

細胞内タンパク質の NMR 解析

Tochio Hidehito
朽尾 豪人

Keyword

インセル NMR (in-cell NMR), 神経変性疾患 (neurodegenerative disease), スーパーオキシドジスムターゼ 1 (superoxide dismutase 1; SOD1), α -シヌクレイン (α -synuclein)

細胞内には、タンパク質、核酸、糖質などの多種多様な生体分子が詰め込まれている。さらに真核細胞では核や小胞体、ミトコンドリアといった内部構造も存在する。従来のタンパク質科学や構造生物学は、ほとんどの場合、試験管内に抽出・純化したタンパク質を対象としており、細胞内環境がタンパク質の構造や生化学的性質に及ぼす影響はあまり考慮されてこなかった。しかし近年、蛍光イメージングに代表されるさまざまな計測技術の発達によって、生細胞中でのタンパク質が追跡可能になり、「細胞内での」タンパク質科学が強く意識されてきている。NMR 分野でも、細胞そのものを測定対象とし、その内部で機能しているタンパク質を調べるといった研究が広がりつつある。

in-cell NMR とは？

NMR で用いられる数百メガヘルツの電磁波は生体や細胞を透過するため、適切な安定同位体標識を施しておけば、細胞や生体内からであっても特定のタンパク質の NMR スペクトルを取得できる。この“in-cell NMR”というアプローチは、2000 年前後から大腸菌で始まり¹⁾、2009 年には哺乳動物由来の培養細胞系でも実現された²⁾。

タンパク質の NMR では、炭素や窒素を ^{13}C や ^{15}N で置換し、それら核種を援用した異核多次元の NMR 測定を行う³⁾。普通の細胞は ^{12}C (99%) や ^{14}N (99.6%) で構成されているため、見たいタンパク質だけを ^{13}C や ^{15}N で置換しておけば、膨大な種類の分子が混在する細胞内からであっても、そのタンパク質の NMR 信号だけを選別して検出することができる。この状況をつくりだすために、二つの細胞調製方法(①, ②)がある。① ^{13}C や ^{15}N を含む培地で特定のタンパク質を大量発現させる^{1,4)}、②あらかじめ同位体標識したタンパク質を外部から導入する、である。このようにして調製した細胞の懸濁液を NMR 測定に供する。後者では、膜透過性ペプチドを用いる²⁾、もしくは、細胞膜に薬剤や電気刺激で孔を開けて入れる^{5,6)} といった方法がとられる。

in-cell NMR を用いた研究例として、細胞内タンパク質と細胞質分子とのあいだの弱い相互作用が研究されている(図 1)⁷⁾。このような相互作用は、細胞を破砕すると失われてしまうため、試験管内で調べることができない。以下では、細胞内で凝集体

を形成し、神経変性疾患を引き起こすとされるタンパク質について、最近の in-cell NMR 研究を紹介する。

SOD1 の in-cell NMR

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) は、家族性の筋萎縮性側索硬化症 (fALS) にかかわるとされるタンパク質である。fALS の発症機構は未解明の部分も多いが、SOD1 の凝集体が細胞内に形成・蓄積されることが、細胞の機能不全にかかわると考えられている。このため、SOD1 のフォールディング安定性の研究がさかんに行われている。

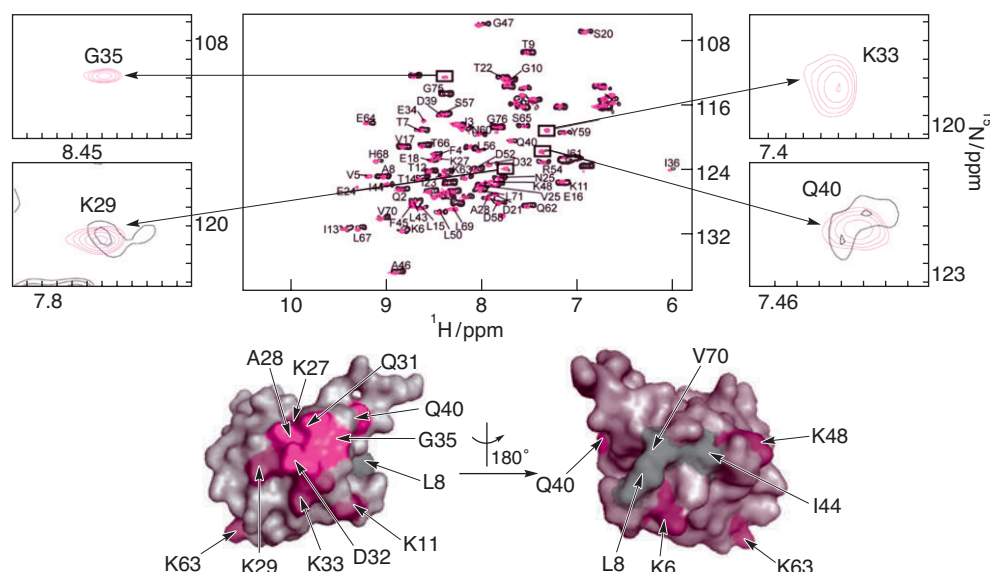
SOD1 は翻訳後に亜鉛イオンと銅イオンの配位、自己二量化、分子内ジスルフィド (S-S) 結合の形成を経て機能をもった成熟型の構造となる。Banci らはヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK293T) に発現させた ^{15}N -SOD1 の成熟過程を in-cell NMR によって観察した(方法①)⁸⁾。その結果、未成熟の SOD1 は大部分が構造をもたないランダムコイルであること、十分量の亜鉛イオンが培地中にあれば、これと自発的に結合することが示された。一方、銅イオンの配位と S-S 結合の形成を経て成熟体になるには、SOD1 に銅イオンを供給する銅シャペロンタンパク質 (CCS) が必要であることも明らかにした。また、fALS 患者で見つかっているさまざまな SOD1 変異体も同様に in-cell NMR によって解析した⁴⁾。そして、いくつかの変異体は細胞内で亜鉛イオンや CCS と結合できないために、細胞内で成熟体にフォールドできないことを示した。彼らは、この未成熟 SOD1 の蓄積が、細胞毒性をもった凝集体の形成を引き起こすと推測している。

 α -シヌクレインの in-cell NMR

パーキンソン病 (PD) もまた、神経細胞内にタンパク質凝集体が蓄積するという病態を示す。この凝集体は多量の α -シヌクレイン (α -Syn) タンパク質を含むことから、その構造が精力的に研究されてきた。これまでに、 α -Syn はアミノ酸配列上、中央部分にある非 β アミロイド成分 (NAC) 領域を介してアミロイド様の凝集体を形成すること、試験管内では定まった構造をとらない天然変性タンパク質であることが示されている。一方で、生体内の α -Syn はヘリックスに富んだ四量体を形成す

図1 HeLa 細胞中の ^{15}N -ユビキチンの in-cell 2D ^1H - ^{15}N 相関 NMR スペクトル

上: 赤色が細胞内、灰色が細胞破碎液中でのスペクトル。K29, K33, G35, Q40 の交差ピークは細胞質分子との相互作用のため、広幅化し強度低下が見られる。下: ユビキチンの分子表面図。■色が相互作用が見られた残基群。ユビキチンは多くのタンパク質と、■色領域を含む疎水パッチで相互作用する。しかし、その領域の NMR 信号は変化がなく、細胞質成分との相互作用は見られていない。Adapted with permission from S. Majumder et al., *Biochemistry*, **54**, 2727 (2015). Copyright 2015 American Chemical Society.



るという説もある⁹⁾。Selenko のグループは、電気穿孔法 (方法②の一つ) によって ^{15}N - α -Syn をさまざまな細胞 (ヒト卵巣がん由来 A2780, ラット黒質由来 RCSN-3, ヒト神経芽細胞腫由来 SK-N-SH など) に導入し、in-cell NMR によって解析した⁶⁾。その結果、試したすべての細胞で、 α -Syn は定まった立体構造をもたないランダムコイルであることがわかった。興味深いことに、 α -Syn のアミノ末端やカルボキシ末端領域は細胞質成分と非特異的に相互作用しているものの、NAC 領域はほとんど細胞質と相互作用がなく、両末端によって外部から遮蔽されていることが示唆された。通常の状態では、NAC が遮蔽されることで、 α -Syn の凝集が防がれているのかもしれない。

PD 発症要因の一つに酸化ストレスがある。メチオニン (Met) の側鎖は容易に酸化されてメチオニンスルホキシド (MetSO) となるが、 α -Syn の Met の酸化は凝集を促進し、細胞毒性を引き起こすとされる。細胞内には MetSO を還元するメチオニンスルホキシドレダクターゼ (MSR) が存在し、これが MetSO を還元し Met を再生することで、凝集を防いでいるとされる。Selenko らは、 α -Syn の Met の酸化還元状態を in-cell NMR でモニターし、 α -Syn の四つの Met のうち、MSR は Met1 と Met5 の酸化体のみを還元し、Met116 と Met127 の酸化体には働かないこと、および還元は Met5 $\rightarrow$ Met1 の順序で起こることを見いだしている¹⁰⁾。ほかに、細胞内でアミノ末端がアセチル化を受けていることが発見されるなど⁶⁾、一連の in-cell NMR 解析から α -Syn の細胞内での状態が明らかになってきた。

なお、電気穿孔法のように外部から標識タンパク質を導入する実験は、手法としては簡便でわかりやすいが、翻訳後修飾や細胞内局在の観点からいうと完全に天然状態のタンパク質を見ているとはいえない。たとえば、細胞内局在や翻訳後修飾は翻訳過程と共役して制御される場合もあるが、タンパク質を直接細胞質に入れる場合、それらが完全に再現できない可能性がある。

今回の紹介例は細胞の懸濁液を NMR 管に入れて測定したもので、溶液 NMR の応用であるが、ほかに固体 NMR の応用例もある^{11,12)}。

現状の in-cell NMR では、1 回の測定に $10^6 \sim 10^7$ 個もの細胞を必要とする。得られる結果は膨大な数の細胞中のタンパク質の平均像である。昨今の蛍光イメージングに比べると感度不足は否めない。単一細胞中の、さらには単一分子のタンパク質を調べるためには、大幅な感度向上が必要である。

ごく最近、ダイヤモンドの NV 中心 (nitrogen-vacancy center; NVC) を磁気センサーとすることで、タンパク質 1 分子の NMR 信号を光学的に検出したという報告がなされた¹³⁾。分子構造の情報は得られていないが、飛躍的な検出感度の向上である。この技術が発展を続ければ、単一細胞中のタンパク質の NMR 解析が実現される可能性があり、大きな期待が寄せられている。

【京都大学大学院理学研究科】

1) Z. Serber et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2446 (2001). 2) K. Inomata et al., *Nature*, **458**, 106 (2009). 3) G. Roberts, L.-Y. Lian, "Protein NMR Spectroscopy: Practical Techniques and Applications," Wiley, Hoboken (2011). 4) E. Luchinat et al., *Nature Commun.*, **5**, 5502 (2014). 5) S. Ogino et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10834 (2009). 6) F.-X. Theillet et al., *Nature*, **530**, 45 (2016). 7) S. Majumder et al., *Biochemistry*, **54**, 2727 (2015). 8) L. Banci et al., *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 297 (2013). 9) T. Bartels et al., *Nature*, **477**, 107 (2011). 10) A. Binolfi et al., *Nature Commun.*, **7**, 10251 (2016). 11) K. K. Frederick et al., *Cell*, **163**, 620 (2015). 12) M. Kaplan et al., *Nature Methods*, **12**, 649 (2015). 13) I. Lovchinsky et al., *Science*, **351**, 836 (2016).