

理研NMR施設利用報告書
(トライアルユース)

09-500-002

利用機関名	室町ケミカル株式会社	
実施部署名	新規事業部	
実施責任者管理職名・氏名	課長 河原 政人	
実施部署所在地	〒836-0895 福岡県大牟田市新勝立町 1-38-5	
実施部署連絡先		
利用課題名	毒素蛋白質・抗毒素蛋白質複合体の立体構造解析よりその特異的認識機構の解明	
利用目的・内容	L型 Ca ²⁺ チャンネルに特異的に結合する神経毒 Triflin と相互作用する SSP-2 の結合部位を特定することを目的とし、無細胞タンパク質合成系を用いて毒素蛋白質 Triflin と抗毒素蛋白質 SSP-2 の合成、および、NMR を用いたフォールド判定を行った。	
利用実施時期及び期間	平成 21 年 8 月 21 日～平成 22 年 7 月 31 日 総利用日数：以下、利用施設参照 当初計画どおり (変更理由)	
利用施設	NMR 装置 (該当部分)	利用装置 ・()600MHz、()700MHz、()800MHz、()900MHz ()低温プローブ付 ()固体プローブ付 ()サンプルエンジェラ付 利用期間 1：平成 22 年 4 月 27 日～平成 22 年 5 月 5 日 利用期間 2：平成 22 年 5 月 6 日～平成 22 年 5 月 9 日

		<p>利用期間3：平成 22年 5月 24日 ~ 平成 22年 5月 27日 利用期間4：平成 22年 6月 14日 ~ 平成 22年 6月 16日 利用期間5：平成 22年 7月 7日 ~ 平成 22年 7月 7日 利用期間6：平成 22年 7月 9日 ~ 平成 22年 7月 11日 利用期間7：平成 22年 7月 14日 ~ 平成 22年 7月 19日 利用期間8：平成 22年 7月 22日 ~ 平成 22年 7月 25日</p> <hr/> <p>利用装置 ・()600MHz、()700MHz、()800MHz、()900MHz ()低温プローブ付 ()固体プローブ付 ()サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間1：平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日 利用期間2：平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日 利用期間3：平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日</p> <hr/> <p>利用装置 ・()600MHz、()700MHz、()800MHz、()900MHz ()低温プローブ付 ()固体プローブ付 ()サンプルチェンジャー付</p> <p>利用期間1：平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日 利用期間2：平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日 利用期間3：平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日</p>
	<p>立体構造解析 パイプ ライン</p>	<p>・発現確認 : 利用回数 137回</p> <hr/> <p>・フォールド判定 : 利用回数 44回</p> <hr/> <p>・大量調製 : 利用回数 6回</p> <hr/> <p>・構造決定 : 利用回数 0回</p>
<p>利用満足度 (複数選択不可)</p>		<p>()大いに満足、()ほぼ満足、()やや不満、 ()大いに不満</p>

<p>成果の概要</p>	<p>実施内容</p>	<p><i>実際に行った作業の概要について記載してください。</i></p> <p>(前期)毒素蛋白質 Triflin とそのホモログ serotriflin, 抗毒素蛋白質 SSP-2 および SSP-5 の 4 種類について無細胞蛋白質合成系を用いて合成条件の最適化を行った。NMR を用いたフォールド判定の結果、serotriflin よりも Triflin のほうが、SSP-5 よりも SSP-2 のほうがよいシグナルが観測された。どちらもフォールドしているが多型の存在が確認され、S-S の結合形成の確認などもおこなった。この時点の問題点としては、タグを切断した合成蛋白質は沈殿しやすく、特にタグ切断後 SSP-2 の回収量が悪かった。</p> <p>以上のことより、Triflin と SSP-2 を優先し、発現調整の改良と天然 Triflin、または天然 SSP-2 を固定化したアフィニティカラムを用いて、それぞれの結合分子種を精製し、NMR 測定をすることを後期の実施計画とした。</p> <p>(後期)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Triflin: 無細胞蛋白質合成系より調製された Triflin は SSP-2 固定化アフィニティカラムで精製後、NMR 測定が可能なサンプル量まで調整ができた。フォールド判定の結果、標識 Triflin は単独でも構造を取っており、天然 SSP-2 の相互作用解析においては、両者の結合は強く、動くピークも確認できたことから SSP-2 が部位特異的に結合していることがわかった。しかし、その部位の帰属までには至っていない。 ・SSP-2: 無細胞蛋白質合成において Triflin と結合する SSP-2 を量的に調製する条件検討と並行して、無細胞蛋白質合成で得られた沈殿物のリフォールディング条件も検討したが、NMR 測定可能な量まで調整ができなかった。天然 SSP-2 は、単独でも構造を取っており、天然変性蛋白質ではないことが明らかにはなった。
	<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><i>本課題実施の結果得られた成果および当初目標に対する達成度などについて記載してください。</i></p> <p>(得られた成果)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・天然 SSP は、CD スペクトルではランダム構造のパターンが得られるが、一次元 NMR 測定の結果、実際は単独でも構造を取っていることがわかった。 ・NMR 測定が可能な量とフォールドした ¹⁵N 標識 Triflin の調製ができた。 <p>本課題の当初の目標は、Triflin/SSP-2 複合体の立体構造解析により、それらの相互作用部位の特定であった。Triflin の立体構造はすでに報告されているため、SSP-2 との相互作用部位の特定と SSP-2 の立体構造の決定を期待していたが、無細胞蛋白質合成系を用いても分子内に S-S 結合の多い蛋白質(SSP-2)の発現は困難であった。しかしながら、実験状況の報告を含む二度の打ち合わせで研究目標を立て直し、¹⁵N 標識 Triflin の調製に集中することにした。その結果、¹⁵N 標識 Triflin の調製ができたことから、今後、ケミカルシフトによる triflin の SSP-2 との相互作用部位の特定が期待できる。達成度としては、80%(100%)である。</p>

<p>今後の展開、課題</p>	<p><i>本課題の結果を踏まえた今後の展開方針および目的達成に向けた今後の課題などについて記載してください。</i></p> <p><今後の展開方針></p> <p>本課題の ^{15}N 標識 Triflin の調製ができたという結果より、今後は、天然 SSP-2 を用いた添加実験によるケミカルシフト解析から Triflin の SSP-2 との相互作用部位の同定を行う。具体的には、Triflin 単独の NMR 帰属を行い、添加実験において SSP-2 との相互作用によって変化するアミノ酸を特定する。</p> <p>^{15}N 標識 SSP-2 の調製においては、合成過程で多量の沈殿物が得られるため、その沈殿物を利用してリフォールディングすることを優先する。リフォールディング条件もほぼ確立しているため、今後の課題は、^{15}N 標識 SSP-2 大量調製とリフォールディング後の多型を含む可溶性分画から結合分子種を効率よく精製する方法の確立である。^{15}N 標識 SSP-2 の調整が NMR 測定可能な量まで達成すると、^{15}N 標識 Triflin を用いた添加実験、または ^{15}N 標識 SSP-2/^{15}N 標識 Triflin 複合体の構造解析が期待できる。</p> <p>以上の二点とより本課題の「Triflin/SSP-2 複合体の立体構造解析」「Triflin/SSP-2 複合体の相互作用部位の特定」という目的が達成できる。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>	<p>蛇毒中には多彩な薬理作用を示すものが多数含まれ、これらの酵素は研究用薬品や臨床検査法に応用されている。本課題は、L 型 Ca^{2+} チャンネルに特異的に結合する神経毒 Triflin と SSP-2 の結合部位に関する研究である。本課題の金属プロテアーゼや Ca^{2+} チャンネル結合性神経毒に対する SSP の阻害機構は、他の毒ヘビにも一般化できる基本的な分子機構である可能性が高い。つまり、本研究から得られる阻害機構の知見は、出血毒を主体としたクサリヘビ科(ハブ、マムシ)だけに止まらず、神経毒をもつコブラやウミヘビへの毒蛇咬傷治療薬の応用につながる可能性が大いに期待される。また、低分子で多機能な SSP 群の立体構造を利用し、医薬品や研究用薬品へ展開できる。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>() あり : () なし</p> <p>「あり」の場合理由:</p>

<p>理研 NMR 施設利用における感想</p>	<p><i>本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用の感想を記載してください。</i></p> <p><良かった点></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ NMR を使用した経験の無い申請者の初歩的な質問に対して、分かりやすい丁寧な回答を頂き、勉強になった。 ・ 理化学研究所の本課題担当者は、申請者の実験に対してとても協力的で、申請者が関連研究や自分の実験についてメールなどで質問すると、親身に相談に応じてくれた。また、構造解析の専門的な意見を聞くことができた点がとても良かった。 <p><改善点></p> <p>課題の採択後、打ち合わせや実験開始月の予定がいつに組まれているのか、また、実験などの流れが全く分からなかった。最初の打ち合わせの時、わかりやすい説明やデジメで流れなどが分かったが、その打ち合わせ後、実験がどれくらい進んでいるのか、実験の経過の報告はいつぐらいしてもらえるのか、わからなかった。研究期間が定められているため、本課題の進行具合によっては当研究室でも並行した実験などを行いたいと予定していた。三か月に一度でもいいので、現在どのような実験をしているのか、問題点はないのか、今後どこまで進みそうかなどについて簡単なメールを頂けると本研究室でも、実験計画が立てやすいと感じた。</p>
<p>利用周辺環境に関する希望</p>	<p>打ち合わせの際、理化学研究所・横浜研究所を訪問した時に食堂で昼食をとれなかったため、食事場所に苦労した(近くに、売店やコンビニがあるかどうかもわからなかった)。外部の人でも食堂で食事ができるか、また、別の食事場所があると助かる(食堂の利用の仕方の案内もあれば助かる)。</p>
<p>今後の利用形態の予定</p>	<p><input type="checkbox"/> 再度本事業への申請を考えている。</p> <p><input type="checkbox"/> 成果の非公開を前提とした「外部利用」(有料)を考えている。</p> <p><input type="checkbox"/> その他理研との共同研究等を考えている。</p> <p>具体的に：</p> <p><input type="checkbox"/> 未定</p>
<p>今後期待するその他のサービス</p>	<p><input type="checkbox"/> 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)</p> <p><input type="checkbox"/> NMR 装置利用の技術的なサポート</p>

	<p>() その他 具体的に</p>
<p>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</p>	<p>(http://kyoyonavi.mext.go.jp/) () 見た : () 見ていない 感想等：イベント情報なども充実しているので、時間があれば興味あるイベントに参加しようと思った。</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。) 謝辞： 構造解析の知識や技術が少ない申請者にとって本事業(本課題の採択)は、本研究の大きな発展につなげてくれたことは間違いない。今回の結果より、本研究の構造解析に関して次から次へと欲が出てきてしまうが、それも理化学研究所横浜研究所のスタッフの協力があったからこそ、次へとつながることができたからである。申請前からすると贅沢な悩みであり、本事業を通して、構造解析の分野やその関連の研究者と接する機会が得られたのは、申請者にとって大きな財産となった。 この場を借りてお礼と感謝を申し上げます。</p>

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。