

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 24 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。

H24 年度は、引き続き要素技術の確立と高度化・最適化(特に、真核細胞における 3D NMR 測定技術と、立体構造解析技術)を行うことを目的とした。また、既に確立した測定・解析手法については実際の系に積極的に応用し、いくつかの球状蛋白質の細胞内立体構造解析、蛋白質の細胞内動態解析、IDP の動的構造解析、蛋白質間相互作用の観測を試みることにした。

2. 研究の実施状況

本研究では (i) 細胞内蛋白質の立体構造, (ii) IDP の細胞内構造, (iii) 分子クラウディングによる蛋白質安定性への影響, (iv) 蛋白質・蛋白質相互作用, および蛋白質・基質相互作用, の 4 テーマについて研究を行っている。

H24 年度は, (i)(ii)(iii) の 3 テーマについて特筆すべき知見が得られた。(i)では昆虫培養細胞 sf9 と HeLa 細胞の系について, NMR 測定技術・立体構造解析技術の開発を行った。sf9 の系では世界初の真核細胞中の蛋白質主鎖シグナルの帰属に成功し, NOE 由来の立体構造情報の観測も行った(図参照)(Hamatsu, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1688-1691 (2013))。HeLa 細胞の系では, 常磁性 NMR による構造情報取得のための新規ランタノイド結合分子プローブの合成を進め, H25 年度上半期中には実用化予定である。(ii)では, ショウジョウバエ drkN SH3 ドメイン(試験管内でフォールド状態と変性状態の平衡)を用い, 大腸菌・HeLa 細胞中で解析を行った。現在までの解析で, 細胞内では変性状態に加えて複数のフォールド状態が存在する可能性が示唆され, 細胞内環境が構造の平衡に影響を与えている初めての例となる可能性がある。(iii)では, 2 種の蛋白質について大腸菌細胞中で DEST 実験を行った結果, これらの蛋白質が細胞内の巨大構造体と非選択的に相互作用していることが示唆された。この相互作用が蛋白質の構造不安定化に寄与している可能性があり, 注目される。(iv)では, 蛋白質間相互作用の観測のために, Ras およびこれと相互作用する蛋白質の in-cell NMR 測定を HeLa 細胞の系で開始した。

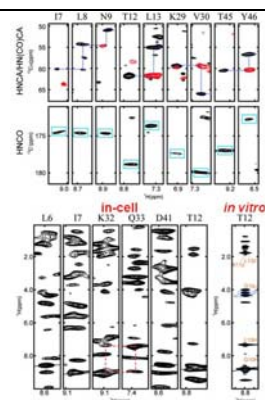


図. Sf9 細胞中の GB1 の主鎖 NMR シグナルの帰属(上), および ¹⁵N-3D NOESY(下)

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 5 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Hamatsu, J., O'Donovan, D., Tanaka, T., Shirai, T., Hourai, Y., Mikawa, T., Ikeya, T., Mishima, M., Boucher, W., Smith, B. O., Laue, E. D., Shirakawa, M. & <u>Ito, Y.</u> "High-resolution heteronuclear multidimensional NMR of proteins in living insect cells using a baculovirus protein expression system." <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 135, 1688-1691 (2013). 2. Kanaba, T., Maesaki, R., Mori, T., <u>Ito, Y.</u>, Hakoshima, T. & Mishima, M. "Microtubule-binding sites of the CH domain of EB1 and its autoinhibition revealed by NMR." <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> 1834, 499-507 (2013). 3. Mikami, S., Kanaba, T., <u>Ito, Y.</u> & Mishima M. "NMR assignments of SPOC domain of the human transcriptional corepressor SHARP in complex with a C-terminal SMRT peptide." <i>Biomol. NMR Assign.</i> Sep. 18 (2012). 4. <u>Ito, Y.</u>, Mikawa, T. & Smith, B. O. "In-cell NMR of intrinsically disordered proteins: Prokaryotic cells". <i>Methods. Mol. Biol.</i> 895, 19-31 (2012). 5. <u>伊藤 隆</u>, 濱津 順平, 池谷 鉄兵, 「蛋白質機能における構造—ダイナミクス—安定性の関係: In-cell NMR からわかること」 <i>生物物理</i> 53, 76-81 (2013) <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 26 件</p>	<p>専門家向け 計 25 件 (末尾に*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> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>伊藤 隆</u>, 「In-cell NMR 法による細胞内分子動態解析」, 学振 167 委員会第 66 回研究会, 東京, H24 年 4 月 19 日, 主催: 学振 167 委員会* 2. <u>Ito, Y.</u> "Cellular structural biology by NMR", Viiki Monday Lectures, Biocenter, University of Helsinki, H24 年 5 月 14 日, 主催: University of Helsinki* 3. <u>Ito, Y.</u> "Applications of nonlinear sampling and maximum entropy processing to problematic protein samples", Structure Biology Seminar, Biocenter, University of Helsinki, H24 年 5 月 15 日, 主催: University of Helsinki* 4. Hamatsu, J., Nietlispach, D., Mishima, M., Ikeya, T., Shirakawa, M., & <u>Ito, Y.</u>, "Structural and dynamic studies of protein in living cells by in-cell NMR spectroscopy", Molecular Crowding 2012: Chemistry and Physics meet Biology, Ascona, Switzerland, H24 年 6 月 10-14 日* 5. 池谷鉄兵, <u>伊藤 隆</u>, Peter Guentert, 「最新 NMR 構造決定法」, NMR discussion in KYOTO 2012 July, 京都, H24 年 7 月 27 日 6. Hamatsu, J., Nietlispach, D., Hembram, D.S.S., Mishima, M., Ikeya, T., Shirakawa, M. & <u>Ito, Y.</u> "Structural and dynamic studies of protein in living cells by in-cell NMR spectroscopy", XXV ICMRBS, Lyon, France, H24 年 8 月 19-24 日* 7. Inomata, K., Murayama, S., Futaki, S., Hiroaki, H., <u>Ito, Y.</u>, Tochio, H. & Shirakawa, M., 「細胞環境下におけるタンパク質の NMR 計測」, 第 50 回日本生物物理学会年会, 名古屋, H24 年 9 月 22-24 日, 主催: 日本生物物理学会 8. Kanaba, T., Maesaki, R., Mori, T., <u>Ito, Y.</u>, Hakoshima, T., & Mishima, M., 「Transferred cross-saturation 法を用いた EB1 の CHドメインの微小管との結合界面の特定」, 第 50 回日本生物物理学会年会, 名古屋, H24 年 9 月 22-24 日, 主催: 日本生物物理学会 9. 池谷鉄兵, 山本晃広, 角越和也, 池田思朗, <u>伊藤 隆</u>, 「測定時間を劇的に短縮: Non-Uniform Sampling 法の津々浦々」, 日本分光学会 NMR 分光部会集中講義, 東京, H24 年 10 月 24 日, 主催: 日本分光学会* 10. 池谷鉄兵, 嶋崎真那人, 三島正規, <u>伊藤 隆</u>, Peter Guntert, 「ベイズ法を利用した新規構造計算手法の開発」, 第 51 回 NMR 討論会, 名古屋, H24 年 11 月 8-10 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会 11. 晴被貴洋, 濱津順平, Dambarudhar Shiba Sanker Hembram, 池谷鉄兵, 三島正規, 白川昌宏, <u>伊藤 隆</u>, 「メチル基選択的プロトン標識を用いた HeLa 細胞中の in-cell NMR 解析」, 第 51 回 NMR 討論会, 名古屋, H24 年 11 月 8-10 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会* 12. 秋吉克昂, 金場哲平, 前崎綾子, 宮崎健介, <u>伊藤 隆</u>, 三島正規, 「NMR によるマルチドメインタンパク質 PKC の構造解析」, 第 51 回 NMR 討論会, 名古屋, H24 年 11 月 8-10 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会

	<p>学会</p> <ol style="list-style-type: none"> 13. 濱津順平, 田中 孝, 白井隆弘, 池谷鉄兵, 三島正規, 白川昌宏, <u>伊藤 隆</u>, 「Sf9 細胞の in-cell NMR: シグナル帰属と構造解析の試み」, 第 51 回 NMR 討論会, 名古屋, H24 年 11 月 8-10 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会* 14. 田中 孝, 濱津順平, 清和恵美子, 池谷鉄兵, 三島正規, <u>伊藤 隆</u>, 「Sf9 細胞の in-cell NMR における測定条件の最適化」, 第 51 回 NMR 討論会, 名古屋, H24 年 11 月 8-10 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会* 15. 山本晃広, 池谷鉄兵, 角越和也, 三島正規, <u>伊藤 隆</u>, 「Nonlinear Sampling データに対する複数の信号再構成法の包括的な比較」, 第 51 回 NMR 討論会, 名古屋, H24 年 11 月 8-10 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会 16. 嶋崎真那人, 池谷鉄兵, 三島正規, <u>伊藤 隆</u>, Peter Güntert, 「二面角系分子動力学計算を用いたタンパク質立体構造決定における構造最適化計算法の開発」, 第 51 回 NMR 討論会, 名古屋, H24 年 11 月 8-10 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会 17. 三神すずか, 金場哲平, 小林彩保, <u>伊藤 隆</u>, 三島正規, 「転写抑制因子 SHARP/SMRT 複合体の溶液構造とCK2によるSMRTのリン酸化」, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, H24 年 12 月 12 日, 主催: 日本分子生物学会 18. 金場哲平, 前崎綾子, 森 智之, <u>伊藤 隆</u>, 箱島敏雄, 三島正規, 「溶液 NMR 法を用いた EB1 の自己阻害及び活性化機構の構造研究」, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, H24 年 12 月 11 日, 主催: 日本分子生物学会 19. 秋吉克昂, 金場哲平, 前崎綾子, 宮崎健介, <u>伊藤 隆</u>, 三島正規, 「NMR によるマルチドメインタンパク質 Protein kinase C 全長の構造解析」, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, H24 年 12 月 11 日, 主催: 日本分子生物学会 20. 小林彩保, 金場哲平, 三神すずか, <u>伊藤 隆</u>, 三島正規, 「転写抑制補因子複合体 SHARP/SMRT の構造解析」, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, H24 年 12 月 11 日, 主催: 日本分子生物学会 21. 晴被貴洋, Dambarudhar Shiba Sankar Hembram, 濱津順平, 池谷鉄兵, 三島正規, 白川昌宏, <u>伊藤 隆</u>, 「メチル基選択的プロトン標識を用いた HeLa 細胞中の in-cell NMR 解析」, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, H24 年 12 月 13 日, 主催: 日本分子生物学会* 22. Hembram, D.S.S., Hamatsu, J., Haremake, T., Oonishi, K., Shirakawa, M., Ikeya, T., Mishima, M. & <u>Ito, Y.</u>, "Multi-dimentional In-cell NMR Spectroscopy of Proteins in Hela Cells", 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, H24 年 12 月 14 日, 主催: 日本分子生物学会* 23. <u>Ito, Y.</u>, "Cellular structural biology by NMR", 4th France-Japan Seminar, 播磨, H25 年 1 月 8 日* 24. Ikeya, T., Shimazaki, M., <u>Ito, Y.</u>, Güntert, P., "Bayesian-based protein structure refinement", RRR workshop 2013, 大阪, H25 年 1 月 31 日-2 月 1 日 25. <u>伊藤 隆</u>, 「生理的条件における NMR 解析」, よこはま NMR 構造生物学研究会 第 46 回ワークショップ「NMR の 10 年後」, 横浜, H25 年 3 月 22 日, 主催: よこはま NMR 構造生物学研究会* <p>一般向け 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>伊藤 隆</u>, 「細胞の中の蛋白質の「姿と動き」を見る」, 首都大学東京・オープンユニバーシティ PRI シリーズ, 東京, H25 年 2 月 20 日
<p>図 書</p> <p>計 0 件</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>「細胞の中の蛋白質の「姿と動き」を見る」, H25 年 2 月 20 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>

様式19 別紙1

新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

特になし.

実施状況報告書(平成24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	33,750,000	35,300,000	0
間接経費	32,400,000	11,685,000	10,125,000	10,590,000	0
合計	140,400,000	50,635,000	43,875,000	45,890,000	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	0	33,750,000	0	33,750,000	33,750,000	0	0
間接経費	0	10,125,000	0	10,125,000	10,125,000	0	0
合計	0	43,875,000	0	43,875,000	43,875,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	24,549,507	600MHz超高感度NMRプローブ, 実験試薬等
旅費	11,970	共同研究先(理化学研究所)への交通費
謝金・人件費等	8,848,596	博士研究員, 技術員人件費
その他	339,927	実験機器の保守, 試薬合成
直接経費計	33,750,000	
間接経費計	10,125,000	
合計	43,875,000	

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超高感度 NMRプローブ	Bruker社, TCl型600MHz 超高感度NMRプローブ	1	19,950,000	19,950,000	2012/11/15	首都大学東京
				0		
				0		