフルオロメチオン標識 VRK1 タンパク質の NMR スペクトルの測定に成功した(図2)。現在導入条件について引き続き検討を行っている。

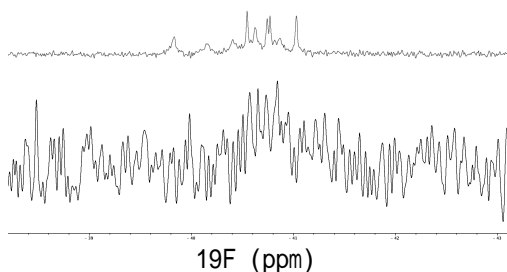


図2：トリフルオロメチオン標識 VRK1 の一次元 19F-NMR スペクトル。(上)精製タンパク質のスペクトル。(下)HeLa 細胞に導入したタンパク質の InCell INMR スペクトル

(3)新規トリフルオロ標識法を検討するため、アミノ酸のフェニルアラニンの側鎖にトリフルオロメチルを付加させたトリフルオロフェニルアラニンに寄るタンパク質の標識を検討した。実験に際しては部位特異的標識技術に定評がある無細胞タンパク質合成系を開発した理化学研究所の研究者に協力を依頼した。対象タンパク質として今回新たにヒトの酸化ストレス応答タンパク質 Keap1 を対象とし、まず通常の発現系を構築した。次にトリフルオロフェニルアラニンをを用いた部位特異的標識法を検討した結果、特定の部位にトリフルオロフェニルアラニンを導入することに成功した。得られた 19F 標識タンパク質の 19F-NMR を測定したところ、高感度な 1D スペクトルを得ることができた(図3)。またシグナルは1本のみ観測され、予定通り選択的に標識されていることが確認できた。

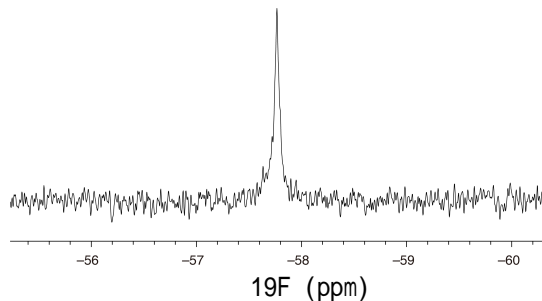


図3：Keap1 の部位特異的トリフルオロフェニルアラニン標識体の一次元 19F-NMR スペクトル

(4)(3)で作成したトリフルオロフェニルアラニン標識 Keap1 タンパク質に、酸化ストレス因子である各種低分子化合物を添加しシグナルの変化を観測したところ、化合物選択的にシグナルが変化することが判明した(図4)。この結果はトリフルオロ標識したフェニルアラニンの近傍に化合物が結合(システイン残基への化合物による修飾)していることを示している(投稿中)。このように部位特異的トリフルオロ標識タンパク質の合成は、タンパク質と基質との相互作用を非常に高感度に検出できる系であり、細胞内におけるタンパク質と基質の相互作用や他の分子による修飾の解析という本研究目標において非常に重要な技法を確立した。

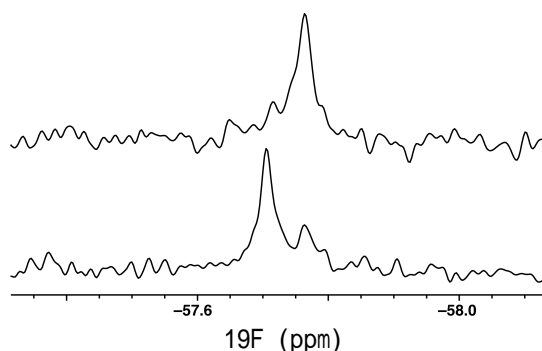


図4：Keap1 の部位特異的トリフルオロフェニルアラニン標識 Keap1 の一次元 19F-NMR スペクトル。(上)Keap1 単体(下)化合物添加後

(5)一方、酸化ストレス応答タンパク質 Keap1 は細胞内で転写因子 Nrf2 を基質として認識する。Keap1 と Nrf2 の相互作用に各種酸化ストレス因子が与える影響を細胞内環境下において高次構造変化の観点から明らかにすることを目的として、まず2量体で機能する Keap1 と Nrf2 の相互作用を NMR を用いて解析するとともに、阻害剤や別の基質タンパク質の添加に伴うシグナルの変化を観測した。その結果、別の基質添加に伴い、段階的に Nrf2 と Keap1 の相互作用が阻害されること、その際 Nrf2 の2種類の Keap1 結合部位に相互作用に違いがあることを構造レベルで明らかにした(投稿準備中)。この結果は細胞内環境では2量体で働く Keap1 と Nrf2

の相互作用を分子レベルで初めて明らかにした成果であり、今後細胞内で同様な解析を行うことで細胞内環境下における Keap1/Nrf2 系の外部刺激(酸化ストレス)に伴う高次構造レベルでの変化を観測するためのデータを習得した成果である。

(6) 一方、研究代表者が別途進めているオミックス解析では、代謝に関わる酵素のアミノ酸変異がヒトの代謝環境に大きな影響を与えていることが判明した。これらの酵素はマルチドメインタンパク質であり、変異はドメイン間の相互作用・活性調節に影響を与えていることが推測された。本研究で開発した 19F 標識技術と細胞内環境下での測定法を活用してこれら代謝酵素の動的構造に変異が与える影響を詳細に分析すべく、該当代謝酵素の大量発現系を構築し、現在 19F を用いた実験を進めている。

(7) 本研究ではタンパク質の各種 19F 標識技術を新たに開発し、細胞内環境下でのタンパク質の動的構造変化の解析に必要な高感度 19F-NMR 測定法の開発に初めて成功した。特にトリフルオロメチル標識体の効果は非常に強力で、分子量が 4 万を超えるようなタンパク質でも NMR で高感度に測定することができる。また本標識法はタンパク質単体の動的構造変化の解析のみならず、高分子量タンパク質と基質との相互作用を高感度に測定できる方法として利用出来ることも明らかにした。このことは、細胞内環境下のような低濃度かつ高密度な環境下のタンパク質でも高感度に構造変化や相互作用の情報を得ることが出来ることを示しており、今後のタンパク質研究において非常に重要な手法として広く活用が期待される。

#### (参考文献)

Inomata, K. et al. *Nature*, 458, 106-109, 2009  
Sakakibara, D. et al. *Nature*, 458, 102-105, 2009  
Li, C. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 321-327, 2010  
Shin, et al. *J. Biol. Chem.*, 286, 22131-22138, 2011

#### 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)

Yamaguchi-Kabata, Y.; Yasuda, J.; Tanabe, O.; Suzuki, Y.; Kawame, H.; Fuse, N.; Nagasaki, M.; Kawai, Y.; Kojima, K.; Katsuoka, F.; Saito, S.; Danjoh, I.; Motoike, I. N.; Yamashita, R.; Koshiba, S.; Saigusa, D.; Tamiya, G.; Kure, S.; Yaegashi, N.; Kawaguchi,

Y.; Nagami, F.; Kuriyama, S.; Sugawara, J.; Minegishi, N.; Hozawa, A.; Ogishima, S.; Kiyomoto, H.; Takai-Igarashi, T.; To, M. S. G.; Kinoshita, K.; Yamamoto, M., Evaluation of reported pathogenic variants and their frequencies in a Japanese population based on a whole-genome reference panel of 2049 individuals. *J Hum Genet*, 査読有, 2018, 63 (2), 213-230.  
DOI: 10.1038/s10038-017-0347-1

Tadaka, S.; Saigusa, D.; Motoike, I. N.; Inoue, J.; Aoki, Y.; Shirota, M.; Koshiba, S.; Yamamoto, M.; Kinoshita, K., jMorp: Japanese Multi Omics Reference Panel. *Nucleic Acids Res* 2018, 査読有, 46 (D1), D551-D557.  
DOI: 10.1093/nar/gkx978

Saigusa, D.; Okamura, Y.; Motoike, I. N.; Katoh, Y.; Kurosawa, Y.; Saijyo, R.; Koshiba, S.; Yasuda, J.; Motohashi, H.; Sugawara, J.; Tanabe, O.; Kinoshita, K.; Yamamoto, M., Establishment of Protocols for Global Metabolomics by LC-MS for Biomarker Discovery. *Plos One*, 査読有, 2016, 11 (8).  
DOI: 10.1371/journal.pone.0160555

Kuriyama, S.; Yaegashi, N.; Nagami, F.; Arai, T.; Kawaguchi, Y.; Osumi, N.; Sakaida, M.; Suzuki, Y.; Nakayama, K.; Hashizume, H.; Tamiya, G.; Kawame, H.; Suzuki, K.; Hozawa, A.; Nakaya, N.; Kikuya, M.; Metoki, H.; Tsuji, I.; Fuse, N.; Kiyomoto, H.; Sugawara, J.; Tsuboi, A.; Egawa, S.; Ito, K.; Chida, K.; Ishii, T.; Tomita, H.; Taki, Y.; Minegishi, N.; Ishii, N.; Yasuda, J.; Igarashi, K.; Shimizu, R.; Nagasaki, M.; Koshiba, S.; Kinoshita, K.; Ogishima, S.; Takai-Igarashi, T.; Tominaga, T.; Tanabe, O.; Ohuchi, N.; Shimosegawa, T.; Kure, S.; Tanaka, H.; Ito, S.; Hitomi, J.; Tanno, K.; Nakamura, M.; Ogasawara, K.; Kobayashi, S.; Sakata, K.; Satoh, M.; Shimizu, A.; Sasaki, M.; Endo, R.; Sobue, K.; Yamamoto, M.; Study, T. M. M. P., The Tohoku Medical Megabank Project: Design and Mission. *J Epidemiol*, 査読有, 2016, 26 (9), 493-511.  
DOI: 10.2188/jea.JE20150268

Koshiba, S.; Motoike, I.; Kojima, K.; Hasegawa, T.; Shirota, M.; Saito, T.;

Saigusa, D.; Danjoh, I.; Katsuoka, F.; Ogishima, S.; Kawai, Y.; Yamaguchi-Kabata, Y.; Sakurai, M.; Hirano, S.; Nakata, J.; Motohashi, H.; Hozawa, A.; Kuriyama, S.; Minegishi, N.; Nagasaki, M.; Takai-Igarashi, T.; Fuse, N.; Kiyomoto, H.; Sugawara, J.; Suzuki, Y.; Kure, S.; Yaegashi, N.; Tanabe, O.; Kinoshita, K.; Yasuda, J.; Yamamoto, M., The structural origin of metabolic quantitative diversity. *Sci Rep*, 査読有, 2016, 6, 31463. DOI: 10.1038/srep31463

Koshiba, S., [Japanese Multi Omics Reference Panel]. *Seikagaku*, 査読無, 2016, 88 (1), 25-30. DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880025

Tochio, N.; Umehara, T.; Nakabayashi, K.; Yoneyama, M.; Tsuda, K.; Shirouzu, M.; Koshiba, S.; Watanabe, S.; Kigawa, T.; Sasazuki, T.; Shirasawa, S.; Yokoyama, S., Solution structures of the DNA-binding domains of immune-related zinc-finger protein ZFAT. *J Struct Funct Genomics*, 査読有, 2015, 16 (2), 55-65. DOI: 10.1007/s10969-015-9196-3

Koizumi, T.; Terada, T.; Nakajima, K.; Kojima, M.; Koshiba, S.; Matsumura, Y.; Kaneda, K.; Asakura, T.; Shimizu-Ibuka, A.; Abe, K.; Misaka, T., Identification of key neoculin residues responsible for the binding and activation of the sweet taste receptor. *Sci Rep*, 査読有, 2015, 5, 12947. DOI: 10.1038/srep12947

Kasai, T.; Koshiba, S.; Yokoyama, J.; Kigawa, T., Stable isotope labeling strategy based on coding theory. *J Biomol NMR*, 査読有, 2015, 63 (2), 213-21. DOI: 10.1007/s10858-015-9978-8

[学会発表](計9件)

小柴生造, 「高精度日本人多層オミックス参照パネルの提供」, 第90回日本生化学会大会, 2017/12/8、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

小柴生造, 「コホート研究におけるオミックス解析」, 日本人類遺伝学会 第62回大会, 2017/11/17、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

小柴生造, 「東北メディカル・メガバンク機構のオミックス解析」, 第11回メタボロームシンポジウム, 2017/11/14、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

Koshiba S., "Metabolomics Approach in Tohoku Medical Megabank Project Prospective Cohort Studies.", *Metabolomics* 2017, 2017/6/28、Brisbane(Australia)

小柴生造, 「19F 標識技術を利用した Keap1-Nrf2 タンパク質の構造機能解析」, 第39回日本分子生物学会大会, 2016/12/1、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Koshiba S., "Protein 19F Labeling Strategy for In-Cell NMR and Functional Analyses.", XXVIIth ICMRBS, 2016/8/25、国立京都国際会館(京都府京都市)

Koshiba S., "Japanese Multi Omics Reference Panel (jMorp)", NHRI-ToMMo Conference, 2016/7/15、東北大学(宮城県仙台市)

小柴生造, 「日本人多層オミックス参照パネルの拡張」, 第89回日本生化学会大会, 2016/9/25、仙台国際センター(宮城県仙台市)

小柴生造, 「日本人多層オミックス参照パネルの公開」, 第88回日本生化学会大会(BMB2015), 2015/12/4、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

[図書](計1件)

小柴生造, 山本雅之, メディカルドゥ, 遺伝子医学 MOOK32 「難病研究 up-to-date」, 2017, 57-63

[その他]

ホームページ

「日本人多層オミックス参照パネル(jMorp)」

<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/2017/compounds>

プレスリリース

「日本人多層オミックス参照パネル、更に高精度に」東北大学 東北メディカル・メガバンク機構(2017年10月03日)

「日本人多層オミックス参照パネル(jMorp)を拡張 -メタボロームの解析人数が1,008人に。項目間関連情報・ペプチド情報を追加-」東北大学 東北メ

ディカル・メガバンク機構 (2016 年 8 月 29 日)

「ゲノムの違いが代謝物に与える影響の一端を解明～500 人規模のメタボローム解析・ゲノム解析が明らかにする代謝の個人差と病気への感受性」東北大学 東北メディカル・メガバンク機構 (2016 年 8 月 18 日)

「日本人多層オミックス参照パネル公開～500 人の日本人集団の血漿のメタボローム&プロテオーム解析が完了」東北大学 東北メディカル・メガバンク機構 (2015 年 7 月 2 日)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小柴 生造 (KOSHIBA, Seizo)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：70332301