

実施課題名： タンデム型フローNMRによるin-cell/in-vivo NMR測定法の開発

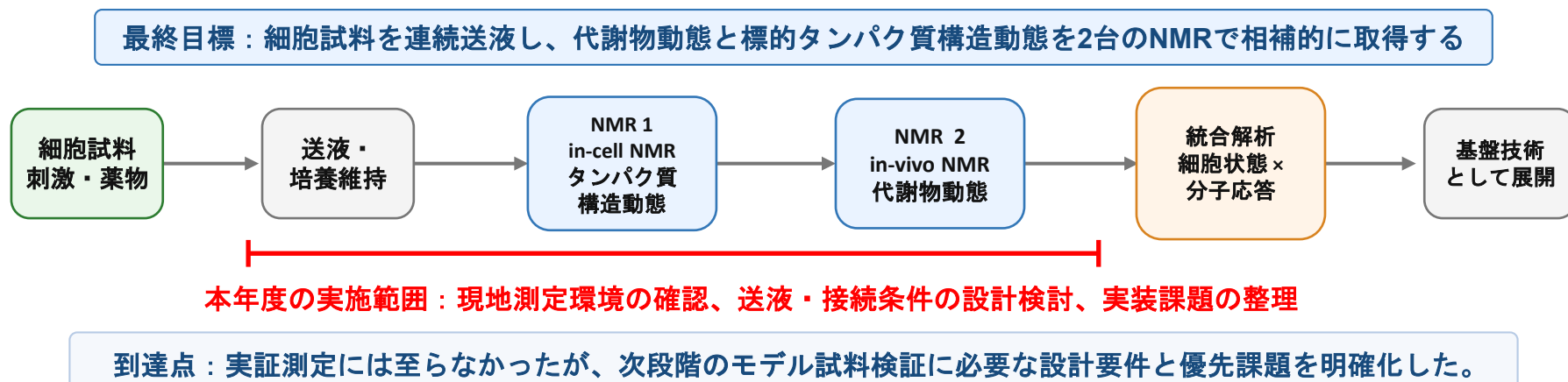
【背景】

生きた細胞内で標的タンパク質の構造動態を解析するin-cell NMRと、細胞代謝物動態を解析するin-vivo NMRを統合し、細胞状態と分子応答を同一の実験系で関連づけて評価する基盤技術の構築を目指した。そのために、2台のNMR装置を送液系で連結したタンデム型フローNMRシステムを想定し、連続送液下でタンパク質由来シグナルと代謝物由来シグナルを相補的に取得する測定法を検討した。本課題では、本格的な実証測定に先立ち、現地装置環境、細胞試料の取り扱い、送液・接続条件を確認し、実装に必要な技術課題を整理することを目的とした。

【実施内容】

本年度は、タンデム型フローNMRシステムの本格的な構築に先立ち、現地でのin-cell NMR測定環境の確認と、システム設計に必要な予備的検討を実施した。具体的には、細胞試料をNMR試料管内で保持しながら測定する際の装置構成、試料設置方法、送液経路、測定中の細胞試料の取り扱いについて確認した。また、2台のNMR装置を送液系で連結して利用することを想定し、チューブ長、流速、装置間での測定タイミング、各装置で取得するNMR情報の役割分担について議論した。特に、タンパク質由来のin-cell NMRシグナルと代謝物由来のin-vivo NMRシグナルを同一の細胞試料環境下で取得するためには、送液安定性、測定感度、データ取得時間を総合的に考慮したシステム設計が不可欠であることを確認した。以上により、本年度は実証測定には至らなかったものの、タンデム型フローNMRシステムの実装に向けて優先的に検証すべき技術課題を整理した。

Fig. 1



NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF25-01-084			
利用課題名	タンデム型フローNMR による in-cell/in-vivo NMR 測定法の開発			
所属機関	自然科学研究機構			
所属部署	生命創成探究センター			
役職・氏名	役職	特任准教授	氏名	猪股 晃介
利用実施時期、及び期間	2025 年 04 月 01 日～2026 年 03 月 31 日 総利用日数： 14 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

本課題では、細胞内タンパク質の構造動態を解析する in-cell NMR と、細胞代謝物動態を解析する in-vivo NMR を統合的に計測するため、2 台の NMR 装置を連結したタンデム型フローNMR システムの構築を目指した。申請者はこれまで、哺乳動物細胞を対象とした in-cell NMR 法の開発と応用研究を進め、細胞内タンパク質の構造安定性、相互作用、動的挙動を原子分解能で解析するための技術基盤を整備してきた。一方で、細胞内で観測されるタンパク質の構造動態を、細胞全体の代謝状態や外部刺激への応答と関連づけて理解するためには、タンパク質 NMR 情報と代謝物 NMR 情報を同一の細胞試料または連続した試料環境下で取得する新たな測定基盤が必要である。本課題では、その実現に向けた第一段階として、既存のフロー型 NMR および in-cell NMR 測定系を基盤に、タンデム型フローNMR システムの構成、測定条件、試料送液系、現地装置環境との適合性について検討を行うことを目的とした。

2. 成果の概要

実施内容

本年度は、タンデム型フローNMR システムの本格的な構築に先立ち、システム設計に必要な予備的検討を中心に実施した。具体的には、現地において in-cell NMR 測定を実施する際の装置構成、試料設置、送液経路、測定中の細胞試料の取り扱いについて確認し、既存の in-cell NMR 測定系をタンデム型フローNMR へ拡張する際に必要となる要素を整理した。また、2 台の NMR 装置を連結して利用する場合に想定される送液系の構成、チューブ長、流速、測定タイミングの同期、各装置で取得する NMR データの役割分担について、利用施設の担当者と議論を行った。特に、細胞試料を安定に維持しながら、タンパク質由来の in-cell NMR シグナルと代謝物由来の in-vivo NMR シグナルを連続的または並行的に取得するためには、単に 2 台の装置を接続するだけではなく、送液安定性、測定時間、データ解析の整合性を総合的に考慮したシステム設計が必要であることを確認した。以上の検討により、本課題で目指すタンデム型フローNMR システムの実装に向けた技術的課題と、今後優先的に検証すべき項目を明確化した。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

当初計画では、タンデム型フローNMR システムを構築し、モデル細胞試料を用いた予備測定、さらに可能であれば in-cell NMR と in-vivo NMR の同時計測に向けた実証実験を行うことを想定していた。しかし、本年度の実施内容は、主としてシステム構築前の予備検討および現地での測定環境の確認にとどまり、実際に 2 台の NMR 装置を連結したタンデム型フローNMR 測定の実施には至らなかった。そのため、当初目標である「細胞内タンパク質の構造動態と細胞代謝物動態の同時計測を行うための計測・解析技術の基盤確立」については、達成途上である。一方で、本課題を進める上で必要となる具体的なシステム構成、送液系の技術的制約、現地装置での in-cell NMR 測定の実施可能性、今後の実験設計上の課題を明確にすることができた点は重要な進展である。特に、タンデム型フローNMR システムは実装例が極めて少なく、事前の設計検討が不十分なまま本測定に進むことは、細胞試料の安定性やデータの再現性に大きな問題を生じる可能性がある。したがって、本年度の成果は、当初計画の実証段階には到達していないものの、次年度以降に実効性のあるシステム構築を進めるための基盤整備として位置づけられる。

成果発表

本課題の利用に基づく論文発表、学会発表、特許出願等は現時点ではない。

今後の展開

今後は、本年度の予備検討で明らかになった技術的課題を踏まえ、まず単一の NMR 装置を用いたフロー型 in-cell NMR 測定条件の再確認と最適化を行う。その上で、送液系の安定性、細胞試料の保持時間、流速条件の影響を検証し、タンデム型フローNMR システムへの拡張に適した実験条件を絞り込む。次の段階では、モデル試料を用いて 2 台の NMR 装置間での連続送液および測定タイミングの調整を行い、タンパク質由来シグナルと代謝物由来シグナルを相補的に取得するための測定プロトコルを構築する予定である。最終的には、細胞外刺激や薬物処理に応答する細胞状態の変化を代謝物 NMR で評価しつつ、標的タンパク質の構造動態を in-cell NMR で解析する実証実験へ展開したい。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

本課題で目指すタンデム型フローNMR システムは、細胞内タンパク質の構造動態と細胞代謝状態を同一の実験系で関連づけて解析するための新しい測定基盤である。現時点では基盤技術の構築段階であり、直ちに社会的・経済的波及効果を生むものではないが、将来的には、細胞内における薬物標的タンパク質の構造変化と、薬物投与に伴う代謝応答を同時に評価できる技術へ発展する可能性がある。これにより、従来の精製タンパク質を用いた解析や抽出後の代謝解析だけでは捉えにくい、生きた細胞内での薬物作用、細胞応答、タンパク質機能制御の理解が進むことが期待される。特に、創薬研究における細胞内ターゲットエンゲージメントの評価、薬物応答性の解析、細胞状態に依存したタンパク質機能変化の検出などに応用できれば、基礎生命科学だけでなく、医薬・薬学分野への展開も見込まれる。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

本課題では、タンデム型フローNMR システムの構築に向けた初期検討として、現地での in-cell NMR 測定環境の確認およびシステム構成に関する議論を行った。利用施設の担当者と直接議論することで、申請段階では十分に具体化できていなかった送液系、装置間接続、測定タイミング、試料安定性に関する実際的な課題を整理することができた点は非常に有意義であった。特に、in-cell NMR 測定では試料の状態維持が重要であり、通常の溶液 NMR とは異なる観点から装置利用条件を検討する必要があることを改めて確認できた。今後、タンデム型フローNMR のような装置横断的・技術開発型の課題を進める上では、測定前の技術相談や装置担当者との継続的な打ち合わせの機会がさらに充実すると、より効率的に研究を進められると感じた。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

NMR プラットフォームには、超高磁場・高感度 NMR 装置の共用に加えて、新しい NMR 測定法や装置利用法を開発する場としての役割を期待している。特に、in-cell NMR、in-vivo NMR、フロー NMR、反応追跡 NMR など、従来の静置試料を対象とした測定とは異なる実験系では、各施設が有する装置技術、試料調製技術、測定ノウハウを組み合わせることが重要である。本課題のような技術開発型の利用では、短期間で明確な成果を得ることが難しい場合もあるが、将来的に新しい測定基盤の創出につながる可能性がある。今後も、装置利用だけでなく、測定系の設計段階から相談できる支援体制や、施設間連携を活かした技術開発支援が継続・発展することを期待している。

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

8. 利用施設

大阪大学

溶液 600MHz

利用期間 1: 2025 年 04 月 01 日～2026 年 03 月 31 日

9. その他の利用施設