

理研NMR施設利用報告書  
(トライアルユース)

12-500-033

平成 25 年 7 月 8 日

利用機関名	REC マテリアルズ (株)	
実施部署名	営業開発部	
実施責任者管理職名・氏名	部長 / 丸山 渉	
実施部署所在地	横浜市保土ヶ谷区常盤台 1 8 - 1 - 2 1 8	
実施部署連絡先		
利用課題名	ウイルス蛋白質の動的構造解析	
利用目的・内容	薬剤開発のターゲットとなる天然変性蛋白質の研究に、安定同位体の利用の有用性を示し、これからの創薬のために、安定同位体 NMR を製薬業界に産業的に広めていくことを、本研究の目的とする。	
利用実施時期及び期間	平成 24 年 10 月 12 日～平成 25 年 3 月 31 日  当初計画どおり・当初計画変更 (変更理由)	
利用施設	NMR 装置 (該当部分に○)	利用装置① ・( <input checked="" type="checkbox"/> )600MHz、( <input type="checkbox"/> )700MHz、( <input type="checkbox"/> )800MHz、( <input type="checkbox"/> )900MHz ( <input type="checkbox"/> )低温プローブ付 ( <input type="checkbox"/> )固体プローブ付 ( <input type="checkbox"/> )サンプルヒーター付 利用期間 1 : 平成 25 年 2 月 12 日～平成 25 年 3 月 10 日 利用期間 2 : 平成 25 年 2 月 18 日～平成 25 年 2 月 24 日 利用期間 3 : 平成 25 年 3 月 18 日～平成 25 年 3 月 31 日

		<p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz</li> <li>( <input type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー</li> </ul> <p>利用期間 1 : 平成 25 年 1 月 15 日～平成 25 年 1 月 24 日</p> <p>利用期間 2 : 平成 25 年 1 月 15 日～平成 25 年 1 月 18 日</p> <p>利用期間 3 : 平成 25 年 1 月 21 日～平成 25 年 1 月 24 日</p> <p>利用期間 4 : 平成 25 年 1 月 21 日～平成 25 年 2 月 3 日</p> <p>利用期間 5 : 平成 25 年 3 月 11 日～平成 25 年 3 月 17 日</p>
		<p>利用装置③</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz</li> <li>( <input type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー付</li> </ul> <p>利用期間 1 : 平成 24 年 10 月 9 日～平成 24 年 10 月 22 日</p>
		<p>利用装置④</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 800MHz、( <input type="radio"/> ) 900MHz</li> <li>( <input checked="" type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー付</li> </ul> <p>利用期間 1 : 平成 25 年 2 月 18 日～平成 25 年 2 月 28 日</p>
		<p>利用装置⑤</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ ( <input type="radio"/> ) 600MHz、( <input type="radio"/> ) 700MHz、( <input type="radio"/> ) 800MHz、( <input checked="" type="radio"/> ) 900MHz</li> <li>( <input type="radio"/> ) 低温プローブ付 ( <input type="radio"/> ) 固体プローブ付 ( <input type="radio"/> ) サンプルチェンジャー付</li> </ul> <p>利用期間 1 : 平成 25 年 3 月 4 日～平成 25 年 3 月 10 日</p> <p>利用期間 2 : 平成 25 年 3 月 25 日～平成 25 年 3 月 31 日</p> <p>利用期間 3 : 平成 25 年 3 月 25 日～平成 25 年 3 月 31 日</p>
	<p>立体構造解析 パイプ ライン</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発現確認 : 利用回数 57 回</li> <li>・ フォールド判定 : 利用回数 45 回</li> <li>・ 大量調製 : 利用回数 36 回</li> <li>・ 構造決定 : 利用回数 0 回</li> </ul>

利用満足度 (複数選択不可)	( <input type="radio"/> )大いに満足、( <input type="checkbox"/> )ほぼ満足、( <input type="checkbox"/> )やや不満、 ( <input type="checkbox"/> )大いに不満	
成果の概要	実施内容	<p>NMR 解析用に、ウシ由来融合蛋白質 (fusion-protein) (アミノ酸 63 残基) と、はしかウイルス核蛋白質 (nucleo-protein) (アミノ酸 125 残基) の大量の蛋白質発現、大量精製、<sup>15</sup>N と <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N ダブルラベルの安定同位体標識をおこなった。これら二つの蛋白質はいずれも、天然変性蛋白質である。</p> <p>1) シグナル連鎖帰属のために、3D-NMR の測定を行った。HNCO、HNCACO、HNCA、HN(CO)CA、そしてアミノ酸のタイプ別の帰属のために HNCACB を測定した。現在、2つの蛋白質のシグナルの帰属を NMRview を用いて解析中である。繰り返し配列などもあるため、まだ現時点では帰属が 100%うまくいくかは不明である。変性蛋白質であるので、シグナルが一部重なってしまい困難がある。</p> <p>2) CLEANEX-PM の測定を、実際に異なる pH の条件下と異なる交換時間の条件下で行った。CLEANEX-PM は水素重水素交換実験とは異なり、天然変性状態の蛋白質でも、残存構造を明らかにする解析が可能である。現在アルファシヌクレインの系の解析に基づいて、二つの天然変性蛋白質に関して行っている。正確な解析は、帰属の結果が出ていないのでまだわからないが、交換時間に応じて交換が起こっていることは示されている。R2 緩和分散の実験は、結局期間内にできなかった。</p>

<p>本課題に より得ら れた成 果、当初 目標と結 果との比 較</p>	<p>データを現在解析中であるので、大きな成果が得られたかは、まだ不明である。当初の予定ではこの今の時点で、二つの新しい天然変性蛋白質の解析が終了している予定であったが、アルファシヌクレインのデータ解析に時間がかかり、次に進めない事情もあった。しかしながら、アルファシヌクレインでおこなったのと同量程度の最低限のデータ取得は、この二つの新しい天然変性蛋白質において、おこなうことができた。今後も必要に応じて、継続でのデータ取得が必要かもしれない。新しい蛋白質のデータ解析には、まだシグナル帰属の問題もあるため、しばらくはかかると思われる。データ解析の難易度は、アミノ酸残基数から見て、アルファシヌクレインよりもやや小さいので、可能だと思われるが、この新しい2つの天然変性蛋白質の方が、変性度が高くなっており、難しくなっている。より高磁場の NMR 装置でのデータ取得ができれば、助けになるかもしれない。</p> <p>蛋白質の発現量や実験中での取り扱いに関しては、よくて行いやすいものをスクリーニングから選んだこともあり、当初の目標どおりにうまくいっていると思われる。</p>
<p>今後の展 開、課題</p>	<p>シグナル帰属をまず完了させ、CLEANEX-PM のデータを解析し、残存構造をできるだけ正確に求めたい。pH を変化させたデータ、交換時間を変化させたデータにフィッティングを行うと、かなり正確なデータが導けることがわかっている。</p> <p>天然変性での残存構造があまりない場合には、R2 緩和分散法での解析が有力になるであろう。R2 緩和分散の実験では、マイナー成分の割合をうまく保つ系の開発が今後の課題となる。</p> <p>また現存するデータから、天然変性構造の鍵の部分の構造がわかれば、変異体を作って解析することがさらに有力な解析方法となる。アミノ酸配列と動的揺らぎ構造の関連を明らかにすることが可能となる。</p> <p>pH を変化させるとき、いろいろな制限があるので、温度変化や緩衝液中での塩濃度変化などの他の要因でも、環境変化を試していきたい。</p> <p>また測定には、クライオプローブ付きの NMR 装置の使用がよいと思われる。そこでマシンタイムの問題がある。蛋白質が極めて安定な場合はよいが、非特異的な凝集などが起こりやすい場合には、すばやい測定が実験の成功の決め手となる。</p>

<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>創薬における NMR 研究の有用性が、明らかになっていくであろう。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>( ) あり : ( ○ ) なし 「あり」の場合理由 :</p>
<p>理研 NMR 施設利用における感想</p>	<p>大変によかった。</p>
<p>利用周辺環境に関する希望</p>	<p>特に無し</p>
<p>今後の利用形態の予定</p>	<p>( ○ ) 再度本事業への申請を考えている。 ( ) 成果の非公開を前提とした「外部利用」(有料)を考えている。 ( ) その他理研との共同研究等を考えている。 具体的に :</p>

	( )未定
今後期待するその他のサービス	( ) NMR 装置利用の教育 (これまで NMR を使用した経験の無い方に対する教育も含む) ( ○ ) NMR 装置利用の技術的なサポート ( ) その他 具体的に
文部科学省の共用ナビ (研究施設共用総合ナビゲーションサイト) に対する感想・改善について	( <a href="http://kyoyonavi.mext.go.jp/">http://kyoyonavi.mext.go.jp/</a> ) ( ) 見た : ( ○ ) 見ていない 感想等 :
その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。) 特に無し

本報告書については、印刷または必要な編集・加工を行った上で公開します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての資料作成または発表をお願いする場合があります。