

磁気共鳴を使った真核細胞内タンパク質の構造・機能解析

朽尾 豪人,* 白川 昌宏

Structural Analysis of Proteins in Living Eukaryotic Cells Using
Magnetic Resonance Spectroscopy

Hidehito Tochio* and Masahiro Shirakawa

Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University;
Kyoto-Daigaku Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan.

(Received September 8, 2011)

Three-dimensional structures of proteins are often critical in understanding proteins functions. However, structures or states of proteins in cells undergo dynamical changes in response to interactions with other proteins and/or biological molecules. In addition, post-translational modification such as phosphorylation, methylation and ubiquitination can drastically change the structure and hence the properties of proteins. Therefore, to precisely correlate structure data of proteins with cell biology data, the structure information should be collected in living cells preferably at atomic level. In addition, as numerous biomolecules are packed into limited space, the concentration of macromolecules is substantially high in cells. Such crowded environment of the cell interior can markedly change proteins behavior, affecting biochemistry and biophysics of the proteins, which is so-called “Macromolecular Crowding Effect”. To figure out protein behavior inside cells, which may be missed in *in vitro* studies, we are developing NMR and ESR methodologies to analyze protein structure and dynamics inside eukaryotic cultured cells. In this paper, in-cell NMR/ESR studies performed on HeLa cells and *Xenopus* oocytes are presented.

Key words—NMR; ESR; ubiquitin; 12-kDa FK506-binding protein (FKBP12)

はじめに

タンパク質の性質や機能を理解するうえで、原子レベルの立体構造情報は極めて有用である。しかし、細胞内のタンパク質は、常に一定の構造をとっているわけではなく、翻訳後修飾を受けたり、様々なリガンドと複合体を形成したりして、その構造をダイナミックに変化させている。したがって、タンパク質の構造を細胞内での機能に結びつけるためには、実際に生きている細胞内でタンパク質の姿を捉えることが望ましい。また、細胞内は、通常の生化学実験が行われる試験管内(多くの場合は希薄溶液)とは大きく異なり、様々な分子が高密度にパッキングされた環境である。このため、細胞内のタンパク質は、いわゆる“Macromolecular Crowding Effect

(MC効果)”を受ける。^{1,2)} MC効果によって、タンパク質のフォールディングが安定化されると言われている。これは、コンパクトにフォールドした状態のほうがアンフォールドしたランダムコイル状態に比べて占有する体積が小さいために、高分子が混み合った細胞内では有利だから、と説明される。もしそうなら、長いリンカーを持つようなタンパク質の構造は大きな影響を受けるだろう。さらに、MC効果は、特異・非特異的にかかわらず、タンパク質間の会合を促進するとされる。タンパク質間相互作用は、あらゆる細胞内事象の素過程であるから、試験管内で精査したタンパク質間相互作用が、実際の細胞内のそれとは大きく異なるとすれば極めて重大な問題である。しかしながら、細胞内にあるタンパク質の立体構造や物性、結合・解離定数を直接調べる有効な方法がないのが現状である。

このような背景から、筆者らは、通常の試験管内での生化学実験に加えて、「生きた細胞内」でもタンパク質の構造や物性を解析し、生化学的知見を得

京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂)

*e-mail: tochio@moleng.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第131年会シンポジウムS07で発表したものを中心に記述したものである。

る必要があると考え、そのための手法開発を進めている。特に、われわれは、NMR や ESR といった磁気共鳴分光法を培養細胞中のタンパク質に「直接」適用し、その構造変化、化学状態変化、リガンド結合、ダイナミクス、物理化学的な性質を原子レベルで解析する研究や、そのための方法論開発に力を入れている。本稿では、われわれの進めてきた一連の in-cell タンパク質解析法を紹介したい。

In-cell NMR について

まず、細胞内タンパク質を NMR を使って解析する in-cell NMR について紹介したい。NMR の優れた点は、生体や細胞に対して極めて「侵襲性」が低い点にある。加えて、周知のように NMR は原子レベルの情報を与える（例えば、本稿執筆時点で、NMR で決定された 9000 個以上の立体構造が Protein Data Bank に登録されている (<http://www.rcsb.org/>)). よって、原理的には、細胞の NMR 測定を行えば、その中のタンパク質の構造を解析することが可能である。もっとも、細胞内には多種多様な生体分子が存在するので、そのまま測定しただけでは役に立つスペクトルは得られない。観察したいタンパク質のみを「選択的に見る」ための工夫が必要となる。そのためには、安定同位体核種 (^{13}C , ^{15}N , ^2H) を利用する。これら核種で細胞内の「見たいタンパク質」のみを標識してやれば、最先端の NMR パルステクニックを駆使して、細胞内の当該タンパク質の NMR スペクトルを得ることができる。ただし、NMR で検出できる量の標識タンパク質が存在している必要はある。

では、“in-cell” 状態でのタンパク質の NMR スペクトルが測定できれば、どのような情報が得られるだろうか？ 究極的には、NMR 構造生物学と同様に、細胞内でのタンパク質の立体構造、すなわち「原子座標」が決定できる。しかしながら、現状では、生理的に意義のある条件下でそこまでの解析を行うのは、ほぼ不可能である（検出感度が足りないため）。それでも、比較的簡便に、細胞内タンパク質の「どの部位の構造が変化したか？」、「どの表面にリガンドが結合したか？」、「どこに翻訳後修飾が起こったか？」といった情報を、少なくともアミノ酸残基レベルで（理想的には原子レベル）モニターできるだろう。これらにより、あるタンパク質が特定の細胞内イベントで果たす役割をより詳細に理解

できる。

最も簡便な in-cell NMR システムは、大腸菌を使った系である。³⁾ タンパク質を大腸菌で大量発現する際に、 ^{15}N や ^{13}C を含む栄養源を用いると、発現されたタンパク質がこれら安定同位体で標識される。発現が良好な場合、標識タンパク質の細胞内濃度を mM オーダーまで上げることができるため、そのまま同位体編集型の ^1H -NMR 測定を実施すれば、標識タンパク質の NMR スペクトルが得られる。これまでに、タンパク質リガンド相互作用、⁴⁾ 立体構造決定、⁵⁾ “Macromolecular Crowding Effects”⁶⁾ の研究などが行われている。しかしながら、大腸菌の系は、タンパク質物性科学の観点からは有用なものの、見たいタンパク質の濃度が生理的条件を大きく超える必要があることと、大腸菌の細胞内は、医学・薬学研究に常用される真核培養細胞とは大きく異なることから、生命科学の基礎・応用研究への展開には限りがあると言わざるを得ない。そこで、筆者らは、真核生物の培養細胞を用いた in-cell NMR を実現すべく研究を進めてきた。

In-*Xenopus* oocyte NMR

真核細胞 in-cell NMR の最初のシステムとして、*Xenopus laevis* oocyte を使ったシステムを考案した。⁷⁾ *Xenopus* oocyte は mRNA や cDNA をマイクロインジェクションすることにより、簡便にタンパク質を発現させることができ、イオンチャンネル等の機能解析において広く用いられてきた。筆者らは、核酸の代わりに、あらかじめ安定同位体標識しておいた「タンパク質」を卵母細胞にマイクロインジェクションし、その細胞を NMR 測定に供することによって、標識タンパク質の in-cell NMR スペクトルを得ることを考えた。

まず、 ^{15}N ユビキチン (Ub) を調製し、これを *Xenopus* oocyte (ステージ V-VI) に注入した。この細胞 200 個程度を生きたままの状態ですりつぶしに導



朽尾 豪人

京都大学大学院工学研究科分子工学専攻准教授。大阪大学理学部化学科卒業。同大学院理学研究科博士課程修了（理学博士）。1998 年香港科技大博士研究員。2001 年横浜市大総合理工学研究科助手。2006 年京都大学大学院工学研究科分子工学専攻助教授。2007 年准教授。生きた細胞の中でタンパク質の構造を解析する方法を模索している。

入し NMR 測定を行った。ここで、注入された細胞内の ^{15}N Ub の終濃度は約 $100\ \mu\text{M}$ であり、十分に NMR で検出可能な量である。ところが、同試料は極めて弱い NMR 信号しか与えなかった [Fig. 1 (a)]. NMR 信号の強度は、濃度のほかに、当該分子の「見かけの分子量の大きさ」や複数の異なる状態間の「交換過程の有無」の影響を受ける。卵母細胞内には Ub と相互作用するタンパク質が多数存在していることから、NMR 信号の消失は、細胞内での ^{15}N Ub と内在性タンパク質との複合体化による分子量増大、そして、複数の状態間の交換過程にあると思われた。実際に、Ub が他のタンパク質と相互作用する際に重要な 3 つの残基、Leu8, Ile44, Val70 を同時にアラニンに置換すると in-cell での NMR 信号は、ほぼ完全に回復した [Fig. 1 (b)]. このことから、先の NMR 信号の消失は、Ub と内在性タンパク質の相互作用に起因していたと言える。

なお、溶液 NMR の信号強度は媒質の粘度にも影響を受け、粘稠な媒質中ほど強度が落ちる。当初、細胞質の粘度が NMR 信号に与える影響を心配していたが、三重アラニン置換体の NMR 共鳴線の線幅等から、卵母細胞の場合は、細胞質の粘度は高いものの、NMR 信号を大きく損なう程ではないということがわかった。

Figure 1 に示したような、二次元 ^1H - ^{15}N 相関スペクトルでは、通常、タンパク質主鎖のペプチド結合のアミド基、及びアスパラギン、グルタミンの側鎖アミド基に由来する交差ピークが観測される。したがって in-cell と *in vitro* の参照スペクトルを比較することによって、細胞内における Ub 誘導体の状態を、個々のアミノ酸残基レベルで推定することが

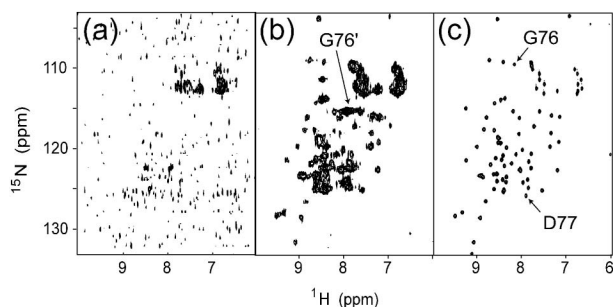


Fig. 1. In-cell NMR Spectra of Ubiquitin and Its Derivative
a) Wild-type ubiquitin in *X. oocytes*, b) L8A, I44A, V70A-D77 Ub in *X. oocytes*, c) L8A, I44A, V70A-D77 Ub measured *in vitro*. The figure was adapted from Ref. 7.

できる。Figure 1 (b) と 1 (c) を比べると Gly76 の交差ピークが *in vitro* に比べてシフトし、Asp77 は in-cell では消失している。その理由として考えられたのは、卵母細胞中の脱ユビキチン化酵素 (DUB: Deubiquitinating enzyme) の働きである。DUB は、Ub 鎖や Ub 前駆体を基質とし、Ub の Gly76 のカルボキシル末端側で (イソ) ペプチド結合を切断する活性を持つ。細胞内に導入した ^{15}N Ub 誘導体が、この切断反応を受ければ、Asp77 の交差ピークは消失し、Gly76 のそれはシフトするはずである。これを調べるために、卵母細胞に DUB の阻害剤であるユビキチンアルデヒドを前もって注入しておき、その後 Ub 誘導体を注入して in-cell スペクトルを測定した。その結果、Asp77 交差ピークの消失は抑制され、予想通り DUB による加水分解が起こっていることが確認された。ただし、この阻害は完全ではないようで、Fig. 2 に示すように、Asp77 のアミド ^1H - ^{15}N 交差ピークは、時間とともに減衰していった。このように、DUB による加水分解反応がモニターされたことは、in-cell NMR を使って、細胞内で進行している生化学反応を、原子レベル (少なくともアミノ酸残基レベル) でモニターできることを意味する。

In-*Xenopus* oocyte ESR

筆者らは、*Xenopus* oocyte を用いたタンパク質の in-cell ESR 実験も考案した。⁸⁾ ESR はラジカルなどの不対電子を検出する方法なので、一般に、タン

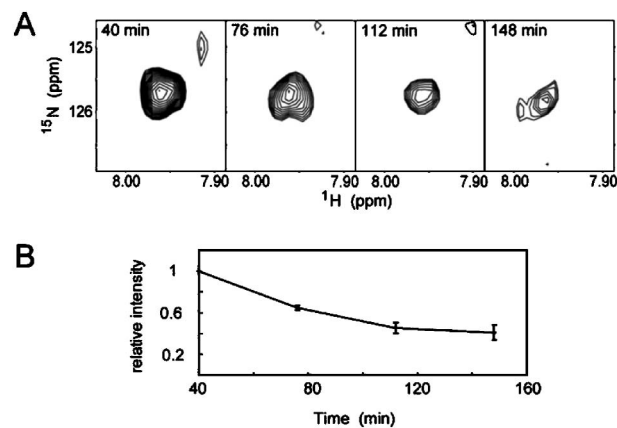


Fig. 2. Endogenous DUB Activity Detected by in-*Xenopus* Oocyte NMR

A. Time dependent decay of the ^1H - ^{15}N HSQC cross-peak of Asp77 of the ubiquitin derivative (L8A, I44A, V70A-D77 ubiquitin) measured in *Xenopus* oocytes. B. Plot of the cross-peak intensities. The figure was adapted from Ref. 7.

パク質が遷移金属イオンを含むか、あるいはタンパク質をラジカルで標識する必要がある。後者の「スピンラベル」を用いる方法として、近年盛んに行われている、SDSL (site directed spin labeled)-ELDOR (electron double resonance)がある。これは、タンパク質中の2カ所をニトロキシドラジカル等でラベルし、DEER (double electron-electron resonance) 法やDQC (double quantum coherence) 法といったパルス ESR 法によって、それら2つのラジカル間の距離を測定し、立体構造の変化や相互作用の情報を得るものである。⁹⁾ 当該法によって測定可能なスピン間距離は1.5–8 nm と広範囲にわたり、その精度は0.01 nm と極めて高い(ただし、スピンラベル剤のリンカーがフレキシブルな場合、nm 程度の不確実性がある)。SDSL-DEER の利点は、スピンラベルさえできてしまえば試料の大きさや状態を問わない点で、溶液 NMR が適用できない巨大タンパク質複合体や結晶化が困難な試料、膜タンパク質についても簡便に適用できることにある。そのため、NMR、X 線結晶回折を補完する手段として独自の地位を築きつつある。

このSDSL-ELDOR 法を *Xenopus* oocytes 内のタンパク質に適用できれば、比較的簡便に細胞内でのコンフォメーション変化を捉えられると期待される。ただし、ELDOR 法は、極低温下(～80 K)で測定する必要がある。そのため、in-cell ではあっても、「生きた細胞」ではなく、「凍結状態」で測定することになる。

筆者らは、モデルタンパク質として、Ub を選び、スピンラベルを導入する部位のアミノ酸を Cys に置換した誘導体を作製して、ニトロキシドラジカルを導入した (Fig. 3)。ここでは、Ser20 と Gly35 の位置、及び、Gly35 と Asp52 にスピンラベルを導入した2種類のSDSL Ub を調製した。次に、先の in-*Xenopus* oocyte NMR と同様の手順で、SDSL Ub を卵母細胞に注入し ESR 測定を行った。

なお、一般に、細胞内は還元的な環境なので、ニトロキシドラジカルは、ヒドロキシルアミンに還元され、不対電子が失われて ESR 信号が検出されなくなる可能性がある。これを検証するためにSDSL Ub 注入後の卵母細胞を ESR にてモニターし、細胞内スピンラベル濃度の経時変化を調べた。その結果、細胞内スピンラベル濃度は時間とともに指数関

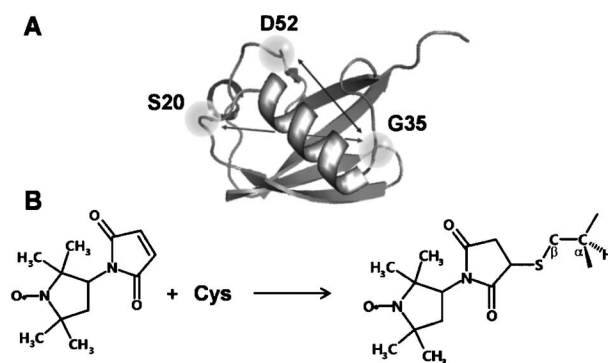


Fig. 3. Site-directed Spin-labeling of Ubiquitin

(A) Ribbon diagram of ubiquitin. Three sites, Ser20, Gly35 and Asp52, were substituted with cysteine and (B) reacted with 3-maleimido-PROXYL. Adapted from Ref. 8.

数的に減少し、その半減期は約 50 分であることがわかった。注入するSDSL タンパク質量が十分であれば、2時間程度なら細胞内でELDOR 測定が可能な程度のスピンラベル濃度を維持できると予測された。

そこで、SDSL Ub を終濃度 150 μM で注入した *Xenopus* oocytes について in-cell ELDOR 実験を行った。試料注入後すぐに凍結した細胞と注入の1時間後に凍結した細胞について、four-pulse constant-time DEER 法を用いて測定したところ Fig. 4(A), (B)に示すようなDEER データが得られた。Figure 4(C), (D)は、Fig. 4(A), (B)から見積もられたスピンラベル間の距離分布であり、各々、Ser20-Gly35 の距離と Gly35-Asp52 の距離の分布に対応する。それぞれの平均距離は、3.14 nm と 2.60 nm であった。これらは、in vitro 参照実験で得られた、3.11 nm と 2.65 nm とよく一致しており、細胞内で構造に変化がないことを示している。これは前述の in-cell NMR 実験の結果とも合致する。また、タンパク質注入後0時間と1時間の距離データにほとんど違いがなかったことから、この時間内では注入したSDSL Ub の変性や分解、構造変化はほとんどないと言える。これも、in-cell NMR の結果と合致する。

このように in-cell ELDOR 法によって細胞内タンパク質の構造情報を簡便かつ、精確に取得することができる。今回の Ub の例では構造変化がなかったが、*Xenopus* oocyte の状態遷移に伴って構造変化するようなタンパク質をターゲットとすれば、例えば、卵母細胞の成熟とともに変化するタンパク質の構造変化をモニターできる。卵母細胞内の特定の

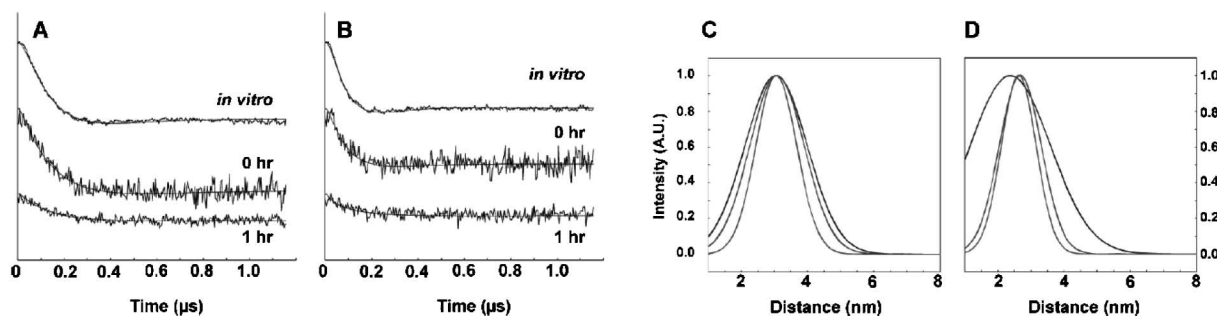


Fig. 4. In-*Xenopus* Oocyte Pulse ESR of Ubiquitin Derivatives

(A and B) Constant-time DEER data of S20C-G35C (A) and G35C-D52C (B) ubiquitin *in vitro* and in oocytes (at 0 and 1 h after injection). The fits to the data are plotted by the solid lines. (C and D) Distance distributions of S20C-G35C (C) and G35C-D52C (D) derived from DEER experiments *in vitro* and in cells either 0 h or 1 h after injection into cells. Adapted from Ref. 8.

シグナル伝達経路を活性化するホルモンやサイトカインはいくつも知られている。現状、スピンラベルの寿命による制限から2時間を超えるようなプロセスを追跡することは困難であるが、比較的短時間のプロセスを狙えば、細胞内シグナル伝達とタンパク質構造変化の相関を調べる研究に展開できると期待される。

In-human cell NMR

HeLa 細胞などの、一般的な培養細胞でもマイクロインジェクションは可能なので、理論的には、*Xenopus* oocyte と同様の手続きで in-cell NMR を行える。しかし、*Xenopus* oocyte (直径~1 mm) に比べて HeLa 等の体細胞は遙かに小さいため (~20 μm)、NMR 装置の検出感度の要請から、1回の測定に大量の細胞 (10^6 – 10^7 個) が必要となる。このような多数の細胞にマイクロインジェクションを行うことはオートインジェクターを用いても非現実的である。そこで筆者らは、低コストで簡便な、細胞膜透過性ペプチド CPP (Cell Penetrating Peptide) を使ったタンパク質導入法による in-cells NMR を考案した。¹⁰⁾ CPP はタンパク質、ペプチド、低分子化合物等に結合させることで、これらの分子を細胞内へ導入できるペプチドで、ドラッグデリバリーを始めとする様々な分野で研究されている。

筆者らは、代表的な CPP である、HIV の TAT 配列を Ub 誘導体、Ub3A のカルボキシル末端に融合したタンパク質の発現系を構築した。Ub3A は前述の in-*Xenopus* oocyte NMR において良好なスペクトルを与えた Ub の三重アラニン置換体である。¹⁵N で均一標識した Ub3A-TAT タンパク質を京大・化研の二木らが開発したプロトコル¹¹⁾に則り、

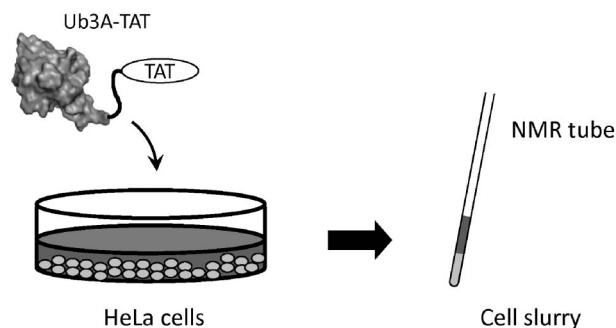


Fig. 5. Schematic Representation of in-HeLa Cell NMR

HeLa 細胞に導入した。そして、およそ 10^7 個の細胞集団について、生存状態を保ったまま ^1H - ^{15}N 相関 NMR スペクトルを測定した (Fig. 5)。なお、NMR 試料管 (直径 4 mm) に高密度に細胞が充填されるため、相応のストレスがかかると推測されるが、約3時間の NMR 測定後にトリパンブルー染色にて確認したところ、90%以上の細胞は生存していた。

HeLa 細胞内での ^{15}N Ub3A の NMR 信号の線幅は *in vitro* と比べても遜色なく、高分解能のスペクトルが得られた [Fig. 6(a)]。NMR 信号の強度から、細胞内の ^{15}N 標識タンパク質の濃度は 20–30 μM と推定された。HeLa 内在性の Ub 濃度は 10–15 μM 程度と報告されているので、¹²⁾ この実験に関し言えば、導入した ^{15}N Ub3A の量は生理的条件を逸脱したものではない。Ub3A の in-cell NMR スペクトルは、一見して *in vitro* の参照スペクトルと大差なく、細胞内で Ub3A の構造に大きな変化がないことが窺える。しかし、よく見ると、Gly76 の交差ピークが移動していた [Fig. 6(a) and (b)]。こ

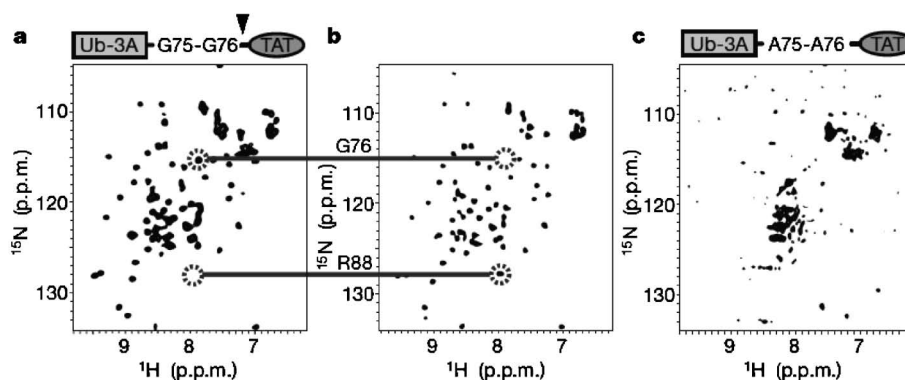


Fig. 6. In-HeLa Cell NMR of Ubiquitin Derivatives

a, Spectrum of Ub3A in HeLa cells. The cross-peak of the C-terminal Gly 76 is indicated. b, *In vitro* reference spectrum of the ^{15}N Ub3A-TAT fusion. The cross-peak of arginine at the C-terminal end of TAT (Arg 88) is indicated. c, Spectrum of HeLa cells treated with ^{15}N Ub 3A-G75A/G76A-TAT. The DUB cleavage site is indicated by a triangle. The figure was adapted from Ref. 10.

れは、上述の *Xenopus* oocyte の場合と同様に、HeLa 内在性の DUB 活性により、Ub3A のカルボキシ末端でペプチド結合が切断されたことを反映していると考えられたので、これを調べるために、DUB によって切断されない Ub3A-Ala-Ala-TAT 誘導体（DUB の認識配列である Ub カルボキシ末端の Gly-Gly モチーフを Ala-Ala に置換したもの）を調製し、HeLa 中で測定した。驚いたことに、スペクトルの様相は大きく異なっていた [Fig. 6(c)]. 得られた NMR 信号の強度は弱く、交差ピークがスペクトル中央部に密集していた。これは、凝集したタンパク質によくみられるパターンである。Ub3A 及び Ub3A-Ala-Ala を蛍光色素 Alexa488 で標識し、先程と同様に HeLa に導入して蛍光観察したところ、DUB で TAT が切り離される Ub3A-TAT は細胞質・核質に均一に分散しているのに対し、DUB による切断を受けない Ub3A-Ala-Ala-TAT は凝集体を形成し斑状に分布しており (Fig. 7), in-cell NMR の結果と合致する。このような凝集体形成は in-cell NMR スペクトルを台なしにするのみならず、積荷タンパク質の本来の機能を損なう恐れもある。したがって、細胞内で CPP と積荷タンパク質が分離されることが望ましい。以上の観点から、筆者らは、ジスルフィド結合を介して CPP と積荷タンパク質をつないで細胞内導入し、in-cell NMR を測る方法も試してみた。細胞質は還元的な環境なので、ジスルフィド結合は切断され、積荷が遊離すると考えられる。¹³⁾ 実際、この方法で Ub3A や Protein G B1 domain の良好な in-cell NMR スペクトル

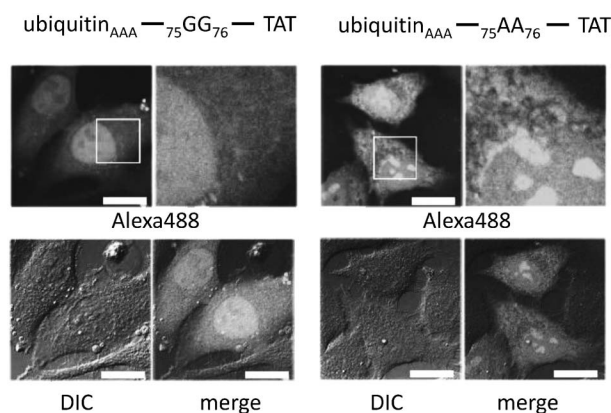


Fig. 7. Distribution of Alexa-488-labelled Ub3A-TAT and Ub3A-G75A/G76A-TAT in HeLa Cells Observed by Confocal Laser-scanning Microscopy

DIC, differential interference contrast. Scale bars, 20 mm. The figure was adapted from Ref. 10.

を得ることに成功した。¹⁰⁾

タンパク質-薬剤相互作用の観察

細胞内タンパク質を標的とした薬剤を開発する際に、*in vitro* 実験で最適化した薬剤候補化合物が、実際に細胞内で、設計通りの様式で標的タンパク質と結合するかどうかはわかれば極めて有用であると思われる。筆者らは、in-cell NMR を使えば、そのような試験が可能になると考え、FKBP12 と免疫抑制剤 FK506 の系をモデルとして検証を行った。¹⁰⁾

まず、FKBP12 を HeLa 細胞に導入するために、TAT-Ub-FKBP12 という融合タンパク質を設計した [Fig. 8(a)]. FKBP12 は Ub のカルボキシ末端側に融合されている。このため、このタンパク質が HeLa に導入されると、内在性 DUB の働きによっ

て TAT-Ub から FKBP12 が切り離される。これによって、FKBP12 は、前項の TAT 融合による凝集体形成を回避できる。逆に、TAT-Ub 部分は、細胞内で凝集体を形成するため、ごく弱い NMR 信号しか与えないと予想される [Fig. 6(c) と類似のスペクトルを与える]。

実際に、 ^{15}N で均一標識した TAT-Ub-FKBP12 を HeLa に導入し、in-cell NMR スペクトルを測定すると、ほぼ ^{15}N FKBP12 由来の NMR シグナルのみしか見えない [Fig. 8(a)]。このスペクトルパターンは、*in vitro* 参照スペクトルとよく一致することから、細胞内でも *in vitro* と同じ立体構造が保持されていることがわかる。次に、培地に FK506 を添加し ^{15}N FKBP12 の in-cell NMR スペクトルを測った。仮に、細胞内で「結合しない」、あるいは、「結合が極めて弱い」場合は、in-cell スペクトルに変化はみられないはずである。果たして、FK506 を添加した細胞の ^{15}N FKBP12 の in-cell スペクトルパ

ターンは変化し、 ^{15}N FKBP12-FK506 複合体の *in vitro* 参照スペクトルと極めて類似したものとなった。このことは、細胞内での FKBP12-FK506 相互作用は *in vitro* でのそれと全く同じ様式であることを意味している。なお、仮に、in-cell スペクトルが、複合体の参照スペクトルと大きく異なる場合は、細胞内での結合様式が *in vitro* とは異なることを意味する。

以上より、in-cell NMR を用いれば、薬剤候補化合物が「細胞膜を透過し、細胞質内の目的タンパク質に、*in vitro* と同様の様式で結合する」ことを検証できると考えられる。

細胞内でのタンパク質フォールディング安定性

冒頭で述べたように、細胞内におけるタンパク質のフォールディング安定性は *in vitro* とは異なるとされる。アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患においては細胞内外にタンパク質の異常凝集体（封入体）がみられるが、¹⁴⁾ 凝集体を構成するタンパク質は本来の立体構造を保持していないとされることから、この凝集形成機構において、細胞内でのフォールディング安定性が重要なパラメーターとなっている可能性がある。フォールディングの安定性が細胞の状態によってどのように影響を受けるかを実験的に検証できれば、上記の病理メカニズムの解明にも重要な示唆を与えると思われる。しかし、これまで、細胞内でタンパク質のフォールディング安定性を定量的に解析できる手法はなかった。

筆者らは、NMR でよく行われる水素交換実験 (Fig. 9) を in-cell 条件で行い、細胞内タンパク質の安定性を定量的に調べる方法を考案した。¹⁰⁾ 詳細な実験方法は原著論文に譲るとして、HeLa 細胞で行った野生型 Ub の水素交換実験の結果について簡単に紹介する。まず、野生型 Ub の細胞内でのアミド水素の交換速度は pH 7.4 における *in vitro* に比べて 15–22 倍程度大きかった (Fig. 10)。これは、Ub が細胞内では *in vitro* に比べて高頻度アンフォールドしていることを意味し、Ub のフォールディングが不安定化していることを示唆する。この水素交換速度の上昇は、Ub 表面の Ile44 を中心とする相互作用面を破壊した Ub3A 誘導体では抑制された (Fig. 10)。すなわち、Ub と UBA や UIM 等の Ub 結合ドメインとの相互作用（に伴うコンフォメーション変換）が、細胞内での不安定化に寄与し

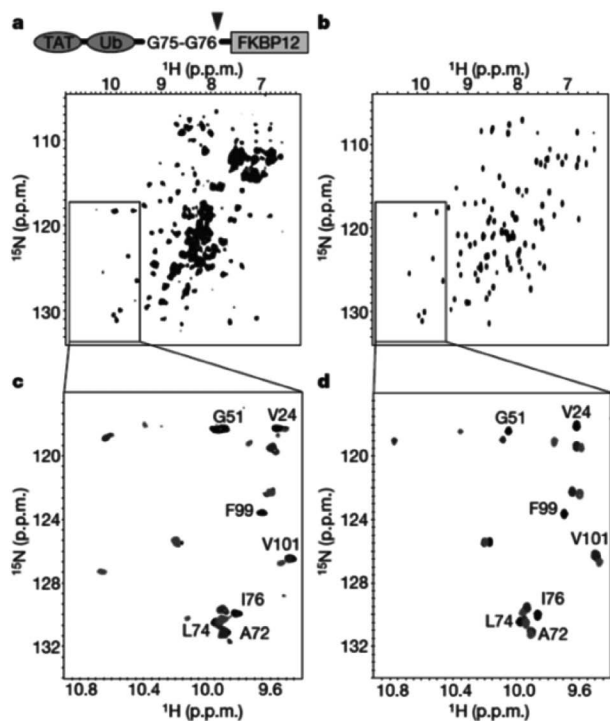


Fig. 8. Protein Drug Interactions in HeLa Cells Analyzed with in-cell NMR

a, b, In-cell two-dimensional ^1H - ^{15}N correlation spectra of ^{15}N -labelled TAT-Ub-FKBP12 in HeLa cells (a) and its *in vitro* reference (b). The construct used is shown above the spectrum in a. The DUB cleavage site is indicated with a triangle. c, Superposition of in-cell spectra with-out and with administration of either FK506 or rapamycin. d, Superposition of *in vitro* reference spectra of ^{15}N FKBP12 in the absence and presence of either FK506 or rapamycin. The figure was adapted from Ref. 10.

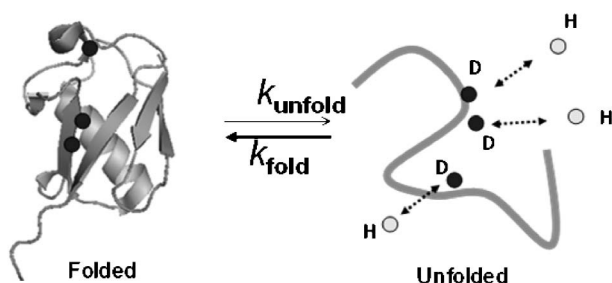


Fig. 9. Hydrogen Exchange Experiment to Measure Protein Folding Stability

The deuterons (D) at amide groups deep inside the protein core with strong hydrogen bonds exchange with solvent protons (H) only when the protein unfolds.

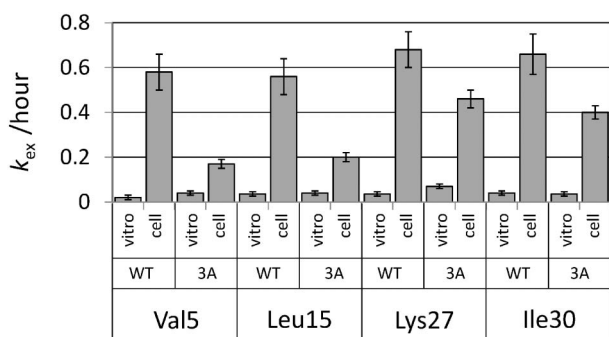


Fig. 10. The Hydrogen Exchange Rates (k_{ex}) in HeLa Cells and *in Vitro* at pH 7.4 of Protected Amides in Wild-type Ubiquitin and Ub3A

Bars indicate standard errors. The figure was adapted from Ref. 10.

ていると推測される。

なお、大変興味深いことに、HeLa 細胞の破碎抽出物液中で同試料の水素交換実験を行ったところ、*in vitro* とほとんど変わりが無い結果を得た。つまり、細胞としての「構造」が保たれたままでなければ「水素交換速度の上昇」という効果はあらわれない。これは、破碎液を使った実験には限界があることを意味しており、細胞内でのタンパク質物性の直接計測や直接構造解析の重要性を物語っている。

現段階では、細胞内での不安定化が、Ub 以外のタンパク質でも起こるのか、それとも Ub に特有なのか、さらに「不安定化」は何に起因しているのか、といった本質的な問題には残念ながら解答が得られていない。今後の展開が待たれる。

ところで、最も単純な MC 効果理論では、細胞

内ではコンパクトなフォールディング状態が「安定化」されると予測しているので、²⁾ 筆者らのデータとは相容れない。しかし、同理論は、タンパク質間の相互作用を、剛体同士の弾性衝突とのみ仮定しており、現実を十分に反映していない。本実験結果は、様々なタンパク質物性を細胞内で計測していくことの必要性を示している。

おわりに

本稿では、筆者らの行ってきた *in-cell* NMR/ESR について紹介した。なかでも、哺乳動物由来の培養細胞を使った *in-cell* NMR 法の確立は、タンパク質科学、分子・細胞生物学、医学、薬学にわたって、広く生命科学研究全般に応用が可能であることから、特に意義が大きいと思われる。また、他グループから、CPP 以外の方法でタンパク質を細胞導入する例も報告されており、¹⁵⁾ 哺乳動物 *in-cell* NMR の今後の発展が期待される。一方で、現在利用可能な NMR 装置の検出感度と、細胞内の大部分のタンパク質の濃度が μM 以下であることを考え合わせると、生理的に意味のある条件下でできる測定は極めて限定されてしまう。これまでにタンパク質の解析のために開発されてきた様々な NMR パルス系列を *in-cell* 条件に適用し、生理的条件の下で、より詳細な構造・ダイナミクス情報を抽出するためには、NMR 装置のさらなる高感度化が必須であることは間違いない。光検出や過分極の利用など、新しい測定原理を用いた NMR ハードウェアの開発が期待される。

REFERENCES

- 1) Rivas G., Ferrone F., Herzfeld J., *EMBO Rep.*, **5**, 23–27 (2004).
- 2) Zhou H.-X., Rivas G., Minton A. P., *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 375–397 (2008).
- 3) Serber Z., Selenko P., Hansel R., Reckel S., Lohr F., Ferrell J. E. Jr., Wagner G., Dotsch V., *Nat. Protoc.*, **1**, 2701–2709 (2006).
- 4) Hubbard J. A., MacLachlan L. K., King G. W., Jones J. J., Fosberry A. P., *Mol. Microbiol.*, **49**, 1191–1200 (2003).
- 5) Sakakibara D., Sasaki A., Ikeya T., Hamatsu J., Hanashima T., Mishima M., Yoshimasu M., Hayashi N., Mikawa T., Wälchli M., Smith B. O., Shirakawa M., Güntert P., Ito

- Y., *Nature*, **458**, 102–105 (2009).
- 6) Schlesinger A. P., Wang Y., Tadeo X., Millet O., Pielak G. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 8082–8085 (2011).
 - 7) Sakai T., Tochio H., Tenno T., Ito Y., Koku-bo T., Hiroaki H., Shirakawa M., *J. Biomol. NMR*, **36**, 179–188 (2006).
 - 8) Igarashi R., Sakai T., Hara H., Tenno T., Tanaka T., Tochio H., Shirakawa M., *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 8228–8229 (2010).
 - 9) Borbat P. P., McHaourab H. S., Freed, J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5304–5314 (2002).
 - 10) Inomata K., Ohno A., Tochio H., Isogai S., Tenno T., Nakase I., Takeuchi T., Futaki S., Ito Y., Hiroaki H., Shirakawa M., *Nature*, **458**, 106–109 (2009).
 - 11) Takeuchi T., Kosuge M., Tadokoro A., Sugura Y., Nishi M., Kawata M., Sakai N., Matile S., Futaki S., *ACS Chem. Biol.*, **1**, 299–303 (2006).
 - 12) Carlson N., Rogers S., Rechsteiner M., *J. Cell Biol.*, **104**, 547–555 (1987).
 - 13) Giriat I., Muir T. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7180–7181 (2003).
 - 14) Lee S.-J., Lim H.-S., Masliah E., Lee H.-J., *Neurosci. Res.*, **70**, 339–348 (2011).
 - 15) Ogino S., Kubo S., Umemoto R., Huang S., Nishida N., Shimada I., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10834–10835 (2009).