

最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

研究課題名	In vivo 構造プロテオミクスの創生と展開
研究機関・部局・職名	首都大学東京・理工学研究科・教授
氏名	伊藤 隆

【研究目的】

「分子クラウディング」と呼ばれる複合的な効果は、蛋白質の立体構造や動的変化（ダイナミクス）に対して顕著な影響を与えられていると考えられている。したがって、閉鎖系での平衡状態の観察を主とする試験管内の実験のみでは、細胞中の蛋白質の構造・機能関連の正確な記述は困難である。

In-cell NMR は細胞内での蛋白質の真の挙動を立体構造の観点から解析できる唯一の手法であり、この手法に対する注目度は高まっているが、例えば in-cell NMR を用いた蛋白質の立体構造解析の成功例はわれわれの例のみであり、この手法が汎用性のあるものとして完成していないことが、様々な蛋白質についての細胞内動態の総合的理解の障壁となっていた。

このような背景を受けて、多数の生体高分子に適用可能な汎用的な in-cell NMR 技術開発を確立し、様々な蛋白質への多角的解析を進めることが本研究の目的である。ここで確立した技術を元に、さらに大規模な網羅解析（プロテオミクス）につなげることで、多くの革新的な知見が得られると期待する。

補助事業期間内には、以下の(i)～(iv)の項目で研究を行う。具体的な研究・開発項目を示す。

(i) 細胞内外でのフレキシブルな領域の立体構造の差異の解析

研究代表者らの報告例では、蛋白質構造の中でフレキシブルなループ領域では *in vitro* と *in vivo* で立体構造の差異が見られ、「分子クラウディング」の影響の可能性があることが示唆されている。このことから、様々な蛋白質で見つまっている「機能上重要でかつフレキシブルな領域」が、実際に細胞内ではどのような立体構造を取っているのかを解析することは非常に大きな意味がある。一方で、細胞内外での立体構造の差異を正確に解析するためには、高分解能の立体構造解析が要求される。研究代表者らによる過去の細胞内蛋白質の立体構造解析例では、主鎖の RMSD で約 1Å 程度の分解能の構造が得られたが、構造の詳細な比較には分解能向上が望ましい。高分解能な立体構造解析を可能にする手法を確立する。

(ii) 細胞内での IDP (内在的に立体構造を取らない蛋白質) の構造解析

最近注目されている intrinsically disordered protein (IDP) の細胞内での挙動は極めて興味深い。真核細胞中では、蛋白質全領域に渡って立体構造をとらない IDP が約 10%、一部領域で構造をとらない IDP が約 40%あると言われている。一方で、in-cell NMR による IDP への解析例はごくわずかであり、詳細な NMR パラメータの比較

による解析は未だ報告が無い。上記(i)で開発する NMR 手法を基にして、IDP の詳細な解析を可能にする技術開発を進める。

(iii) 分子クラウディングによる蛋白質の安定性への影響の定量化

HeLa 細胞を用いた研究代表者らの研究によって、細胞内環境が蛋白質のフォールド安定性に大きな効果を及ぼしており、むしろ構造不安定化に寄与している可能性があることが判明している。これは、「分子クラウディング」効果に関する従来の分子生物学の常識を覆すものであり、多数の蛋白質についての今後の同様な解析が待たれている。蛋白質の動的性質については ^{15}N 核の緩和解析が有用であるが、定量的な解析結果の報告は未だになかった。最新のダイナミクス解析手法を用いて、細胞内蛋白質の動的性質を解析する方法を確立し、細胞内での蛋白質のダイナミクスと機能の相関を定量解析によって明らかにする。

(iv) 蛋白質・蛋白質相互作用、および蛋白質・基質相互作用の解析

In-cell NMR による分子間相互作用解析では、従来は蛋白質側のシグナルの変化や消失に基づく定性的な解析がほとんどである。In-cell NMR による NMR シグナルの帰属手法を高度化することにより高分解能な解析を可能にし、細胞内での蛋白質間ネットワークを構造の観点から明らかにする手法を開発する。

【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
○	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

本研究課題の目的は“多種多様な生体分子に適用可能な汎用的な in-cell NMR 技術開発と、さまざまなタンパク質への多角的、網羅的解析”である。すでに課題担当者には本技術についての実績があり、このために達成すべき目標として、in-cell NMR の汎用的な技術開発のためにいくつかのタンパク質についての構造解析等の個別目標があった。全体をとおして細胞内タンパク質の立体構造研究に関しては見るべき成果があり、細胞内タンパク質の立体構造およびダイナミクスの解析の基盤ができたともいえる。しかし、当初掲げた汎用性の高い生細胞タンパク質 in vivo NMR 解析法の実現という目標から、その対象がこれまでのところ真核細胞に限定したものとなっている。大腸菌での網羅的な解析につながるような一定の改良が行われたことは評価できるが、テーマを大きくしすぎたとも言え、従って、今後先駆的技術開発に持つていくためには、早急に問題点を掘り下げブレークスルーに繋がる新たな解析法に発展させていく必要がある。

② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

本研究課題は、研究代表者が独自に開発した生細胞タンパク質の in vivo NMR 研究をプロテオミクスに進展させて行く為の技術の開発である。研究途上での成果は出ているが、当初目標としていた汎用性の高いプロテオミクス解析に持って行くにはハードルが高い状況である。特に、当初予定していた大腸菌細胞内タンパク質の in-cell NMR によるプロテオミクス解析には成功していない。事後評価報告書によれば、最終年度に集中して網羅的解析を試み、計 74 種の蛋白質について、大腸菌の系を用いて良好な in-cell NMR スペクトルを与える試料の探索を行った結果、安定同位体標識のための M9 最少培地で良好な発現を示した低分子量蛋白質のうち約 1 割は、立体構造解析につながる良好な NOESY スペクトルを与えることが判明したとある。また、高い測定・解析・構造計算ツールの整備を行った結果、研究開始時に比べてはるかに汎用性の高い解析法を確立することができたとも記されている。初期目標達成とは言えないが、努力は高く評価され、有望であり、今後に期待したい。また、解決策として真核細胞（昆虫細胞、HeLa 細胞）の系にシフトしているが、様々なタンパク質への多角的取り組みには難儀している状況である。これも最終年度には、試料管に培地を供給し続ける Bioreactor システムを適用し、sf9 の延命化を図ることで、良好な 3D NOESY スペクトルの取得に成功するなどの多くの改良努力がなされている。これら様々な要素技術の開発と改良を行うことにより当初目標の達成に近づいたと評価する。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が

(ある ・ ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が

(創出された ・ 創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

細胞内蛋白質の立体構造について、本プログラム開始以前から本研究代表者が優位に進めてきた研究であり、その優位性を維持することにより、高精度な NMR 解析と立体構造情報を得る技術を確立し、sf9 細胞内タンパク質について大きな成果を得ている。しかし、当初計画していた汎用性、革新性の高い細胞内タンパク質 in-cell NMR 技術をベースにしたプロテオミクス解析に難儀している状況を踏まえると、研究の優位性は下がり、本補助事業期間内に限ると先進性は相対的に乏しい。

ただ、真核細胞中（昆虫培養細胞）でのタンパク質の立体構造情報の解析に成功したこの成果は、細胞内タンパク質の動的解析を可能にするもので in-cell NMR の先駆け研究として評価できる。また、新しい NMR データ処理法に Quantitative Maximum Entropy reconstruction 法を取り入れ良好な結果を得たことは、特記すべき研究成果であろう。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

in-cell NMR と呼ばれる分野に対する日本のグループの寄与は大きく国際競争力も高い。本補助事業者が今後他の日本の研究者達とより緊密な協力を進めていけば、関連研究分野の進展に寄与できる。

Intrinsically Disordered Protein (IDP; 内在的に立体構造をとらないタンパク質)の細胞内構造情報は他の手法・他の環境における構造情報と相補的であり、関連研究分野の研究活性化に寄与できる。

現時点では、学術的成果による可能性に終始している感があるが、本 in-cell NMR 研究分野は、基礎科学的研究分野というよりは医療産業分野等に利用・発展可能な応用科学的研究分野でもあり、今後成果を産業に活かすことも期待される。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

概ね適切に行われているが、研究実施体制については、大きな研究目的に対して博士研究員 1 名 + 技術員 1 名と大学院学生数名の研究グループは規模が小さすぎるように思われる。また、中間評価で記述した 700MHz 級以上の高磁場 NMR 装置の利用については、その後、HeLa 細胞の系で使用開始しているとのことであり、適切に対応がなされている。

論文発表、会議発表は適切に行われているが、国際性の高い研究業績という観点から言えば内容について一層の向上を期待したい。また、研究成果の一般への公開 (マスコミ等) や知的財産権の出願・取得等に対しても、より一層の積極性が望まれる。大学主催のイベントに参加し活動しているが、学外に向けての活動も積極的に進めてほしい。