

猪股 晃介（特任准教授）（2025 年 10 月 1 日着任）

福富 幸代（事務支援員）

A-1) 専門領域：NMR 分光学，生化学，生物物理学，タンパク質科学

A-2) 研究課題：

- a) In-cell NMR による哺乳動物細胞内におけるタンパク質の拡散解析
- b) 細胞内タンパク質を標的とした室温超編極 NMR 法の確立
- c) クマムシの乾燥耐性に関わるタンパク質 CAHS1 の in-cell NMR 解析

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) In-cell NMR を用いて哺乳動物細胞内におけるタンパク質の並進拡散係数 (D) および回転相関時間 (τ_c) を直接計測し，細胞特有の高粘性・高分子密度環境がこれらの動態に及ぼす影響を定量的に明らかにすることを目的とする研究を進めた。本年度は，細胞内におけるタンパク質の並進・回転拡散を評価するための技術基盤の確立を行なった。モデルタンパク質としてユビキチン変異体 (L8A, I44A, V70A, D77) を，モデル細胞として HeLa 細胞を用いて，in-cell NMR による並進拡散係数 (D) および回転相関時間 (τ_c) の定量を試みた。その結果，並進拡散係数 (D) については希薄溶液中（約 $2.2 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ）と比較して，細胞内ではおよそ $4.9 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ と約 1/4 まで大きく低下することが確認された。一方，回転相関時間 (τ_c) については，希薄溶液中に比べ細胞内では τ_c が増大していることを示唆する初期データが得られているものの，高い定量性を確保することができていない。現在，測定条件や解析パラメータ等を最適化することで解決を試みている。
- b) In-cell NMR の高感度化および計測時間の大幅な短縮を狙った室温超編極 NMR 法の確立を目的とする研究を，スピノ生命科学コア・スピノ細胞生物学研究グループの宮ノ入客員准教授とともに進めた。本年度は，光増感剤を用いる光誘起動的核分極 (Photo-CIDNP) に着目し，LED 光源で室温・溶液条件下にラジカルペアを生成して芳香族アミノ酸残基等の信号を高感度化できる特長を活かしつつ，装置メーカーと共同で「LED 照射 NMR システム」を構築し，バイオリアクター型 in-cell NMR へ接続可能な測定基盤を整備した。その実証として，均一 ^{13}C ， ^{15}N 標識 α シヌクレイン中の Tyr 残基観測で信号感度の 2-3 倍向上を確認した一方，偏極寿命が短いという課題も明確化した。このボトルネックに対し，縦緩和時間 (T_1) の短さを RO-SAIL アミノ酸標識で改善する方針を立て，Photo-CIDNP 感度が 100 倍程度向上すること，さらに HeLa S3 抽出液中でも成立することを示し，細胞内適用へ向けた実行可能性を高めた。
- c) クマムシの乾燥耐性に関与するタンパク質 CAHS1 について，in-cell NMR 解析に向けた予備検討を実施した。使用した細胞はクマムシ由来細胞ではなく HeLa 細胞（ヒト培養細胞）である。これは，①現時点でクマムシの株化細胞が樹立されていないこと，② HeLa 細胞内においても，クマムシ細胞内と同様に乾燥耐性獲得に関連する CAHS1 の凝縮体形成が確認されていること，以上の 2 点を踏まえた選択である。本年度は，in-cell NMR 計測に供する試料調製条件を確立した。さらに，確立した条件下で ^{15}N 標識 CAHS1 を用いた in-cell NMR 測定を試みたところ，in-cell NMR スペクトルでは多くのピークが顕著な線幅増大により消失した。一方，in-cell NMR 実験後に調製した細胞破砕液（破砕に伴い希釈された溶液）の NMR スペクトルでは，多数のピークが検出された。以上の 2 種のスペクトルの比較から，CAHS1 は HeLa 細胞内で高次構造体（あるいは凝集・凝縮体）を形成している可能性が示唆された。この結果は，既報・事前情報とも整合的であり，今後の in-cell NMR 解析の方向性を支持する所見である。

B-8) 大学等での講義, 客員

大阪大学蛋白質研究所, 招へい准教授, 2025年6月–2026年3月.

理化学研究所, 客員研究員, 2026年2月–2027年3月.

C) 研究活動の課題と展望

本年度の課題は, (a)in-cell NMR 拡散解析において並進拡散係数 D の再現性・汎用性を確立するとともに, 回転相関時間 τ_c を高い定量性で評価できる測定・解析条件(パルス系列, 温度制御, フィット手順)の整備を進めること, (b)室温超編極(Photo-CIDNP)で偏極寿命の短さを克服し, in-cell NMR で感度向上と測定時間短縮を両立する実装技術を完成させること, (c)CAHSI で線幅増大により信号が消失する問題に対し, 観測可能な条件設定の確立と測定プロトコル最適化に注力することである。今後は(a)モデル系を複数タンパク質へ拡張しつつ, 同一細胞種内の細胞状態(温度, pH, ATP 枯渇など)変化に伴う動態を定量比較し, 細胞内粘性・相互作用の寄与を切り分ける。(b)RO-SAIL 標識等による T_1 改善を軸に, 抽出液から生細胞へ段階的に実証し, バイオリアクター型 in-cell NMR へ統合し, 再現性検証を強化する。(c)測定後の破碎液解析も併用して解釈を確立し, 乾燥耐性機構の分子像に迫る。