

生きたヒト細胞内におけるタンパク質の多核多次元 NMR
(京大院工¹, 京大化研², 神戸大医³, 首都大東京⁴)

○朽尾豪人¹, 猪俣晃介¹, 大野(真板)綾子¹, 磯貝信¹,
天野剛志³, 伊藤隆⁴, 廣明秀一³, 二木史郎², 白川昌宏¹

Multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in living human cells

○Hidehito Tochio¹, Kosuke Inomata¹, Ayako Ohno¹, Shin Isogai¹, Takeshi Tenno³,
Yutaka Ito⁴, Hidekazu Hiroaki³, Shiro Futaki², Masahiro Shirakawa¹

¹Graduate School of Engineering, ²Institute for Chemical Research, Kyoto
University, ³Graduate School of Medicine, University of Kobe, ⁴Graduate School of
Sciences and Engineering, Tokyo Metropolitan University

Structure of proteins in live cells is changing dynamically via interactions with other proteins and/or biological molecules. Such structural changes are often closely related to cellular events. Therefore, direct structural analysis of proteins in living cells provides clues to understanding protein functions. Here, we report a new methodology for acquiring multi-dimensional NMR spectra of proteins inside human-derived cultured cells, which enables a direct assessment of protein structure inside the cells.

【序論】

細胞内におけるタンパク質は化学修飾、立体構造変化、タンパク質間相互作用、リガンド結合等をとおして、その「形」を変えつつ機能を発揮している。生体低侵襲的に原子分解能の情報を与える NMR を用いれば、生細胞内でダイナミックに変化するタンパク質の構造情報を得ることが可能である。我々は以前、アフリカツメガエル卵母細胞内におけるタンパク質の状態変化を二次元 ¹H-¹⁵N 相関スペクトルにより検出できることを報告した(参考文献 1)。しかしながら、医学・薬学を含む、より広範な生命科学分野への適用を考えると、マウスやヒトなど高等哺乳動物由来の細胞系での“*In-Cell NMR*”の実現が不可欠である。本研究では、ヒト由来培養細胞中で特定のタンパク質の多核多次元 NMR スペクトルを測定する方法の開発を行なった。

キーワード

培養細胞、*In-Cell NMR*、細胞膜透過性ペプチド

著者ふりがな

とちお ひでひと、いのまた こうすけ、おおの あやこ、いそがい しん、てんの たけし、いとう ゆたか、ひろあき ひでかず、ふたき しろう、しらかわ まさひろ

培養細胞中で特定のタンパク質を ^{15}N 等の安定同位体で標識するためには、同位体を栄養源に含む培地中で培養し、目的タンパク質を発現させる方法が考えられる。しかしながら、ヒト由来培養細胞の場合、培地のコストと現状の NMR 装置の感度を勘案すると、この方法は現実的でない。そこで、あらかじめ同位体標識タンパク質を調製し、これを培養中の細胞内に導入するという方法を採用した。タンパク質導入のための手法としては、遺伝子導入の技術を応用するなど、幾つかの方法が考えられるが、本研究では比較的低コストで実現できる、細胞膜透過性ペプチドを用いることにした。

【実験】

細胞膜透過性ペプチドを共有結合させた ^{15}N 標識タンパク質を調製し、これをヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞内に導入した。導入後の細胞をバッファーに懸濁させ、生きた状態を保ったまま NMR 管に詰めて、 37°C にて 2D ^1H - ^{15}N 相関スペクトルの測定を行なった。測定後、細胞を取り出し、上澄み液及び細胞破砕液の 1D ^1H - $\{^{15}\text{N}\}$ SOFAST-HMQC を測定し、細胞内から外液への漏れが無いことを確認した。また、測定毎に細胞の生存能をトリパンブルー染色で確認した。細胞内局在については、蛍光試薬 Alexa488 でタンパク質を標識後細胞内導入し、共焦点レーザー顕微鏡で確認した。NMR 測定は Bruker 社製の DRX700 (CryoProbe 付き) を使い、データ処理はソフトウェア NMRPipe (F. Delaglio)、AZARA (W. Boucher) を使用し、解析は Sparky (UCSF) で行なった。

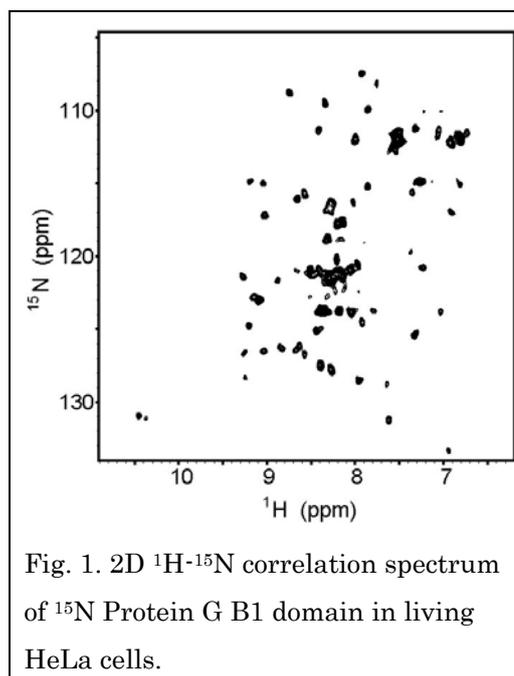


Fig. 1. 2D ^1H - ^{15}N correlation spectrum of ^{15}N Protein G B1 domain in living HeLa cells.

【結果と考察】

Fig. 1に示すように、生きた HeLa 細胞内の ^{15}N 標識タンパク質について、良好な ^1H - ^{15}N 相関スペクトルを得ることに成功した。良好なスペクトルを得るために必要な時間は、タンパク質の種類にもよるが、2~6 時間であった。トリパンブルー染色による判定では、6 時間の測定後でも 95%以上の細胞が生存能を保っていた。以上の結果より、本手法によって、生きたヒト由来培養細胞内でタンパク質の構造解析が可能であることが示された。討論会では、複数種のタンパク質について行なった実験結果をもとに、細胞内タンパク質の相互作用等について議論する。

参考文献 1. Sakai T. et al. *J Biomol NMR.*, **36**, 179-88 (2006).