

バイオリアクター型 in-cell NMR 法の開発と Ras の活性状態の観測への応用

西田 紀貴

1. はじめに

タンパク質の機能解明において、タンパク質の立体構造情報は必須である。これまでに、X線結晶構造解析法や核磁気共鳴 (NMR) 法、それに近年著しい技術革新を遂げたクライオ電子顕微鏡法を用いて、膜タンパク質や巨大タンパク質複合体を含むさまざまなタンパク質の構造決定が行われ、その機能解明が進んできた。また NMR 法ではタンパク質の動的な構造情報や、存在割合の少ない状態の構造解析も可能となるなど、タンパク質の立体構造解析技術は成熟期を迎えており、誰もが手軽にタンパク質の立体構造情報を得ることができるようになった。

しかし、タンパク質が実際に機能する細胞内環境に目を向けると、細胞内は多種多様なタンパク質が 200~400 mg/mL もの高濃度で存在する分子混雑 (molecular crowding) 環境であり、通常の構造生物学的解析が行われる希薄溶液中 (*in vitro*) とは大きな違いがある。したがって、*in vitro* で計測されたタンパク質の構造や活性は、はたして細胞内でも同じと考えてよいのだろうか? という疑問があった。DNA ポリメラーゼに関する研究でノーベル化学賞を受賞したアーサー・コンバーグ博士が晩年著した生化学十戒 (Ten Commandments)¹⁾ の一つに molecular crowding があげられており、細胞内がきわめて高密度環境であり、細胞破碎液を調製する際には何十倍にも希釈されることの影響に対して注意すべきと述べられている。

このような分子混雑環境下で生じる代表的な影響として、排除体積効果 (excluded volume effect) がある。タンパク質などの生体高分子が混みあって存在する空間では、他の分子が占有できる体積が制限される。このような条件では、体積がコンパクトな状態の方が熱力学的に有利とな

るため、たとえばフォールド-アンフォールド状態の平衡にあるタンパク質ではフォールド状態 (アンフォールド状態よりも体積が小さい) が安定化し、結合解離の平衡にあるタンパク質では複合体状態 (解離状態よりも体積が小さい) が促進すると考えられる。実際に、分子クラウダーと呼ばれる高濃度の可溶性タンパク質 (たとえばウシ血清アルブミン) や高分子ポリマー (たとえばポリエチレングリコールや Ficoll など) の存在下においては、希薄溶液中よりも α シヌクレインの凝集速度の上昇²⁾ や、DNA ポリメラーゼを構成するサブユニット間の親和性の上昇³⁾ が観測されている。一方、FRET プローブを用いて実際の細胞内における分子のコンパクトさを調べた実験では、クラウダーを用いた再構成系とは異なり、細胞内ではより伸びた構造をとることが示されている⁴⁾。これは細胞内では排除体積効果の他にも、内在性分子との非特異的相互作用や、バルク水の減少による水和状態の変化、粘性の増大などによっても、タンパク質の構造が影響を受けることを示している。したがって、細胞内環境を *in vitro* で再現することは困難であり、タンパク質の真の機能を明らかにするためには実際の細胞内での解析が必要であることを示している。

このような細胞内環境下におけるタンパク質の構造を調べる手法として、細胞内に導入した安定同位体標識タンパク質の NMR シグナルを直接観測する in-cell NMR 法がある。NMR 法で用いるラジオ波は細胞に対して非侵襲的であり、生きた細胞内におけるタンパク質の構造情報を直接観測することができる。in-cell NMR 法は細胞内の特定のタンパク質の高分解能スペクトルを観測する手法であり、主に代謝物などのシグナルを観測する *in vivo* NMR とは区別される。本稿では、特に哺乳細胞を用いた in-cell NMR 法の手法開発と、それを用いた細胞内現象のリアルタイム観測法について概説する。参考文献については、スペースの都合上こちらの総説も参考にされたい⁵⁾。

2. in-cell NMR 観測のための安定同位体標識タンパク質の導入法

in-cell NMR 観測のためには、安定同位体標識した標的タンパク質を細胞内に導入する必要がある。2001 年に報告された最初の in-cell NMR 観測例では、¹⁵N 標識培地で培

千葉大学大学院薬学研究院 (〒260-8675 千葉県千葉市中央区
亥鼻 1-8-1)

Development of in-cell NMR bioreactor system for real-time monitoring of the activation status of Ras

Noritaka Nishida (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930819

© 2021 公益社団法人日本生化学会

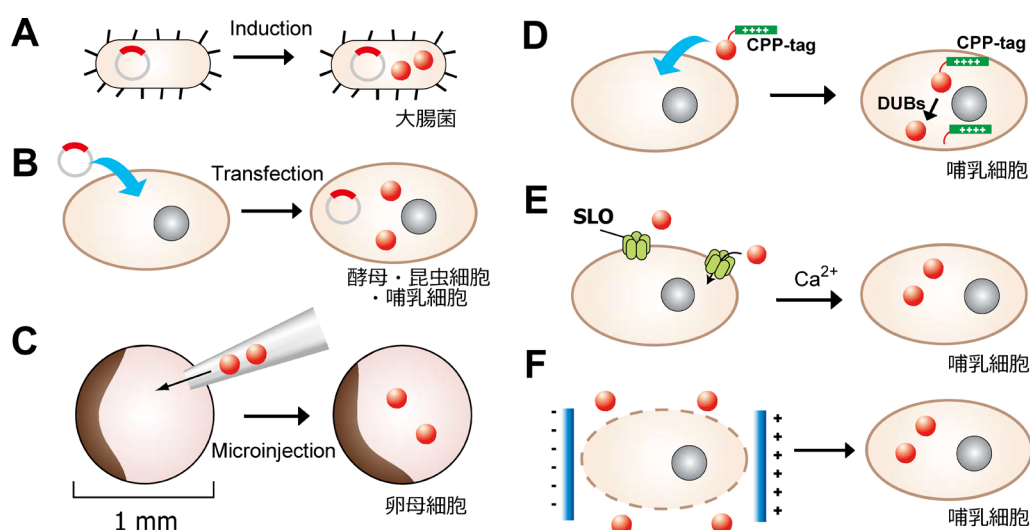


図1 in-cell NMR 観測のためのタンパク質導入法
(A)大腸菌および(B)各種真核細胞内の大量発現. (C)マイクロインジェクション法による卵母細胞への導入. (D) CPP タグを付加した標的タンパク質の導入. (E) SLO によるポア形成と膜修復 (リシール) を利用した導入法. (F) エレクトロポレーション法を用いた導入法. (Nishida, N., Ito, Y., & Shimada, I. (2020) *In situ* structural biology using in-cell NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1864**, 129364⁵⁾ より一部改変)

養した大腸菌内に大量発現させた金属結合タンパク質のスペクトルの観測が行われた⁶⁾ (図1A). 大腸菌は比較的容易に観測対象タンパク質の大量発現を行うことができるため、この方法を用いることで大腸菌内におけるタンパク質の立体構造決定や相互作用解析などが行われた。その後、酵母や昆虫細胞、哺乳細胞などにおいても安定同位体標識培地中で発現させることで、標的タンパク質のNMRシグナルを観測できることが報告された (図1B)。一方で、この方法では細胞内のすべてのタンパク質が安定同位体標識されるため、標的タンパク質以外のタンパク質に由来するバックグラウンドシグナルが観測の妨げとなる。

そこで安定同位体標識したタンパク質を細胞外から導入する方法が考案された。アフリカツメガエルの卵母細胞のように直径が大きい (約1mm) 細胞については、マイクロインジェクション法によって標識タンパク質や核酸を注入することができる (図1C)。また哺乳細胞にも適用可能な手法として、標的タンパク質に膜透過ペプチド (cell penetrating peptide: CPP) を融合し、細胞内へ直接取り込ませるといった方法も開発された。ただし、CPPは塩基性が高いため、細胞内で膜に集積してNMRシグナルの観測が困難となる。そこで、CPPにユビキチン (Ub) を融合し、さらにそのC末端に標的タンパク質を連結させることで、細胞内の脱ユビキチン化酵素 (DUB) によって標的タンパク質をCPPから切り離すといった工夫が必要である⁷⁾ (図1D)。このようなタンパク質へのタグ修飾を必要としない手法として、細胞膜の表面に可逆的なポアを形成する Streptolysin O (SLO) を用いてタンパク質を導入し、

その後Ca²⁺添加によりリシールする方法が開発されている⁸⁾ (図1E)。SLOが形成するポアの直径は35nm程度であり、150kDa程度の大きさのタンパク質が導入可能である。また、エレクトロポレーション (電気穿孔法) を用いて、SLO法と同様に細胞膜を一過的に透過性にすることで標識タンパク質を導入する手法も開発されている (図1F)。

in-cell NMR観測のためには、細胞内に少なくとも数十μM程度の濃度の安定同位体標識タンパク質を導入することが必要である。細胞内では高い粘性のために回転相関時間が増大してNMRシグナルの線幅が広幅化するため、測定感度の点では*in vitro*と比べて大きく劣る。このように¹⁵N標識タンパク質での観測が難しい場合は、分子量の増大の影響を受けにくい側鎖メチル基を観測するメチルTROSY (transverse relaxation-optimized spectroscopy) 法の利用が有効である。また、天然変性タンパク質 (intrinsically disordered protein: IDP) は球状タンパク質と比べて細胞内の粘性の増大の影響を受けにくく、比較的感度よくシグナルを検出することができる。

3. バイオリアクター装置の開発

in-cell NMR法では、通常NMRサンプル管内に10⁷個程度の数の細胞を充填して測定を行う。しかし、当然ではあるが、このような条件ではNMRサンプル管内で栄養源や酸素が枯渇して細胞内環境が劣化し、細胞死が生じる。特に問題となるのは、死細胞から漏出したタンパク質は細胞内タンパク質と比べて先鋭なシグナルを与えるため、細胞

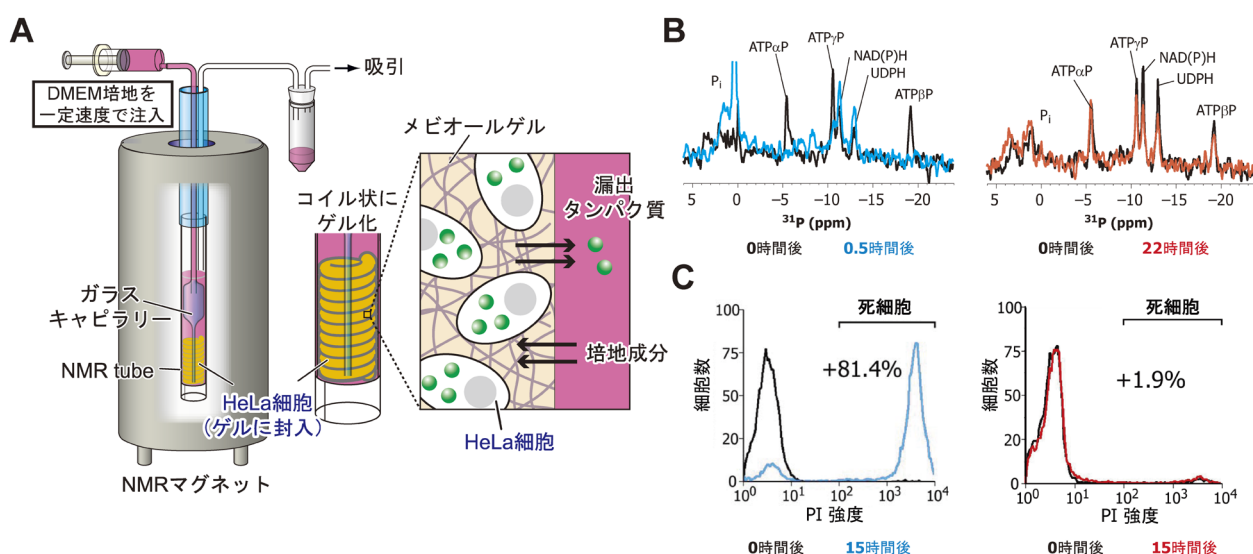


図2 in-cell NMR測定中の細胞を生理的に保つバイオリアクター装置

(A) バイオリアクター装置の概略図. (B) ^{31}P NMRによる細胞内ATP濃度の経時変化の観測 (C) in-cell NMR測定前後の死細胞割合の変化. 左は懸濁液をそのまま測定, 右はバイオリアクターで培地を灌流して測定した場合.

内タンパク質の観測の妨げとなる. そのため, 従来の in-cell NMR法ではこのような細胞死が起こるよりも前に測定を終える必要があり, 短時間の観測 (通常2~3時間程度) しか行うことができなかった.

このような問題を解決するため, 我々はNMR測定中の細胞に培地を供給するバイオリアクターシステムを開発した⁹⁾ (図2A). この装置では, 培地灌流下でも細胞をNMR管内の適切な位置に保持するため, 細胞をゲルに包埋しておく必要がある. するために, 温度依存的にゲルを形成するメビオールゲルを用いて, 低温条件で細胞と混合し, パスツールピペットでゆっくりと吐き出しながら温めることでNMRサンプル管内にコイル状のゲルを形成させた. コイル状にすることでゲルの表面積が大きくなり, 培地成分が細胞へ速やかに浸透するとともに, 細胞死によって漏出したタンパク質を速やかに排出することもできる (図2A). 実際に細胞内のATP濃度を ^{31}P NMR測定により調べると, 細胞懸濁液では測定開始30分後には完全に枯渇していた細胞内ATPが, バイオリアクター装置を用いて培地を灌流させた場合は20時間以上にわたって保持されていた (図2B). 測定中の細胞死についても, バイオリアクターで培地を灌流させることで懸濁液中と比較して顕著に抑制されていることがわかった (図2C). 以上より, バイオリアクター装置を用いることで, 細胞内環境を生理的に保持したまま長時間の in-cell NMR観測を行うことが可能となった.

4. 細胞内Rasの活性状態のリアルタイム観測

NMR法では, 短時間のスペクトルを連続的に測定する

ことにより, 酵素反応やタンパク質のフォールディングなどの進行をリアルタイムに追跡することが可能である. バイオリアクター型 in-cell NMRにより長時間のNMR観測が可能となったことで, 細胞内で起こる生命現象をリアルタイム観測することができるようになった. ここではその一例として, 我々が最近解析を行った低分子量GTPase (guanosine triphosphatase) のRasに関する解析結果について紹介する¹⁰⁾.

Rasは代表的な低分子量GTPaseであり, GDP (guanosine diphosphate) が結合した不活性化状態からGTP (guanosine triphosphate) が結合した活性化状態に変換されることで, 受容体型チロシンキナーゼを起点とするシグナル伝達において分子スイッチとして機能する. また, Rasの特定の残基に変異が導入されると恒常的な活性化が引き起こされ, 細胞増殖が亢進してさまざまな種類のがんを引き起こすことが知られている. Rasの活性はGTPの加水分解速度定数 (k_{hy}) と, GDP-GTP交換速度定数 (k_{ex}) によって規定され (図3A), *in vitro*ではNMR法を用いてRasの k_{hy} と k_{ex} をNMRによって測定できる. また k_{hy} と k_{ex} の値から, Rasの活性化の指標であるGTP結合型割合を算出できる (図3B). G12Vなどの発がん性変異体では恒常的な活性化を反映して野生型よりも高いGTP結合型割合を示す. 一方, 野生型Rasについても40%程度がGTP結合型として存在すると算出されており, *in vitro*の測定結果はRasのシグナル伝達依存的に活性化する分子スイッチとしての役割と矛盾するものであった.

そこで実際の細胞内環境下におけるRasの活性を調べるため, in-cell NMRによるリアルタイム観測を行った. RasのIle21の側鎖メチル基は, GTP結合型とGDP結合型で異

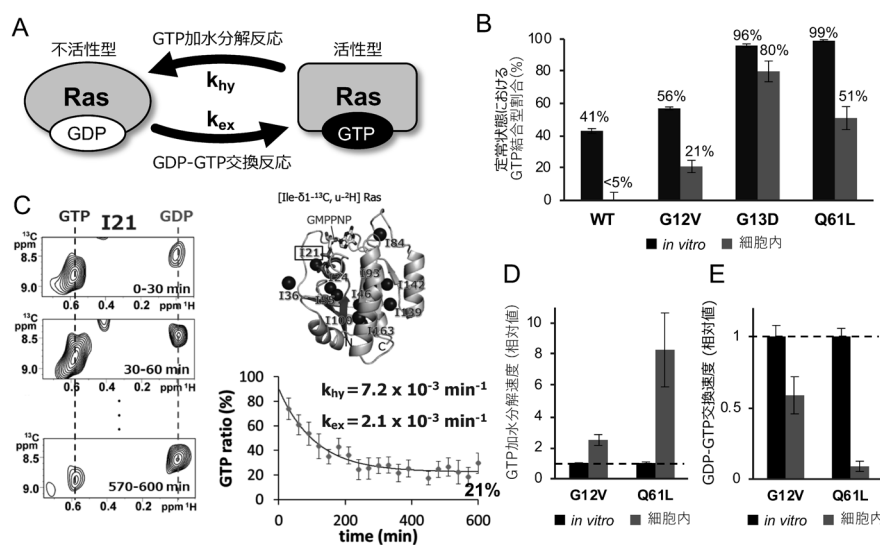


図3 細胞内RasのGTP結合型割合のリアルタイム観測

(A) Rasの活性を規定する二つの反応速度定数。(B) Ras野生型および発がん性変異体のGTP結合型割合の細胞内と*in vitro*の比較。(C) Ile21の側鎖メチル基のNMRシグナルに基づくRas G12V変異体のGTP結合型割合のリアルタイム観測と k_{hy} , k_{ex} の定量。G12VとQ61L変異体について(D) k_{hy} および(E) k_{ex} の細胞内と*in vitro*の比較。

なる化学シフト値を示すため、これらのシグナル強度に基づいてGTP結合型割合を算出できる。HeLa S3細胞にIleメチル標識Ras (GTP結合型)を導入してバイオリアクター装置で培地を灌流しながら1測定30分間のNMR測定を連続的にを行い、RasのGTP型割合の経時変化を観測した。その結果、たとえばG12V変異体では経時的にGTP型割合の減少が観測され、20%程度で定常状態に達した(図3C)。他の発がん性変異体や野生型についても同様の測定を行い*in vitro*の結果と比較すると、いずれの場合も定常状態におけるGTP型割合は*in vitro*よりも低い値を示していた。特筆すべきことに、野生型Rasについてはほぼ完全に不活性型のGDP結合型として存在しており、細胞内で測定した結果はRasの分子スイッチとしての機能を正しく説明するものであった(図3B)。また、G12VやQ61L変異体では細胞内のGTP結合型の経時変化から細胞内における k_{hy} と k_{ex} を算出することも可能であった。*in vitro*と比べて細胞内の k_{hy} は上昇し(図3D)、細胞内の k_{ex} は低下しており(図3E)、これにより細胞内ではGTP結合型割合が減少していることが明らかとなった。このような細胞内における活性の変化を引き起こす要因として、 k_{ex} の低下については分子混雑環境における分子拡散速度の低下が原因であることを突き止めている。また、G12V変異体の k_{hy} の上昇については、細胞内に存在する30~50kDaの未知のタンパク質分子が引き起こしていることを見いだしている。このように、細胞内におけるRasの活性は細胞内環境下特有のさまざまな要因により適切に制御されていることが明らかとなった。

5. おわりに

以上のように、*in-cell* NMR法を用いて細胞内環境下における特定の生命現象をリアルタイムに捉えることができるようになった。本稿では紹介できなかったが、これまでに細胞内におけるリン酸化¹¹⁾、アセチル化など翻訳後修飾の進行^{8,12)}、細胞内環境依存的なタンパク質の安定性¹³⁾など、さまざまな解析例が報告されている。また、バイオリアクター装置で灌流する培地にリガンドや薬剤などを添加することで、細胞に刺激を与えることも可能である。たとえば細胞に酸化ストレスを加えたり、特定のタンパク質の阻害剤を加えたりして、それによって引き起こされる細胞内タンパク質応答の観測も行われている¹⁴⁾。このような方法を用いることで、薬物と標的タンパク質との相互作用を実際の細胞内で観測するというような、新たな創薬ツールとして*in-cell* NMR法が利用されることも期待される。

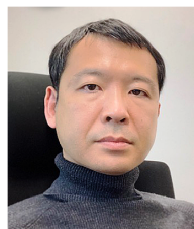
in-cell NMR観測における最大の課題は測定感度であり、現在のリアルタイム観測では1枚のスペクトルの測定に数十分程度の時間を要している。今後、NMR装置の高磁場化や検出プローブの高感度化のようなハードウェア側の進歩に加え、不均一サンプリング法を用いたスペクトル再構成などの測定法や安定同位体標識法などの工夫により、測定感度を向上させることが必要である。単位時間あたりの測定感度を向上させることで、リアルタイム観測の時間分解能を向上させることができるだけでなく、細胞内の特定の環境(たとえば細胞膜や核・ミトコンドリアなどの各種オルガネラ)に局在化した標的タンパク質の*in-cell* NMR観測の実現も期待される。

文 献

- 1) Kornberg, A. (2000) Ten commandments: Lessons from the enzymology of DNA replication. *J. Bacteriol.*, **182**, 3613–3618.
- 2) Munishkina, L.A., Cooper, E.M., Uversky, V.N., & Fink, A.L. (2004) The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation. *J. Mol. Recognit. JMR*, **17**, 456–464.
- 3) Batra, J., Xu, K., Qin, S., & Zhou, H.-X. (2009) Effect of macromolecular crowding on protein binding stability: modest stabilization and significant biological consequences. *Biophys. J.*, **97**, 906–911.
- 4) Gnutt, D., Gao, M., Brylski, O., Heyden, M., & Ebbinghaus, S. (2015) Excluded-Volume Effects in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 2548–2551.
- 5) Nishida, N., Ito, Y., & Shimada, I. (2020) In situ structural biology using in-cell NMR. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.*, **1864**, 129364.
- 6) Serber, Z., Ledwidge, R., Miller, S.M., & Dötsch, V. (2001) Evaluation of parameters critical to observing proteins inside living *Escherichia coli* by in-cell NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8895–8901.
- 7) Inomata, K., Ohno, A., Tochio, H., Isogai, S., Tenno, T., Nakase, I., Takeuchi, T., Futaki, S., Ito, Y., Hiroaki, H., et al. (2009) High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature*, **458**, 106–109.
- 8) Ogino, S., Kubo, S., Umamoto, R., Huang, S., Nishida, N., & Shimada, I. (2009) Observation of NMR signals from proteins introduced into living mammalian cells by reversible membrane permeabilization using a pore-forming toxin, streptolysin O. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10834–10835.
- 9) Kubo, S., Nishida, N., Udagawa, Y., Takarada, O., Ogino, S., & Shimada, I. (2012) A gel-encapsulated bioreactor system for NMR studies of protein-protein interactions in living mammalian cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 1208–1211.
- 10) Zhao, Q., Fujimiya, R., Kubo, S., Marshall, C.B., Ikura, M., Shimada, I., & Nishida, N. (2020) Real-time in-cell NMR reveals the intracellular modulation of GTP-bound levels of RAS. *Cell Rep.*, **32**, 108074.
- 11) Selenko, P., Frueh, D.P., Elsaesser, S.J., Haas, W., Gygi, S.P., & Wagner, G. (2008) In situ observation of protein phosphorylation by high-resolution NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 321–329.
- 12) Theillet, F.-X., Binolfi, A., Bekei, B., Martorana, A., Rose, H.M., Stuver, M., Verzini, S., Lorenz, D., van Rossum, M., Goldfarb, D., et al. (2016) Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature*, **530**, 45–50.
- 13) Inomata, K., Kamoshida, H., Ikari, M., Ito, Y., & Kigawa, T. (2017) Impact of cellular health conditions on the protein folding state in mammalian cells. *Chem. Commun. (Camb.)*, **53**, 11245–11248.
- 14) Mochizuki, A., Saso, A., Zhao, Q., Kubo, S., Nishida, N., & Shimada, I. (2018) Balanced regulation of redox status of intracellular thioredoxin revealed by in-cell NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 3784–3790.

著者寸描

●西田 紀貴 (にしだ のりたか)



千葉大学大学院薬学研究院教授。博士(薬学)。

■略歴 1999年東京大学薬学部卒業。2004年同大学院薬学系研究科博士課程修了。同年Harvard Medical School博士研究員。07年東京大学大学院薬学系研究科助教。16年より准教授を経て、19年より現職。