

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム
(英語)

研究開発課題名： (日本語) 細胞内タンパク質の無侵襲原子レベル立体構造解析技術の開発
(英語) Noninvasive analysis of proteins in living cells

研究開発担当者 (日本語) 京都大学大学院理学研究科 教授 朽尾 豪人
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Professor, Hidehito Tochio

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

疾患に関わる幾つかのタンパク質について in-cell NMR を試行した。In-cell NMR スペクトルの質はタンパク質によって大きく左右され、十分な量の安定同位体標識タンパク質が細胞内に存在していても良好なスペクトルが得られない場合があった。これは、非特異的な相互作用が強かったからだと考えられる。細胞内外で NMR スペクトルが異なるものがあったが、これは細胞内外で構造状態に違いがあることを意味しており、興味を持たれる。また、ドメイン配向を in-cell NMR で調べるために、二つのドメインからなるタンパク質をヒト由来の培養細胞に導入し、その NMR スペクトルを得る条件を検討した。電気穿孔の条件や培養条件などを検討した結果、良好な in-cell NMR スペクトルを得ることができ、当該タンパク質の細胞内での構造に関する情報を得た。これまでの in-cell NMR 実験は培地に懸濁した細胞の測定に限られていたが、接着状態の細胞で in-cell NMR 測定を行う方法を開発した。モデルタンパク質においては、接着状態と懸濁状態でスペクトルに明確な差異が見られ、培養形態に由来する細胞質環境の違いが、内部タンパク質の NMR スペクトルに反映されたものと考えられる。

We performed in-cell NMR experiments on several disease related proteins. The quality of the obtained spectra varied one protein to the next. NMR signals of some proteins were too weak to be detected, even sufficient amount of isotope-labeled proteins existed in the cells. This may be due to extensive non-specific interactions in the cells, which can broaden NMR signals resulting in poor signal to noise ratio. Some proteins showed spectral differences between in-cell and in vitro, reflecting structural variances. A two domain protein was subjected to in-cell NMR experiments to obtain relative domain orientation in the cells. After exploring parameters for electroporation and cell culturing, analyzable in-cell NMR spectra were successfully recorded, which provided us with structural information of the protein in the cells. Although application of in-cell NMR had been thus far limited to cells suspended in culture media, we have developed a novel technique tailored for NMR measurement on adherent cells. The obtained in-cell NMR spectra somewhat differed from those measured in suspended cells. This would reflect different cytosolic states among these two different culturing modes.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 1 件）

1. 五十嵐龍治, 枋尾豪人, 白川昌宏. ナノダイヤモンド NVC を使った新しい生体・細胞計測法. 光技術コンタクト 2016, 54, 3-11.
2. Higashino T, Nakatsuji H, Fukuda R, Okamoto H, Imai H, Matsuda T, Tochio H, Shirakawa M, Tkachenko NV, Hashida M, Murakami T, Imahori H., Hexaphyrin as a Potential Theranostic Dye for Photothermal Therapy and (19) F Magnetic Resonance Imaging., Chembiochem. 2017 Feb 15.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Direct analysis of protein behavior in the cellular environment、口頭、朽尾豪人、蛋白研セミナー「NMR and Beyond」、大阪大学（吹田市）、2016/6/6、国内.
2. Structural study of proinflammatory cytokine Interleukin(IL)-18、口頭、朽尾豪人、第42回内藤コンファレンス、札幌、2016/10/4-7、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

京都大学 ELCAS にて高校生向けの講義を行った。演題「タンパク質の形から生命現象を理解する」朽尾豪人、京都大学吉田キャンパス、2016/10/15.

(4) 特許出願

該当なし。