

課題番号	LS101
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

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

1. 当該年度の研究目的

蛋白質の構造・機能相関の正確な記述には、生細胞中の蛋白質動態の詳細な解析が不可欠である。生細胞内蛋白質の解析手段としての in-cell NMR を発展させることによって、生体分子に普遍的に適用可能な技術に成熟させ、様々な蛋白質への多角的・網羅的解析を可能にすることが本研究の目的である。

H23 年度は、引き続き要素技術の確立と高度化・最適化を行うことを目的とした。また、分子量 10K 程度の球状蛋白質や、IDP(内在的に立体構造を取らない蛋白質)の in-cell NMR 解析を行い、細胞内環境が蛋白質の立体構造に与える影響を解析することとした。さらに、¹⁵N 緩和解析によるフォールディング安定性の検証や、蛋白質間相互作用および蛋白質・基質相互作用のための方法論的研究も行うこととした。

2. 研究の実施状況

本研究では (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, (ii) 細胞内での IDP の構造解析, (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的解析, (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の高度化, の 4 テーマについて研究を行っている。

H23 年度の実施状況は以下の通り。テーマ(i)では生きた細胞中の蛋白質の立体構造解析手法の高度化を行った。昨年度は大腸菌中の GB1 ドメインの解析を行い、従来よりも 1 ケタ低い濃度の試料について立体構造を算出(世界で 2 件目)したが、今年度はデータの処理法, 立体構造計算法等について改良を行い、同一データからさらに高精度な構造を得ることに成功した。テーマ(ii)では、ヒト Rad52C 末端領域の解析を進めるとともに、ヒト Ras やショウジョウバエ drkN SH3 ドメイン等、試験管内で構造多形であることが報告されている蛋白質についても解析を開始した。テーマ(iii)では、大腸菌細胞における 2 種の蛋白質のダイナミクスについて、¹⁵N 緩和解析という手法を用いて詳細に解析を行った。テーマ(iv)では、真核細胞を用いた in-cell NMR 研究に注目し、培養昆虫細胞やヒト培養細胞の系における、NMR シグナルの解析法の改良を試みた。特に培養昆虫細胞 Sf9 の系で良好なスペクトルを得ることに成功し、より高度な 3 重共鳴 NMR 実験にも成功した(図)。これは真核細胞の in-cell NMR としては世界初である。

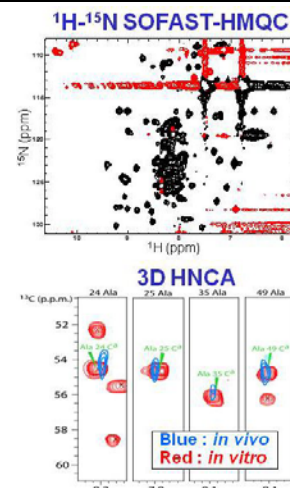


図. 生きた Sf9 細胞中の GB1 の ¹H-¹⁵N 相関スペクトル (上), および HNCA 3 重共鳴スペクトル (下)

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 4 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件 (1) Kumiko Kawasaki, Teppei Kanaba, Momoko Yoneyama, Naoko Murata-Kamiya, Chojiro Kojima, <u>Yutaka Ito</u>, Hiroyuki Kamiya & Masaki Mishima. "Insights into substrate recognition by the <i>E. coli</i> orf135 protein through its solution structure" <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> 420, 263-368 (2012) (2) Kumiko Kawasaki, Momoko Yoneyama, Naoko Murata-Kamiya, Hideyoshi Harashima, Chojiro Kojima, <u>Yutaka Ito</u>, Hiroyuki Kamiya, Masaki Mishima "1H, 13C and 15N NMR assignments of the <i>Escherichia coli</i> Orf135 protein" <i>Biomolecular NMR Assignments</i> 6, 1-4 (2012) (3) Jin Inoue, Takayuki Nagae, Masaki Mishima, <u>Yutaka Ito</u>, Takehiko Shibata, Tsutomu Mikawa "A mechanism for single-stranded DNA-binding protein (SSB) displacement from single-stranded DNA upon SSB-RecO interaction" <i>Journal of Biological Chemistry</i> 286, 6720-6732 (2011).</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 1 件 (1) <u>Yutaka Ito</u>, Tsutomu Mikawa & Brian O. Smith "In-cell NMR of intrinsically disordered proteins in prokaryotic cells" <i>Methods in Molecular Biology</i>, in press (2012)</p>
<p>会議発表 計 27 件</p>	<p>専門家向け 計 26 件 (通し番号右肩に*印のあるものは、本研究の直接の成果の発表。その他は本研究の成果を含む発表。)</p> <p>(1)* <u>伊藤 隆</u>, 「生細胞内蛋白質の立体構造決定」, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ「核磁気共鳴の高感度化が拓く生体内蛋白質計測の未来」, 大阪, H23年6月8日, 主催:日本蛋白質科学会 (2) 金場哲平, 佐伯邦道, 森 智行, 前崎綾子, <u>伊藤 隆</u>, 箱嶋敏雄, 三島正規, 「微小管ダイナミクスを制御する蛋白質群についての構造研究」, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 大阪, H23年6月8日, 主催:日本蛋白質科学会 (3) 秋吉克昂, 宮崎健介, 金場哲平, <u>伊藤 隆</u>, 三島正規, 「NMR 法によるマルチドメインタンパク質 Protein kinase C の構造解析の試み」, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 大阪, H23年6月8日, 主催:日本蛋白質科学会 (4) 井上 仁, 永江峰幸, 三島正規, <u>伊藤 隆</u>, 柴田武彦, 美川 務, 「蛋白質間相互作用により生じる単鎖 DNA 結合蛋白質 (SSB/ RPA) の ssDNA からの解離の一般的機構」, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 大阪, H23年6月8日, 主催:日本蛋白質科学会 (5)* <u>伊藤 隆</u>, 「多次元 NMR の原理と測定時間を短縮するアプローチ」, 日本分光学会 NMR 講習会, 東京, H23年7月20日, 主催:日本分光学会 (6)* <u>伊藤 隆</u>, 「NMR を用いた細胞構造生物学」, 蛋白研セミナー「先端的 NMR 拠点から生まれる新たな潮流: 最新成果, 役割, 利用」, 大阪, H23年7月29日, 主催:大阪大学 (7)* <u>Yutaka Ito</u>, "Practical aspects of protein structure determination by in-cell NMR.", The 4th Asia-Pacific NMR Symposium, 北京, 中国, H23年10月18日 (8)* <u>伊藤 隆</u>, 濱津順平, 花島知美, 細谷沙織, 大西香穂里, 白井隆弘, 晴被貴洋, Dambarudhar Shiba Sankar Hembram, 三島正規, 池谷鉄兵, Peter Güntert, 白川昌宏, 「NMR を用いた細胞構造生物学」, 分子アンサンブル 2011, 和光, H23年11月11日, 主催:理化学研究所 (9) Masaki Mishima, Teppei Kanaba, Ayaho Kobayashi, <u>Yutaka Ito</u>, Suzuka Mikami, "Weak and transient interaction underlying the transcriptional corepressor SHARP/SMRT complex", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23年11月17日, 主催:日本核磁気共鳴学会 (10)* Jumpei Hamatsu, Takahiro Shirai, Daniel Nietlispach, Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Masahiro Shirakawa, and <u>Yutaka Ito</u>, "Structural and dynamic studies of proteins in living cells by in-cell NMR spectroscopy", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23年11月16-18日, 主催:日本核磁気共鳴学会 (11)* Saori Hosoya, Tomomi Hanashima, Junpei Hamatsu, Teppei Ikeya, Masaki Mishima,</p>

- Peter Güntert, Masahiro Shirakawa and Yutaka Ito, "Structure determination of the protein G B1 domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23 年 11 月 16-18 日, 主催:日本核磁気共鳴学会
- (12)* Kaori Onishi, Jumpei Hamatsu, Dambarudhar Shiba Sankar Hembram, Takahiro Haremaki, Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Masahiro Shirakawa, and Yutaka Ito, "Heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy of proteins in human cultured cells", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23 年 11 月 16-18 日, 主催:日本核磁気共鳴学会
- (13) Teppei Kanaba, Tomoyuki Mori, Ryoko Maesaki, Yutaka Ito, Toshio Hakoshima, Masaki Mishima, "Autoinhibition and activation of end-binding 1 revealed by NMR", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23 年 11 月 16-18 日, 主催:日本核磁気共鳴学会
- (14) Katsutaka Akiyoshi, Kensuke Miyazaki, Teppei Kanaba, Ryoko Maesaki, Yutaka Ito and Masaki Mishima, "An attempt to obtain the structural insight of the multidomain protein PKC by solution NMR", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23 年 11 月 16-18 日, 主催:日本核磁気共鳴学会
- (15) Ayaho Kobayashi, Suzuka Mikami, Teppei Kanaba, Yutaka Ito and Masaki Mishima, "Structural and dynamical studies of transcriptional corepressor SHARP/SMRT complex", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23 年 11 月 16-18 日, 主催:日本核磁気共鳴学会
- (16) Kouhei Sakaki, Katsutaka Akiyoshi, Yutaka Ito and Masaki Mishima, "Structural study of ternary complex formation of IRF4 using NMR", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23 年 11 月 16-18 日, 主催:日本核磁気共鳴学会
- (17) Kunimichi Saeki, Ryoko Maesaki, Yutaka Ito, Toshio Hakoshima, and Masaki Mishima, "Structural studies of tubulin tyrosine ligase 1", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23 年 11 月 16-18 日, 主催:日本核磁気共鳴学会
- (18)* Teppei Ikeya, Masaki Mishima, Yutaka Ito and Peter Güntert, "NMR structure refinement by torsion angle molecular dynamics simulation using a physical force field in CYANA", ISNMR 2011, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011, (第 50 回 NMR 討論会), 横浜, H23 年 11 月 16-18 日, 主催:日本核磁気共鳴学会
- (19)* 伊藤 隆, 「細胞構造生物学:in-cell NMR を用いたアプローチ」, 第 14 回 生命化学研究会 ~In-Cell Interactions を調べる・動かす・組み上げる, 白浜, H23 年 12 月 2 日, 主催:生命化学研究会
- (20)* 濱津順平, Daniel Nietlispach, 池谷鉄兵, 三島正規, 白川昌宏, 伊藤 隆, "Structural and dynamic studies of proteins in living cells by in-cell NMR spectroscopy", 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, H23 年 12 月 14 日, 主催:日本分子生物学会
- (21)* 細谷沙織, 花島知美, 濱津順平, 池谷鉄兵, 三島正規, Peter Güntert, 白川昌宏, 伊藤 隆, "Structure determination of the protein G B1 domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy", 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, H23 年 12 月 14 日, 主催:日本分子生物学会
- (22) 秋吉克昂, 宮崎健介, 金場 哲平, 前崎綾子, 伊藤 隆, 三島正規, 「溶液 NMR 法を用いた全長 Protein kinase C の構造決定の試み」, 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, H23 年 12 月 14 日, 主催:日本分子生物学会
- (23)* 濱津順平, 伊藤 隆, 「In-cell NMR による細胞構造生物学」, 文部科学省・科研費特定領域研究「高次系分子科学」第 14 回ミニ公開シンポジウム(北海道大学低温科学研究所共同利用研究集会 合同研究会), 札幌, H24 年 1 月 17 日, 主催:特定領域研究「高次系分子科学」
- (24)* 伊藤 隆, 「In-cell NMR による細胞内蛋白質分子動態解析」, 生物物質科学フォーラム, 石川, H24 年 3 月 9 日, 主催:生物物質科学フォーラム
- (25)* 伊藤 隆, 「原核細胞を用いた in-cell NMR」, 蛋白研セミナー「in cell NMR workshop 2012」, 大阪, H24 年 3 月 27 日, 主催:大阪大学
- (26)* 池谷 鉄兵, 伊藤 隆, 「細胞内蛋白質構造の精密化」, 蛋白研セミナー「in cell NMR workshop 2012」, 大阪, H24 年 3 月 27 日, 主催:大阪大学, 他

様式19 別紙1

	<p>一般向け 計1件</p> <p>(1) 伊藤 隆, 「生きた細胞中の蛋白質の立体構造を決定する」, 首都大学東京・オープンユニバーシティ PRI シリーズ, 東京, H24年2月15日</p>
<p>図書</p> <p>計2件</p>	<p>(1) 伊藤 隆, 「In-cell NMRを用いた細胞内蛋白質の立体構造解析」, 蛍光イメージング/MRIプローブの開発(監修: 菊地和也) 分担執筆, シーエムシー出版, H23年9月, 総ページ数: 196ページ, ISBNコード: 978-4-7813-0454-0</p> <p>(2) 伊藤 隆, 「細胞内環境での蛋白質の立体構造解析」, 広がる NMR の世界(編著: 朝倉哲郎) 分担執筆, コロナ社, H23年4月, 総ページ数: 192ページ, ISBNコード: 978-4-339-06619-7</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>首都大学東京・大学院理工学研究科・分子物質化学専攻, 有機構造生物化学研究室, 伊藤グループ・ホームページ, http://www.comp.tmu.ac.jp/osbc/Group_Ito/index.html</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>首都大学東京オープンユニバーシティ, PRI シリーズ</p> <p>「生きた細胞中の蛋白質の立体構造を決定する」, H24年2月15日, 首都大学東京飯田橋キャンパス, 一般対象, 約50名参加, 本研究の背景および内容についてわかりやすく説明した。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

特になし。

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	108,000,000	38,950,000	0	69,050,000	0
間接経費	32,400,000	11,685,000	0	20,715,000	0
合計	140,400,000	50,635,000	0	89,765,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	37,041,704	0	0	37,041,704	37,041,704	0	0
間接経費	11,685,000	0	0	11,685,000	11,685,000	0	0
合計	48,726,704	0	0	48,726,704	48,726,704	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	34,220,413	600MHz NMRコンソール式, 実験試薬等
旅費	0	
謝金・人件費等	2,670,129	技術員人件費
その他	151,162	DNAシーケンス解析委託費, 投稿論文校閲費
直接経費計	37,041,704	
間接経費計	11,685,000	
合計	48,726,704	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
600MHz NMRコン ソール式	Bruker社, AVANCE III 600	1	28,875,000	28,875,000	2011/11/25	首都大学東京
				0		
				0		