

## 論文の内容の要旨

論文題目 バイオリアクターを用いた in-cell NMR 法による細胞内タンパク質間相互作用の観測

氏名 久保 智史

### 【背景】

タンパク質の細胞内における構造や機能を調べるためには、可能な限り細胞内環境に近い条件で解析を行うことが重要である。in-cell NMR 法は、生きた細胞内のタンパク質の NMR シグナルを直接観測する手法であり、精製や結晶化を必要とする従来の手法とは異なり、タンパク質が実際に機能を発揮する環境下でのタンパク質構造や相互作用を解析することが出来る。当研究室ではこれまでに、細胞膜上に可逆的なポアを形成させる streptolysin O (SLO)を用いて、哺乳細胞内に安定同位体標識タンパク質を導入し NMR 観測を行う新規 in-cell NMR 法を開発した<sup>[1]</sup>。

しかし、哺乳細胞を対象とした in-cell NMR 測定法では、十分な測定感度を得るために、高い細胞密度で測定を行う必要がある。そのために、測定中に溶液中の培地成分や溶存酸素が枯渇し、測定環境が生理的条件から解離してしまうだけでなく、細胞内の ATP 濃度が顕著に低下することで細胞死が誘起されてしまう。さらに、細胞内に導入したタンパク質は経時的に細胞外へ漏出してしまふことが知られており、細胞外に漏出したタンパク質由来の NMR シグナルは細胞内タンパク質の観測の妨げとなる。よって、in-cell NMR 法はこれらのサンプルの経時的変化が起こる前に測定を終える必要があり、長時間の測定を必要とする様々な NMR 測定法を適用できないという問題があった。

NMR サンプル管内の細胞を生存状態に保つためには、サンプル管内に培地を灌流するバイオリアクターを用いることが有効である。そこで本研究では、哺乳細胞に対して適用可能なバイオリアクターを開発し、生理的環境を保ちながら in-cell NMR 測定を行う手法を開発することを目的とした。また、開発した測定法により、転移交差飽和 (TCS) 法を用いて、細胞外から導入したタンパク質と内在性タンパク質との相互作用を解析することを目指した。

## 【方法】

### バイオリアクターを用いた in-cell NMR 法

本研究にて開発したバイオリアクターでは、外径 1 mm のチューブの先端に接続したガラスキャピラリーを介して、NMR サンプル管の底部に 50  $\mu$ l/ml で DMEM (25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 20% D<sub>2</sub>O) を常時供給した。DMEM はよく脱気した後に CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間攪拌し、細胞の生存に必要な O<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> を溶存させて用いた。サンプル管の中部には外径 2 mm のテフロンチューブを挿入し、アスピレーターを用いて余剰の DMEM を吸引した (Fig. 1 A,B)。

バイオリアクターで培地灌流時にも細胞を NMR サンプル管底部に保持するため、細胞懸濁液は温度可塑性のポリマーである Mebiol gel と混合し、ゲル内に封入した。Mebiol gel はおよそ 20 °C を境界に高温ではゲル化、低温ではゾル化するポリマーであり、細胞の 3 次元培養などに実績があり細胞毒性を有さない。また、ゲル化後も DMEM 培地の流路を保ち、効率よく培地成分を交換するため、細胞懸濁液は NMR サンプル管内においてコイル状にゲル化した (Fig. 1 C)。

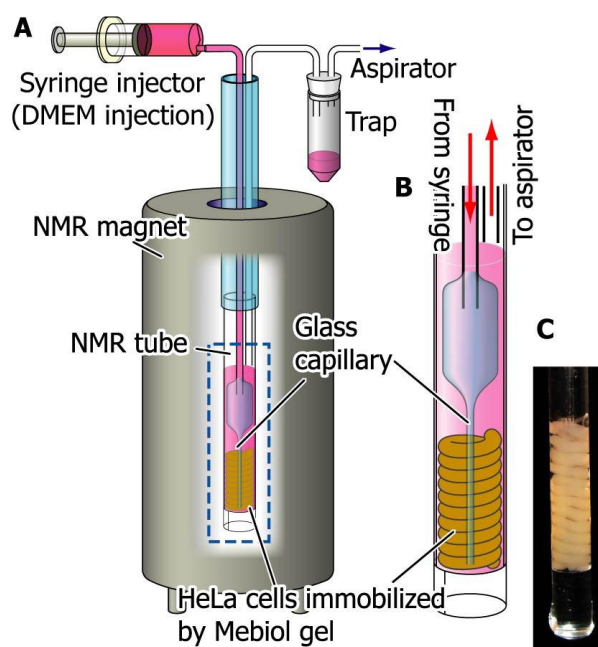


Figure 1. バイオリアクターの模式図

(A) 本研究で用いたバイオリアクターの模式図。(B) A における点線内の拡大図。(C) Mebiol gel を用いて HeLa 細胞懸濁液を NMR サンプル管内にてコイル状にゲル化した際の写真。

### 観測対象とするタンパク質

本研究では、微小管結合タンパク質 CLIP-170 の微小管結合ドメインである CG1 (9.4 kDa) を観測対象とした。CG1 はこれまでに開発した SLO を用いた手法により、HeLa S3 細胞に導入した。細胞内 CG1 の NMR シグナルを高感度で測定するため、Ile, Leu, Val の側鎖メチル基を選択的に <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C 標識した CG1 を観測対象として、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C SOFAST-HMQC 法による in-cell NMR スペクトルの測定を行った。

## 【結果】

### バイオリアクターの有効性の評価

バイオリアクターを用いることによる細胞への影響を調べるため、 $^{31}\text{P}$  NMR 測定によってサンプル管内の細胞内に存在する ATP のシグナルを観測することで、細胞内 ATP 濃度の経時変化を調べた。従来法で測定を行った場合は測定後 30 分で細胞内 ATP はほぼ枯渇したが、バイオリアクターを用いることで 22 時間経過後も初期濃度の 80% 以上の細胞内 ATP 濃度を保つことが出来た (Fig. 2)。

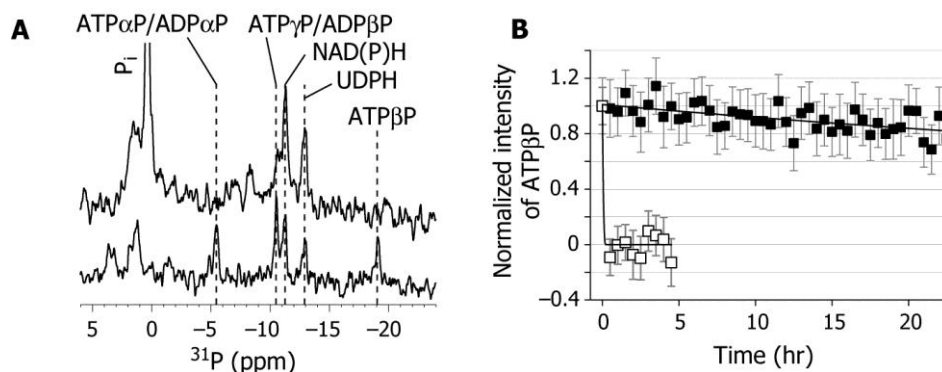


Figure 2. 細胞内 ATP 濃度の経時変化

(A) バイオリクターなしで 30 分経過後(上)、およびバイオリアクターありで 22 時間経過後(下)の細胞の  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトル。(B) バイオリクターなし(□)、およびバイオリアクターあり(■)の場合の ATP $\beta$ P に由来するシグナルの経時的な強度変化。

次に、ILV 側鎖メチル基を選択的に  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識した CG1 細胞内に導入し、バイオリアクターを用いて in-cell NMR スペクトルの測定を行った。その結果、in vitro において観測されていた CG1 由来のシグナル全てを、in-cell NMR スペクトルにおいて高い分解能で得ることが出来た (Fig. 3 A,B)。さらに、従来法で 1 時間の in-cell NMR 測定を行うと、測定後の上清から測定中に漏出した CG1 由来のシグナルが観測されていたが、バイオリアクターを用いて測定を行うと、5 時間の測定を行った後も上清からは CG1 に由来するシグナルは観測されなかった (Fig. 3 C,D)。よって、バイオリアクターを用いることで細胞内 CG1 由来のシグナルを選択的に観測できることが分かった。これは、細胞外の DMEM 培地が常に交換されているため、細胞からタンパク質が漏出したとしても速やかに希釈され除去されるためである。

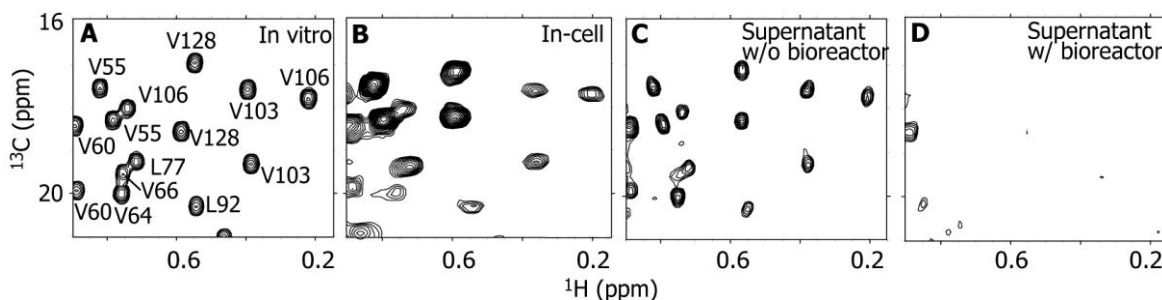
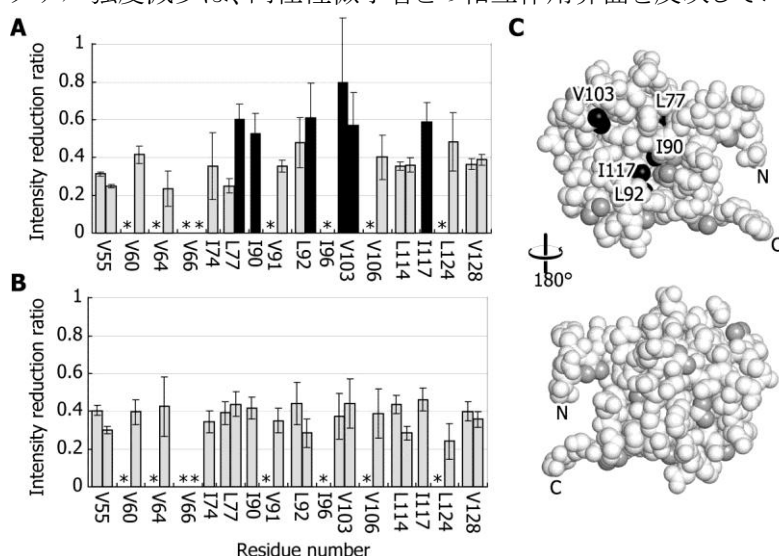


Figure 3. バイオリクターを用いた CG1 の in-cell NMR 測定

(A) バイオリクターを用いて得られた CG1 の in-cell NMR スペクトル。(B) In vitro における CG1 のスペクトル。(C,D) バイオリクターなしで 1 時間(C)、およびバイオリアクターありで 5 時間(D)の in-cell NMR 測定を行い、測定後に Mebiol gel を低温でゾル化させ、細胞外液を回収して NMR スペクトルを測定した。

## 細胞内における転移交差飽和実験 (in-cell TCS 実験)

バイオリアクターを用いることで長時間の in-cell NMR 測定が可能になったため、導入した CG1 における内在性微小管との相互作用部位を TCS 法により解析した。in-cell TCS 実験の結果、観測されたシグナル強度減少比をシグナルごとにプロットしたところ、L77, I90, L92, V103, I117 において 0.5 以上の強度減少比が観測された。これらの残基は CG1 の立体構造上において一定の面を形成し、報告されている CG1 の微小管相互作用界面と一致した (Fig. 4 A,C)。さらに、観測された相互作用が内在性微小管との特異的な相互作用に由来することを確かめるため、安定同位体標識 CG1 と同時にその 10 倍量の非標識 CG1 を細胞内に導入して、in-cell TCS 実験を行った。過剰量の非標識 CG1 を細胞内に導入することにより、微小管上の CG1 結合部位が非標識 CG1 によって占有されるため、特異的な相互作用を抑制し、細胞内分子との非特異的な相互作用の影響のみを観測することができると考えた。その結果、すべてのシグナル強度減少率は、0.5 以下に抑制された (Fig. 4 B)。よって、in-cell TCS 実験において観測されたシグナル強度減少は、内在性微小管との相互作用界面を反映していることが示された<sup>[2]</sup>。



**Figure 4. in-cell TCS 実験**

(A) in-cell TCS 実験における各シグナルのシグナル強度減少率。シグナルの縮重により解析対象から外れた残基をアスタリスクで示した。0.5 以上のシグナル強度減少率を示した残基を黒で示した。(B) 過剰量の非標識 CG1 存在下における in-cell TCS コントロール実験。(C) A の結果を CPK 表示した CG1 の立体構造 (PDB code: 2CP9) にマッピングした。観測対象のメチル基を灰色、0.5 以上のシグナル強度減少率を示した残基を黒で示す。

## 【考察】

本研究においてバイオリアクターを用いた in-cell NMR 法を開発することにより、生理的条件下において in-cell NMR 測定を行うことが可能になった。さらに、in-cell TCS 法による細胞内のタンパク質間相互作用解析が可能であることが示された。本手法は、細胞内のみ安定に存在する、膜タンパク質やタンパク質複合体を相互作用相手とした TCS 実験に適用できると考えている。また、Mebiol gel は細胞の 3 次元培養にも適用可能なため、本手法の開発により in-cell NMR 法を接着状態の細胞に応用することが可能となる。今後、バイオリアクターによって生理的条件下においた細胞を用いて、細胞周期の進行に伴うタンパク質の相互作用変化や、翻訳後修飾の変化などを研究対象とした、in-cell NMR 法による原子レベルでの解析が展開されると期待する。

## 【参考文献】

<sup>1</sup> Ogino S., Kubo S., Umemoto R., Huang S., Nishida N., Shimada I. (2009) *J Am Chem Soc*, **131**, 10834

<sup>2</sup> Kubo S., Nishida N., Udagawa Y., Takarada O., Ogino S., Shimada I. (2012) *Angew Chem Int Ed*, in press