核磁気共鳴法を用いた細胞内タンパク質の無侵襲解析

朽尾豪人,^{*,a,†} 村山秀平,^a 猪股晃介,^b 森本大智,^a 大野綾子,^c 白川昌宏^a

Non-invasive Analysis of Proteins in Living Cells Using NMR Spectroscopy

Hidehito Tochio,^{*,a,†} Shuhei Murayama,^a Kohsuke Inomata,^b Daichi Morimoto,^a
Ayako Ohno,^c and Masahiro Shirakawa^a

^aDepartment of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University; A4-132 Kyoto daigaku-Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan; ^bRIKEN, QBiC; OLABB, Osaka University 6-2-3, Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan; and ^cDepartments of Nutritional Physiology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School; 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan.

(Received October 3, 2014)

NMR spectroscopy enables structural analyses of proteins and has been widely used in the structural biology field in recent decades. NMR spectroscopy can be applied to proteins inside living cells, allowing characterization of their structures and dynamics in intracellular environments. The simplest “in-cell NMR” approach employs bacterial cells; in this approach, live *Escherichia coli* cells overexpressing a specific protein are subjected to NMR. The cells are grown in an NMR active isotope-enriched medium to ensure that the overexpressed proteins are labeled with the stable isotopes. Thus the obtained NMR spectra, which are derived from labeled proteins, contain atomic-level information about the structure and dynamics of the proteins. Recent progress enables us to work with higher eukaryotic cells such as HeLa and HEK293 cells, for which a number of techniques have been developed to achieve isotope labeling of the specific target protein. In this review, we describe successful use of electroporation for in-cell NMR. In addition, ¹⁹F-NMR to characterize protein-ligand interactions in cells is presented. Because ¹⁹F nuclei rarely exist in natural cells, when ¹⁹F-labeled proteins are delivered into cells and ¹⁹F-NMR signals are observed, one can safely ascertain that these signals originate from the delivered proteins and not other molecules.

Key words—nuclear magnetic resonance; macromolecular crowding effect; electroporation; fluorine-19

1. NMR とタンパク質の構造解析

核磁気共鳴 (NMR) 分光法は、有機低分子の構造同定に必要不可欠な分析法であるが、タンパク質の立体構造解析にも広く用いられている。NMR 法は、測定対象となる試料が溶液なのか、あるいは、固体なのかで測定手法が大きく異なるが、構造生物学分野では長らく溶液 NMR が中心的に用いられてきた。しかし、近年は固体 NMR 法の技術開発がめ

ざましく、同法を利用したタンパク質の構造解析も数多く報告されている。¹⁾ NMR の特長は「原子分解能」の情報を与える点にある。つまり、個々の原子核 (¹H が代表的) が各々の置かれた磁氣的・化学的環境に応じた NMR 信号を発するため、どの原子がタンパク質中でどのような環境に置かれているかを知ることができる。もし、タンパク質の構造が変化すれば、変化した部位の NMR 信号もまた変化するため、構造変化の場所を特定できる。ただし、どんな原子核からでも NMR 信号が観測できるわけではない。例えば、天然炭素の 99% をしめる炭素-12 は、NMR 信号を与えないし、天然の窒素 (窒素-14) は、NMR 信号を与えるにしても、極めて低感度でしか検出できない。そこで、タンパク質の NMR では、炭素や窒素を NMR 測定に好適な安定同位体に置換した試料を用意する (炭素は ¹³C で、窒素は ¹⁵N で置換する)。これによって、タンパク質分子を構成する大部分の原子を区別して観察でき

^a京都大学大学院工学研究科 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂 A4-132), ^b理化学研究所生命システム研究センター (〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3 大阪大学バイオ関連多目的施設), ^c徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野 (〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15)

現所属: [†]京都大学大学院理学研究科生物物理学教室 (〒606-8502 京都市左京区北白川追分町)

*e-mail: tochio@mb.biophys.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 134 年会シンポジウム S49 で発表した内容を中心に記述したものである。

るようになる。

このような試料に対して各種 NMR スペクトルを測定・解析すれば、個々の原子核について様々な NMR パラメーターが得られ、そこから原子核間の距離や二面角が求められる。必要十分な構造情報が得られれば、これらを用いて立体構造を決定することもできる。1つの重要な観点として、個々の原子核が示す化学シフト値などの NMR パラメーターは、その周りの化学構造や立体構造、ダイナミクスを鋭敏に反映する「レポーター」になる、ということが挙げられる。つまり、個々の原子核の NMR 信号を通して、タンパク質の構造や相互作用をモニターすることができるというわけである。例えば、タンパク質全体に配置された多数の「構造レポーター」を利用することで、溶液条件（塩強度、pH、リガンド添加、金属イオン添加）や温度の変化で、タンパク質のどの部位が構造変化するのか、どの部位にリガンドが結合するのか、などを比較的容易に同定することができる。溶液条件の変化に伴う部位特異的な状態変化を簡便に検出できる点は、NMR の最大の特長であり、X 線結晶回折法による原子座標決定と併用することで、対象タンパク質の動作機構を詳細に解明できる。

2. NMR を用いた細胞内タンパク質の解析

2-1. 細胞内タンパク質を直接解析する意義

近年、生きた細胞を NMR 測定に供し、細胞内の特定タンパク質の NMR スペクトルを取得する、いわゆる“in-cell NMR”というアプローチが試みられている。これにより、細胞内でのタンパク質の構造情報が獲得できると期待されている。従来、精製したタンパク質試料を緩衝液に溶解させて（固体 NMR の場合は沈殿やファイバー状試料、微結晶など）構造解析を行っていたが、そのような「試験管内」の環境は細胞内の環境とは大きく異なる。果たして、試験管内での解析結果が、細胞内で実際に機能しているタンパク質の構造・状態をどの程度正しく反映しているのか？ という素朴な疑問に対して、in-cell NMR はなんらかの手掛かりを与えると期待されている。より具体的には、細胞質には様々なタンパク質や核酸を始めとする生体分子、生体高分子が、高密度に充填されているし、膜で覆われた細胞内小器官が存在する。一方で、通常の構造解析や生化学実験は比較的希薄で、均一な溶液で行われる。

このような違いがタンパク質の構造や物性に影響を及ぼす可能性がある。例えば、細胞内のような混合系では無数の非特異的相互作用が起きていると想像されるが、これが、タンパク質の性質にどのような影響を及ぼすかは自明ではない。加えて、細胞内の水分子の多くはタンパク質表面などに水和した状態として存在しており、「自由水」が大半を占める希薄水溶液中とは、自ずとその化学的性質が異なり得る。²⁾

一般的には、強固にフォールドしたタンパク質の構造が細胞内外で大きく変わるとは考え難い。しかし、定まった立体構造をとらないループ領域や、ごく緩くフォールドした部位の構造的特徴は、媒質や共存分子とアミノ酸側鎖との相互作用の影響を大きく受けると考えられ、細胞内外で異なり得る。また、複数のドメインからなるタンパク質の場合、ドメイン間の相互作用はごく弱いケースもある。その場合は細胞内の共存分子の影響や分子混合の影響を受けるだろう。結果として、細胞内外でドメイン間の相互作用の強さや様相が異なり、ドメイン間の相対配置に相違が生じることもあり得る。これらは、いずれも当該タンパク質の生化学的な性質に影響を及ぼし得る。

タンパク質の解離・会合平衡はどうか。混み合った環境下では排除体積効果のため、タンパク質複合体の形成が促進されると考えられている。³⁾ 同様に、タンパク質がほどけた状態（ランダムコイル）に比べてコンパクトにフォールドした状態のほうが排除体積が小さい。そのため、排除体積効果はフォールディング安定性を増大させると考えられている。ただし、実際の細胞内では、排除体積効果に加えて、共存分子との非特異的な相互作用も無視できない。すなわち、あるタンパク質と細胞内の無数のコンポーネントの間には非特異的な引力や斥力が働く。場合によっては、ほどけた状態のほうが細胞内共存分子との相互作用で安定化されることも考えられる。そうすると、排除体積効果によるフォールディング促進が打ち消されることもあり得る。⁴⁾ 実際に、われわれはユビキチンのフォールディング安定性が HeLa 細胞内で低下することを示唆するデータを得ているし、⁵⁾ Schlesinger らも大腸菌で類似の結果を得ている。⁶⁾

このように、細胞内の様々な環境条件が様々な影

Fig. 1. Three Ways of Preparing Stable-isotope Labeled Proteins in Cells

1: Streptolysin O (SLO) makes pores on the plasma membrane, through which proteins are translocate. 2: Fusion with cell penetrating peptide (CPP)-tag allows membrane crossing of the cargo proteins that are labeled with stable-isotopes. 3: Overexpression of the protein of interest. The cells are cultured in isotope-enriched media. The Figure is adapted from *Experimental Medicine* vol. 32, No. 10, page 35, Fig. 2.

響を及ぼし合い、個々のタンパク質の細胞内での物理学的・化学的特性を決める。翻訳後修飾や細胞内局在による環境の違いも考慮すると、細胞内でのタンパク質の性質を試験管内での実験結果から予測することが、そう単純ではないことがわかる。このような背景から、近年、細胞内タンパク質の構造や状態を直接解析するために、NMR を利用しようとする試みが広がっている。

2-2. In-cell NMR とは NMR の特長は、原子分解能と生体非侵襲性である。前者は構造生物学分野で、後者は magnetic resonance imaging (MRI) の分野で広く認知されている。そこで、細胞を NMR 測定に供すれば、その内部に含まれるタンパク質について原子レベル構造情報を取得することが可能となると期待される。ただし、単に細胞を測定するだけではダメで、観察対象のタンパク質のみを NMR 検出に適した安定同位体 [^{13}C , ^{15}N 又はフッ素 (^{19}F)] で標識する必要がある。さもなければ、細胞に含まれる多種多様な分子の NMR 信号が観察したいタンパク質のそれを完全に覆い隠すだろう。

細胞内の望みのタンパク質を同位体標識するにはいくつか方法が提案されているが、大きく分けて以下の2つに分類できる (Fig. 1)。

(1) 同位体含有栄養源を含む培地で細胞を培養し、タンパク質を発現させる。

(2) 前もって同位体標識したタンパク質を細胞内に導入する。

それぞれに一長一短がある。まず、(1) の方法では、観察したいタンパク質以外の細胞内分子も同位

体標識されてしまうので、なるべく目的タンパク質の発現レベルを高くしなければならない。このため、天然の状態から大きく逸脱する可能性がある。加えて、培地のコストが高い。(2) では、こういった問題は生じないが、正規のタンパク質合成経路を経ないため、観察対象タンパク質の局在をコントロールし難く、やはり天然の状態を反映しない可能性がある。

これまで、in-cell NMR は様々な細胞系で行われているが、最も一般的なのは大腸菌である。 ^{13}C や ^{15}N を含む合成培地中でタンパク質を大量発現させることで、簡単に同位体標識が行えるため、その菌体を適切な培地に懸濁し、NMR 測定すれば、発現タンパク質の in-cell NMR スペクトルを測定できる。⁷⁾ この方法で、タンパク質間相互作用、^{8,9)} 巨大分子混合効果の研究、⁶⁾ や構造決定、¹⁰⁾ 天然変性タンパク質の細胞内構造解析¹¹⁾ などが行われている。真核細胞では、メタノール資化性酵母、¹²⁾ アフリカツメガエル卵母細胞、¹³⁻¹⁵⁾ 哺乳動物由来培養細胞での in-cell NMR 実施例がある。これらの場合、タンパク質の標識法は様々である。大腸菌同様に、同位体培地中での大量発現を行った例、^{16,17)} 細胞膜透過性ペプチド (cell penetrating peptide; CPP)^{5,18)} や Streptolysin O¹⁹⁾ を利用して、あらかじめ調製しておいた同位体標識タンパク質を細胞導入し、その細胞を NMR 測定に供した例が報告されている。

以上のほかに、電気穿孔法を利用して、標識タンパク質を細胞導入することも考えられ、各所で in-cell NMR への応用が試みられている。この方法は遺伝子や薬剤を細胞に導入する方法として広く用いられている。細胞に高電圧(数百～数千ボルト程度)をミリ秒程度印加することで、瞬間的に細胞膜に孔が空き、そこを通過して DNA や薬剤分子が入っていく。筆者らも、同法を in-cell NMR に応用してみた。種々の条件検討を行ったところ、同法で良好な in-cell NMR スペクトルが得られることが分かった。まず、HeLa 細胞を同位体標識したタンパク質溶液に懸濁し、ここに市販の電気穿孔装置を用いて電圧を印加する。回復培養後、細胞を NMR 測定に供する。得られた in-cell NMR スペクトルの質は、前記 CPP 法を利用して得たスペクトルと比べて遜色のないものであった (論文準備中, Fig. 2)。電気穿孔法では、観察対象タンパク質に CPP をつな

Fig. 2. In-cell NMR by Electroporation-mediated Protein Delivery

Upper) Schematic representation of electroporation-mediated delivery of isotope-labeled proteins to cells. Lower) The 2D ^1H - ^{15}N correlation spectra of cells to that ^{15}N -proteins were delivered by electroporation (left, unpublished) and a solution sample of the same protein (right).

が必要がない。細胞を懸濁させたタンパク質溶液に電気処理を行うのみ、という簡便さから、今後、同法を利用した in-cell NMR が広がっていくと思われる。例えば、NMR による構造決定に用いたタンパク質溶液（通常、数百 μM ~1 mM）を流用し、これに HeLa などの培養細胞を懸濁して電気穿孔を行えば、すぐさま in-cell NMR 測定が行えるだろう。

2-3. 細胞内タンパク質-リガンド相互作用の観察 In-cell NMR でどのような情報が得られるのか。1つの利用法は、細胞内でのタンパク質間相互作用の解析である。例えば、Burz らは、大腸菌内でタンパク質-タンパク質間の相互作用を調べる STINT 法を開発した。この方法では共発現させた2つの異なるタンパク質間の相互作用部位をアミノ酸残基レベルで調べられる。^{9,20)} 真核細胞の系では、HeLa 細胞内での 12-kDa FK506-binding protein (FKBP12) と薬剤 (FK506, ラパマイシン) 相互作用⁵⁾や、細胞内微小管タンパク質とその結合パートナーの相互作用が解析されている。²¹⁾

以下、最近、われわれが浜地 格博士のグループ（京都大学工学研究科）と共同で行った、タンパク質と低分子リガンドの相互作用を細胞内で研究した

例を紹介する。²²⁾ まず、 ^{19}F は ^1H について NMR 検出感度の高い核であり、その天然存在比は 100% であることから、比較的高感度な測定が可能である。加えて、通常、フッ素はタンパク質には含まれないうえに、細胞内にもほとんど含まれていない。したがって、細胞内の特定のタンパク質のみを ^{19}F で標識すれば、そのタンパク質由来の ^{19}F -NMR 信号を得ることができ、これをレポーターとしてそのタンパク質の状態解析が可能になる。たいいていの in-cell NMR では、 ^{15}N や ^{13}C 標識タンパク質を測定対象とし、 ^1H - ^{15}N 、あるいは ^1H - ^{13}C の二次元 NMR スペクトルを利用していた。このような測定は、タンパク質の全体に渡って多数の NMR 信号が得られるため、全体構造の特徴を詳細に把握できるという利点がある反面、測定に長時間を要する。対して、フッ素 NMR の場合は、特定のアミノ酸のみをフッ素化アミノ酸に置換するため、観測される NMR 信号の数、すなわち「構造レポーター」の数は少ない。しかし、数が少ないため、1次元 NMR スペクトルで十分に信号を分離できることから、測定時間を大幅に短縮できる。タンパク質にフッ素化アミノ酸が導入されている必要があるが、これはさほど困難で

Fig. 3. (a) The Construction of a ^{19}F -NMR Biosensor Based on LDT Chemistry, (b) Chemical Structures of the ^{19}F -type LDT Labeling Reagent 1, Acetazolamide (AAZ) and Benzenesulfonamide (BS), and (c) ^{19}F NMR Spectra of Purified 1-hCAI (100 μM) upon Addition of AAZ (0, 80, 160 μM)

(c) Open circle, -62.0 ppm, 1-hCAI with a free ligand-binding pocket; Filled circle, -63.0 ppm, 1-hCAI with AAZ. The Figure is adapted from Ref. 22).

はなく、大腸菌の培地に適切なフッ素化アミノ酸を入れておけば、これがタンパク質に取り込まれる。実際に、この方法で、大腸菌内に発現させた ^{19}F 標識タンパク質の NMR スペクトルが測定されており、フォールディングの観察などが行われている。⁶⁾ ただし、ここで紹介する例では、従来法とは全く異なり、浜地博士らの開発した ligand directed tosyl (LDT)-chemistry を利用して、細胞内のタンパク質にフッ素含有基が導入された。LDT-chemistry とは、タンパク質中のリガンド結合サイト（酵素の基質結合部位など）近傍に選択的に化学修飾を施す手法である [Fig. 3(a)].²³⁾ 今回の場合、Fig. 3(b) に示した化合物 1 をヒト炭酸脱水酵素 1 (human carbonic anhydrase 1; hCA1) に作用させることで、hCA1 の His67 の側鎖を ^{19}F で標識した。この ^{19}F 標識 hCA1 は良好な ^{19}F -NMR スペクトルを示したが [Fig. 3(c)], 興味深いことに、ここに hCA1 に結合するリガンド (acetazolamide; AAZ) を加えると、スペクトルに変化がみられた（化学シフトが約 1 ppm ほどシフト）。これは、先に導入された ^{19}F プローブはリガンド結合ポケットと、ある程度の相互作用があるが、AAZ がポケットに結合すると、その場所から追い出されることに起因していると思われる。以上は、結晶構造で確認している。²²⁾

hCA1 に対して AAZ を滴定すると、徐々に AAZ 結合型 ^{19}F -hCA1 の NMR 信号が生じ、逆に

AAZ 非結合型の NMR 信号は減少していく [Fig. 3(c)]. hCA1 に対して十分な量の AAZ を加えることで、AAZ 非結合型の信号は消失し、AAZ 結合型のみとなった。これは、すべての hCA1 分子が AAZ と結合したことを意味する。この「飽和」状態に至る前の段階、例えば、リガンド結合型と非結合型が 50% ずつ存在する状態を考えてみる。今の場合、リガンドの結合は、あくまで非共有結合的なものであるため、その結合には一定の寿命があり、hCA1 はリガンド結合、非結合の状態間を交換しているはずである。NMR 測定法の一つである、exchange spectroscopy (EXSY) スペクトルを測定すると、このような交換過程について速度論的なパラメーターを得ることができる。Figure 4(a) に 50% の ^{19}F -hCA1 がリガンド benzenesulfonamide (BS) との結合状態にある試料について測定した ^{19}F -EXSY スペクトルを示した。一連の EXSY スペクトルを解析した結果 BS 結合と非結合状態の交換速度 (k_{ex}) は、 1.0 s^{-1} であった [Fig. 4(b)]. この測定は試験管内の ^{19}F 標識 hCA1 について行ったものであるが、LDT-chemistry の優れた点は、同様の標識が、細胞内のタンパク質に対しても適用できる点にある。実際、赤血球中の hCA1 を ^{19}F 標識し、BS 存在下で in-cell ^{19}F -EXSY 測定を行ったところ [Fig. 4(c)], BS 結合と非結合状態間の交換速度を求めることができた。その結果は興味深いもので、

Fig. 4. Chemical Exchange of 1-hCAI

(a) Selected region of the two-dimensional 1-hCAI NOESY spectrum of the complex with benzenesulfonamide (BS) in test tube experiments. The chemical shifts of 1-hCAI (Open circle; -62.0 ppm) and 1-hCAI_{BS} (Filled circle; -62.7 ppm) are indicated. (b) The ratios of cross-peak intensities [I_c/I_d] are plotted for 1-hCAI and 1-hCAI_{BS} as a function of NOESY mixing times in a test tube (Open circle), in 2.5-fold diluted lysate (Filled circle), in non-diluted lysate (X), and in RBCs (Open square). (c) Selected regions of the two-dimensional NOESY spectrum of 1-labeled RBCs with benzenesulfonamide (BS). The chemical shifts of 1-hCAI (Open circle; -62.0 ppm) and 1-hCAI_{BS} (Filled circle; -62.6 ppm) are indicated. The spectrum was measured in a sample containing HBS buffer ($20 \mu\text{M}$ TFA, 10% D_2O) at 35°C . (d) The exchange rates (k_{ex}) of 1-hCAI following the addition of BS *in vitro*, in 2.5-fold diluted lysate, non-diluted lysate, in RBCs or *in vitro* with various additional agents (15 wt% PEG6K, 15 wt% PEG20K or 10 wt% Hb). Error bars represent the S.D. of three experiments. The Figure is adapted from Ref. 22).

赤血球内での交換速度は、 1.6 s^{-1} と、試験管内に比べて 1.6 倍加速されていた [Fig. 4(d)]. 赤血球の破碎液を調製し、そのなかで同様に ^{19}F -hCAI の ^{19}F -EXSY を測定したところ、1.2 倍程度の k_{ex} の増大がみられた [Figs. 4(b) and (d)]. 一方、破碎液を 2.5 倍に希釈すると k_{ex} は通常のバッファー中とほとんど同じになった [Fig. 4(d)]. したがって、細胞内での交換過程の加速は、少なくとも部分的には、分子混合の効果があらわれたものと考えられる。分子混合の研究にはしばしば、各種の crowder 溶液中でタンパク質のパラメーターの計測が行われる (crowder とは、タンパク質には化学的な作用は及ぼさないが、空間を物理的に占有し、タンパク質の存在可能体積を減ずるよう機能する分子)。そこで、代表的な crowder である polyethyleneglycol (PEG) 中で、 k_{ex} を測定したところ

PEG6K 中では k_{ex} に変化はみられなかったものの、より鎖長の長い PEG20K では交換速度の上昇がみられた。同様に、赤血球内の主要タンパク質成分であるヘモグロビン (Hb) の濃厚水溶液中でも k_{ex} の上昇がみられた [Fig. 4(d)]. 細胞破碎液や crowder 存在下で、一定の k_{ex} の上昇がみられたことから、交換過程の加速には分子混合が寄与していると考えられる。しかし、今回試したいいずれの条件でも、*in-cell* での k_{ex} までは加速されなかった。このことは、単純な分子混合の効果のみでは細胞内環境での hCAI のふるまいを説明できないことを意味しており、細胞内タンパク質の性質を「直接」解析することの重要性を表している。

3. 今後の展開

ここ数年で、大腸菌のみならず、哺乳動物由来の細胞を使った *in-cell* NMR の実施例が増えてきた。

細胞内で、かつ原子レベルでタンパク質科学的な解析が行える手法は、現状では in-cell NMR 法以外にないため、極めてユニークな情報を与えるツールと言えるだろう。ただし、まだまだ限界もある。例えば、1 回の NMR 測定には 10^6 – 10^7 個もの細胞数を要するうえ、現状、観察対象タンパク質の細胞内局在はコントロールされていない。よって、得られるデータは、これらすべてを「平均化」したものである。「細胞内環境 vs. 試験管内環境」という、劇的に大きな差異がタンパク質の物理化学や生化学に及ぼす影響を議論する場合は、平均化された情報でも一定の意味があると思われる。しかし、今後、より生物学的に意義深い情報を得るためには、細胞集団の状態を均一化することと、タンパク質の局在を制御することが重要になってくるだろう。そういった試みも行われており、例えば、ごく最近、Barbieriらは、ミトコンドリアに局在させたタンパク質の NMR スペクトルを測定し、その状態を解析している。²⁴⁾ また、現状では NMR 測定の検出感度の低さが大きな障壁となっており、多様な NMR 測定法のうちのごく一部のものしか in-cell NMR には適用できない。加えて、必要な細胞内タンパク質の濃度は天然状態よりも数桁以上高い。このような問題が解決されるために、感度の向上は必須であり、超偏極法や超高感度な磁気センサー^{25,26)}を使った、より感度の高い NMR 検出の実現が待たれる。

謝辞 電気穿孔法を利用した in-cell NMR は、榎園能章博士（京大理）との共同研究です。In-cell ^{19}F -NMR による hCA1 とリガンドの相互作用解析は京都大学工学研究科の高岡洋輔博士（現・東北大理）、浜地 格博士のグループとの共同研究です。共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Park S. H., Das B. B., Casagrande F., Tian Y., Nothnagel H. J., Chu M., Kiefer H., Maier K., De Angelis A. A., Marassi F. M., Opella S. J., *Nature*, **491**, 779–783 (2012).
- 2) Mentre P., “L’eau dans la cellule,” University of Tokyo Press, Tokyo, 2006.
- 3) Zhou H.-X., Rivas G., Minton A. P., *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 375–397 (2008).
- 4) Sarkar M., Smith A. E., Pielak G. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 19342–19347 (2013).
- 5) Inomata K., Ohno A., Tochio H., Isogai S., Tenno T., Nakase I., Takeuchi T., Futaki S., Ito Y., Hiroaki H., Shirakawa M., *Nature*, **458**, 106–109 (2009).
- 6) Schlesinger A. P., Wang Y., Tadeo X., Millet O., Pielak G. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 8082–8085 (2011).
- 7) Serber Z., Selenko P., Hansel R., Reckel S., Lohr F., Ferrell J. E. Jr., Wagner G., Dotsch V., *Nat. Protoc.*, **1**, 2701–2709 (2007).
- 8) Burz D. S., Dutta K., Cowburn D., Shekhtman A., *Nat. Protoc.*, **1**, 146–152 (2006).
- 9) Xie J., Thapa R., Reverdatto S., Burz D. S., Shekhtman A., *J. Med. Chem.*, **52**, 3516–3522 (2009).
- 10) Sakakibara D., Sasaki A., Ikeya T., Hamatsu J., Hanashima T., Mishima M., Yoshimasu M., Hayashi N., Mikawa T., Wälchli M., Smith B. O., Shirakawa M., Güntert P., Ito Y., *Nature*, **458**, 102–105 (2009).
- 11) Waudby C. A., Camilloni C., Fitzpatrick A. W. P., Cabrita L. D., Dobson C. M., Vendruscolo M., Christodoulou J., *PLoS One*, **8**, e72286 (2013).
- 12) Bertrand K., Reverdatto S., Burz D. S., Zitomer R., Shekhtman A., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 12798–12806 (2012).
- 13) Sakai T., Tochio H., Tenno T., Ito Y., Kokubo T., Hiroaki H., Shirakawa M., *J. Biomol. NMR*, **36**, 179–188 (2006).
- 14) Selenko P., Frueh D. P., Elsaesser S. J., Haas W., Gygi S. P., Wagner G., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 321–329 (2008).
- 15) Luh L. M., Hänsel R., Löhr F., Kirchner D. K., Krauskopf K., Pitzius S., Schäfer B., Tufar P., Corbeski I., Güntert P., Dötsch V., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 13796–13803 (2013).
- 16) Banci L., Barbieri L., Bertini I., Luchinat E., Secci E., Zhao Y., Aricescu A. R., *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 297–299 (2013).
- 17) Banci L., Barbieri L., Luchinat E., Secci E., *Chem. Biol.*, **20**, 747–752 (2013).
- 18) Danielsson J., Inomata K., Murayama S., Tochio H., Lang L., Shirakawa M., Oliveberg

- M., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 10266–10269 (2013).
- 19) Ogino S., Kubo S., Umemoto R., Huang S., Nishida N., Shimada I., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10834–10835 (2009).
- 20) Burz D. S., Dutta K., Cowburn D., Shekhtman A., *Nat. Methods*, **3**, 91–93 (2006).
- 21) Kubo S., Nishida N., Udagawa Y., Takarada O., Ogino S., Shimada I., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **52**, 1208–1211 (2013).
- 22) Takaoka Y., Kioi Y., Morito A., Otani J., Arita K., Ariyoshi M., Tochio H., Shirakawa M., Hamachi I., *Chem. Commun. (Camb)*, **49**, 2801–2803 (2013).
- 23) Tsukiji S., Miyagawa M., Takaoka Y., Tamura T., Hamachi I., *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 341–343 (2009).
- 24) Barbieri L., Luchinat E., Banci L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 2492–2496 (2014).
- 25) Mamin H. J., Kim M., Sherwood M. H., Rettnner C. T., Ohno K., Awschalom D. D., Rugar D., *Science*, **339**, 557–560 (2013).
- 26) Staudacher T., Shi F., Pezzagna S., Meijer J., Du J., Meriles C. A., Reinhard F., Wrachtrup J., *Science*, **339**, 561–563 (2013).