

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 25 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。

H25 年度は計画の最終年度であり、これまで開発してきた要素技術の高度化・最適化を収束させつつ、今後の応用研究への展開を模索することを目的とした。特に、世界初となる真核細胞内蛋白質の立体構造決定と、ランタノイド結合プローブを用いた新しい構造解析法の確立も目指した。また、細胞内環境が IDP の動的平衡に与える影響の詳細な解析や、蛋白質間相互作用の観測法の開発も行うこととした。

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の蛋白質安定性への影響, (iv) 蛋白質・蛋白質, 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た。

H25 年度は, (i) では世界初となる真核細胞内蛋白質の立体構造決定に挑戦した。これまで開発してきた要素技術(安定同位体標識技術, NMR 試料管への培地供給システム, 迅速な NMR 測定法, 新しいデータ処理法, バイズ推定を用いた立体構造解析法)を結集した結果, まだ精密化が必要ではあるが, sf9 内の GB1 蛋白質の精密な立体構造の算出に成功した(図 1)。また, DOTA 骨格を持つ新規ランタノイド結合分子プローブの合成にも成功した(図 2)。このプローブを用いることで, 細胞内の還元的な環境下で常磁性効果による長距離の立体構造情報の取得が可能になり, これまで不可能だった細胞内濃度の低い蛋白質の立体構造解析に道を開いた。(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であり, 細胞内環境で変性状態のスペクトルに変化)について, 試験管内, クラウディング剤存在下, 大腸菌・HeLa 細胞中で解析を行い, 細胞内環境が構造の平衡に与える影響を詳細に分析した。(iii) では, sf9 の系および HeLa 細胞の系を用いて, 真核細胞内蛋白質の蛋白質主鎖のダイナミクス解析に挑戦した。(iv) では, Ras およびこれと相互作用する RGL-RBD 等を用い, 電気穿孔法と膜透過ペプチドの 2 種の蛋白質導入による蛋白質間相互作用解析の系の確立を行った。

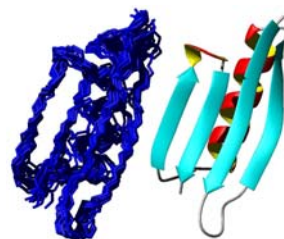


図 1. 真核細胞中の蛋白質としては世界初の, Sf9 細胞中の GB1 の立体構造。

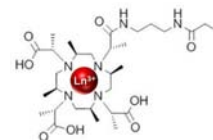


図 2. In-cell NMR のための新しい DOTA-M8 化合物

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. Wang, W., Uzawa, T., Tochio, N., Hamatsu, J., Hirano, Y., Tada, S., Saneyoshi, H., Kigawa, T., Hayashi, N., <u>Ito, Y.</u>, Tajji, M., Aigaki, T. & Ito, Y. "A fluorogenic peptide probe developed by <i>in vitro</i> selection using tRNA carrying a fluorogenic amino acid." <i>Chem. Commun.</i> 50, 2962-2964 (2014). 2. Mikami, S., Kanaba, T., Takizawa, N., Kobayashi, A., Maesaki, R., Fujiwara, T., <u>Ito, Y.</u> & Mishima, M. "Structural insights into the recruitment of SMRT by the corepressor SHARP under phosphorylative regulation." <i>Structure</i> 22, 35-46 (2014). 3. Hembram, D.S.S., Haremaki, T., Hamatsu, J., Inoue, J., Kamoshida, H., Ikeya, T., Mishima, M., Mikawa, T., Hayashi, N., Shirakawa, M. & <u>Ito, Y.</u> "An in-cell NMR study of monitoring stress-induced increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in HeLa cells." <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 438, 653-659 (2013). 4. Kobayashi, A., Kanaba, T., Satoh, R., Fujiwara, T., <u>Ito, Y.</u>, Sugiura, R. & Mishima, M. "Structure of the second RRM domain of Nrd1, a fission yeast MAPK target RNA binding protein, and implication for its RNA recognition and regulation." <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 437, 12-17 (2013). 5. 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> 7, 267-270 (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 22 件</p>	<p>専門家向け 計 21 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. 小林彩保, 佐藤亮介, 藤原俊伸, 伊藤 隆, 杉浦麗子, 三島正規, 「RNA 結合蛋白質 Nrd1 の NMR 法による構造解析」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 鳥取, 平成 25 年 6 月 12-14 日, 主催: 日本蛋白質科学会 2. 金場哲平, 秋吉克昂, 前崎綾子, 宮崎健介, 伊藤 隆, 三島正規, 「NMR を用いた溶液中のマルチドメインタンパク質 PKC の構造解析の試み」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会鳥取, 平成 25 年 6 月 12-14 日, 主催: 日本蛋白質科学会 3. <u>Ito, Y.</u> "Cellular (in vivo) structural biology by NMR", Seminar at School of Cancer Sciences, University of Birmingham, バーミンガム(英国), 平成 25 年 7 月 30 日, 主催: University of Birmingham* 4. Tanaka, T., Hamatsu, J., Seiwa, E., Ikeya, T., Masaki, M. & <u>Ito, Y.</u>, "Structural analysis of proteins inside living sf9 cells by in-cell NMR spectroscopy", 5th Asia-Pacific NMR Symposium, ブリスベーン(オーストラリア), 平成 25 年 10 月 27-31 日* 5. 角越和也, 池谷鉄兵, 伊藤 隆, 清水 謙多郎, 「圧縮センシングを用いた NMR スペクトルの復元法」, 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都, 平成 25 年 10 月 28-30 日, 主催: 日本生物物理学会* 6. 嶋崎真那人, 池谷鉄兵, 三島正規, 伊藤 隆, Peter Güntert, 「NMR タンパク質立体構造決定のための新規構造最適化法の開発」, 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都, 平成 25 年 10 月 28-30 日, 主催: 日本生物物理学会* 7. 小林彩保, 佐藤亮介, 藤原俊伸, 杉浦麗子, 伊藤 隆, 三島正規, 「分裂酵母由来の MAP キナーゼによりリン酸化される RNA 結合タンパク質 Nrd1 の構造解析」, 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都, 平成 25 年 10 月 28-30 日, 主催: 日本生物物理学会 8. <u>Ito, Y.</u>, "In situ observation of protein structure and dynamics by in-cell NMR", Workshop on Modeling Biomolecular Systems in Cellular Environments, 京都, 平成 25 年 11 月 1 日* 9. 鴨志田一, 晴被貴洋, 濱津順平, 井上 仁, 池谷鉄兵, 三島正規, 白川昌宏, 伊藤 隆, 「In-cell NMR を用いた, HeLa 細胞内のストレス応答による Ca²⁺濃度変化のモニタリング」, 第 52 回 NMR 討論会, 金沢, 平成 25 年 11 月 12-14 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会* 10. 田中 孝, 浜津順平, 清和恵美子, 池谷鉄兵, 三島正規, 伊藤 隆, 「Sf9 細胞の in-cell NMR におけるアミノ酸選択的安定同位体標識」, 第 52 回 NMR 討論会, 金沢, 平成 25 年 11 月 12-14 日, 主催: 日本

様式19 別紙1

	<p>核磁気共鳴学会*</p> <ol style="list-style-type: none"> 11. 嶋崎真那人, 池谷鉄兵, 三島正規, 伊藤 隆, Peter Güntert, 「NMR 蛋白質立体構造決定のための新規構造最適化法の開発」, 第 52 回 NMR 討論会, 金沢, 平成 25 年 11 月 12-14 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会* 12. 小林彩保, 佐藤亮介, 藤原俊伸, 伊藤 隆, 杉浦麗子, 三島正規, 「MAP キナーゼによりリン酸化される RNA 結合タンパク質 Nrd1 の構造解析」, 第 52 回 NMR 討論会, 金沢, 平成 25 年 11 月 12-14 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会 13. 金場哲平, 矢巻菜央, 秋吉克昂, 前崎綾子, 宮崎健介, 伊藤 隆, 三島正規, 「マルチドメインタンパク質 Protein kinase C の構造解析の試み」, 第 52 回 NMR 討論会, 金沢, 平成 25 年 11 月 12-14 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会 14. 飯沼純弥, 小林彩保, 金場哲平, 伊藤 隆, 三島正規, 「リン酸化された SHARP/SMRT キメラの構造解析」, 第 52 回 NMR 討論会, 金沢, 平成 25 年 11 月 12-14 日, 主催: 日本核磁気共鳴学会 15. 池谷鉄兵, 伊藤 隆, 「NMR による蛋白質分子立体構造解析の高精度化および細胞内計測を目指した CS とベイズ法適用の試み」, 新学術領域 4 班合同ミニワークショップ, 京都, 平成 25 年 11 月 17 日, 主催: 新学術領域研究「スパースモデリングの深化と高次元データ駆動科学の創生」 16. 伊藤 隆, 「Future perspectives on eukaryotic in-cell NMR」, 第 36 回分子生物学会年会(ワークショップを企画), 神戸, 平成 25 年 12 月 5 日, 主催: 日本分子生物学会* 17. 池谷鉄兵, 伊藤 隆, 「In-cell NMR 法を用いた生きた細胞内での天然変性蛋白質の立体構造とダイナミクス」, 新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第 3 回公開シンポジウム, 福岡, 平成 26 年 2 月 27-28 日, 主催: 新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」* 18. 伊藤 隆, 「大腸菌および昆虫細胞を用いた in-cell NMR 試料調製」, In-cell NMR 講習会 2014(講習会を主催), 横浜, 平成 26 年 3 月 18 日* 19. 伊藤 隆, 「迅速な NMR 測定及び処理」, In-cell NMR 講習会 2014(講習会を主催), 横浜, 平成 26 年 3 月 19 日* 20. 伊藤 隆, 「Azara ME & QME での処理」, In-cell NMR 講習会 2014(講習会を主催), 横浜, 平成 26 年 3 月 19 日* 21. 彦根佑哉, 平井 剛, 袖岡幹子, 伊藤 隆, 「In-cell NMR を志向した DOTA-M8 リガンドの合成研究」, 名古屋, 平成 26 年 3 月 28 日, 主催: 日本化学会* <p>一般向け 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 伊藤 隆, 「生きた細胞の中の蛋白質の立体構造やフレキシビリティを「その場観察」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, H26 年 2 月 14 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>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「Cellular structural biology by <i>in situ</i> magnetic resonance spectroscopy」, 平成 25 年 12 月 5 日, 神戸ポートアイランド, 専門家対象, 約 60 名参加. 菅瀬謙治博士(サントリー)と共同で主催. 国内外の研究者に, in-cell NMR および関連分野における最新の研究成果を紹介していただいた. 伊藤自身も最新の成果について報告した. 2. 首都大学東京オープンユニバーシティ, PRI シリーズ, 「生きた細胞の中の蛋白質の立体構造やフレキシビリティを「その場観察」する!」, 平成 26 年 2 月 14 日, 首都大学東京飯田橋キャンパス, 一般対象, 約 20 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. 3. In-cell NMR トレーニングコース 2014, 平成 26 年 3 月 18-19 日, 理化学研究所・横浜研究所, 専門家(企業の研究者含む)対象, 約 40 名参加. 木川隆則博士(理化学研究所), 白川昌宏教授(京都大学)と共同で主催. 本研究の成果である in-cell NMR の最新手法の紹介

様式19 別紙1

	と、細胞や NMR 装置を用いた実演・演習を行った。
新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件	
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

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	72,700,000	35,300,000	0	0
間接経費	32,400,000	21,810,000	10,590,000	0	0
合計	140,400,000	94,510,000	45,890,000	0	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	35,300,000	0	35,300,000	35,300,000	0	0
間接経費	0	10,590,000	0	10,590,000	10,590,000	0	0
合計	0	45,890,000	0	45,890,000	45,890,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	21,367,462	遠心機, 超純水製造機, 安定同位体標識試薬等
旅費	737,120	研究成果発表旅費(NMR討論会)等
謝金・人件費等	9,253,186	博士研究員+技術員人件費, 講演招聘謝金
その他	3,942,232	機器修理, DNA+ペプチド合成委託等
直接経費計	35,300,000	
間接経費計	10,590,000	
合計	45,890,000	

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
高速冷却遠心機 一式	トミー精工 Suprema21, アンゲ ルローター-NA400含 む	1	2,129,400	2,129,400	2013/11/14	首都大学東京
超純水製造装置 一式	ミリポア社 Milli- Q Integral-3Sシス テム	1	2,548,035	2,548,035	2014/1/8	首都大学東京