

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造  
生命科学と先端的基盤技術」  
研究課題「NMR と計算科学の融合による *in situ*  
構造生物学の確立と真核細胞内蛋白質の動態研  
究への応用」

## 研究終了報告書

研究期間 平成25年10月～平成31年3月

研究代表者:伊藤 隆  
(首都大学東京大学院理学研究科、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1)実施概要

本研究では、真核細胞内蛋白質の立体構造、ダイナミクス、相互作用等を高分解能で解析することができる「NMR および計算科学を融合した研究手法」の開発を推進してきた。これによって、蛋白質が実際に機能している場での真の姿に迫る「*in situ* 構造生物学」の創設を目指した。具体的には、①in-cell NMRを用いた真核細胞内蛋白質の立体構造解析法の確立とその応用、②計算科学的手法を用いた細胞内蛋白質の動態解析、および、③細胞内蛋白質の動態の普遍的な理解とその応用研究、を鋭意展開してきた。

主要な成果は以下の通りである。まず、伊藤グループ、木川グループの連携で確立した、迅速な多次元 in-cell NMR 測定法、最新の情報科学的手法を用いた再現性の高いデータ処理法、遺伝的アルゴリズムを用いた自動解析法、およびベイズ推定を用いた効率的な立体構造計算法を、生きた昆虫培養細胞 Sf9 内の蛋白質に適用し、3種の蛋白質について、真核細胞で初となる高分解能の立体構造決定に成功した。また、希薄溶液中と明らかに異なるコンフォメーションの同定にも成功した。この Sf9 細胞中の立体構造解析は比較的短距離の距離拘束を与える NOE 情報を用いて行われたが、伊藤グループはより長距離の立体構造情報を与える常磁性 NMR 効果にも注目し、細胞内環境でも使用可能な常磁性ランタノイド結合タグの開発とヒト培養細胞内での常磁性効果の観測に成功した。木川グループはさらに、無細胞蛋白質合成技術と選択的安定同位体標識技術を駆使した「符号化標識法」を、実際の in-cell NMR データに適用し、シグナル密集領域においても比較的短時間で解析可能であることを実証した。また、伊藤グループ・木川グループは、細胞試料を生理的条件下に保つ Bioreactor 装置の改良も行い、この装置を用いて in-cell NMR 解析を行った結果、細胞の健康状態が内在蛋白質の立体構造の維持に大きな影響を与えていることを見出した。

また、in-cell NMR 解析技術の応用例として、木川グループは  $^{19}\text{F}$ -標識 Ras を HeLa 細胞に導入し解析を行った結果、蛋白質が細胞膜に局在した状態での in-cell NMR 信号の観測に成功し、かつ細胞内における蛋白質ライフサイクルの一端を観測することにも成功した。

杉田グループは、新しい拡張アンサンブル法を開発し、NMR で得られたデータを生かしつつ、細胞環境をあらわに考慮した系の計算機シミュレーションを可能にした。さらに、現実に近い系として、マイコプラズマ細胞内に存在する蛋白質・核酸の種類とその濃度、低分子化合物やイオンの種類とその濃度を再現した巨大分子系の全原子モデルを構築し、画期的な全原子分子動力学シミュレーションを行った。その結果、細胞内環境下の蛋白質の様々な動態を解析することに成功した。さらに、杉田グループと木川グループの連携により、分子クラウディング環境が蛋白質のダイナミクスへ与える影響を解明するための(クラウディング環境に最適化した分子力場関数を用いた)分子動力学シミュレーションを行った。その結果、分子クラウディング環境下では、均一な溶液というよりは、様々なサイズの過渡的な蛋白質クラスターを形成しているという新しい分子動態の描像が提案された。一方、伊藤グループは細胞内  $^{15}\text{N}$ -DEST 実験を行い、高分子構造体との過渡的な相互作用の解析を行った結果、大腸菌内では、全体の数%が高分子構造体と結合しており、その結合速度 ( $k_{\text{on}}$ ) は一秒間に約 50 回程度であることを示した。このように、NMR 解析とシミュレーションの連携により、蛋白質の細胞内動態の詳細が明らかになりつつある。

以上のように、蛋白質が実際に機能している場での真の姿に迫る「*in situ* 構造生物学」は現実のものになりつつある。波及的効果として、本研究で伊藤グループ、木川グループが開発した手法は、ヒト培養細胞を用いた蛋白質間相互作用の解析、疾病原因蛋白質の細胞内動態についての構造的基盤の解析、従来に比べて付加価値のついた薬剤スクリーニングなどを可能にする基盤的技術となり得る。また、杉田グループの「細胞内環境を考慮した分子動力学」は、細胞内クラウディング環境下の蛋白質動態の理解に役立つのみならず、分子クラウディング環境を考慮した創薬応用計算を可能にし、試験管内と細胞内での蛋白質の動態の違いに基づいた、薬剤との相互作用の変化を予測できる可能性を示している。

## (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

### 1. 生きた真核細胞内の蛋白質の高分解能立体構造決定

概要:本研究の大きな目的の一つは、細胞試料の寿命と低い測定感度という実験上の問題を解決して、真核細胞内蛋白質の立体構造決定手法を世界に先駆けて確立することにある。NMR 試料管内の細胞試料の延命化、迅速な in-cell NMR 測定とデータ処理技術の確立および、ベイズ推定を利用した新しい立体構造解析手法の開発によって、NOE 由来の距離情報を用いた、生きた sf9 細胞内の protein G B1 ドメイン、ユビキチン、TTHA1718 の立体構造解析を行うことができた。

### 2. 細胞内環境を考慮した大規模分子動力学シミュレーション

概要:「京」コンピュータを用いて、「細胞内環境を考慮した大規模分子動力学シミュレーション」に初めて成功した。細胞質内分子混雑環境を考慮するために、巨大生体超分子を多数含む全原子モデルを構築し、蛋白質の動態を解析した。これまでの創薬応用計算ではこのような効果を全く考慮しておらず、低分子創薬の結果が実際の薬剤開発に接続できていない。「細胞内環境を考慮した分子動力学」はこの問題を解決し、試験管内と細胞内での蛋白質の動態の違い、薬剤との相互作用の変化を予測する可能性を秘めている。

### 3. 生きた真核細胞の膜に結合したシグナル伝達分子の観測

概要:細胞内のバックグラウンドが無い  $^{19}\text{F}$  標識を施した Ras 蛋白質を細胞外から導入し、内在性の酵素群によって段階的に翻訳後修飾を受けた後、細胞内での膜輸送経路に組み込まれ適切な場所に局在させることに成功した。 $^{19}\text{F}$  NMR 観測により、分子全体の配向と分子内部のダイナミクスが結合ヌクレオチドに応じて同期して変化する様子を捉えることにより、細胞内における蛋白質ライフサイクルの一端を観測することに成功した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

### 1. ヒト培養細胞を用いた蛋白質間相互作用解析、薬剤スクリーニングへの寄与

概要:本研究における、迅速な NMR 測定法、データ処理法、解析法の確立によって、ヒト培養細胞中の蛋白質の in-cell NMR 測定は、従来よりも著しく簡便なものとなった。従って、ヒト培養細胞を用いた、蛋白質間相互作用の解析、薬剤スクリーニングなどを行う実験基盤が整った。標的蛋白質の細胞内分子クラウディング下の動態を反映させることによって、従来の希薄溶液中での実験よりも付加価値の高いスクリーニング結果を得ることができる。

### 2. 細胞内環境のシミュレーションのための計算手法の開発

概要:細胞内環境で蛋白質ダイナミクスの効率的な探索を行うことのできる計算手法の開発を行った。メタダイナミクス法はサンプリング効率を高める。バイアス交換メタダイナミクス法については、レプリカ状態交換メタダイナミクス法と名付けた、交換率や自由エネルギーの収束性が従来法より優れた方法を確立した。さらに、計算コストを下げるため、溶質のみの温度を変化させる gREST という手法を開発した。これらの利用により細胞内環境のシミュレーションにおける大きな寄与が期待される。また、NMR による蛋白質の回転緩和解析と比較することで、シミュレーションの基盤となる分子力場の改良も行った。

### 3. 化学シフト情報を必要としない統合的な NMR データ解析法

概要:我々は、符号化標識法(SiCode)に基づく試料により分子特性を得る測定をし、テンソル分解によって分けた個々のシグナルから帰属のためのアミノ酸情報と特性情報の両方を取り出す解析法を開発した (SiPex)。従来は必須であった化学シフト情報を用いず、また時間軸データの直接解析を可能にするため、従来の NMR 解析の概念を変える可能性を秘めており、今後の科学技術イノベーションに大きく寄与する成果となりうる。

<代表的な論文>

1. Takashi Tanaka, Teppei Ikeya, Hajime Kamoshida, Yuusuke Suemoto, Masaki Mishima, Masahiro Shirakawa, Peter Güntert and Yutaka Ito, “High-Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells.” *Angewandte Chemie International Edition* **58**, 7284-7288 (2019). doi: 10.1002/anie.201900840.
2. Kohsuke Inomata, Hajime Kamoshida, Masaomi Ikari, Yutaka Ito and Takanori Kigawa, “Impact of cellular health condition on protein folding state in mammalian cells”, *Chemical Communications* **53**, 11245-11248 (2017). doi: 10.1039/c7cc06004a.
3. Isseki Yu, Takaharu Mori, Tadashi Ando, Ryuhei Harada, Jaewoon Jung, Yuji Sugita, and Michael Feig, “Biomolecular interactions modulate macromolecular structure and dynamics in atomistic model of a bacterial cytoplasm”, *eLife* **5**. e19274 (2016). doi: 10.7554/eLife.19274.

## § 2 研究実施体制

### (1)研究チームの体制について

#### ① 「伊藤」グループ

研究代表者:伊藤 隆 (首都大学東京大学院理学研究科, 教授)

研究項目

- ・NMR 測定法とデータ処理法の開発・最適化
- ・In-cell NMR のための常磁性 NMR 測定法の確立
- ・In-cell NMR に最適化した部位特異的安定同位体標識蛋白質の調製
- ・細胞内蛋白質の効率的な構造情報取得法と構造決定法の開発

#### ② 「木川」グループ

主たる共同研究者:木川隆則 (国立研究開発法人理化学研究所生命機能科学研究センター, チームリーダー)

研究項目

- ・選択的アミノ酸標識と3重共鳴 2D NMR を用いた, 蛋白質主鎖・側鎖シグナル帰属法の開発
- ・迅速な多次元 NMR 測定, および精度の高いデータ処理技術の開発
- ・In-cell NMR に最適化した部位特異的安定同位体標識蛋白質の調製

#### ③ 「杉田」グループ

主たる共同研究者:杉田有治(国立研究開発法人理化学研究所杉田理論分子科学研究室, 主任研究員)

研究項目

- ・分子動力学シミュレーションを用いた細胞内蛋白質の動態の解析
- ・新しい拡張アンサンブル法の開発による NMR 情報を繰り込んだ構造探索
- ・分子クラウディング系への拡張アンサンブル法の導入

### (2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

グループごとに, ネットワーク形成の相手(所属)および連携内容を示した。

#### 伊藤グループ

- 袖岡幹子博士, 平井 剛博士 (理化学研究所), in-cell NMR 測定のためのランタノイド結合タグの開発
- 甲斐荘正恒特任教授 (首都大学東京), SAIL 法の昆虫培養細胞 Sf9 の系への応用
- 嶋田一夫教授, 西田 紀貴准教授 (東京大学): bioreactor システム
- 白川昌宏教授 (京都大学): in-cell NMR を用いたドメイン間相対配置の解析
- 城 宜嗣教授, 澤井仁美博士 (兵庫県立大学): 酸素センサー蛋白質の NMR 解析
- 片岡正和准教授 (信州大学): TraB 蛋白質の NMR 解析
- 藤原俊伸教授, 杉浦麗子教授 (近畿大学): RNA 結合蛋白質の NMR 解析
- 広瀬 侑博士 (豊橋科学技術大学): 光受容蛋白質の構造解析
- 池田思朗教授 (統計数理研究所): スパースサンプリングデータの信号再構成
- 奥村久士准教授 (分子科学研究所): 効率的な構造サンプリング法の開発
- 北原 亮教授 (立命館大学): 高圧力下の蛋白質立体構造決定
- 鳥澤拓也博士 (中外製薬): NMR スペクトル自動解析の創薬研究への応用
- 寺内 勉博士 (大陽日酸): 常磁性金属結合タグの合成と評価
- Ernest Laue 教授, Wayne Boucher 博士 (英国 Cambridge 大学): QME によるデータ解析
- Brian Smith 博士 (英国 Glasgow 大学): QME によるデータ解析
- Daniel Nietlispach 博士 (英国 Cambridge 大学): 迅速な多次元 NMR 測定法の開発
- Michael Overduin 教授 (英国 Birmingham 大学→カナダ Alberta 大学): in-cell NMR を用いた CaMK 阻害剤のスクリーニング
- Gary Pielak 教授 (米国 North Carolina 大学 Chapel Hill 校): 細胞内蛋白質のフォーワードダイニング解析
- Geerten Vuister 教授 (英国 Leicester 大学): 蛋白質の NMR 解析のための統合ソフトウェアの開発 (<https://www.ccpn.ac.uk/>)
- Cyril Dominguez 博士 (英国 Leicester 大学): in-cell NMR を用いた核内蛋白質の解析
- 田仲加代子博士 (英国 Leicester 大学): in-cell NMR を用いた Ras 蛋白質の解析
- Jonathan Heddle 教授 (ポーランド Jagiellonian 大学): 細胞内動態を考慮したバイオナノ物質の開発
- Roland Riek 教授, Juan Atilio Gerez 博士 (スイス ETH Zürich): In-cell NMR のためのヒト培養細胞への標的蛋白質導入法の最適化
- Michael Sattler 教授 (ドイツミュンヘン工科大学): マルチドメインタンパク質の構造解析

#### 木川グループ

- 岡田真人教授 (東京大学): 符号化標識法のためのスペクトル分解法の開発
- 樺島祥介教授 (東京工業大学): CS を用いた NMR スペクトル再構成法の開発
- 田中利幸教授 (京都大学): 化学シフトによらない NMR データ解析法の開発
- 池田思朗教授 (統計数理研究所): 化学シフトによらない NMR データ解析法の開発
- 大陽日酸 (株): 符号化標識法に適した高精度安定同位体標識技術の開発および符号化標識法の製品化

#### 杉田グループ

- Michael Feig 教授 (米国 Michigan 州立大学): 細胞環境を考慮した分子動力学シミュレーション

- Joanna Trylska 教授 (ポーランド Warsaw 大学) : RNA の分子認識機構の解明を目指した分子動力学計算
- Xuhui Huang 教授 (Hong Kong University of Science Technology) : マルコフ状態モデル計算
- Karrisa Sanbonmatsu 教授 (米国 Los Alamos National Laboratory) : リボゾームの動的構造解明
- Wonpil Im 教授 (米国 Lehigh 大学) : 細胞環境をモデリングするツールの開発