

理研NMR施設利用報告書

(トライアルユース)

09-500-005

平成23年8月11日

利用機関名	大陽日酸株式会社	
実施部署名	SI 事業部	
実施責任者管理職名・氏名	営業部長 折笠 敬	
実施部署所在地	東京都品川区小山 1-3-26 東洋 Bldg.	
実施部署連絡先		
利用課題名	ウイルス天然変性蛋白質の安定同位体標識 NMR 解析	
利用目的・内容	天然変性部位を含むことが予想される HIV の p17 (マトリックス) 蛋白質と p24 (コア) 蛋白質、インフルエンザウイルスの NS-1 (無構造) 蛋白質の溶液中での NMR 構造解析	
利用実施時期及び期間	平成 22 年 5 月 13 日～平成 23 年 3 月 31 日  総利用日数：30 日間  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 ・(○)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 利用期間 1：平成 22 年 10 月 12 日～平成 22 年 10 月 17 日 利用期間 2：平成 23 年 1 月 11 日～平成 23 年 1 月 16 日

		<p>利用期間 3 : 平成 23 年 2 月 21 日 ~ 平成 23 年 2 月 27 日          利用期間 4 : 平成 23 年 2 月 21 日 ~ 平成 23 年 2 月 27 日          利用期間 5 : 平成 23 年 2 月 28 日 ~ 平成 23 年 3 月 10 日</p> <hr/> <p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ <input type="radio"/> 600MHz、 <input type="checkbox"/> 700MHz、 <input type="checkbox"/> 800MHz、 <input type="checkbox"/> 900MHz</li> <li>  <input type="radio"/> 低温プローブ付 <input type="checkbox"/> 固体プローブ付</li> <li>  <input type="checkbox"/> サンプルチェンジャー付</li> </ul> <p>利用期間 1 : 平成 22 年 6 月 22 日 ~ 平成 22 年 6 月 27 日          利用期間 2 : 平成 22 年 10 月 12 日 ~ 平成 22 年 10 月 17 日          利用期間 3 : 平成 22 年 11 月 1 日 ~ 平成 22 年 11 月 10 日          利用期間 4 : 平成 23 年 1 月 12 日 ~ 平成 23 年 1 月 16 日          利用期間 5 : 平成 23 年 2 月 21 日 ~ 平成 23 年 2 月 24 日          利用期間 6 : 平成 23 年 2 月 21 日 ~ 平成 23 年 2 月 24 日          利用期間 7 : 平成 23 年 3 月 4 日 ~ 平成 23 年 3 月 10 日          利用期間 8 : 平成 23 年 3 月 30 日 ~ 平成 23 年 3 月 31 日</p> <hr/> <p>利用装置③</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ <input type="checkbox"/> 600MHz、 <input checked="" type="radio"/> 700MHz、 <input type="checkbox"/> 800MHz、 <input type="checkbox"/> 900MHz</li> <li>  <input type="checkbox"/> 低温プローブ付 <input type="checkbox"/> 固体プローブ付</li> <li>  <input type="checkbox"/> サンプルチェンジャー付</li> </ul> <p>利用期間 1 : 平成 22 年 11 月 1 日 ~ 平成 22 年 11 月 7 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 4 回</li> </ul> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ フォールド判定 : 利用回数 3 回</li> </ul> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 大量調製 : 利用回数 11 回</li> </ul> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 構造決定 : 利用回数 0 回</li> </ul>
<p>利用満足度 (複数選択不可)</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> 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</p>	

成果の概要	実施内容	<p>アミノ酸一次配列より天然変性部位を含むことが予想されるウイルス蛋白質 3 種類 (HIV の p17 蛋白質、p24 蛋白質、インフルエンザウイルスの NS-1 蛋白質) を安定同位体標識し、「NMR 構造解析」と「pH 滴定実験」を実施した。</p> <p>1. 主鎖シグナル帰属</p> <p>1) <math>^{13}\text{C}</math>, <math>^{15}\text{N}</math> 標識サンプルの 3 D 測定で、p17 と p24 において高品質のスペクトルが得られた (600MHz クライオプローブ)。スペクトルの帰属については実施中。</p> <p>2) NS-1 蛋白質は溶解度が低く、凝集しやすい蛋白質であることが判明した。</p> <p>2. pH 滴定実験</p> <p>1) <math>^{15}\text{N}</math> 標識サンプルを用いて pH による化学シフト変化の測定を p17 と p24 について実施した。化学シフト変化の値より、pH 変化によっておこる構造変化の様子が、分子レベルで明らかとなった。</p> <p>2) 一定条件における R2、R1、Hetero-nuclear NOE などの緩和測定を行った。現在、解析中であり、ピコからナノ秒オーダーの動態を明らかにする。</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>本課題により得られた具体的な成果は、p17、p24 の pH による構造変化を分子レベルで捉えたことである。</p> <p>1. p17 蛋白質</p> <p>pH6 において、良好な天然状態のスペクトルが得られ、個々のシグナルは、きれいに分散して観測された。pH を徐々に下げていくと化学シフト値が変化した。異なる状態がもし存在していても、pH4 付近までは、速い交換であることがわかった。さらに pH2.5 にすると、変性状態に対応するスペクトルが得られた。興味深いことにその中間の pH3.5 にすると、変性状態と天然状態の両方に対応するピークがそれぞれ独立に観測された。これは、2 状態は NMR の時間スケールから考えると遅い交換であることを示している。</p> <p>2. p24 蛋白質</p> <p>pH6.5 において、分散したピーク (天然状態) と集まったピーク (変性状態) の両方が観測され、p24 では天然変性領域の存在が示唆された。一方、pH4 では pH6.5 よりもきれいに分散したスペクトルが観測された。このように pH4 でスペクトルの均一性が示されたが、やや変性している可能性も残っている。pH3.5 以下では p24 蛋白質は変性しており、容易に凝集することが予測される。</p>

		<p>まだ実際の詳細な構造情報を導きだす NMR 測定には入っていないが、条件検討の初期段階としては十分な情報を得たと確信している。</p>
<p>今後の展開、課題</p>		<p>今後は、これまでの測定条件検討の結果を活用し、以下のとおり展開したい。</p> <p>1. p17 蛋白質</p> <p>p17 蛋白質の構造は、興味深い pH 依存性を示す。pH6 (天然状態)、pH3.5 (天然状態と変性状態)、pH2.5 (変性状態) の3つの状態において、R2、R1、Hetero-nuclear NOE などの緩和測定をおこない、ピコからナノ秒オーダーの動態を、それぞれの状態において明らかにする。さらに遅い運動に対応する H/D 交換を観測し、二次構造や露出性を評価する。また両状態が観測される pH3.5 においてはさらに NOESY を測定し、天然状態と変性状態間の化学交換によるピークを観測する。これらの結果をふまえて、R2 緩和ディスパージョン実験を計画する。</p> <p>2. p24 蛋白質</p> <p>p24 蛋白質には、天然変性領域が存在する可能性があるため、天然変性の鍵となる部位を明らかにしたい。まず、主鎖のシグナル帰属の結果に基づいて、天然状態での2次構造を求める。さらに pH6.5 と pH4 の両状態において、R2、R1、Hetero-nuclear NOE などの緩和測定や、H/D 交換実験を実施する。この蛋白質では、タグ付加の異なる2種類 (N タグ付加体、C タグ体で C タグを切断したもの) を</p>

		<p>作成した。これらの比較実験を実施する。C タグ体は、より凝集しやすい傾向にある。NMR スペクトルの変化を測定することで、凝集のメカニズムを解明する。</p> <p>3. NS-1 蛋白質</p> <p>NS-1 蛋白質は、pH7.5 以上で 100mM 以上の NaCl の存在下で初めて溶解する。この不安定な性質は天然変性状態をとる可能性を示唆している。アミドのみならず、水との交換の関連ないスペクトル(CO 等)が構造解析に有用かもしれない。様々なスペクトル測定を適応し、難度の高い本蛋白質に取り組んでゆく。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し</p>		<p>まだ明らかにできていないが、ウイルス天然変性蛋白質の持つユニークな特徴を明らかにすることで、新しいワクチン開発等の産業にも波及効果を及ぼすことが期待される。</p>
<p>成果公開延期の希望の有無</p>		<p>( V ) あり : ( ) なし  「あり」の場合理由：まだ、あまり進行していない。</p>
<p>理研 NMR 施設利用における感想</p>		<p>大変によかった。もし宿舎の施設があれば、もっとよい。</p>

<p>利用周辺環境に関する希望</p>	
<p>今後の利用形態の予定</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> 再度本事業への申請を考えている。  <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。  <input type="checkbox"/> その他理研との共同研究等を考えている。  具体的に：   <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)  <input type="checkbox"/> NMR 装置利用の技術的なサポート  <input type="checkbox"/> 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>(<a href="http://kyoyonavi.mext.go.jp/">http://kyoyonavi.mext.go.jp/</a>)  <input type="checkbox"/> 見た : <input type="checkbox"/> 見ていない  感想等：</p>

その他	(上記の項目以外でご意見等お願いします。)
-----	-----------------------

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。