

In-Cell NMR 法による真核細胞内におけるタンパク質 —タンパク質およびタンパク質—低分子薬剤間相互作用 の観察への試み

¹ 京都大学工学研究科, ²CREST/JST, ³ 神戸大学医学研究科, ⁴ 京都大学化学研究所, ⁵SORST/JST, ⁶ 首都大学東京, ⁷ 理研横浜研究所
○猪股晃介^{1,2}, 大野(真板)綾子¹, 朽尾豪人^{1,2}, 磯貝信¹, 天野剛志^{2,3},
中瀬生彦⁴, 武内敏秀⁴, 二木史朗^{4,5}, 伊藤隆^{2,6}, 廣明秀一^{2,3},
白川昌宏^{1,2,7}

Trial for observation of protein-protein and protein-drug interaction inside eukaryotic cells by
In-Cell NMR

Kohsuke Inomata^{1,2}, Ayako Ohno¹, Hidehito Tochio^{1,2}, Shin Isogai¹, Takeshi Tenno^{3,2},
Ikuhiko Nakase⁴, Toshihide Takeuchi⁴, Shiroh Futaki^{4,5}, Yutaka Ito^{6,2}, Hidekazu Hiroaki^{3,2}, &
Masahiro Shirakawa^{1,2,7}

¹Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University;; ²CREST, JST;; ³Division of Structural Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University;;
⁴Institute for Chemical Research, Kyoto University;; ⁵SORST, JST;; ⁶Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University;; ⁷RIKEN, Yokohama Institute, Suehirocho, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan

In-cell NMR is an isotope-aided multi-dimensional NMR technique that enables observations of conformations and functions of proteins in living cells. This method has been successfully applied to proteins in bacteria. However, application of in-cell NMR to eukaryotic cells is far limited to *Xenopus laevis* oocytes. We will a method to obtain high-resolution two-dimensional heteronuclear NMR spectra of proteins inside living human cells. And we will discuss the potential as the method for observation of protein-protein and protein-drug interaction inside mammalian cells.

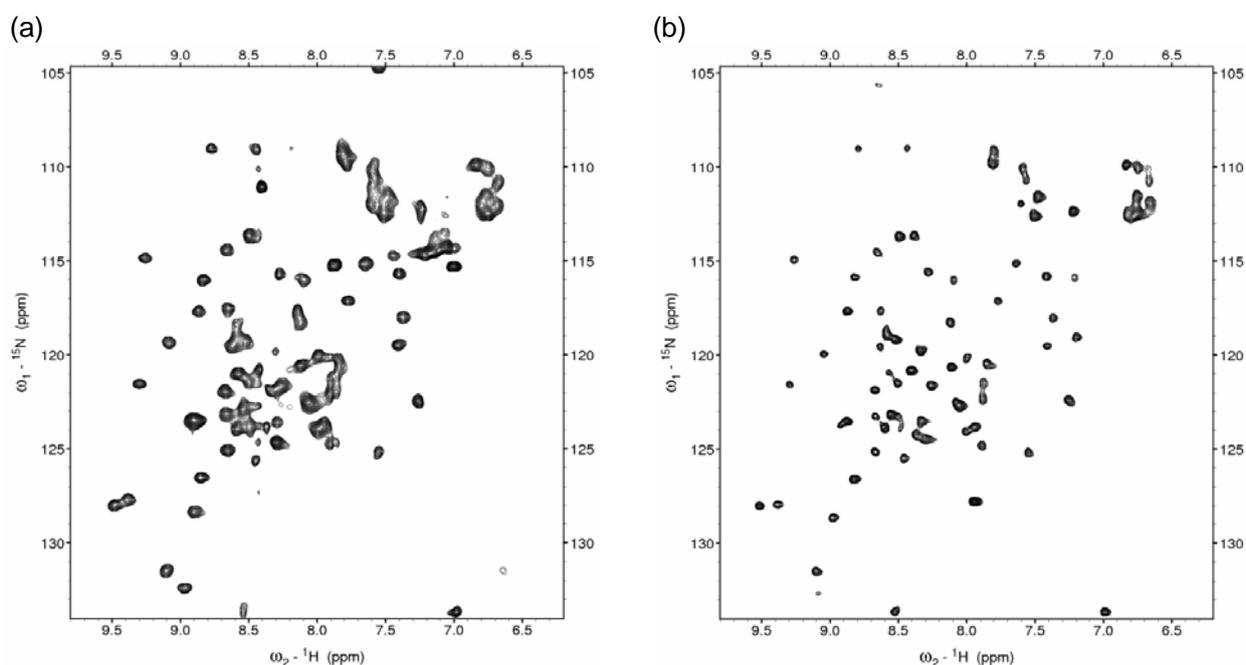
In-Cell NMR 法とは、NMR の生体非侵襲性を活かして、生きた細胞内におけるタンパク質等生体高分子を異種核多次元 NMR 測定するである。それにより、それら生体高分子の動態を選択的に観察・解析することができる。この方法は大腸菌を用いた

In-Cell NMR, 異種核多次元 NMR, 高等哺乳細胞,

いのまた こうすけ, おおの あやこ, とちお ひでひと, いそがい しん, てんの
たけし, なかせ いくひこ, たけうち としひで, ふたき しろう, いたう ゆたか,
ひろあき ひでかず, しらかわ まさひろ

実験系によってまず提案された。大腸菌を用いた In-Cell NMR によって、いくつかのグループが現在までに、生細胞内におけるタンパク質-タンパク質およびタンパク質-低分子リガンド相互作用の検出等の実験を報告している。更にこのような原核細胞での成功に続き、近年我々を含むいくつかのグループが真核細胞の一種であるアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた In-Cell NMR 法の確立がなされた。卵母細胞では大腸菌とは異なり、安定同位体標識されたタンパク質を効率よく発現させることができない。そのため、あらかじめ大腸菌等から大量に発現・精製した、安定同位体標識されたタンパク質をマイクロインジェクション法といった物理的な方法によって卵母細胞の中に注入することによって異種核多次元 NMR 測定を行う。つまり、細胞の体積が大きいアフリカツメガエルの卵母細胞等にしか応用できないという制約がある。

そこで我々は、この In-Cell NMR 法を、上記卵母細胞以外の真核細胞、例えばヒト等の哺乳動物体細胞へ拡張し、その中におけるタンパク質-タンパク質およびタンパク質-低分子薬剤間相互作用等を観察するための方法の開発を行っている。本発表では、In-Cell NMR 法に適用する真核細胞をヒト由来細胞株として、観察したいタンパク質を高効率に細胞内へ導入する方法の検討を行い、細胞内におけるタンパク質の ^1H - ^{15}N 二次元 NMR 測定を行った結果を示すことによって、In-Cell NMR 法によるヒト等の高等動物体細胞内におけるタンパク質-タンパク質およびタンパク質-低分子薬剤間相互作用解析等への応用についての展望を議論する。



Two-dimensional ^1H - ^{15}N correlation spectra of ^{15}N labeled ubiquitin derivative

(a) in-cell NMR

(b) *in vitro*