

NMR で迫るヒト生細胞中の核酸分子の挙動と 木質バイオマスの超微細構造

片 平 正 人*

1. はじめに

ライフサイエンスとグリーンサイエンスは、通常かなり異なる研究分野であると捉えられている。しかし私の研究室では、両研究が並行して進行している。両研究を担当している大学院の学生さん達も、研究室のセミナーで自らの研究を互いに発表し合い、議論を重ねている。研究分野が異なる事による壁は、特に感じていないようである。

ライフサイエンス分野の研究としては生命現象の基本的な理解を目指す研究や病気に関連した研究を進めている。またグリーンサイエンス分野の研究としては、バイオマスの有効活用を目指して、バイオマスの分子構造の解析や酵素を用いたバイオマスの有用物質への変換に関する研究を進めている。どちらの研究も、核磁気共鳴 (NMR) 法を主たる武器として用いている。本稿では前者の研究として、ヒトの生きた細胞に導入した核酸分子の NMR スペクトルを取得する事で、生細胞中における核酸分子の構造とダイナミクスを明らかにする研究について紹介する。また後者の研究として、木質バイオマスの新規な分子構造を NMR 法によって解明し、さらにこの分子構造に働き掛ける酵素を活用する事によって、木質バイオマスの有効活用を図る研究について紹介する。

2. インセル (in-cell) NMR 法とは

ヒトの細胞内はタンパク質や核酸等の生体高分子でとても混みあっており (図 1 左)、これら溶質の濃度は 300-400 g/L に達する。一方生体高分子の研究は、通常希薄溶液条件下 (図 1 右) で行

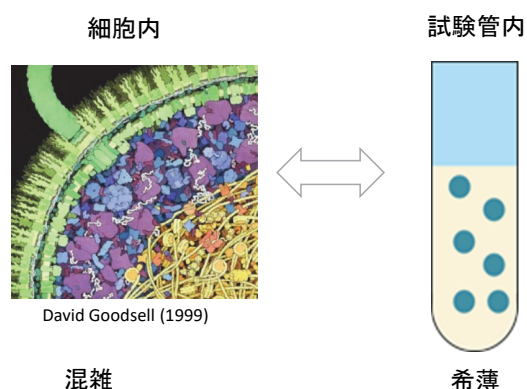


図 1. 細胞内の混雑条件と試験管内の希薄溶液条件の模式図. 左図は David Goodell, 1999, doi: 10.2210/rcsb_pdb/goodsell-gallery-001 より.

われる。細胞内の混雑下と試験管内の希薄条件下では、生体高分子の構造やダイナミクスが異なる可能性が指摘され始めている。インセル (in-cell) NMR 法とは、注目する生体高分子を生細胞に導入し、この NMR スペクトルを測定する事で、生きた細胞中における生体高分子の挙動を直接的に捉える方法である。これまでタンパク質に関しては、ヒト生細胞に導入した試料のインセル NMR スペクトルが報告されてきたが、核酸に関しては報告が無かった。我々は、ヒト生細胞に導入した核酸分子の NMR スペクトルを観測する事に世界で初めて成功した¹²⁾。

3. 核酸分子のヒト生細胞への導入法の確立とバイオリクターシステムの運転

ヒト生細胞としては、HeLa 細胞を用いた。Streptolysin O (SLO) という毒素タンパク質を HeLa 細胞に作用させると、細胞膜に孔が生じる (図 2)。この孔を通して目的の核酸分子を細胞内

*京都大学エネルギー理工学研究所教授

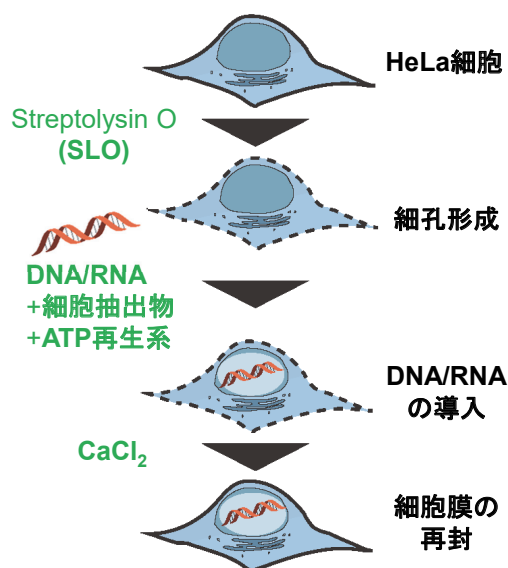


図2. インセル NMR 法の為の試料調製において、ヒト生細胞 (HeLa 細胞) に目的の核酸分子を導入する方法. 毒素タンパク質 Streptolysin O (SLO) によって細胞膜に形成させた孔を通して、目的の核酸を細胞内に導入する. この際に細胞抽出液や ATP 再生系を共存させる事で、良好な導入が達成される. 導入後は、カルシウムを添加して孔を閉じる.

に導入した. この際に細胞抽出液と ATP 再生系を共存させる事で、核酸分子の良好な導入が達成された. その後カルシウムを添加する事で、SLO を細胞から除去して孔を塞ぐ. このようにして、目的の核酸分子を HeLa 細胞に導入する事に成功した (図2).

導入した核酸が、細胞内のどこに存在するのかわかると. 目的の核酸には蛍光性の分子 FAM を取り付けてあり、核酸の位置を知る事ができる (図3左). 一方ヘキストという蛍光性分子を添加すると、細胞の中の核に集まり、核が染まる事が分かっている (図3中央). FAM の像とヘキストの像を重ねると、両者の位置が一致した (図3右). これより、ヒト生細胞に導入した核酸は、細胞内の核に局在する事が分かった.

次に、核酸を導入した生細胞を集めて NMR 用の試料管に詰めた. NMR 試料管内の細胞に対して、栄養に富む培地成分を連側的に供給するバイオリクターシステムを導入した (図4). これによって、NMR 試料管内の細胞の寿命が飛躍的に

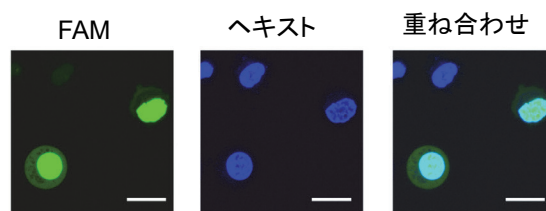


図3. ヒト生細胞に導入した核酸の細胞内局在 (細胞核への局在). 導入した核酸は蛍光性分子 FAM で標識してある. 一方蛍光性分子ヘキストは、細胞核に局在する事が知られている. 白線は 20 μ m. 文献1) より改変.

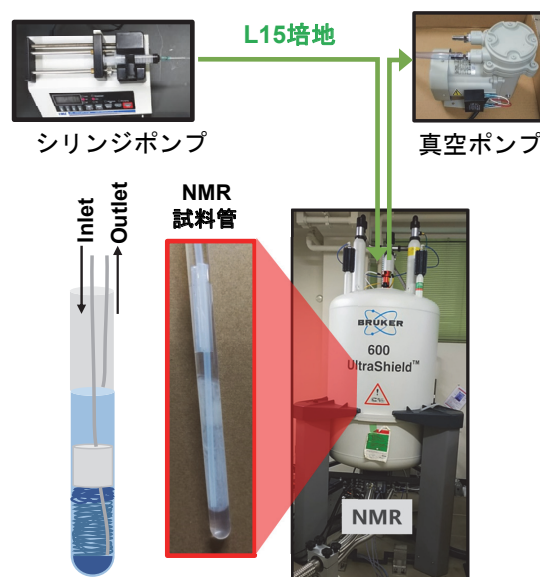


図4. NMR 試料管内のヒト生細胞に新鮮な培地を連側的に供給する事によって細胞の寿命を飛躍的に延ばすバイオリクターシステム.

伸び、NMR スペクトルを長時間測定する事が可能となり、シグナル/ノイズ比 (S/N 比) が高い良好な NMR スペクトルを取得できるようになった³⁾.

4. インセル NMR 法によるヒト生細胞中における 3 重鎖 DNA 構造の形成の直接的な証明

DNA は通常は 2 重鎖構造を形成するが、プリン残基が連続した配列とピリミジン残基が連続した配列があると、3 重鎖構造を形成する事が知られている. プリン鎖 (R) とピリミジン鎖 (灰色の Y) がワトソン=クリック型の塩基対を介した対合によって 2 重鎖を形成し、さらにここにピリミジン鎖 (赤色の Y) がフーグスティン型の塩基対を介して対合する事で 3 重鎖となる (図5). 3

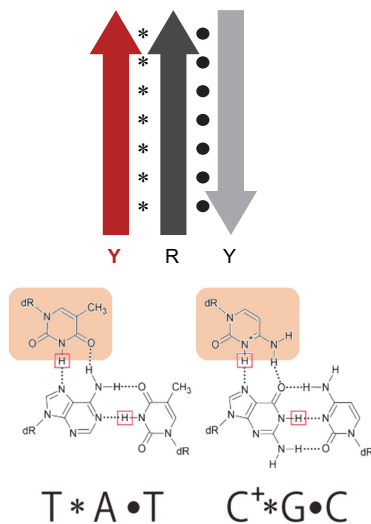


図5. 上：3重鎖核酸構造. プリン鎖 (R) とピリミジン鎖 (灰色のY) がワトソン＝クリック型の塩基対 (●) を介して対合して2重鎖を形成し、ここにさらに別のピリミジン鎖 (赤色のY) がフーグスティン型の塩基対 (*) を介して対合して3重鎖となる. 下：3重鎖におけるワトソン＝クリック型及びフーグスティン型の塩基対.

重鎖を形成する可能性がある配列はゲノム中に数多く存在する. 3重鎖が形成される事で特定の遺伝子の転写が阻害され、この遺伝子に対応したタンパク質が生合成されない事で病気 (フリードリッヒ運動失調症等) が発症する事が示唆されている. 3重鎖構造の形成は、試験管内の希薄溶液条件下では示されてきたが、生細胞中でも形成されるのかは不明であった. そこでインセル NMR 法によって、生細胞中における3重鎖構造の形成

の有無を直接的に検証する事とした.

試験管内の希薄溶液条件下において3重鎖構造を形成する事が分かっている DNA (図6上) を、HeLa 細胞に導入した. この細胞を集めてインセル NMR スペクトルを測定した (図6下の上段のスペクトル). なおここに示したイミノプロトンのスペクトルは、ワトソン＝クリック型及びフーグスティン型の塩基対の形成の有無に関する情報を与え、3重鎖の形成の有無を判断するのに有用である. 参考の為、試験管内希薄溶液条件下で測定した同じ DNA の NMR スペクトルも示す (図6下の下段のスペクトル). 試験管内希薄溶液条件下で観測されたスペクトルに関し、3重鎖に特徴的なピークにオレンジ色の縦線を付した. 同様なピークが、インセル NMR のスペクトルにも存在する事が分かる (該当するピークに同様なオレンジ色の縦線を付してある). これにより、DNA の3重鎖構造が生細胞中において形成される事が、初めて示された³⁾.

上述のように3重鎖 DNA 構造は、病気の原因となっている事が示唆されている. 3重鎖構造を壊す化合物は、病気の治療に役立つ可能性がある. 細胞に各種化合物を作用させ、3重鎖構造が壊れるか否かをインセル NMR スペクトルに基づいて判断する事が可能である. このようにインセル NMR 法は、基本的な生命現象に関する構造学的

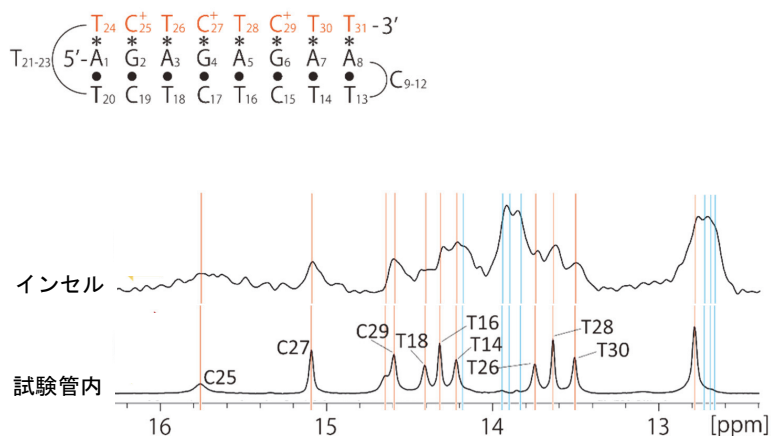


図6. 上：試験管内において3重鎖構造を形成する事が分かっている1本鎖核酸の配列と3重鎖構造の形成スキーム. 下：インセル (上段) 及び試験管内 (下段) における NMR スペクトル. 塩基対様式を敏感に反映するイミノプロトン領域のスペクトルを示してある. 3重鎖構造に特徴的なピークに、残基番号と赤色の縦線を施してある. 文献3) より改変.

な知見を与えると共に、薬剤の開発等にも応用する事ができる。

5. インセル NMR 法による核酸のダイナミクスに関する情報の取得

インセル NMR 法によって、核酸のダイナミクスに関する情報を取得する事も可能である。核酸の塩基対は、水素結合によって対合した閉状態（図7左）と水素結合が切れて対合しなくなった開状態（図7中央）を行ったり来たりするダイナミカルな平衡状態にある。閉状態に比べて開状態の時間は短い、開状態で塩基が露出した時のみ、特定の生体反応が生じる事がある。タンパク質による露出した塩基の特異的な認識や化学修飾等がこれにあたる。従って塩基対の開／開のダイナミクスの実態を知る事は、生命現象の理解に欠かせない。

開状態においては、閉状態で塩基対の水素結合を担っていた塩基のイミノプロトンが露出する為、溶媒の水と化学交換を生じる（図7右）。従って、塩基のイミノプロトンの化学交換の速度 (k_{ex}) を実験的に求める事で、塩基対の開／開のダイナミクスに関する知見を得る事ができる。実際 k_{ex} は、塩基対の開／開の速度定数 k_{close} , k_{open} 及び開状態

におけるイミノプロトンの水との交換速度定数 $k_{ex, open}$ と、図7に示した関係式で結ばれる。従って k_{ex} を実験的に求める事で、塩基の開／開のダイナミクスに関する情報を取得する事ができる。

我々はインセル NMR 法によって、核酸の2重鎖中の各塩基のイミノプロトンに関して、 k_{ex} の値を生細胞中において決定した。また、試験管内希薄溶液条件下においても対応する k_{ex} の値を決定した。その結果生細胞中においては、試験管内希薄溶液条件下よりも k_{ex} の値が総じて大きい事が見出された。この違いが何に由来するのかを解明する為に、細胞内環境をミミックする各種物質を試験管内希薄溶液条件下に添加し、 k_{ex} の値の上昇の有無を調べた。その結果、正の総電荷を有するタンパク質を添加すると k_{ex} の値が上昇する事が分かった。核酸の総電荷が負である事を考慮すると、生細胞中においては核酸とタンパク質の非特異的な相互作用によって、核酸の塩基対が、試験管内希薄溶液条件下に比べて不安定化している事が示唆された。塩基対の不安定化によって溶媒に露出した塩基は、別の特異的なタンパク質によって認識され、核酸が関係した生命現象の発現に関与する事が考えられる。

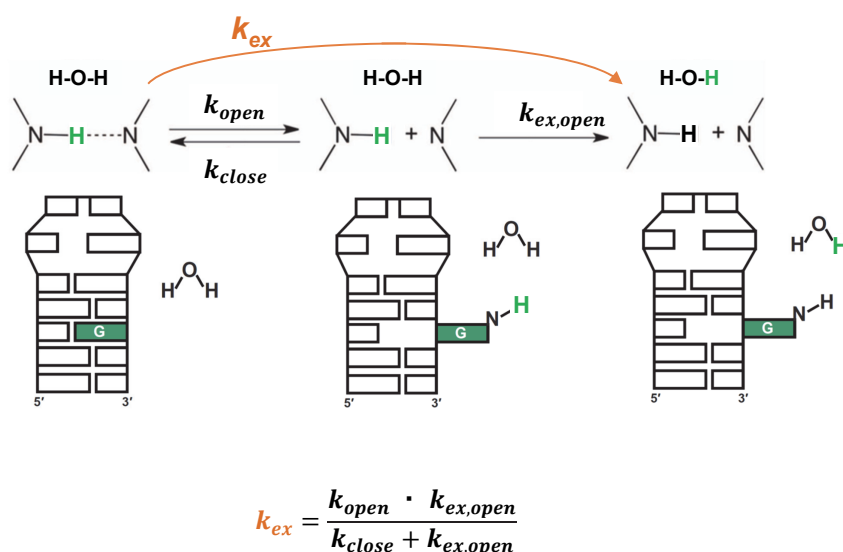


図7. 上段と中段：塩基対の開閉に伴うイミノプロトンと水分子の交換の模式図。下段：イミノプロトンと水分子の交換の速度定数 k_{ex} と、塩基対の開／開の速度定数 k_{close} , k_{open} 及び開状態におけるイミノプロトンの水との交換速度定数 $k_{ex, open}$ の関係式。

6. 木質バイオマスの分子構造の解析に有用な HSQC 及び HMBC スペクトル

次に、NMR 法を用いた木質バイオマスの分子構造の解析について紹介する。この解析において有用なのが、2次元 HSQC スペクトルと HMBC スペクトルである (図 8)。HSQC スペクトルからは、直接結合した炭素と水素の共鳴線の位置に関する情報が得られる。一方 HMBC スペクトルからは、共有結合を 2 個、3 個あるいは 4 個介して結合した炭素と水素の共鳴線の位置に関する情報が得られる。HSQC と HMBC を組み合わせて解析する事で、木質バイオマスの分子構造を決定する事ができる。

7. 木質バイオマスにおける LCC 結合とその超微細構造の NMR 法による決定

木質バイオマスの三大成分は、セルロース、ヘミセルロース及びリグニンである。前二者はバイオエタノール等のバイオエネルギーの原料となり、またセルロースナノファイバー等の素材としても活用されている。一方リグニンは、高付加価値物質の原料としての活用が期待されている。三大成分は非共有結合によって絡みあっている。さらに、ヘミセルロースとリグニンは、LCC (Lignin Carbohydrate Complex) 結合と呼ばれる共有結

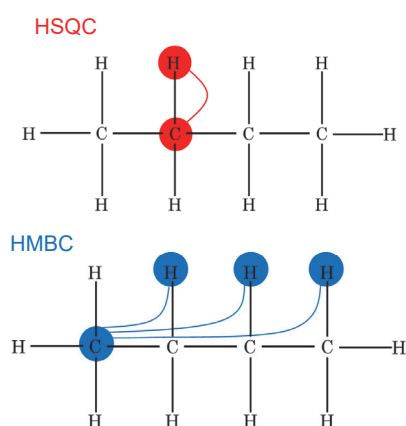


図 8. 2次元 HSQC スペクトルと HMBC スペクトルにおいて観測される炭素と水素の相関ピークの説明。前者では、直接結合した炭素と水素の組に関して相関ピークが生じる。後者では、共有結合を 2 個、3 個あるいは 4 個介して結合した炭素と水素の組に関して相関ピークが生じる。

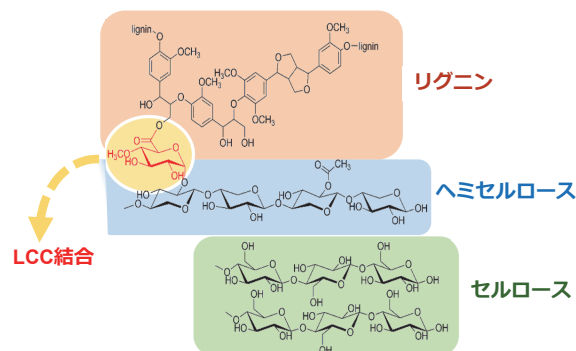


図 9. 木質バイオマスの三大成分セルロース、ヘミセルロース及びリグニンと、ヘミセルロースとリグニンの間の LCC 結合。

合で結ばれている (図 9)。LCC 結合は三大成分の分離・精製を困難にし、木質バイオマスの各成分を有効活用する上で障壁となっている。

LCC 結合が実際にはどのような化学結合であるのかに関しては、予想される化学結合を有するモデル化合物を複数種類合成し、それらの NMR スペクトルを天然の木質バイオマスの NMR スペクトルと比較する事で、推定がなされてきた。しかしこれまで、LCC 結合の実体を直接的に明らかにした研究はなかった。我々は上述の 2次元 HSQC と HMBC スペクトル、さらに 3次元の TOCSY-HSQC スペクトル等を組み合わせた解析によって、エーテル型の LCC 結合の実体を初めて直接的に解明した⁴⁾。その後さらに、エステル型の LCC 結合 (図 9) についても明らかとした (論文投稿中)。このように NMR 法は、木質バイオマスの超微細構造を決定するのに有用である。

8. 異種発現させた酵素を利用した LCC 結合の選択的な切断

LCC 結合を切断する事ができれば、木質バイオマスの三大成分の分離・精製が容易になり、各成分を有効に利活用する事が可能になる。ある種の木材腐朽菌は、我々が分子構造を決定したエステル型の LCC 結合を選択的に切断する酵素であるグルクロノイルエステラーゼ (GE) を有する (図 10 左)。そこで、木材腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* (Cs) の GE 及び *Pleurotus eryngii*

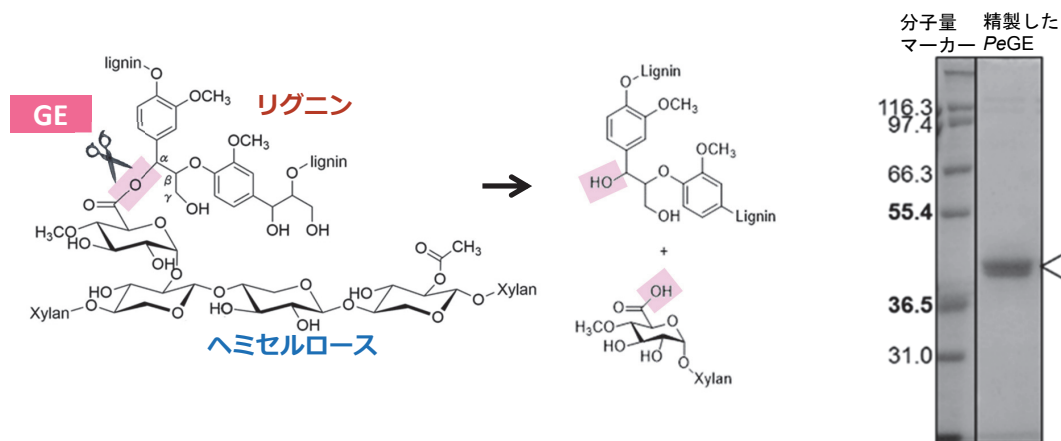


図 10. 左：木材腐朽菌由来のグルクロノイルエステラーゼ(GE)によるエステル型の LCC 結合の切断の模式図. 右：酵母で異種発現した後、各種クロマトグラフィーによって精製して単一標品とした *Pleurotus eryngii* (Pe) (エリンギ) 由来の GE の電気泳動図. 文献 5) より改変.

(Pe) (エリンギ) 由来の GE を酵母を用いて異種発現させ、これらを用いて LCC 結合を切断する事を試みた(図 10 左). 酵母にこれら GE の遺伝子を組み込み、異種発現を行った. 発現した GE を各種クロマトグラフィーを用いて精製した結果、単一標品を得る事に成功した(図 10 右). エステル型の LCC 結合のモデル化合物であるベンジルグルクロン酸を基質として用いて、得られた GE の酵素パラメータを測定した(表 1). その結果、エリンギ由来の GE は、これまでに報告された GE の中で最も高い酵素活性 (k_{cat}/K_m) を有する事が分かった⁵⁾.

異種発現した GE を用いて、天然の木質バイオマス中の LCC 結合を切断する事を現在進行させている. 天然の木質バイオマスの HSQC スペクトル中における LCC 結合に由来するピークが、異種発現させた GE を作用させることで減弱する事が観測されており、GE によって LCC 結合を切断できる事が示唆された. 木質バイオマスの有効活用に繋がる成果であると考えられる.

表 1. GE の酵素反応の速度定数 (文献 5) より改変)

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)
CsGE	55.8	30.6	0.42
PeGE	23.9	150.7	4.38

9. 京大における木質バイオマス研究に関する最近の動向

ーバイオマスプロダクトツリー産学共同研究部門の設置ー

京大における木質バイオマスの研究に関する最近の動向について紹介をする. 京都大学と株式会社ダイセルは、自然と共生する循環型の低炭素社会の実現と新しい産業の創出に貢献することを目指して、京都大学・ダイセル社の包括連携協定を 2021 年 10 月 1 日に締結した⁶⁾. 協定の期間は 8 年半で、2030 年まで続く.

また、京都大学のエネルギー理工学研究所、生存圏研究所、化学研究所、農学研究科、および人間・環境学研究科とダイセルのリサーチセンターは、バイオマスの新しい変換プロセスの開発と持続的循環利用を共通テーマとした基礎研究と研究成果の社会への還元を目指した包括的研究連携協定を同日に締結した.

さらに、本プログラム推進のための拠点として、エネルギー理工学研究所、生存圏研究所、化学研究所、およびダイセル社合同の「バイオマスプロダクトツリー産学共同研究部門」を、宇治キャンパス内に同日に設置した. エネルギー理工学研究所からは、片平のグループが「バイオマスの微細構造の NMR 法による決定と酵素を用いた利活用法の開発」という研究テーマで参画している. ス

ターゲット時のメンバーは16名である。市販のセルラーゼによるセルロースの分解効率を格段に高める酵素の発見とその構造機能相関の研究等の成果が得られつつある⁷⁾。

2021年10月8日に、上記協定と産学共同研究部門設置に関する調印式及び記者発表が、湊長博京都大学総長と株式会社ダイセルの小河義美社長等の出席のもとに行われた。協定の趣旨説明、産学共同研究部門における研究概要の説明等が行われた後、報道各社との活発な質疑応答が行われた。「バイオマスプロダクトツリー産学共同研究部門」の研究の今後の進展が期待される。

10. おわりに

2022年度には、液体クロマトグラフィー及び質量分析計と一体となった800 MHzのNMR装置が新たに設置される予定となっている。今後もNMR法を研究室の骨格に据え、ライフサイエンス分野の研究とグリーンサイエンス分野の研究を車の両輪として、研究室の活動を進めていくつもりである。

謝辞

本稿で紹介した内容は、当研究室の永田准教授、山置助教、近藤博士研究員、神庭博士研究員及び大学院博士課程の学生のLinさん、阪本君及び八木君等の研究成果である。また、共同研究者である京大生存圏研究所の渡辺教授・西村助教と京大農学研究科の三上教授に感謝致します。本稿で紹介した研究は科研費（課題番号：20H03192, 20K21477及び21H05519）、AMED（課題番号：20fk0410027及び22580694）、JST/e-ASIA・JRP、「ゼロエミッションエネルギー」共同利用・共同研究拠点及び株式会社ダイセルとの共同研究の支援によって遂行されました。

参考文献

- 1) Yamaoki, Y., Kiyoshi, A., Miyake, M., Kano, F., Murata, M., Nagata, T. and Katahira, M. (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **20**, 2982–2985. “The first successful observation of in-cell NMR signals of DNA and RNA in living human cells”
- 2) Yamaoki, Y., Nagata, T., Sakamoto, T. and Katahira, M. (2020) *Biophys. Rev.*, **12**, 411–417. “Recent progress of in-cell NMR of nucleic acids in living human cells”
- 3) Sakamoto, T., Yamaoki, Y., Nagata, T. and Katahira, M. (2021) *Chem. Commun.*, **57**, 6364–6367. “Detection of parallel and antiparallel DNA triplex structures in living human cells using in-cell NMR”
- 4) Nishimura, H., Kamiya, A., Nagata, T., Katahira, M. and Watanabe, T. (2018) *Sci. Rep.*, **8**, 6538. “Direct evidence for α ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls”
- 5) Lin, M.I., Hiyama, A., Kondo, K., Nagata, T. and Katahira, M. (2018) *Appl. Microbiol. Biotech.*, **102**, 9635–9645. “Classification of fungal glucuronoyl esterases (FGEs), and characterization of two new FGEs from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Pleurotus eryngii*”
- 6) <http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/new-iae/NewsRelease/JP/2021/10/08-090822.html>
- 7) Nguyen, H., Kondo, K., Yagi, Y., Iseki, Y., Okuoka, N., Watanabe, T., Mikami, B., Nagata, T. and Katahira, M. (2021) *ACS Sustain. Chem. & Eng.*, **10**, 923–934. “Functional and structural characterization of a lytic polysaccharide monooxygenase, which cooperates synergistically with cellulases, from *Ceriporiopsis subvermispora*”