

大学院教育支援機構（DoGS）海外渡航助成金 報告書

Outcome report

計画名 Plan	天然変性タンパク質 TIA-1 の in-cell NMR 技術の確立
氏名 Name	小林凌河
研究科・専攻・学年 Graduate school/Division/Year level	理学研究科 生物科学専攻 修士課程 2 回生
渡航国 Country	スウェーデン
渡航日程 Travel schedule	2024 年 2 月 5 日 ~ 2024 年 2 月 26 日

- ページ数に制限はありません。No limits on the number of pages
- 写真や図なども組み込んでいただいて結構です。You can include pictures or illustrations.
- 各項目について具体的に記述してください。Please fill in each item specifically.
- 日本語または英語で記載ください。Please use Japanese or English.

渡航計画の概要 Outline of the travel plan

タンパク質は溶液中で絶えず運動しており、そのダイナミックな動態がその機能を果たすうえで重要である。そうしたタンパク質の運動をとらえることが可能な手法が核磁気共鳴法 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) である。しかし、希薄な試料溶液と細胞内環境では、他分子との相互作用や分子同士の混み合いによってタンパク質の置かれる状態が異なることが多くの研究で指摘されてきた。そこで、細胞試料を用いて動態を観測する「in-cell NMR 法」が、タンパク質の実相を調べるために有用と考えられている。

本渡航では、天然変性タンパク質 T-cell intracellular antigen-1 (TIA-1) の細胞内動態を解明するために、本タンパク質を対象とする in-cell NMR 法の修得、確立を目指した。TIA-1 は筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) に関わる可能性があり、その細胞内動態の解明は当疾患の発症機構に関する情報を与える可能性がある。渡航先はストックホルム大学アレニウス研究所とし、受け入れ研究室 (Oliveberg lab) は本技術に関する蓄積がある。さらに、当研究室は主要な ALS 関連タンパク質である Superoxide Dismutase1 (SOD1) の物性を長年研究してきたため、本渡航では研究者との議論を通じて ALS 発症の分子メカニズムに関する考察を深めることも目指した。

成果 Outcome

本研究では、TIA-1 N 末端領域の ^{15}N , ^{13}C 標識リコンビナントタンパク質を試料として実験を行った。当領域は TIA-1 のタンパク質間相互作用に重要であると考えられており、決まった立体構造を持たない天然変性領域 (IDR) である。

初めに、細胞内環境との比較用に希薄溶液を作成した。試料を 50mM MES pH 6.5, 150mM NaCl, 1mM DTT, 5% D₂O からなる溶媒に終濃度 500 μM になるように溶かし、Bruker 600MHz 装置を用いて 298K における ^{15}N -HSQC を測定した。ただし自己凝集性が強かったため、タンパク質間の弱い疎水性相互作用を阻害する効果を持つ 1,6-Hexanediol を添加することで自己凝集を抑制し、測定を行った。その結果、各アミド基由来の NMR シグナルを得ることに成功した。

次に、in-cell NMR の準備実験として、細胞破碎液を用いた NMR 測定を行った。ヒト細胞は凝集性が高く、良い条件の試料を用意できなかったため大腸菌 (BL-21) 破碎液を用いた。1.5g の大腸菌を希薄溶液と同様の溶媒に溶解し超音波で破碎し、当濃度になるように TIA-1 IDR を破碎液に添加し ^{15}N -HSQC を測定した。その結果、主鎖由来のシグナルを得ることはできたもののほとんどのピークは消失していた。こうしたシグナルの減弱は in-cell NMR で頻発する問題

であり、細胞に豊富に含まれるリボソームとの不特定な相互作用によると考えられた。

生細胞では破碎液と比べて生体高分子がより高密度であるため、破碎液でシグナルが得られなかった試料を対象とする in-cell NMR は困難だと考えられる。そのため、より詳細な発現条件や測定条件の検討を要すると想定され、期間内での発現条件や測定条件の確定が困難だと考えられた。そこで帰国後に実験を継続するために、in-cell NMR 実験で使用されたことのある標準的な TTHA タンパク質を用いて in-cell NMR の実験手技習得を試みた。TTHA を 15N 標識培地中で大腸菌に発現させ in-cell NMR を行った。今後は、ここで学んだ手法を TIA-1 IDR に応用することを目指す。

今後の展望 Prospects for the future

本渡航では、ヒト細胞における手法の確立には至らなかったものの、大腸菌 NMR で得られた結果や実験条件の検討結果、先駆的研究者からの直接の技術指導による手法の習得は大きな前進である。ヒト細胞と大腸菌では大きな隔たりがあり、大腸菌においても有効なシグナルを得ることは難しかったものの、自己凝集しやすい TIA-1 IDR の NMR 測定が細胞内環境で可能であるという事実は、今後のヒト細胞実験に向けたポジティブな見通しを与えている。そのため、今後は①大腸菌で測定可能な発現条件の検討の継続 ②適切なヒト細胞株を用いた NMR 測定 の段階を踏むことで本テーマ達成に向けて研究を継続する。